

Débora Romualdo Lacerda

# **Efeito do treinamento físico no esqueleto de ratas com obesidade associada à ovariectomia**

Belo Horizonte

Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Universidade Federal de Minas Gerais

2012

Débora Romualdo Lacerda

# **Efeito do treinamento físico no esqueleto de ratas com obesidade associada à ovariectomia**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Esporte.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Danusa Dias Soares

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Rogéria Serakides

Belo Horizonte

Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Universidade Federal de Minas Gerais

2012

L131e Lacerda, Débora Romualdo  
2012 Efeito do treinamento físico no esqueleto de ratas com obesidade associada à ovariectomia. [manuscrito] / Débora Romualdo Lacerda – 2012.  
162 f., enc.:il.

Orientadora: Danusa Dias Soares

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.  
Bibliografia: f. 117-131

1. Exercícios físicos - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Osteoporose - Teses. 4. Exercícios Físicos - Teses. I. Soares, Danusa Dias. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. III. Título.

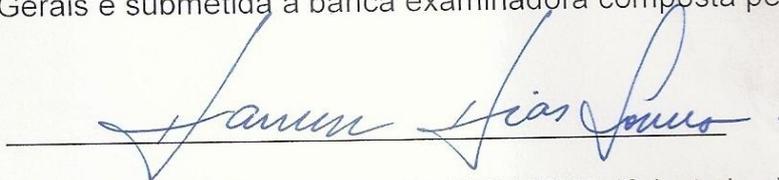
CDU: 661.1

Ficha catalográfica elaborada pela equipe de bibliotecários da Biblioteca da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais.



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte**

Dissertação intitulada "Efeito do treinamento físico no esqueleto de ratas com obesidade associada à ovariectomia", de autoria da mestranda Débora Romualdo Lacerda, defendida em 16 de julho de 2012, na Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais e submetida à banca examinadora composta pelos professores:



Prof. Dr. Danusa Dias Soares EEEFTO/UFMG (Orientadora)  
Departamento de Educação Física  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. Rogéria Serakides (Co-orientadora)  
Setor de Patologia do Departamento de clínica e cirurgia veterinárias  
Escola de Veterinária  
Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. Adelina Marta Reis  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 16 de julho de 2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE), da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional e no Laboratório do Setor de Patologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária Escola de Veterinária – UFMG, sob auxílios financeiros concedidos das agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES).

Dedico este trabalho ao meu pai, Francisco de Assis Lacerda, à minha mãe, Levinda Romualdo Lacerda, e ao meu companheiro, Igor Ronan Coelho, pelo apoio e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por cuidar da minha vida e por me fazer sentir paz, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, Levinda Romualdo Lacerda e ao meu pai Francisco de Assis Lacerda: vocês participaram de cada etapa desta dissertação, se dedicaram incessantemente e somente com o apoio e compreensão de vocês, foi possível realizar este estudo. Vocês não deixaram faltar amor, paciência e dedicação para que eu pudesse abraçar meus sonhos, mesmo que fosse necessário abandonar os de vocês. Eu agradeço por participarem intensamente desta trajetória e principalmente por darem sentido a minha vida. Meu amor incondicional a vocês.

Ao Igor Ronan Coelho. Jamais poderei mensurar sua importância em minha vida. Você representa o que há de mais essencial para mim e sem a sua presença companheira teria sido impossível realizar este trabalho. Agradeço imensamente pelo amor, por sempre acreditar em mim e por tantas vezes abrir mão dos seus sonhos para viver os meus. Seu amor me faz ter convicção e segurança para seguir em frente. Obrigada por encher minha vida de alegria simplesmente por estar do meu lado.

À professora Danusa Dias Soares pela orientação, pela paciência e principalmente pela amizade sincera. Você é o exemplo profissional que quero seguir na minha carreira acadêmica. Admiro muito sua fortaleza e em todos os momentos que tive alguma dificuldade ao longo do mestrado, você sempre me trouxe a solução com calma, maturidade e serenidade. O que aprendi com você foi muito mais do que os conhecimentos acadêmicos. A nossa convivência me fez entender o quanto a vida vai além dos estudos. Sinto-me honrada em ter sido sua aluna e de ter tido a oportunidade de crescer cientificamente e pessoalmente com você. Obrigada por ter me ensinado muito além da ciência. A você minha eterna gratidão e amizade.

À professora Rogéria Serakides. Agradeço pela incessante paciência, disposição e por ter me mostrado a importância de viver um dia de cada vez. Sinto-me lisonjeada por ter sido co-orientada por você, uma grande referência profissional e acadêmica. Seus ensinamentos científicos e pessoais foram valiosos para mim e perpassam o que é possível escrever nesta dissertação. Obrigada por ter aberto as portas do seu espaço de trabalho para a realização de todo este estudo.

À professora Adaliene Versiani Ferreira pela amizade e pelo enorme exemplo acadêmico. Agradeço imensamente por ter tido o privilégio de contar com a sua preciosa colaboração científica e especialmente pelas suas palavras amigas nos momentos difíceis. Você foi um dos principais pilares que sustentaram este trabalho e um modelo de pesquisadora que quero espelhar-me.

À professora Natália de Melo Ocarino por ter disponibilizado tanto tempo para me ajudar e auxiliar em todas as etapas deste estudo. Sinto-me honrada por ter contado com a sua valiosa contribuição científica. Obrigada por ter sido a minha grande inspiração para realização deste estudo.

Aos professores do LAFISE, Luiz Oswaldo Rodrigues, Nilo Resende Viana Lima, Samuel Pena Wanner e Emerson Silami pelas contribuições científicas e pelo exemplo profissional.

Aos professores Cândido Coimbra e Adelina Marta Reis pelas valiosas contribuições científicas na banca.

Às minhas irmãs Ana Luiza e Juliana por me ouvirem em incontáveis momentos, por todo envolvimento e entusiasmo com o meu mestrado, por não medirem esforços para me apoiarem e por acreditarem em meus passos e escolhas. Pelo amor incondicional que nos une, com muito carinho, agradeço.

Às minhas amigas Carla Schneider, Daniela Guimarães, Jomara Tran, Liane de Oliveira, Natalia Furtado e Aline Horta por compreenderem minha ausência, pela preciosa amizade incomparável e especialmente por sempre estarem ao meu lado. Obrigada pelas conversas que tantas vezes me acalmaram e fizeram-me esquecer os obstáculos do mestrado. É muito bom poder contar com esse sentimento de irmã que nos une há tantos anos.

Aos meus cunhados Fabrício Ângelo e Thiago Henrique e a minha tia Zélia pela amizade, pelo apoio e paciência em todos os momentos.

Agradeço de forma especial à minha amiga Michele Macedo Moraes. Indubitavelmente, a sua amizade foi uma das grandes conquistas que tive na vida. É um privilégio para mim, ter do meu lado, uma pessoa tão admirável como você. Sem sua extraordinária contribuição científica e, ainda, sem o seu exemplo como ser humano, não teria sido possível escrever esta dissertação. Ter você como minha irmã é um presente valioso para mim. Obrigada por fazer parte da minha história, por acreditar em mim e principalmente por esta amizade única.

À minha amiga e companheira Jankerle Neves Boeloni e ao Juneo Freitas. Vocês me receberam com muita alegria desde o primeiro dia e sem dúvida, não pouparam esforços em todos os experimentos e na análise óssea. Meu aprendizado das técnicas de histologia só foi possível porque contei com toda sabedoria, didática e principalmente com a paciência incessante de vocês que, para mim, já são grandes professores. Assim como vocês foram importantes na minha formação, tenho certeza de que serão essenciais para a vida de muitos alunos que tiverem a alegria e privilégio de conviverem com vocês.

À Marina Chaves Oliveira pelo companheirismo em todas as análises de ELISA, pelas palavras de amizade, pelo convívio harmonioso e por sempre me fazer acreditar que no final tudo dá certo!

À Tarcila Figueiredo Almeida pela amizade e enorme disposição em todas as etapas da análise do tecido ósseo. Sua alegria e carinho foram uma das minhas grandes motivações para terminar este trabalho.

Ao Luiz Alexandre Barcelos pela intensa colaboração na coleta, pelas palavras de incentivo, pelas ricas discussões científicas e especialmente pela alegria e humor mesmo nos momentos mais tensos. Agradeço pela sabedoria e, por tantas vezes,

me mostrar o melhor caminho para enfrentar os obstáculos que compartilhamos juntos durante este período.

À Letícia Maria de Souza Cordeiro e Patrícia Rocha por todo carinho, pela amizade, pela paciência incalculável, pelas eternas palavras de apoio e por não terem medido esforços para me ajudar sempre que precisei.

À Renata Lane e Roberta Maria Miranda pela amizade sincera, pelo carinho, pelas conversas confortadoras, pelos momentos compartilhados ao longo desses anos. A convivência com vocês foi fundamental para mim.

Ao Thiago Mendes pela paciência infinita, pela amizade e por toda ajuda e colaboração na estatística. Você contribuiu muito e é impossível descrever em palavras toda admiração que tenho por você.

Aos meus companheiros de laboratório Juliana Bohem Guimarães, Guilherme Passos Ramos e Ivana Fonseca pelos momentos divertidos e pela disposição em ajudar.

À Zélia Menezes e à Marcela Machado pelo companheirismo, pela disponibilidade e presteza em ajudar sempre que necessário. A contribuição de vocês foi essencial para este trabalho.

Às técnicas Marilene e Leimar (Laboratório de Patologia- EV/UFMG) pela grande disposição e paciência ao me ensinarem as técnicas de histologia.

Aos meus companheiros da Corpo a Corpo, especialmente ao Rogério Martins, por sempre me receber com tanta alegria e por facilitar a realização deste trabalho.

À todos os meus companheiros do LAFISE, do Laboratório da Escola de Veterinária, do laboratório de Imunofarmacologia do ICB e àqueles que conviveram comigo durante este período e participaram comigo desta formação.

Ana Cláudia Serafim

Ana Cansado

Andre Maia Lima

Carolina Franco Wilke

Cletiana Gonçalves da Fonseca

Christian Emmanuel

Cristiano Lino

Daniela Galvão Diniz

Diogo Pacheco

Francisco Teixeira Coelho

João Eustáquio Pinto de Oliveira

Maria Aparecida Vasconcelos Faria

Milene Rodrigues Malheiros

Paula Vidgal

Reinaldo Paulineri Junior

Rodrigo Diniz

Washington Pires

William Coutinho Damasceno

## RESUMO

Este trabalho é composto por três protocolos experimentais. No experimento do capítulo 1 foi avaliado o efeito do treinamento físico e da obesidade sobre o tecido ósseo trabecular de ratas. Encontrou-se que, nas ratas obesas, houve aumento do percentual de osso trabecular de maneira sítio-dependente. Entretanto, a análise morfológica do tecido ósseo mostrou que estes animais apresentaram características patológicas de osteopetrose, que foram revertidas pelo treinamento físico. No experimento do capítulo 2, avaliou-se o efeito da ovariectomia sobre o tecido ósseo de ratas obesas. Apesar das ratas obesas castradas apresentarem maior percentual de osso trabecular em relação às castradas alimentadas com a dieta controle, a ovariectomia reduziu a quantidade de trabéculas e promoveu osteoporose no esqueleto de forma sítio-dependente. No experimento do capítulo 3, foi avaliado o efeito do treinamento físico no tecido ósseo de ratas obesas e com osteoporose. O treinamento físico atenuou a osteoporose induzida pela ovariectomia nas ratas obesas e não obesas de forma sítio-dependente, embora esses efeitos tenham sido menos proeminentes nas ratas obesas e castradas em relação às eutróficas. Os resultados apresentados nesta dissertação ilustram a associação entre obesidade, treinamento físico e tecido ósseo.

**Palavras chaves:** treinamento físico; obesidade; osteoporose; ovariectomia; adipocinas.

## LISTA DE FIGURAS

### **Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas obesas**

FIGURA 1: Representação esquemática dos grupos experimentais .....	17
FIGURA 2: Representação esquemática do delineamento experimental .....	19
FIGURA 3. Representação esquemática do protocolo de treinamento físico .....	24
FIGURA 4. Análise histológica de secções do tecido adiposo periuterino .....	32
FIGURA 5. Análise histológica de secções das vértebras lombares .....	36
FIGURA 6. Análise morfológica de secções das vértebras lombares L1-L3 .....	37
FIGURA 7. Análise histológica de secções do osso nasal e da metáfise da tíbia proximal .....	39
FIGURA 8. Análise histológica de secções do fêmur proximal e do fêmur distal.....	40

### **Obesidade altera de forma sítio-dependente o tecido ósseo de ratas obesas ovariectomizadas**

FIGURA 1: Representação esquemática dos grupos experimentais .....	60
FIGURA 2: Representação esquemática do delineamento experimental .....	62
FIGURA 3: Análise histológica de secções do tecido adiposo periuterino .....	66
FIGURA 4: Análise histológica de secções das vértebras lombares .....	70
FIGURA 5. Análise histológica de secções do osso nasal e da metáfise da tíbia proximal .....	71
FIGURA 6. Análise histológica de secções fêmur proximal e da metáfise do fêmur distal .....	72

### **Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas ovariectomizadas obesas e não obesas**

FIGURA 1: Representação esquemática dos grupos experimentais .....	88
FIGURA 2: Representação esquemática do delineamento experimental .....	91
FIGURA 3: Análise histológica de secções do tecido adiposo periuterino .....	95
FIGURA 4: Análise histológica de secções das vértebras lombares L1-L3 .....	99
FIGURA 5: Análise histológica de secções das vértebras lombares L4-L6 .....	100
FIGURA 6. Análise histológica de secções metáfise da tíbia proximal .....	102
FIGURA 7. Análise histológica de secções do osso nasal .....	103
FIGURA 8. Análise histológica de secções do fêmur proximal .....	104
FIGURA 9. Análise histológica de secções da metáfise do fêmur distal .....	105

## LISTA DE TABELAS

### **Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas obesas**

TABELA 1: Composição da dieta de alta palatabilidade .....	20
TABELA 2: Valor calórico e composição de macronutrientes, umidade e fibras de ambas as rações .....	20
TABELA 3: Análise quantitativa de sacarose e minerais de ambas as rações .....	21
TABELA 4: Parâmetros de treinamento antes e depois do treinamento físico.....	30
TABELA 5: Ganho de massa corporal, variáveis séricas, área sob a curva do TOTG, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino .....	34
TABELA 6: Vértebras torácicas, epífise dos ossos longos e metáfise do úmero ....	41
TABELA 7: Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios em ratas alimentadas pela dieta controle ou dieta de alta palatabilidade .....	42
TABELA 8: Efeito da dieta de alta palatabilidade sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios em ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade e não treinadas .....	42

### **Obesidade altera de forma sítio-dependente o tecido ósseo de ratas obesas ovariectomizadas**

TABELA 1: Ganho de massa corporal, variáveis séricas, área sob a curva do TOTG, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino .....	68
TABELA 2: Vértebras torácicas, epífise dos ossos longos e metáfise do úmero ....	73
TABELA 3: Efeito da ovariectomia sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios em ratas alimentadas pela dieta controle ou dieta de alta palatabilidade .....	74

## **Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas ovariectomizadas obesas e não obesas**

TABELA 1: Parâmetros de treinamento antes e depois do treinamento físico.....	93
TABELA 2: Ganho de massa corporal, variáveis séricas, área sob a curva do TOTG, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino .....	97
TABELA 3: Vértebras torácicas, epífise dos ossos longos e metáfise do úmero ...	106
TABELA 4: Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios ósseos de ratas não obesas com osteoporose.....	107
TABELA 5: Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios ósseos de ratas obesas com osteoporose.....	108

## LISTA DE GRÁFICOS

### **Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas obesas**

GRÁFICO 1. Índice de adiposidade e área dos adipócitos .....	32
GRÁFICO 2. Análise de histomorfometria das vértebras lombares .....	36
GRÁFICO 3. Correlações entre a concentração sérica de leptina e o percentual de trabéculas nas vértebras L1-L3 no grupo DAP-NT e DAP-T .....	38
GRÁFICO 4. Análise de histomorfometria do osso nasal e da metáfise da tíbia proximal .....	39
GRÁFICO 5. Análise de histomorfometria do fêmur proximal e da metáfise do fêmur distal .....	40

### **Obesidade altera de forma sítio-dependente o tecido ósseo de ratas obesas ovariectomizadas**

GRÁFICO 1. Índice de adiposidade e área dos adipócitos .....	66
GRÁFICO 2. Análise de histomorfometria das vértebras lombares .....	70
GRÁFICO 3. Análise de histomorfometria do osso nasal e da metáfise da tíbia proximal .....	71
GRÁFICO 4. Análise de histomorfometria do fêmur proximal e do fêmur distal .....	72

### **Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas ovariectomizadas obesas e não obesas**

GRÁFICO 1. Índice de adiposidade e área dos adipócitos .....	95
GRÁFICO 2. Análise de histomorfometria das vértebras lombares L1-L3 .....	99
GRÁFICO 3. Análise de histomorfometria das vértebras lombares L4-L6 .....	100

GRÁFICO 4. Análise de histomorfometria da metáfise da tíbia proximal .....	102
GRÁFICO 5. Análise de histomorfometria do osso nasal .....	103
GRÁFICO 6. Análise de histomorfometria do fêmur proximal .....	104
GRÁFICO 7. Análise de histomorfometria da metáfise do fêmur distal .....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adipo Q: adiponectina

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

ChREBP: proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato

CV: coeficiente de variação

DMO: densidade mineral óssea

DAP: dieta de alta palatabilidade

DPM: desvio padrão da média

DC: dieta controle

GH: hormônio do crescimento

HDL: colesterol de alta densidade

Icv: intracerebroventricular

IL-1: interleucina 1

IL-6 interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

IMC: Índice de Massa Corporal

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina

HOMA- IR: índice de resistência a insulina (modelo de avaliação homeostática)

L1-L3: vértebras lombares 1-3

L4-L6: vértebras lombares 4-6

MC: massa corporal

$\Delta$ MC: ganho de massa corporal

NPY: neuropeptídeo Y

NRC: *National Research Council – Nutrient Requirements of the Laboratory rats*

(Conselho Nacional de Pesquisa – Requerimentos nutricionais para ratos de laboratório)

NT: animais que não realizaram o treinamento físico

OVX: ovariectomia

PCR: proteína - C reativa

PPAR- $\gamma$ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PTH: paratormônio

RNA: Ácido ribonucléico

SHBG: globulina transportadora dos hormônios sexuais

SHAM: animais submetidos à cirurgia *sham*

T1-T7: vértebras torácicas 1-7

T8-T13: vértebras torácicas 8-13

TE: tempo de exercício

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TAP: tecido adiposo periuterino

TAR: tecido adiposo retroperitoneal

TAM: tecido adiposo mesentérico

TOTG: teste oral de tolerância a glicose

TP: teste progressivo

T: animais que realizaram o treinamento físico

V<sub>max</sub>: velocidade máxima

W: trabalho

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas obesas</b>	
2.1 Introdução.....	6
2.2 Objetivos e hipóteses .....	15
2.3 Métodos .....	16
2.4 Análise estatística .....	29
2.5 Resultados .....	30
2.6 Discussão .....	43
2.7 Conclusão .....	52
<b>3 Obesidade altera de forma sítio-dependente o tecido ósseo de ratas obesas ovariectomizadas</b>	
3.1 Introdução .....	55
3.2 Objetivos e hipóteses .....	59
3.3 Métodos .....	60
3.4 Análise estatística .....	64
3.5 Resultados .....	65
3.6 Discussão .....	75
3.7 Conclusão .....	81
<b>4 Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas ovariectomizadas obesas e não obesas</b>	
4.1 Introdução .....	84

<b>4.2 Objetivos e hipóteses .....</b>	<b>86</b>
<b>4.3 Métodos .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4 Análise estatística .....</b>	<b>92</b>
<b>4.5 Resultados .....</b>	<b>93</b>
<b>4.6 Discussão .....</b>	<b>109</b>
<b>4.7 Conclusão .....</b>	<b>114</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>130</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho versa sobre a influência do treinamento físico sobre duas patologias consideradas epidemias mundiais: a osteoporose (RAISZ, 2005) - uma doença metabólica generalizada, caracterizada por menor aposição óssea decorrente da insuficiência osteoblástica (NUNES e NUNES 1988) - e a obesidade (FRIEDMAN, 2009) - uma enfermidade crônica, caracterizada por acúmulo excessivo de tecido adiposo (AHIMA, 2011) - bem como sobre as interações entre essas duas doenças. Até a década de 90, o tecido adiposo era visto apenas como um reservatório energético e um isolante térmico; entretanto, a partir dos estudos de HOSTAMISLIGIL *et al* (1993), ZHANG *et al* (1994) e SHERER *et al* (1995), este tecido começou a ser considerado um órgão endócrino, que interage com todo o organismo, por secretar citocinas com ações sistêmicas. Dentre essas adipocinas, destacam-se a leptina, a adiponectina, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e a interleucina -6 (IL-6), pois estas, além de modularem o metabolismo e o balanço energético, regulam também o tecido ósseo.

O desenvolvimento das patologias apresentadas como epidemias mundiais são relacionadas às alterações no estilo de vida dos indivíduos. Durante todo o processo evolutivo, os vertebrados precisaram exercitar-se para conseguirem o alimento e fugirem de predadores - necessidades básicas para garantir a sobrevivência (CHAKRAVARTHY e BOOTH, 2004). Dessa forma, quanto mais econômico energeticamente era o sistema, mais adequado este seria para o animal e, portanto, selecionado evolutivamente. Entretanto, atualmente, as facilidades para aquisição do alimento têm reduzido a necessidade dos indivíduos realizarem esforço físico para consegui-lo, o que resulta em uma tendência a um balanço energético positivo e, como conseqüência, aumenta-se o risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas, tais como a obesidade e a osteoporose. Nesse contexto, evidências experimentais mostram que o exercício físico pode prevenir, atenuar ou até reverter estas patologias, como apresentado por OCARINO *et. al* (2007), que mostraram que o treinamento físico restaura a massa óssea em todo o esqueleto em ratas com

osteoporose, enquanto TOUATI *et. al* (2011) evidenciaram que o treinamento físico associado com redução da ingestão alimentar reverte a obesidade.

Apesar de muitos trabalhos não investigarem a relação entre a osteoporose e a obesidade, evidências evolutivas e clínicas têm mostrado a interligação entre ambas as patologias. Uma evidência evolutiva desta interação aponta para o fato de a leptina - descrita em 1994 e com as funções de regulação do apetite e do balanço energético (FRIEDMAN, 2009) - ter surgido, na escala evolutiva, juntamente com o esqueleto nos vertebrados (KARSENTY e OURI, 2012). Outro fator que reforça essa interação é que adipócitos e osteoblastos são derivados do mesmo progenitor: as células tronco mesenquimais (ZHAO *et al*, 2008). Além disso, observa-se que ambas as patologias apresentam respostas similares em relação às citocinas pró-inflamatórias – tanto a obesidade quanto a osteoporose resultam em aumento da inflamação (HOTAMISLIGIL, 2006; WEITZMANN e PACIFICI, 2006). Do ponto de vista epidemiológico, a inter-relação entre os dois sistemas é evidenciada por resultados que mostram que mulheres obesas apresentam menor risco de fraturas ósseas (REID, *et al* 1992), enquanto indivíduos com anorexia desenvolvem osteoporose (TENG, 2011, REID, 2008). Assim, o panorama criado ao serem somadas as perspectivas evolutivas e clínicas aponta para uma intrincada relação entre o tecido adiposo e ósseo. Entretanto, ressalta-se que esses trabalhos clínicos estabelecem que mulheres obesas parecem estar “protegidas” da osteoporose e que esta conclusão baseia-se apenas em análises de densitometria óssea de um único sítio ósseo. Para melhor elucidar a relação entre estas duas patologias, é necessário, portanto, um trabalho que avalie também aspectos que revelem a qualidade do osso, através da histomorfometria, além da investigação de todo o esqueleto, já que os efeitos no tecido ósseo são sítio-dependentes (BOELONI *et al.*, 2010; OCARINO *et al.*, 2007). Além disso, como o exercício físico pode atenuar ou até reverter às alterações induzidas por estas patologias, torna-se relevante o estudo dos efeitos do treinamento físico na interação entre obesidade e osteoporose.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Verificar os efeitos do treinamento físico e da obesidade sobre diferentes sítios ósseos do esqueleto de ratas com e sem osteoporose e sua associação com as adipocinas.

### **Objetivos específicos**

- Verificar os efeitos do treinamento físico sobre diferentes sítios ósseos do esqueleto de ratas obesas e sua associação com as adipocinas (Capítulo 1).
- Verificar os efeitos da ovariectomia sobre diferentes sítios ósseos do esqueleto de ratas obesas e sua associação com as adipocinas (Capítulo 2).
- Verificar os efeitos do treinamento físico sobre diferentes sítios ósseos do esqueleto de ratas obesas com osteoporose e sua associação com as adipocinas (Capítulo 3).

## 2 Treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas obesas

### RESUMO

**Objetivo:** Verificar os efeitos do treinamento físico sobre o esqueleto de ratas obesas e sua relação com as adipocinas. **Métodos:** 24 ratas *Wistar* com 21 dias foram distribuídas em quatro grupos: 1) Dieta controle (DC)- não treinadas (NT); 2) Dieta de alta palatabilidade (DAP)-NT; 3) DC - treinadas (T); 4) DAP-T. Os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Aos 5 meses de idade os animais foram familiarizados ao exercício na esteira e foi feito o primeiro teste progressivo (TP) para avaliação da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e determinação da intensidade do treinamento. Em seqüência, os animais foram submetidos ao treinamento físico a 60-65% da  $V_{max}$  do TP durante 30 min/ dia por 13 semanas. Na 14ª semana foi realizado um teste oral de tolerância a glicose (TOTG) e o quinto TP. Após 72h este procedimento foi realizada a eutanásia, pesagem dos coxins adiposos, retirada e armazenamento dos tecidos adiposos e do soro. O esqueleto foi colhido e armazenado em formolaldeído tamponado a 10% para análise histomorfométrica do percentual de osso trabecular. As comparações entre os grupos foram realizadas através da ANOVA two way. O nível de significância adotado foi  $\alpha \leq 0,05$ . **Resultados:** Comparados aos animais não treinados, todas as ratas que realizaram o treinamento apresentaram maior tempo de exercício (min), trabalho (kgm) e velocidade máxima ( $km \cdot h^{-1}$ ). A massa corporal, o peso dos coxins adiposos, a área do tecido adiposo periuterino, a concentração sérica de leptina, triglicérides, insulina, as concentrações teciduais de TNF-alfa e IL-6 e o índice de HOMA, foram maiores nas ratas DAP em relação às DC e não houve diferença para o treinamento físico. Os percentuais de osso trabecular na coluna lombar, nas vértebras T8-T13, no fêmur distal, na tíbia e a espessura do osso nasal foram maiores para as ratas DAP-NT quando comparadas aos animais alimentados pela dieta controle. O treinamento físico aumentou o percentual de osso trabecular nas vértebras L4-L6, no fêmur proximal e a espessura do osso nasal dos grupos DC-T vs. DC-NT. Nas vértebras L1-L3 observou-se no grupo DAP-T características morfológicas de osteopetrose que foram revertidas pelo treinamento físico. Houve correlação positiva entre a concentração sérica de leptina e o percentual de trabécula óssea nas vértebras L1-L3 para o grupo DAP-NT ( $p=0,04$  e  $r=0,83$ ,  $R^2=0,68$ ). **Conclusão:** a obesidade promoveu aumento da quantidade de tecido ósseo trabecular de forma sítio-dependente e nas vértebras lombares L1-L3 este aumento foi correlacionado com a concentração sérica de leptina. Entretanto, a análise morfológica do tecido ósseo mostrou que esses animais apresentaram características patológicas de osteopetrose, que foram revertidas pelo treinamento físico.

**Palavras-chave:** leptina; obesidade; tecido ósseo; treinamento físico.

## ABSTRACT

### Chapter 1: Physical training-induced site-dependent alterations in the skeleton of obese female rats

**Objective:** to investigate the effects of physical training on the skeletal in obese female rats. **Methods:** 24 female *Wistar* rats (21 days old) were divided into four groups: 1) control diet (C) – non trained (NT); 2) high palatability diet (HP) – NT; 3) C – trained (C-T); 4) HP-T. The rats received food and water *ad libitum*. At 5 months of age, the rats were familiarized with treadmill running and submitted to the first maximal graded exercise testing to evaluate the maximal velocity ( $V_{max}$ ) and also to obtain the intensity of the physical training. The animals were submitted to exercise for 30min/day during 13 weeks. On the 14<sup>th</sup> week an oral glucose tolerance test (OGTT) and the 5<sup>th</sup> maximal graded exercise testing was realized. After 72h, the rats were euthanasiated and blood samples, adipose tissue and the skeleton were collected. The skeleton was fixed in 10% buffered formalin to posterior histomorphometry of the trabecular bone. Two-way ANOVA was used to examine differences among groups. Statistical significance was established at a value of  $p \leq 0,05$ . **Results:** All exercise-trained rats presented higher exercise time (min), work (kgm) and maximal velocity ( $\text{km.h}^{-1}$ ) than the NT group. Body mass, adiposity, adipocyte area, serum leptin, serum insulin, HOMA-IR index and the levels of TNF- $\alpha$  e IL-6 in adipose tissue were greater for the rats fed HP diet when compared to C diet. Exercise training did not alter any of the above- mentioned variables. The percentage of trabecular bone in lumbar vertebrae, in thoracic vertebrae T8-T13, in distal femur, in metaphyseal and epiphyseal of the tibia and the thickness of nasal bone were greater for the rats fed HP diet when compared to rats fed C diet. The physical training increased the percentage of trabecular bone in lumbar vertebrae L4-L6, in proximal femur and elevated the thickness of the nasal bone in rats fed C diet. Morphological analysis of the lumbar vertebrae L1-L3 revealed pathological characteristics of osteopetrosis that were reverted by the physical training. Serum leptin concentration correlated positively with trabecular bone volume (group HP-NT:  $p=0,04$  and  $r=0,83$ ,  $R^2=0,68$ ). **Conclusion:** Obesity increased the trabecular volume bone in a site-dependent manner. In lumbar vertebrae L1-L3 this effect correlated positively with serum leptin concentration. However, the morphological analysis revealed pathological characteristics of osteopetrosis that were reverted by physical training.

**Key-words:** leptin; obesity; skeletal; physical training.

## 2.1 INTRODUÇÃO

### Treinamento físico

O sedentarismo aumenta em mais de 50% o risco para o desenvolvimento da obesidade, da diabetes tipo 2 e da osteoporose, o que evidencia que o exercício físico influencia a interação entre o tecido ósseo, o tecido adiposo e o metabolismo (BOOTH e LEES, 2007). Considerando que os animais foram evolutivamente selecionados para exercitarem-se (BOOTH e LEES, 2007), especula-se que o treinamento físico possa promover alterações no tecido ósseo e tecido adiposo em indivíduos obesos e com osteoporose.

A atividade física aumenta o potencial osteogênico das células tronco mesenquimais da medula óssea em ratas ovariectomizadas (OCARINO *et al.* 2008). Em animais não ovariectomizados também ocorre o aumento da densidade mineral óssea em função do exercício físico. Contudo essa resposta varia de acordo com o sítio ósseo avaliado e em função da parte do osso longo analisado, sendo maior para as regiões mais distais (HAMIRICK *et al.*; 2006). A atividade física aumenta a quantidade de trabéculas e a espessura do osso cortical tanto nos ossos submetidos ao impacto mecânico direto, como também nos sítios que apresentam menor impacto durante o exercício, como o osso nasal (OCARINO *et al.*, 2007). Dessa forma, como os efeitos no tecido ósseo são sítio-dependentes, é necessária a avaliação tanto do esqueleto axial, como do apendicular. O aumento da formação óssea e a redução da reabsorção - ambos os processos induzidos pelo treinamento físico - são associados tanto ao maior impacto mecânico, quanto a fatores sistêmicos, tais como redução da concentração sérica de paratormônio (PTH) e o aumento da vitamina D (IWAMOTO *et al.*; 2004).

Durante o exercício físico, ocorrem adaptações nos sistemas fisiológicos que são dependentes da intensidade e duração do exercício. Assim, o treinamento físico pode alterar as concentrações de hormônios e citocinas produzidas pelo tecido

adiposo que, por sua vez, influenciam o tecido ósseo e o metabolismo. Em relação às alterações endócrinas, a diminuição do tecido adiposo em resposta ao treinamento físico está relacionada com o aumento da sensibilidade do receptor de leptina em indivíduos obesos (KIMURA *et al*, 2004; FLORES *et al*, 2006). Além disso, o treinamento físico aumenta a concentração plasmática de adiponectina (ZENG *et al*, 2007). Tanto na obesidade, como na osteoporose ocorre aumento das concentrações de citocinas próinflamatórias (HOSTAMIGIL, 2006; MUNDY, 2007). Como o exercício físico possui um papel antiinflamatório associado a aumento na concentração de interleucina 10 (IL-10) e do antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1ra) e uma redução do TNF- $\alpha$ , postula-se atividade física possa reduzir a inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade (PEDERSEN & PETERSEN, 2005).

### **Tecido ósseo**

A visão clássica sobre o tecido ósseo o apresenta como o local primário para a hematopoiese e para a regulação da homeostase mineral (MORGAN *et. al.*, 2010). Além dessas funções, nos últimos doze anos o grupo de pesquisadores liderado por Gerald Karsenty tem mostrado que o tecido ósseo interage através de mecanismos endócrinos com diversas regulações no organismo: tais como as do tecido adiposo, do hipotálamo (DUCY, *et. al.*, 2000; TAKEDA *et. al.*; 2002.; ELEFTERIOU *et. al.*; 2005, YADAV *et. al.*, 2009), do metabolismo energético (LEE *et. al.*; 2009.; FERRON *et. al.*; 2010.; FUZILE *et. al.*; 2010) e com o sistema reprodutor (OURY *et. al*, 2011). Dessa forma, a perspectiva da fisiologia integrada tem modificado a visão do tecido ósseo como um órgão estático, sendo o mesmo atualmente compreendido como um tecido que participa da regulação dinâmica do organismo (KARSENTY e FERRON, 2012; KARSENTY e OURY, 2012).

No osso são encontrados três tipos de células: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. O osteoblasto é derivado das células-tronco mesenquimais, localizadas no periósteo e na medula óssea, sendo que essas podem diferenciar-se

também em adipócitos e condrócitos (DALLAS e BONEWALD, 2010). Esse processo é denominado diferenciação osteogênica e é regulado por hormônios, tais como estrógeno, androgênios (VENKEN *et. al* , 2008), glicocorticóides (MIGLIACCIO *et. al.*; 2007), hormônios tireoidianos (T3/T4) (BOELONI, 2009; 2012) e insulina (YANO *et al*, 1994); bem como pela mecanotransdução (ROBLING, 2006), por fatores de transcrição (LONG, 2012) e por citocinas, tais como a leptina (THOMAS *et al*, 1999), o TNF-alfa e a IL-6 (LENCEL e MAGNE, 2011). Os osteoblastos regulam a osteoclastogênese e sua principal função é de promover a formação óssea (ZAIDI, 2007). Além dessas ações, estas células controlam o metabolismo energético, pois produzem a osteocalcina que, na forma descarboxilada, é secretada na corrente sanguínea e estimula a produção de insulina e adiponectina (LEE *et. al*, 2007; FERRON *et. al*, 2008). Os osteoblastos, após o seu amadurecimento, podem entrar em apoptose ou tornarem-se osteócitos que são o tipo de célula mais abundante do osso (DALLAS e BONEWALD, 2010). Os osteócitos, por sua vez, regulam o metabolismo de cálcio e fósforo, a mineralização do osso, a reabsorção óssea profunda denominada osteólise osteocítica e a transmissão de sinais mecânicos, onde possuem um papel central (BONEWALD, 2006). Os osteócitos participam da mecanotransdução, pois detectam forças mecânicas aplicadas no osso e transmitem respostas anabólicas para as células da superfície óssea através de mensageiros químicos, o que estimula a diferenciação de osteoblastos e inibe a atividade dos osteoclastos (ROCHEFORT *et. al*, 2010). Os osteoclastos são células formadas a partir de macrófagos, cuja função principal é de reabsorver a matriz óssea, através da osteoclasia (ZAIDI, 2007).

### **Tecido ósseo e obesidade**

O olhar integrado sobre o tecido ósseo, ao apresentá-lo como um órgão endócrino modulador do tecido adiposo (KARSENTY e OURI, 2012), tem proporcionado avanços no entendimento de doenças crônicas e de suas interconexões, tais como a osteoporose, a obesidade e o diabetes tipo 2 (KARSENTY e FERRON, 2012; PAULA *et al*, 2010). Aspectos evolutivos e clínicos têm mostrado que o tecido

adiposo e o tecido ósseo estão diretamente relacionados (KARSENTY e OURI, 2012; KARSENTY e FERRON, 2012). Uma teoria que suporta, evolutivamente, a intrincada relação entre os dois tecidos, baseia-se em evidências de que o surgimento do esqueleto e da leptina ocorreram concomitantemente durante o desenvolvimento da vida na Terra. A partir disso, é possível hipotetizar que o aparecimento da leptina durante a evolução coincide com a sua necessidade funcional no organismo, sendo assim é possível sugerir que essa adipocina, além de modular o balanço energético, também regule o tecido ósseo (KARSENTY e OURI, 2012). A manutenção do esqueleto - uma das últimas aquisições evolutivas - ocorre através do remodelamento ósseo. Este processo, de alto custo energético, consiste na alternância entre formação e reabsorção do osso e é essencial para a homeostase do tecido ósseo. Como a leptina, que aparece na evolução juntamente com os vertebrados, é um sinalizador metabólico, sugere-se que, através desta adipocina, dá-se a ponte da forte associação entre o tecido ósseo e adiposo (KARSENTY e OURI, 2012). Outra evidência que reforça essa inter-relação é que fatores comuns, tais como hormônios e citocinas, modulam a diferenciação das células tronco mesenquimais em adipócitos ou osteoblastos e ambos são derivados do mesmo progenitor (ZHAO *et al*, 2008).

Observações clínicas corroboram essa hipótese, pois indivíduos com anorexia nervosa apresentam diminuição do crescimento, redução da massa óssea e distúrbios alimentares (TENG, 2011). Outra patologia que influencia o tecido adiposo e ósseo é hipogonadismo, pois a redução da produção de estrógeno está associada com um maior risco de fraturas, desenvolvimento de osteopenias, aumento da adiposidade e alterações metabólicas, tais como redução da oxidação lipídica e aumento da lipogênese hepática (RAISZ, 2005; PAQUETTE *et al.*, 2008). Além disso, REID (2008) afirma que mulheres obesas apresentam maior densidade mineral óssea (DMO) e, portanto, do ponto de vista clínico, parecem estar “protegidas” da osteoporose. Esses estudos epidemiológicos mostraram uma correlação positiva entre índice de massa corporal (IMC) e densidade mineral óssea (DMO), sendo que a redução ponderal resultou em diminuição da massa óssea (HAMIRICK *et al*, 2008). Entretanto, destaca-se que estes estudos estabeleceram a correlação positiva entre obesidade e massa óssea a partir somente de análises de

densitometria óssea considerando unicamente um sítio ósseo do esqueleto. A utilização da técnica de histomorfometria representa uma estratégia para o aprofundamento do estudo do tecido ósseo, pois esta permite a análise da qualidade do osso, que poderá ser avaliado histologicamente e morfológicamente (KAKRSENTY, 2006). Além disso, ressalta-se que estes trabalhos estabelecem estas conclusões a partir de um único sítio ósseo avaliado, sendo que é conhecido que os efeitos podem variar de acordo com o sítio ósseo analisado, já que os ossos possuem metabolismo diferenciado, resposta variada ao estímulo mecânico e hormonal (BOELONI *et al*, 2010; OCARINO *et al*, 2007). Assim, para melhor elucidar a relação entre obesidade e massa óssea, é necessário estudos que investiguem essas características qualitativas do tecido ósseo e ainda a avaliação de todo o esqueleto.

Os mecanismos fisiológicos que fundamentam a relação entre obesidade e tecido ósseo ainda não estão totalmente elucidados, mas algumas explicações têm sido propostas. Uma das hipóteses é que a maior massa corporal aumenta o impacto mecânico, o que estimula a formação óssea, através da mecanotransdução e dessa forma, resulta em aumento da DMO (ZHAO *et al*, 2007; 2008; REID, 2008). Outro mecanismo sugerido é através do hiperestrogenismo que ocorre na obesidade. Essa alteração, resultante da maior aromatização dos androgênios em estrógenos que ocorre no tecido adiposo, pode ser ainda em função da maior fração livre de hormônios sexuais no sangue, devido à inibição induzida pelo aumento da insulina na produção hepática de globulinas transportadoras de hormônios sexuais (SHBG) que acontece na obesidade - (ZHAO *et al*, 2008; REID, 2008).

As evidências apresentadas sugerem que o esqueleto, o tecido adiposo e a reprodução podem ser regulados pelos mesmos fatores (KARSENTY e FERRON, 2012). Dentre esses fatores integradores, destacam-se a leptina, a adiponectina, a insulina, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6. A leptina é produzida principalmente no tecido adiposo (FRIEDMAN, 2009). A idéia de que havia um sinal circulante que influenciava o apetite e que era produzido proporcionalmente a massa adiposa foi proposta primariamente por Kenedy, em 1953, através da Teoria Lipostática. Essa hipótese foi corroborada posteriormente

por HERVEY (1959) e COLEMAN (1973). A partir desses experimentos chegou-se àquele que permitiu a descoberta leptina, descrita pela primeira vez pelo grupo de pesquisadores liderado por Friedman, em 1994. A leptina age através de receptores centrais e periféricos presentes em diversos tecidos como hipotálamo, tecido ósseo, barreira hematoencefálica e tecido adiposo, dentre outras regiões (MARGETIC *et al*, 2002). Ao atuar sobre o hipotálamo, a leptina reduz o apetite e aumenta o gasto energético (TRAYHURN e BING, 2006). Com base nas ações fisiológicas da leptina, muito tem sido estudado sobre os possíveis efeitos desta adipocina no tratamento da obesidade, já que a concentração plasmática de leptina está relacionada ao tamanho da massa de tecido adiposo presente no corpo, sendo que indivíduos obesos apresentam maiores concentrações (CONSIDINI *et al*, 1996). Entretanto, observa-se que a obesidade pode levar a um estado de resistência à leptina (CONSIDINI *et al*, 1996; MÜNZBERG e MYERS, 2005).

Como apresentado acima, evidências evolutivas mostram que a leptina modula a relação entre tecido ósseo e adiposo, sendo que esta ação pode ocorrer de forma direta, estimulando a diferenciação osteogênica e inibindo a osteoclastogênese (THOMAS *et. al*; 1999; GORDELADZE *et. al*, 2002) ou indireta, através de um aumento na reabsorção óssea (via serotonina no sistema nervoso central) – (DUCY *et al*; 2000; TAKEDA *et al*, 2002; YADAV *et al*, 2009). Evidências clínicas ressaltam que os efeitos diretos da leptina parecem ser predominantes em relação aos efeitos centrais. Além disso, como na obesidade ocorre redução da ação da leptina no sistema nervoso central, é possível também que ocorra resistência aos efeitos centrais da leptina sobre o tecido ósseo (DUCY *et. al*, 2000; CORNISH *et al*, 2002; REID e COMISH, 2004; REID, 2008)

Outro fator sugerido para explicar a relação entre obesidade e tecido ósseo é a insulina. Segundo ZHAO *et al* (2008), há correlação positiva entre a concentração plasmática de insulina e a DMO. Osteoblastos apresentam receptor para a insulina que, por sua vez, estimula a diferenciação osteogênica e inibe a osteoclastogênese (REID, 2008; YANO *et al*, 1994). Além disso, a insulina inibe a produção hepática da SHBG, que aumenta a concentração da fração livre de estrógeno e androgênios e assim estimula o anabolismo no tecido ósseo. Portanto, a hiperinsulinemia presente

na obesidade pode ser um dos fatores que contribuem para a maior DMO de indivíduos obesos e assim a insulina representa mais uma das conexões entre tecido ósseo e obesidade.

A tentativa de explicar a relação entre esqueleto e obesidade conduz também aos resultados obtidos com as investigações sobre o TNF-alfa e a IL- 6. O trabalho de HOTAMISLIGIL *et al* (1993) foi o primeiro a mostrar que na obesidade, os adipócitos aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Isso ocorre em função da hipóxia presente devido à hipertrofia dos adipócitos e conseqüente migração de macrófagos (HOTAMISLIGIL, 2006; SUN *et al.*; 2011). Como apresentado anteriormente, a massa corporal, a hiperinsulinemia e a maior concentração sanguínea de leptina e de estrógeno exercem ação anabólica no tecido ósseo. Entretanto, na obesidade fatores que regulam o catabolismo no esqueleto também estão aumentados, tais como citocinas pró-inflamatórias e glicocorticóides que inibem a diferenciação osteogênica e estimulam a reabsorção óssea através da osteoclasia (ZHAO *et al*, 2008; MIGLIACCIO *et. al.*; 2007). Assim, apesar de muitos estudos proporem um efeito anabólico da obesidade sobre o tecido ósseo, esta perspectiva tem sido questionada devido ao possível aumento dos estímulos catabólicos que essa patologia gera no tecido.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória secretada por vários tipos de células, tais como macrófagos, adipócitos e fibroblastos (POPA *et al.*; 2007). HOSTAMISLIGIL *et al* (1993) encontraram que o tecido adiposo também produz o TNF- $\alpha$  e ainda que a sua expressão nos adipócitos e sua concentração plasmática é maior em camundongos obesos quando comparado ao controle. Esse trabalho foi o primeiro a evidenciar que há uma correção entre o metabolismo e o sistema imune, propondo a partir desta perspectiva, a interação entre obesidade, diabetes tipo 2 e inflamação. HOTAMISLIGIL (2006) ressalta que do ponto de vista evolutivo existem fortes evidências para esta correção. O suprimento energético e a capacidade de ativar uma resposta imune efetiva são requisitos fundamentais para a sobrevivência e estão, portanto, relacionados com a seleção de diferentes populações durante a evolução das espécies. Um exemplo que corrobora a ideia apresentada é dado a partir da *drosophila melanogaster*, um invertebrado que utilizava

de uma mesma estrutura para coordenar a função de estoque de nutriente e a resposta a patógenos. Esta estrutura evoluiu nos mamíferos para diferentes órgãos: tecido adiposo, fígado e sistema hematopoiético, mas que apresentam uma regulação integrada. A partir desta perspectiva, o TNF-alfa tem sido associado à obesidade, dislipidemia e resistência à insulina. O TNF-alfa estimula lipólise no tecido adiposo, embora não aumenta a oxidação de lipídeos. Além disso, é associado com aumento da resistência à insulina (QI e PEKALA, 2000; KIENS, 2006; HOTAMISLIGIL, 2006; SUN *et al.*; 2011).

Estudos epidemiológicos mostram que a concentração plasmática de TNF-alfa correlaciona-se negativamente com a DMO (ZHENG *et al.*, 1997), sendo que este resultado é sustentado por trabalhos experimentais que encontraram que camundongos *knockout* para TNF-alfa apresentam maior massa óssea (LENCEL e MAGNE, 2011). Os mecanismos propostos para explicar essas relações baseiam-se na ação do TNF- $\alpha$  em aumentar a osteoclastogênese, e diminuir a atividade osteoblástica *in vitro* e *in vivo* (NANES, 2003; BERTOLINI *et al.*, 1986; GASPERSIC *et al.*, 2003).

Até o final do século passado, a IL-6 era conhecida predominantemente por suas funções relacionadas ao sistema imune. Entretanto, na década de 90 foi identificado que o tecido adiposo também produz esta citocina e que o músculo esquelético, durante a contração muscular, também secreta IL-6 durante o exercício (MOHAMED-ALI *et al.*, 1997; STEENBERG *et al.*, 2000). Como a obesidade resulta em um aumento nas concentrações séricas de IL-6, foi sugerido que esta citocina também contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina, pois se correlaciona negativamente com a captação de glicose. Entretanto este efeito varia quando avaliado no músculo esquelético ou nos hepatócitos (KERN *et al.*, 2001; CARREY e FEBBRAIO, 2004; GLUNT e KROOK, 2008).

A IL-6 tem sido utilizada como um marcador para prever a reabsorção óssea e correlaciona-se negativamente com a DMO (DING *et al.*, 2008). Estudos experimentais reiteram esta correlação, pois foi demonstrado que a IL-6 aumenta a osteoclastogênese e contribui para o aumento da reabsorção óssea (ISHIMI *et*

*al*,1990; ROZEN *et al*, 2000). Além disso, após a ovariectomia ocorre aumento na expressão dessa citocina no osso, o que evidencia sua participação na redução da massa óssea nas situações de deficiência estrogênica (YHIHUI *et al*, 2000).

## 2.2 OBJETIVO

Verificar os efeitos do treinamento físico sobre diferentes sítios ósseos do esqueleto de ratas obesas e sua relação com as adipocinas.

## HIPÓTESES

As hipóteses a serem testadas são as seguintes:

### Em relação ao efeito obesidade induzida pela dieta de alta palatabilidade:

H<sub>0</sub>: A obesidade induzida pela dieta de alta palatabilidade não altera o tecido ósseo trabecular de ratas.

H<sub>1</sub>: A obesidade induzida pela dieta de alta palatabilidade altera o tecido ósseo trabecular de ratas.

### Em relação aos efeitos do treinamento físico nas ratas obesas

H<sub>0</sub>: O treinamento físico não altera o tecido ósseo trabecular de ratas com obesidade induzida pela dieta de alta palatabilidade.

H<sub>1</sub>: O treinamento físico altera o tecido ósseo trabecular de ratas com obesidade induzida pela dieta de alta palatabilidade.

### Em relação à associação entre leptina sérica, concentração de citocinas do tecido adiposo e tecido ósseo

H<sub>0</sub>: A leptina sérica, o TNF-alfa e a IL-6 do tecido adiposo periuterino não se correlacionam com o percentual de trabécula óssea.

H<sub>1</sub>: A leptina sérica, o TNF-alfa e a IL-6 do tecido adiposo periuterino se correlacionam com o percentual de trabécula óssea.

## 2.3 MÉTODOS

A coleta e análise dos dados referentes aos três capítulos desta dissertação foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE - EEEFTO), no Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (Escola de Veterinária - UFMG) e no Laboratório de Imunofarmacologia (Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB - UFMG).

### **Cuidados Éticos**

Todos os procedimentos referentes aos três capítulos desta dissertação obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal estabelecidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG - 226/10- ANEXO 1) e foram aprovados pelo colegiado de pós-graduação em Ciências do Esporte (EEFFTO-UFMG).

### **Amostra e descrição dos grupos**

Foram utilizadas 24 ratas *Wistar* com idade de 21 dias provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno (30 x 20 x 19cm) em uma sala da Escola de Veterinária – UFMG sob um ciclo claro escuro de 12 horas de luz e 12 horas de escuro com água e ração *ad libitum*. A temperatura do ambiente foi registrada diariamente ( $25,4^{\circ}\text{C} \pm 3,4$ ) e as ratas foram divididas em 4 grupos experimentais como descrito abaixo (FIGURA 1).

- Grupo DP-NT: Animais alimentados com dieta controle e que não realizaram o treinamento;
- Grupo DP-T: Animais alimentados com dieta controle e que realizaram o treinamento;
- Grupo DAP-NT: Animais alimentados com dieta de alta palatabilidade e que não realizaram o treinamento;
- Grupo DAP-T: Animais alimentados com dieta de alta palatabilidade e que realizaram o treinamento;

**Experimento 1:**  
**Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo de ratas obesas e não obesas**



FIGURA 1. Representação esquemática dos grupos experimentais DC: Dieta controle. DAP: Dieta de alta palatabilidade. NT: não treinado. T: treinado. Fonte: criação do próprio autor.

### **Delineamento experimental**

Aos 21 dias de idade, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: animais alimentados com ração controle (DC) ou com ração de alta palatabilidade (DAP) e iniciou-se o tratamento com as respectivas dietas que foram mantidas até o final do experimento. Segundo BARCELLOS (2012), ratos *Wistar*, com 21 dias de

idade, ao serem alimentados com esta dieta de alta palatabilidade durante dezessete semanas apresentam maior adiposidade, maior ingestão alimentar e maior massa corporal. Além disso, um estudo piloto foi realizado anteriormente a coleta deste experimento e estes resultados foram confirmados em fêmeas com cinco meses de idade. Com base nesses resultados, como o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do treinamento físico em animais com obesidade, os animais permaneceram com as dietas até completarem a idade correspondente a cinco meses e em seguida iniciou-se o treinamento físico, sendo que durante este período as respectivas dietas foram mantidas.

Após o período de indução da obesidade, os animais realizaram o primeiro teste progressivo (TP) para avaliação do trabalho realizado (W), do tempo de exercício (TE) e da velocidade máxima inicial ( $V_{max}$ ). A partir desse último valor, foi calculada a intensidade de exercício de cada animal e iniciado o treinamento físico por treze semanas. Os animais do grupo não treinado eram levados à sala onde era realizado o exercício e mantidos em suas respectivas gaiolas, em repouso, sob mesmas condições ambientais. No final da quarta, oitava e décima segunda semanas de treinamento, foi realizado o teste progressivo para adequação da intensidade de exercício. Setenta e duas horas depois da última sessão de treinamento realizou-se o teste oral de tolerância à glicose. Dois dias posteriores a esse procedimento, as ratas foram submetidas ao último teste progressivo para avaliação do trabalho, do tempo de exercício e da velocidade máxima após o período de treinamento. Setenta e duas horas após este último procedimento, os animais foram eutanasiados seguido de jejum noturno. Todos os animais foram eutanasiados o período da manhã (7h30min - 12h). O delineamento experimental está representado na figura 2. Informações complementares do delineamento experimental e da distribuição dos grupos estão disponíveis no apêndice 1.

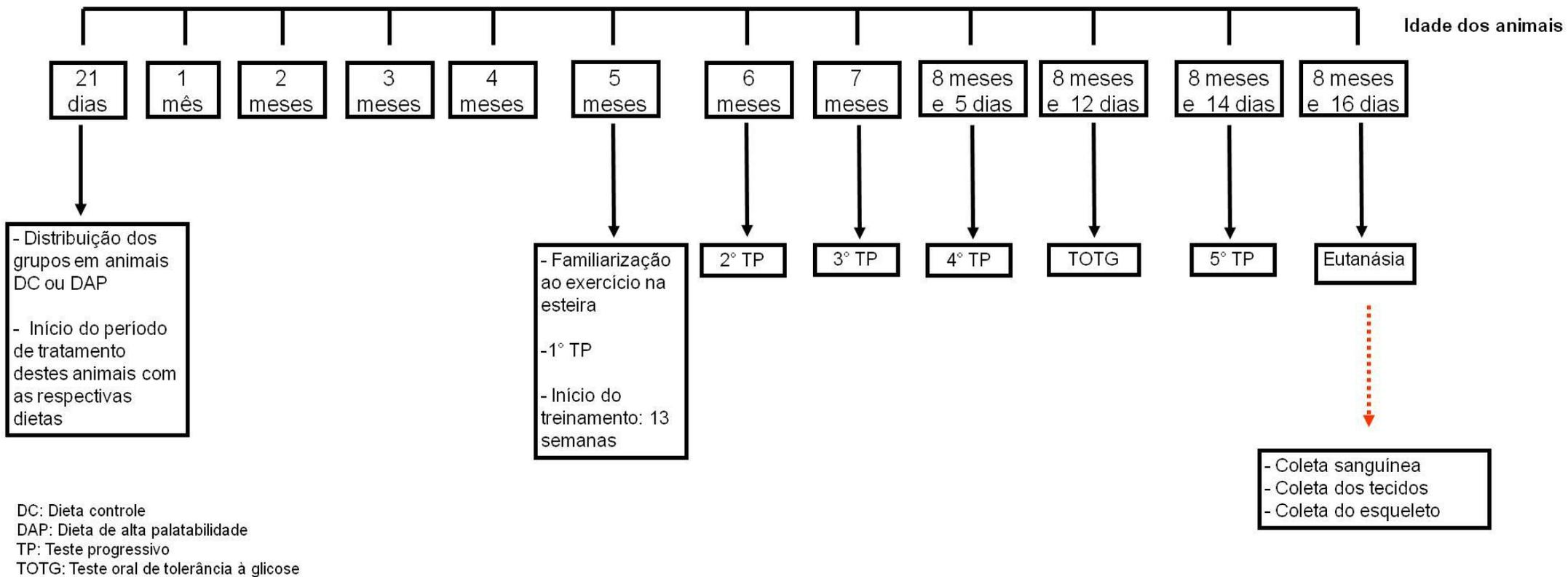


FIGURA 2. Representação esquemática do delineamento experimental  
 Fonte: criação do próprio autor

## Procedimentos pré-treinamento

### Dietas

Os animais do grupo controle foram alimentados com ração padrão Labina-Purina e as ratas do grupo DAP foram alimentadas com ração de alta palatabilidade utilizada para promover a obesidade nos animais (BARCELLOS; 2012) – TABELA 1 e 2. Todos os requerimentos nutricionais apresentados por ambas as rações estão compatíveis com as recomendações do NRC, 1995 (*National Research Council - Nutrient Requirements of Laboratory Rat*).

TABELA 1 - Composição da dieta de alta palatabilidade

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentração (%)</b>
Açúcar cristal	11
Leite condensado Nestlé®	40
Ração moída (Purina)	40
Água	9

BARCELLOS (2012)

TABELA 2. Valor calórico e composição de macronutrientes, umidade e fibras de ambas as rações

<b>Nutriente</b>	<b>Ração Controle</b>	<b>Ração de alta palatabilidade</b>
Energia (kcal/g)	3,59kcal/g	3,23 kcal/g
Carboidratos (%)	54,63	54,69
Lipídeos (%)	5,21	5,71
Proteínas (%)	23,85	13,27
Cinzas (%)	7,94	4,01
Umidade (%)	8,60	22,30
Fibras (%)	6,23	3,47

BARCELLOS, 2012.

TABELA 3: Análise quantitativa de sacarose e minerais de ambas as rações

<b>Nutriente</b>	<b>Ração Controle</b>	<b>Ração de alta palatabilidade</b>
Sacarose (g/100g)	37,04	48,40
Cálcio (%)	1,4	1,0
Fósforo (%)	1,04	0,63

A análise dos minerais foi realizada no Laboratório da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária – UFMG e a análise da sacarose foi realizada no Laboratório HIDROCEPE - LTDA. Fonte: criação do próprio autor.

### **Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

Após o período de treinamento foi realizado o teste oral de tolerância à glicose. Após 15h de jejum, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rata (tempo 0). Em seguida, cada animal recebeu, via gavagem, uma solução de glicose na concentração de  $2\text{g.kg}^{-1}$ . As amostras de sangue foram coletadas no basal e nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a ingestão da glicose e foram avaliadas imediatamente em um glicosímetro. Após o TOTG, foi fornecida água e ração *ad libitum*. Esse teste foi realizado 72h depois da última sessão de treinamento físico.

### **Treinamento físico**

No quinto mês de experimento, iniciou-se o período de treinamento físico. Na semana anterior ao início deste protocolo, realizou-se a familiarização ao exercício físico na esteira e o primeiro teste progressivo para avaliação dos parâmetros de treinamento.

## **Familiarização ao exercício**

O protocolo de familiarização ao exercício físico na esteira foi iniciado quando os animais completaram cinco meses de idade. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de familiarizar os animais ao exercício físico e prevenir o estresse devido à nova condição experimental. As ratas correram durante cinco dias consecutivos, com uma velocidade constante de 10 m.min<sup>-1</sup> e 5% de inclinação (BARCELLOS, 2012).

## **Teste progressivo**

Para avaliar o desempenho físico, os animais foram submetidos a testes com intensidades progressivas antes do início do treinamento, durante o período de treinamento físico (4º, 8º e 12º semana) e cinco dias após o término do treinamento físico. Os testes foram realizados sempre 48h após a última sessão de exercício. O protocolo foi iniciado com a velocidade de 6 m.min<sup>-1</sup>, sendo a velocidade progressivamente aumentada em 3,4 m.min<sup>-1</sup>, a cada intervalo de 3 minutos, até o término do teste. A inclinação da esteira foi mantida constante (CARVALHO *et al.*, 2005). Havia uma grade de estimulação elétrica posicionada no final da esteira. O critério utilizado para a interrupção do teste foi a permanência do animal por 10 segundos consecutivos sobre a grade de estimulação elétrica (SOARES *et al.*, 2004; 2007). As condições ambientais foram registradas através de um termohigrômetro de bulbo seco (temperatura seca - TS: 23,8±1,6; temperatura úmida- TU: 19,4±2,2; umidade relativa do ar- URA: 62,4±9,5%), já que essa variável pode interferir no desempenho (RODRIGUES *et. al*, 2003). O tempo de exercício (TE), o trabalho e a velocidade foram utilizados como parâmetros de desempenho físico nos animais.

## **Descrição do treinamento físico**

Os animais foram submetidos ao treinamento físico por 13 semanas com frequência de cinco vezes por semana, inclinação da esteira de 5° e intensidade correspondente a 60-65% da  $V_{max}$  obtida no teste progressivo. O exercício teve a duração de 15 minutos por dia na primeira semana passando para 30 minutos por dia na segunda, sendo esta duração mantida até o final do período de treinamento (adaptado de OCARINO *et. al*; 2004; 2007; 2008A; 2009). A adaptação realizada foi a determinação da intensidade relativa do treinamento físico. As condições ambientais foram registradas diariamente (TS: 22,8±3,5; TU: 17,7±2,1; URA: 57,4±7,5). Todos os procedimentos referentes ao período de treinamento físico estão descritos na figura 3.

## **Eutanásia**

Os animais foram eutanasiados, após jejum noturno, por decapitação, 72h após o último teste progressivo. Foram retirados os coxins adiposos (retroperitoneal, periuterino e mesentérico) e o restante da carcaça óssea foi fixada em formolaldeído tamponado com fosfato a 10%. Posteriormente foi realizada a dissecação do fêmur, tíbia, úmero, osso nasal, vértebras lombares e torácicas.

## **Procedimentos gerais com as amostras sanguíneas e teciduais**

Para a obtenção do soro, o sangue foi centrifugado durante 15 min a 3500 rpm. Foram obtidas quatro alíquotas que foram armazenadas a -80 °C para a dosagem da concentração sérica de glicose, de insulina e de leptina. As amostras teciduais foram armazenadas imediatamente a -80°C para posterior homogeneização e realização do protocolo de extração de citocinas para análise por ELISA.

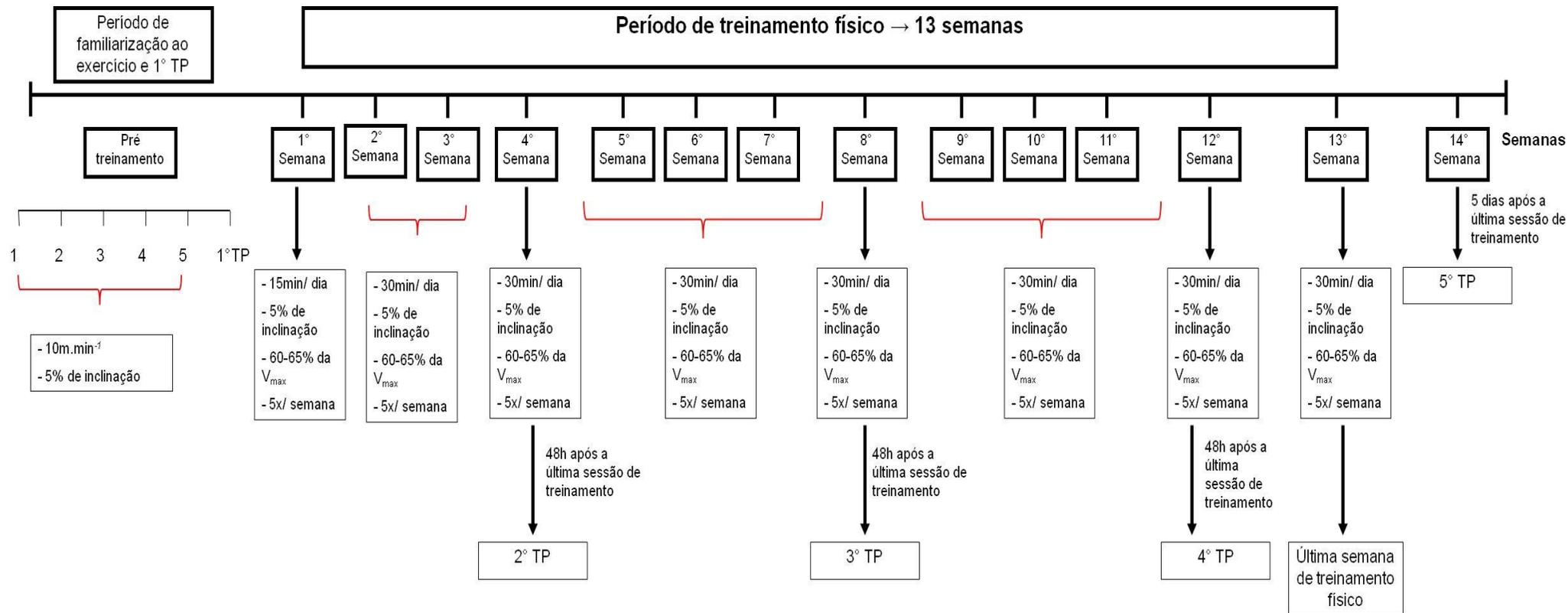


FIGURA 3. Representação esquemática do protocolo de treinamento físico.  
 Fonte: criação do próprio autor.

## Variáveis medidas e calculadas

### Massa corporal (MC)

Os animais foram pesados semanalmente em uma balança com precisão de 0,01g. O ganho de massa corporal ( $\Delta MC$ ) foi calculada pela diferença entre a MC avaliada imediatamente antes da eutanásia e a MC no primeiro dia de experimento.

### Tempo de exercício, velocidade máxima e trabalho

O tempo de exercício correspondeu ao intervalo de tempo entre o início do teste progressivo e o momento que o teste foi interrompido. A  $V_{max}$  foi determinada como a maior velocidade alcançada no teste. O trabalho foi calculado segundo a equação proposta por Brooks e White (1978):

$$\text{Trabalho (kgm)} = \Sigma(\text{MC} \cdot V \cdot \text{sen}\theta \cdot T)$$

MC: Massa corporal (kg)

V: velocidade da esteira ( $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ )

$\text{sen}\theta$ : seno do ângulo de inclinação da esteira

T: duração do estágio

## **Coxins adiposos, índice de adiposidade e histomorfometria do tecido adiposo periuterino**

Os coxins adiposos (retroperitoneal, periuterino e mesentérico) foram pesados em balança de precisão de 0,001g para determinação do índice de adiposidade que foi calculado segundo a seguinte equação (OLIVEIRA *et. al*, 2012):

$$IA = \frac{(TAP+TAR+TAM)}{\text{Massa corporal}} \times 100$$

IA: índice de adiposidade

TAP: Tecido adiposo periuterino

TAR: Tecido adiposo retroperitoneal

TAM: Tecido adiposo mesentérico

Parte do tecido adiposo periuterino (TAP) foi aliquoteado e congelado a -80°C para análises posteriores de TNF-alfa e IL-6 e cerca de 400mg foram fixados em formolaldeído para posterior análise de histomorfometria. Entre os três sítios de tecido adiposo coletados, o TAP foi escolhido para estas análises, devido estudos anteriores mostrarem que entre os três sítios, este é o que apresenta maior associação com as alterações metabólicas e endócrinas avaliadas nesta dissertação (SACKMANN-SALA *et al.*; 2012). Para a análise de histomorfometria do tecido adiposo periuterino, 24h após a fixação em formolaldeído tamponado 10% com PBS, os fragmentos de TAP foram armazenados no álcool 70% até o dia do processamento em histotécnico e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados no micrótomo (*Microm, HM-315*) e sessões histológicas com espessura de 7 µm foram colocadas em lâminas para coloração em eosina e hematoxilina (APÊNDICE 2). Para análise histomorfométrica dos adipócitos, as lâminas foram fotografadas em microscópio de luz equipado com câmera digital (Moticam 2500) e foi utilizada uma lente objetiva com aumento de 10x. A área foi obtida por meio da medida aleatória de 50 adipócitos por lâmina através do programa ImageJ.

## **Concentrações séricas de glicose, leptina, insulina e índice HOMA**

A concentração sérica glicose foi determinada por método colorimétrico conforme instruções do fabricante (*Kit Labtest*). A leptina e a insulina foram quantificadas no soro através do método ELISA (*Kits de ELISA Linco Research*). O índice HOMA (*homeostatic model assessment*) foi calculado segundo a seguinte equação:  $HOMA-IR = \text{glicose de jejum (mmol.L)} \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/ml}) \div 22,5$ .

## **Concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino**

Para análise do TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino utilizou-se o método ELISA (*Kits de ELISA R & D Systems*). Para as análises teciduais foi realizado um protocolo de homogeneização no qual 100 mg de tecido foram homogeneizados com 1ml de solução de extração de citocinas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, retirado o infranadante que foi congelado a -20°C para posterior análise por meio do método de ELISA.

## **Processamento e histomorfometria do tecido ósseo**

Como os efeitos no tecido ósseo podem variar de acordo com o sítio analisado (OCARINO et al, 2004; 2007) no presente estudo avaliou-se tanto o esqueleto axial, representado pelo osso nasal (sítio ósseo submetido a um menor impacto mecânico e a um maior efeito dos fatores hormonais - OCARINO et al., 2004; 2007), coluna torácica e lombar, como o apendicular, representado pelos ossos longos. As carcaças ósseas foram dissecadas e fixadas em formolaldeído tamponado com fosfato a 10% por, no mínimo, sete dias. Em seguida, foi realizada a descalcificação por 40 dias em uma solução contendo 1200ml de ácido fórmico (85% P.A ACS), 3800ml de água destilada e 450g de citrato de sódio tribásico. No 15º dia após o

início da desmineralização, o fêmur foi cortado medialmente e sua parte distal, úmero proximal, tíbia proximal, osso nasal e as vértebras lombares e torácicas foram cortados longitudinalmente e colocados em cassetes. Esse procedimento tem como objetivo acelerar a descalcificação e preparar os sítios para o posicionamento correto na inclusão na parafina e posterior corte no micrótomo. Após os 40 dias de descalcificação, os sítios ósseos foram colocados em água corrente durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação dos tecidos em uma bateria de álcool a 70%, 80%, 90%, absoluto usado e novo para posterior diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina histológica (56 a 58° C).

Após resfriar em temperatura ambiente, os blocos foram congelados a -20° C e sessões histológicas de 4-5µm foram obtidas em um micrótomo (*Microm, HM-315*), fixadas em lâminas de 26mm x 76mm embebidas de albumina e colocadas em água a temperatura de 50 - 60°C para abertura do corte. Posteriormente, as lâminas foram coradas em hematoxina e eosina (APÊNDICE 3).

Para a análise histomorfométrica do osso nasal foi utilizada uma lente objetiva com um aumento de 40x e uma lente ocular que possuía uma régua milimetrada para mensuração da espessura do osso nasal, sendo que 30 pontos foram avaliados (OCARINO *et. al*; 2007). Os valores foram convertidos em micrômetros e a média utilizada para a análise estatística. A determinação da quantidade de osso trabecular foi realizada através de uma ocular com graticula micrométrica de 121 pontos posicionada 1mm abaixo da placa epifisária e objetiva de 20x nos seguintes sítios: vértebras lombares (L1-L3 e L4-L6), torácicas (T-T7 e T8-T13), fêmur proximal, metáfise e epífise dos ossos longos (tíbia, úmero, fêmur distal). Na tabela do apêndice 4 estão apresentados a quantidade de campos e pontos quantificados por sítio ósseo. Em cada ponto da graticula foi quantificado se havia presença de trabécula, medula óssea vermelha, medula óssea amarela ou artefato. Posteriormente, esses valores foram calculados em forma de percentual, sendo que o artefato foi descontado do valor total dos pontos. Todas as etapas do processamento do tecido ósseo para avaliação por histomorfometria estão representadas na figura do apêndice 5.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). O nível de significância adotado foi  $\alpha \leq 0,05$ . Inicialmente, foi verificada a normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. Para a verificação da associação entre as variáveis, foi utilizada a correlação de *Pearson*. As análises foram realizadas em programas estatísticos Statistica e Sigma Plot 11 – Sigma Stat. Foi utilizada a análise de variância *two way* considerando duas fontes de variação (dieta e treinamento).

Em seguida, foi aplicado um teste *post-hoc* de acordo com o número de grupos (tratamentos) e coeficiente de variação (CV) da análise de variância, que foi calculado através da seguinte equação:

$$CV = \frac{\sqrt{QME}}{X \text{ geral}}$$

CV= coeficiente de variação da análise de variância

QME: quadrado médio do erro

X geral: média de todos os dados

Para as variáveis com instabilidade baixa ( $CV < 15\%$ ) foi utilizado o teste SNK e para aquelas com instabilidade média e alta ( $CV = 15-30\%$  e  $CV > 30\%$ ) foi utilizado o Teste Fischer LSD (Teste t) – (SAMPAIO, 2007). Quando necessário, foi realizada a transformação logarítmica ou radicial para a normalidade dos dados.

## 2.5 RESULTADOS

### Variáveis de treinamento

Na tabela 4 estão apresentadas as variáveis utilizadas como parâmetros de treinamento avaliados antes e depois do treinamento físico (primeiro e último testes progressivos). Os grupos DC-T e DAP-T apresentaram maior tempo de exercício, velocidade máxima e trabalho quando comparados aos animais não treinados ( $p < 0,0001$  para todos os parâmetros) e não houve diferença nas comparações referentes ao efeito da dieta. Os valores dessas variáveis foram similares em todos os grupos antes do início do treinamento.

TABELA 4. Parâmetros de treinamento antes e depois do treinamento físico

Parâmetros	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	NT	T	NT	T
TE pré treinamento (min)	22,1±3,1	20,1±1,3	18,1± 3,8	18,6± 3,0
TE pós treinamento (min)	17,8±3,0	28,8±3,0 <sup>α</sup>	15,2±4,2	28,1±3,7 <sup>α</sup>
Velocidade máxima pré treinamento (km·h <sup>-1</sup> )	1,5±0,21	1,4±0,08	1,3±0,2	1,4±0,2
Velocidade máxima pós treinamento (km·h <sup>-1</sup> )	1,3±0,1	1,9±0,2 <sup>α</sup>	1,2±0,2	2,0±0,2 <sup>α</sup>
Trabalho pré treinamento (kgm)	7,9±3,6	8,3±0,9	8,3±2,55	8,1±2,0
Trabalho pós treinamento (kgm)	5,9± 0,9	17,69±3,4 <sup>α</sup>	6,9±1,1	18,2±4,8 <sup>α</sup>

<sup>α</sup>Diferença em relação aos respectivos controles do treinamento (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T),  $n=5$  para o grupo DC-T e  $n=6$  para o restante dos grupos. NT: não treinado; T: treinado. TE: tempo de exercício. Fonte: resultado do próprio autor.

## **Índice de adiposidade e área dos adipócitos**

Os animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maior índice de adiposidade quando comparado aos animais dieta controle (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T; DC-NT vs. DAP-T,  $p < 0,0001$  para todas as comparações). O treinamento físico, independente do tipo de dieta consumida, não alterou a adiposidade das ratas - (GRÁFICO 1A). Em concordância com o índice de adiposidade, os tecidos adiposos periuterino (TAP), retroperitoneal (TAR) e mesentérico (TAM), todos relativizados pela massa corporal, também foram maiores nas ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade e não houve efeito do treinamento físico (APÊNDICE 6). A análise histológica mostrou aumento da área dos adipócitos nos grupos dieta DAP avaliada através de análise morfométrica de secções do tecido adiposo periuterino (DC - NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T; DC-NT vs. DAP-T,  $p < 0,001$  para todas as comparações) e o treinamento físico não alterou essa variável: DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T,  $p = 0,4$  para ambas as comparações (GRÁFICO 1B e FIGURA 4).

## **Massa corporal**

O grupo DAP-NT apresentou maior ganho de massa corporal quando comparado ao grupo DC-NT,  $p \leq 0,01$ . O treinamento físico não alterou a massa corporal independente da dieta consumida (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T,  $p = 0,1 - 0,7$  para todas as comparações). (TABELA 5). Esses mesmos resultados foram encontrados para a massa corporal e estão apresentados no apêndice 6. Antes do início do treinamento físico, essas variáveis foram maiores nos grupos DAP em relação aos animais dieta controle (APÊNDICE 6).

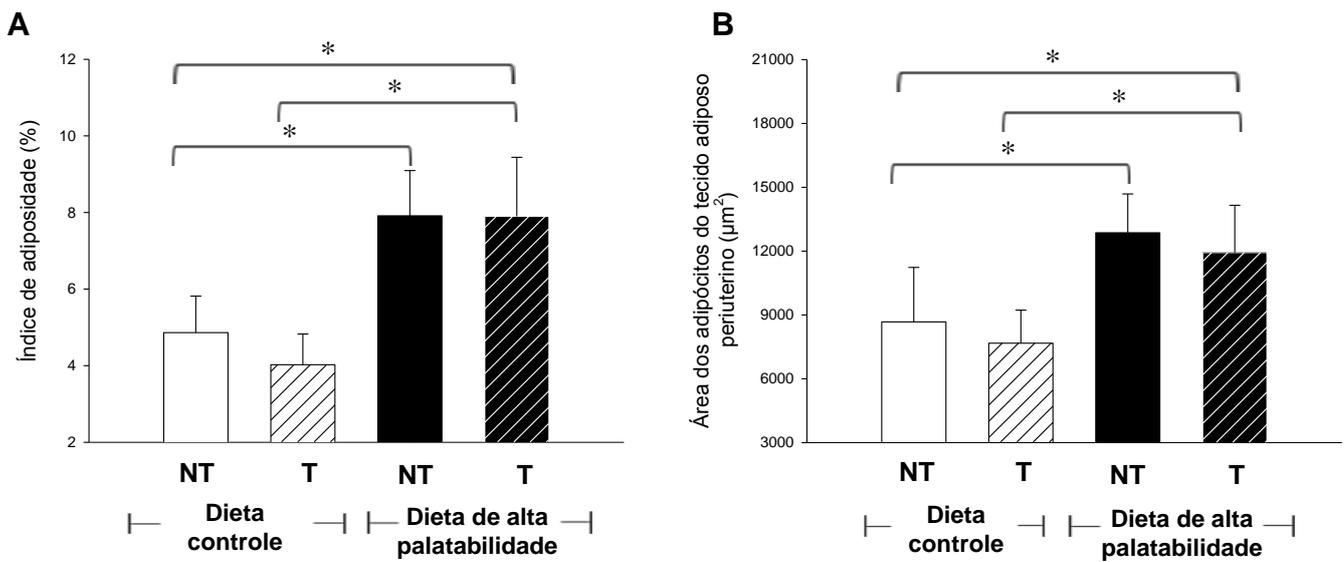


GRÁFICO 1. Índice de adiposidade e área dos adipócitos. A) Índice de adiposidade (%). B) Área dos adipócitos. \* Diferença entre os grupos indicadas nas barras horizontais,  $n=5$  para o grupo DC-T e  $n=6$  para o restante dos grupos. NT: não treinado; T: treinado. Fonte: resultado do próprio autor.

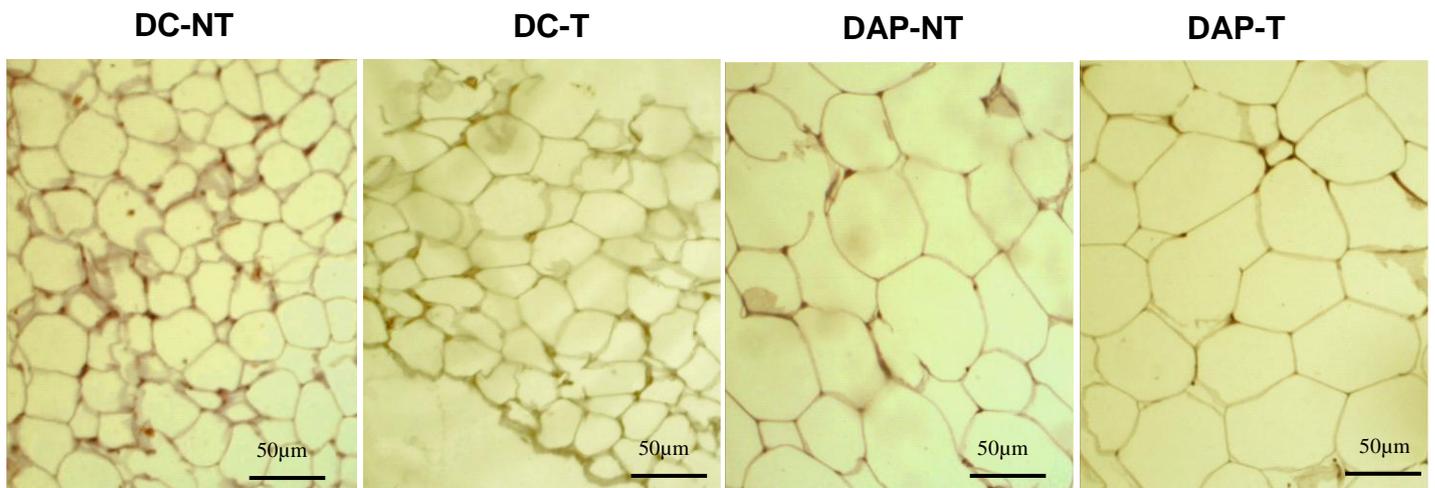


FIGURA 4. Análise histológica de seções do tecido adiposo periuterino. DC-NT (Dieta controle e não treinado); DC-T (Dieta controle e, treinado); DAP-NT (Dieta de alta palatabilidade e não treinado); DAP-T (Dieta de alta palatabilidade e treinado). Fonte: resultado do próprio autor.

## **Teste oral de tolerância à glicose**

Os dados referente às comparações ao longo do tempo do teste oral de tolerância à glicose estão apresentados no APÊNDICE 7. Na tabela 5 está representada a área sob a curva da concentração sanguínea de glicose ao longo do tempo, no teste oral de tolerância a glicose. As ratas do grupo DAP apresentaram maior área sob a curva em relação aos seus respectivos controles (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T; DC-NT vs. DAP-T,  $p < 0,05$ ) e não apresentaram diferença nas comparações referentes efeito do treinamento físico (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T,  $p = 0,2-0,8$ ).

## **Variáveis séricas, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino**

Não houve diferença entre os grupos para a concentração sérica de glicose. As concentrações séricas de leptina, insulina e o índice HOMA foram maiores nas ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade ( $p \leq 0,01$  para todas as comparações) e não houve diferença para o treinamento físico (DC-NT vs. DC-T,  $p = 0,5-0,8$ ; DAP-NT vs. DAP-T,  $p = 0,3-0,6$ ) – (TABELA 5). Variáveis séricas complementares estão apresentadas no apêndice 6.

As concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino estão representadas na tabela 5. Para ambas citocinas, as ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade apresentaram concentrações maiores em relação aos animais alimentados com a dieta controle (DC-NT vs. DAP-NT,  $p = 0,03$  para TNF-alfa e para IL-6; DC-T vs DAP-T,  $p < 0,001$ ). Os animais treinados, independente da dieta consumida, não apresentaram diferenças nas concentrações teciduais de TNF-alfa e IL-6 (DC-NT vs DC-T; DAP-NT vs DAP-NT,  $p = 0,1 - 0,6$ ). O grupo DAP-T apresentou maiores concentrações em relação ao grupo DC-NT – TABELA 5.

TABELA 5. Ganho de massa corporal, variáveis séricas, área sob a curva do TOTG, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino

Variáveis	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	NT	T	NT	T
ΔMC (g)	259,8±21,2	298,1±13,2	341,4±57,8*	349,8±49,5* <sup>γ</sup>
Área sob a curva da glicose no TOTG (mg.dl <sup>-1</sup> x 120min)	15085± 908,6	14947,5±261,1	17852,5±1519,5*	16876,2±1546,1* <sup>γ</sup>
Glicose (mg.dl <sup>-1</sup> )	56,7±4,2	54,2±13,6	61,2±8,7	63,2±8,7
Insulina (ng.ml <sup>1</sup> )	1,01±0,09	1,09± 0,1	2,1±0,6*	2,5±1,2* <sup>γ</sup>
HOMA-IR	3,8±0,5	3,3±1,0	8,3±2,9*	10,2 ±6,1* <sup>γ</sup>
Leptina (ng.dl <sup>-1</sup> )	7,4±4,4	5,5±5,04	19,7±4,3*	18,5± 6,7* <sup>γ</sup>
TNF-alfa (ng.massa de TAP)	69,5±14,2	86,5±52,8	160.9±52,5*	224,5±112,0* <sup>γ</sup>
IL-6 (ng.massa de TAP)	134,3±75,7	147,0±18,0	327,8±73,3* <sup>γ</sup>	379,1±138,2* <sup>γ</sup>

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T). <sup>α</sup> Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T). <sup>γ</sup>Diferença entre o grupo DAP-T vs. DC-NT, *n*=5 para o grupo DC-T e *n*=6 para o restante dos grupos. Para a variável insulina e índice de HOMA, o grupo DC-NT apresentou *n*=5. Para as concentrações de insulina, TNF-alfa, IL- 6 no tecido adiposo periuterino e para o índice HOMA foram necessárias a realização da transformação logarítmica e radicial respectivamente para a normalidade dos dados. TAP: tecido adiposo periuterino. NT: não treinado; T: treinado. TAP: tecido adiposo periuterino. TOTG: teste oral de tolerância a glicose. ΔMC: ganho de massa corporal. Fonte: resultado do próprio autor.

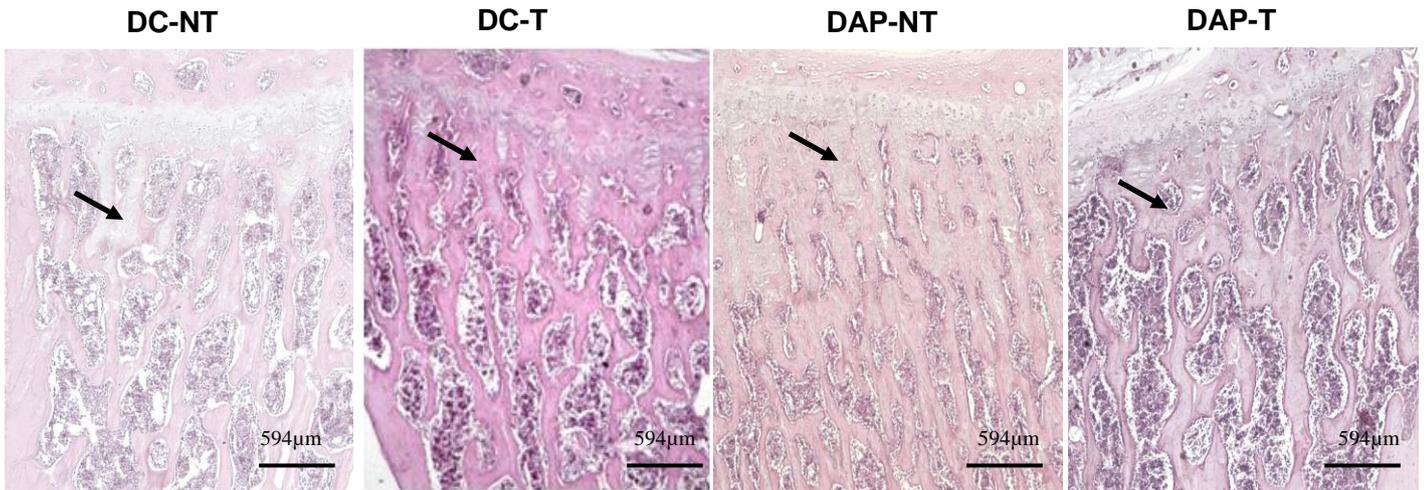
### Histomorfometria do esqueleto axial e apendicular: Vértebras, osso nasal e ossos longos

No grupo DAP-NT foi encontrada uma maior quantidade de trabéculas ósseas nas vértebras L1-3 e L4-L6 em relação ao grupo DC-NT, (GRÁFICOS 2A e 2B – FIGURAS 5A e 5B). O grupo DAP-T apresentou redução no percentual de trabécula óssea em relação ao grupo DAP-NT nas vértebras L1-L3 (*p*=0,008) e não houve diferença na comparação com o grupo DC-NT (*p*=0,1). Não houve efeito de treinamento físico no grupo dieta controle (*p*=0,09). Para as vértebras L4-L6, as ratas DC-T apresentaram maior percentual de trabécula óssea que os animais DC-NT (*p*<0,001) e não houve diferença para o treinamento nos grupos DAP (*p*=0,5).

A partir da análise morfológica das vértebras L1-L3, observou-se no grupo DAP-NT, quando comparados aos outros grupos, o espessamento e confluência das trabéculas ósseas com características histológicas de osso osteônico, tais como presença de linhas de cimentação e presença de canais centrais semelhantes ao tecido ósseo cortical no centro da trabécula, conferindo ao osso um aspecto mosaico (FIGURA 6). Esses achados são compatíveis com um quadro patológico de osteopetrose que não foi observado nos animais do grupo dieta controle e dieta de alta palatabilidade treinado, bem como nos outros sítios ósseos avaliados nesse estudo. Como evidenciado no gráfico 2A, o grupo DAP-T apresentou redução do percentual de osso trabecular nas vértebras L1-L3 em relação ao grupo DAP-NT. Tanto no grupo DAP-NT, bem como no grupo DAP-T, os osteoblastos apresentaram-se ativos, com núcleos arredondados e houve presença de hipertrofia osteoblástica. Essas características morfológicas indicam que a diminuição da quantidade de trabécula óssea no grupo DAP-T não foi devido a uma diminuição da formação óssea. No grupo DAP-T os osteócitos apresentaram-se ativos e alojados em lacunas alargadas, indicando que pode ter ocorrido aumento na reabsorção óssea profunda (osteólise osteocítica). Esse resultado encontrado nas vértebras L1-L3 foi correlacionado significativamente com as concentrações séricas de leptina no grupo DAP-NT e não houve correlação para o grupo DAP-T (GRÁFICO 3), bem como para o percentual de trabécula óssea e a concentração tecidual de TNF-alfa e IL-6 em nenhum dos grupos (dados não mostrados).

A espessura do osso nasal dos grupos DAP-NT e DAP-T foi maior quando comparada àquela das ratas DC-NT ( $p < 0,001$ ) e não houve diferença entre os grupos DAP-T vs. DC-T – ( $p = 0,06$ ). Para os animais alimentados com a dieta controle, o treinamento físico resultou em aumento da espessura do osso nasal, quando comparado ao grupo DC-NT, ( $p < 0,001$ ) – (GRÁFICO 4A e FIGURA 7A).

### A: Vértebras lombares L1-L3



### B: Vértebras lombares L4-L6

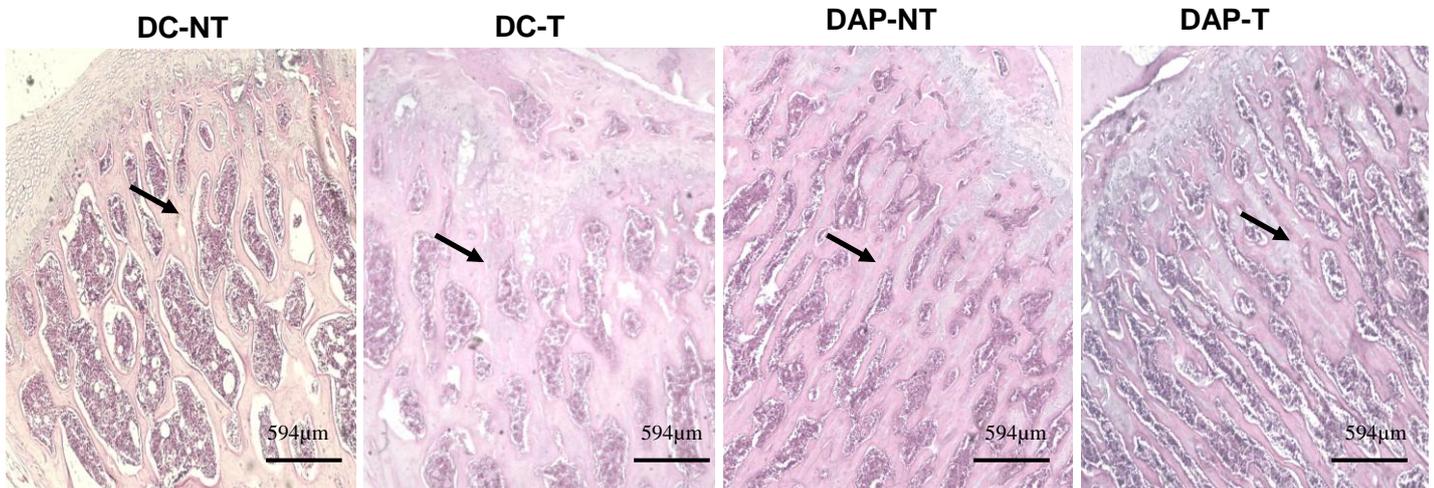


FIGURA 5. Análise histológica de secções das vértebras lombares, barra=594µm. A) Vértebras lombares L1-L3 B) Vértebras lombares L4-L6. DC-NT (Dieta controle e não treinado); DC-T (Dieta controle e treinado); DAP-NT (Dieta de alta palatabilidade e não treinado); DAP-T (Dieta de alta palatabilidade e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

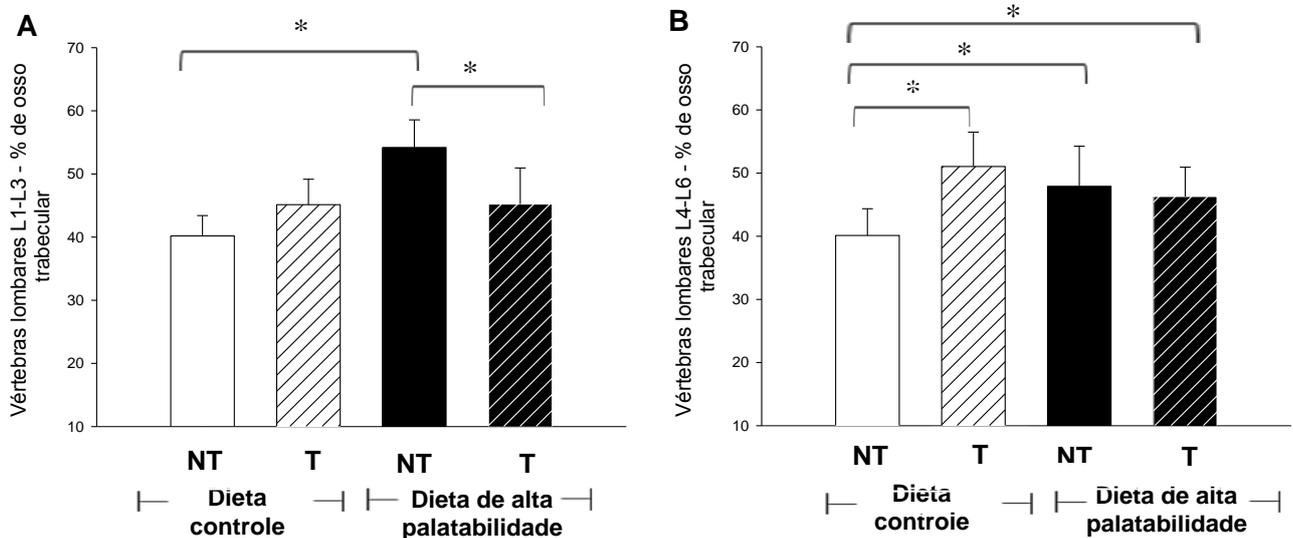
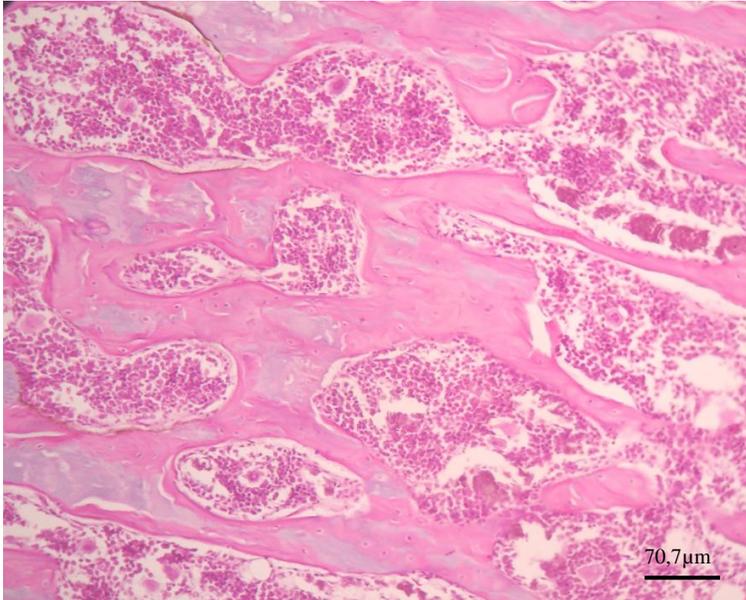
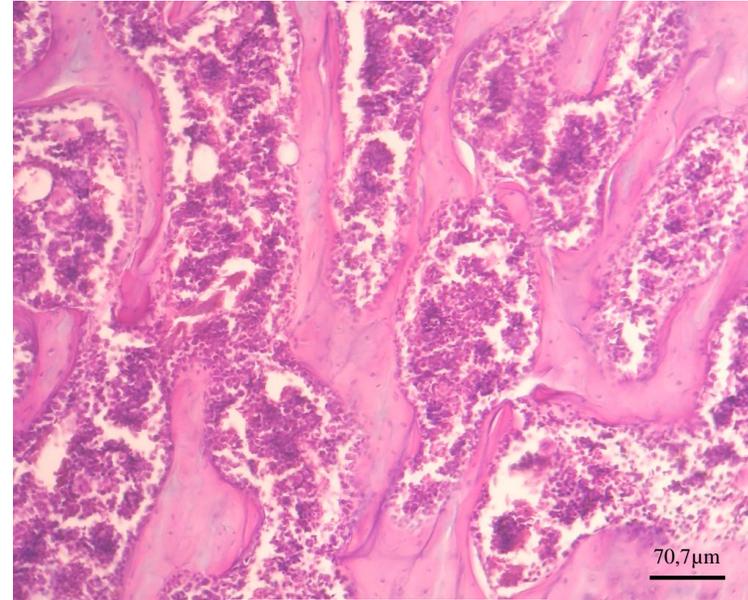


GRÁFICO 2. Análise de histomorfometria das vértebras lombares. A) Percentual de trabécula nas vértebras L1-L3. B) Percentual de trabécula nas vértebras L4-L6. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais. Para todas as variáveis,  $n=5$  para o grupo DC-T e  $n=6$ . NT: não treinado. T: treinado. Estes gráficos estão representados em tabelas no apêndice 10. Fonte: resultado do próprio autor.

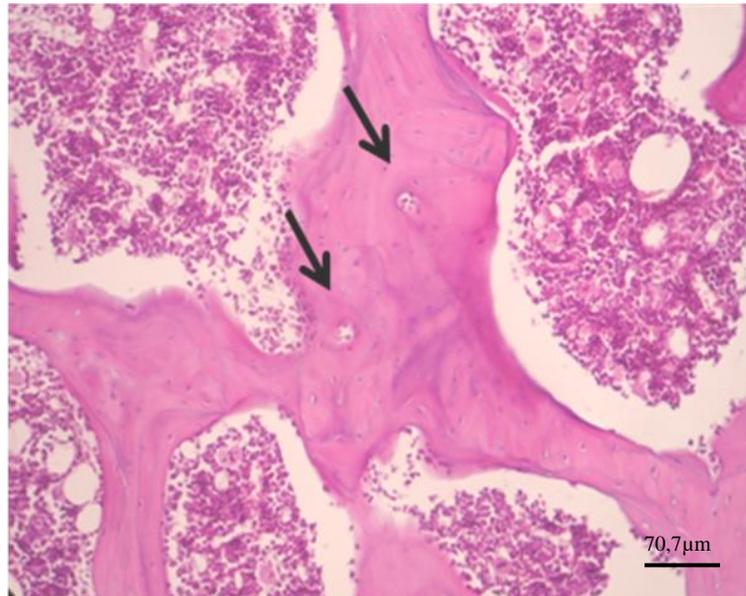
**A: DC-NT**



**B: DAP-T**



**C: DAP-NT**



**D: DAP-NT**

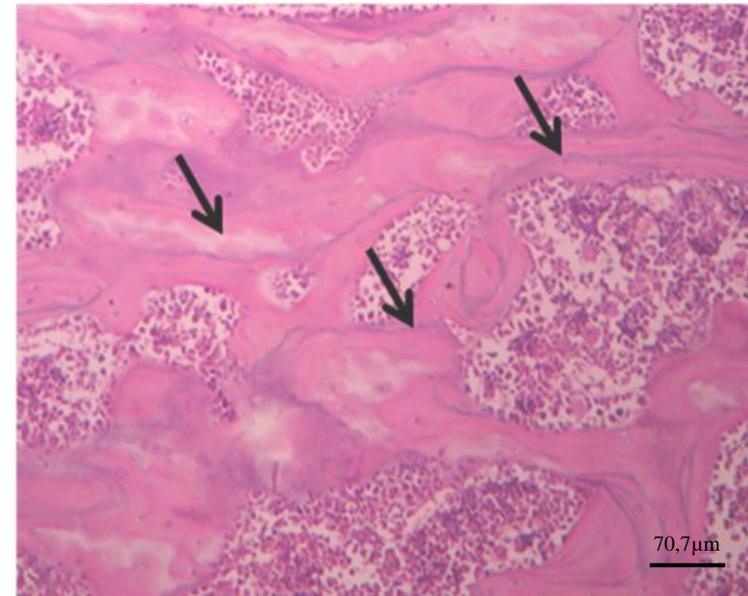


FIGURA 6. Análise morfológica de secções das vértebras lombares L1-L3, barra=70,7µm. A e B) presença de trabéculas normais, sem linhas de cimentação. C) Espessamento da trabécula e presença de canais centrais semelhantes aos do tecido ósseo cortical no centro da trabécula. D) Presença de linhas de cimentação no osso trabecular. DC-NT (Dieta controle e não treinado); DC-T (Dieta controle e treinado); DAP-NT (Dieta de alta palatabilidade e não treinado); DAP-T (Dieta de alta palatabilidade e treinado). Fonte: resultado do próprio autor. 7

DAP – NT:  $p= 0,03 / r = 0,85 / R^2= 0,72$   
DAP – T:  $p= 0,22 / r = 0,58 / R^2= 0,33$

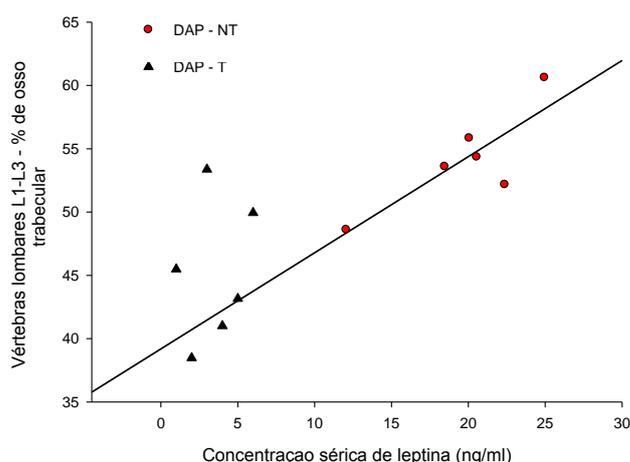
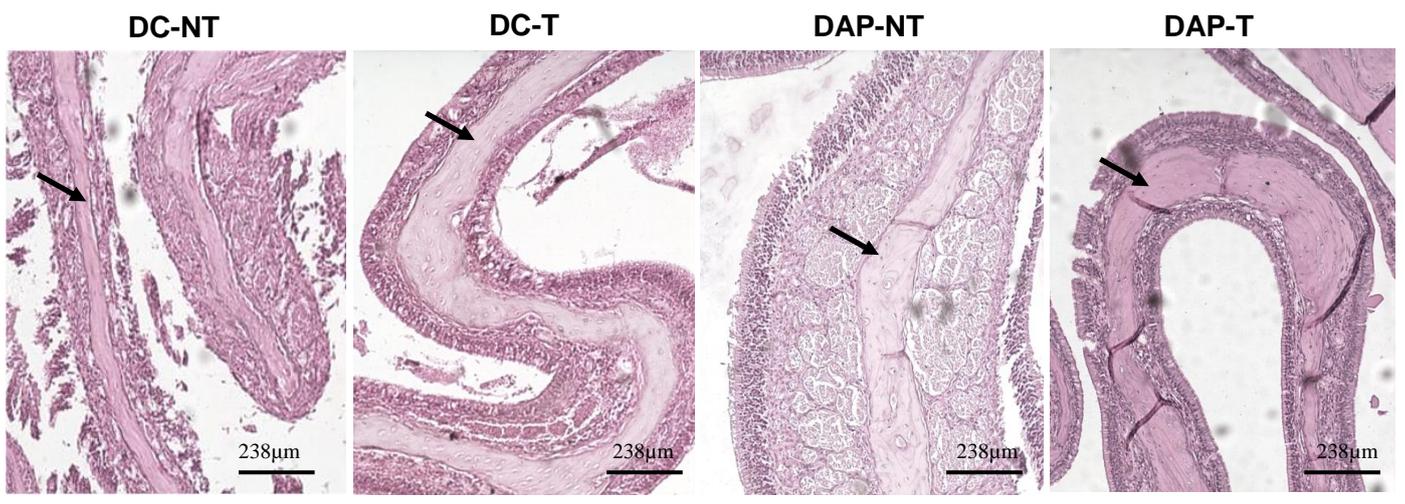


GRÁFICO 3. Correlações entre a concentração sérica de leptina e o percentual de trabéculas nas vértebras L1-L3 no grupo DAP-NT e DAP-T,  $n=6$ . Fonte: resultado do próprio autor.

Os animais do grupo DAP-NT apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea na metáfise da tíbia quando comparados com seu controle (DAP-NT vs. DC-NT,  $p=0,02$ ). Não houve diferença entre o grupo DAP-T vs. DC-T, ( $p= 0,2$ ), bem como não houve efeito do treinamento físico na metáfise da tíbia (DC-NT vs. DC-T,  $p=0,2$ ; DAP-NT vs. DAP-T,  $p=0,9$ ) – GRÁFICO 4B / FIGURA 7B. Os animais do grupo DAP apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea na epífise da tíbia em relação aos seus controles (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T) - (TABELA 6). Para o fêmur proximal, os grupos submetidos ao treinamento apresentaram maiores percentuais quando comparados aos seus respectivos controles (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T – GRÁFICO 5A e FIGURA 9A). Para o fêmur proximal, não houve diferença na quantidade de trabécula para as ratas do grupo DAP em relação ao grupo DC – GRÁFICO 5A e FIGURA 9A. Na avaliação da epífise e da metáfise do fêmur distal as ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade e não treinadas apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea (DAP-NT vs. DC-NT – GRÁFICO 5B / FIGURA 9B / TABELA 6). Para os grupos DAP-T e DC-T, não foi encontrada diferença na epífise do fêmur distal; mas, na metáfise, os animais DAP-T apresentaram maior percentual de trabécula óssea quando comparado ao grupo DC-T. Não houve diferença para o treinamento físico para ambos os sítios do fêmur distal (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T,  $p=0,1 - 0,9$ ) - (GRÁFICO 5B e TABELA 6 – FIGURA 9B).

**A: Osso nasal**



**B: Metáfise da tíbia proximal**

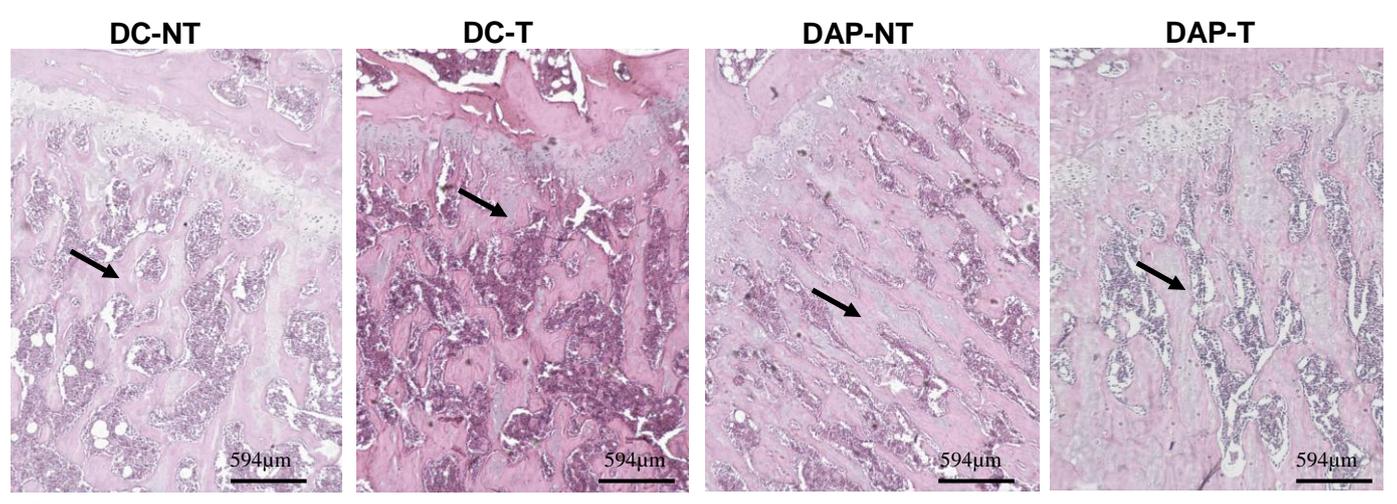


FIGURA 7. Análise histológica de secções do osso nasal e metáfise da tíbia proximal – barra=238µm e 594µm respectivamente. DC-NT (Dieta controle e não treinado); DC-T (Dieta controle e treinado); DAP-NT (Dieta palatável e não treinado); DAP-T (Dieta palatável e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

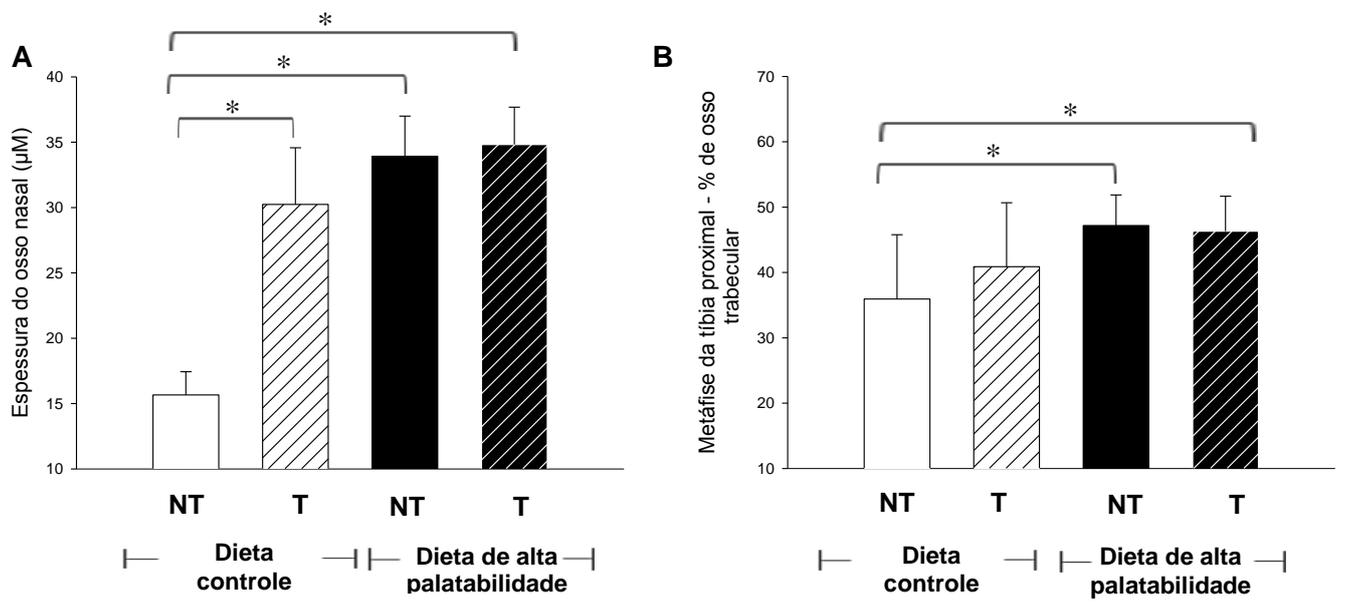
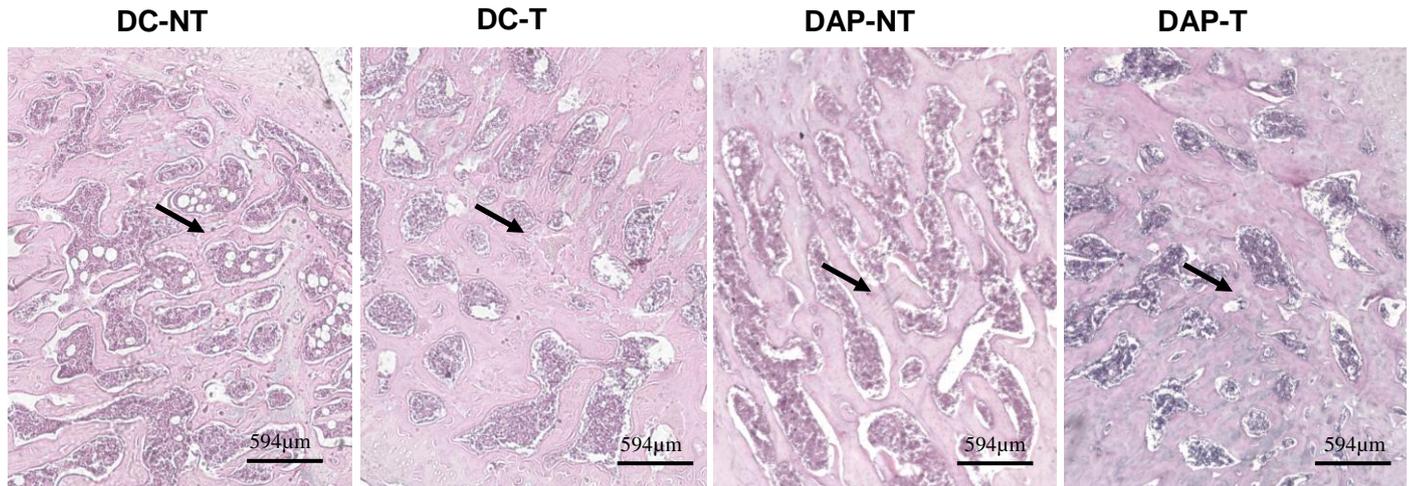


GRÁFICO 4. Análise de histomorfometria do osso nasal e metáfise da tíbia proximal. A) Espessura do osso nasal. B) Percentual de trabécula na tíbia proximal. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais. Para todas as variáveis,  $n=5$  para o grupo DC - T e  $n=6$ . NT: não treinado. T: treinado. Estes gráficos estão representados em tabelas no apêndice 10. Fonte: resultado do próprio autor.

### A. Fêmur proximal



### B. Metáfise do fêmur distal

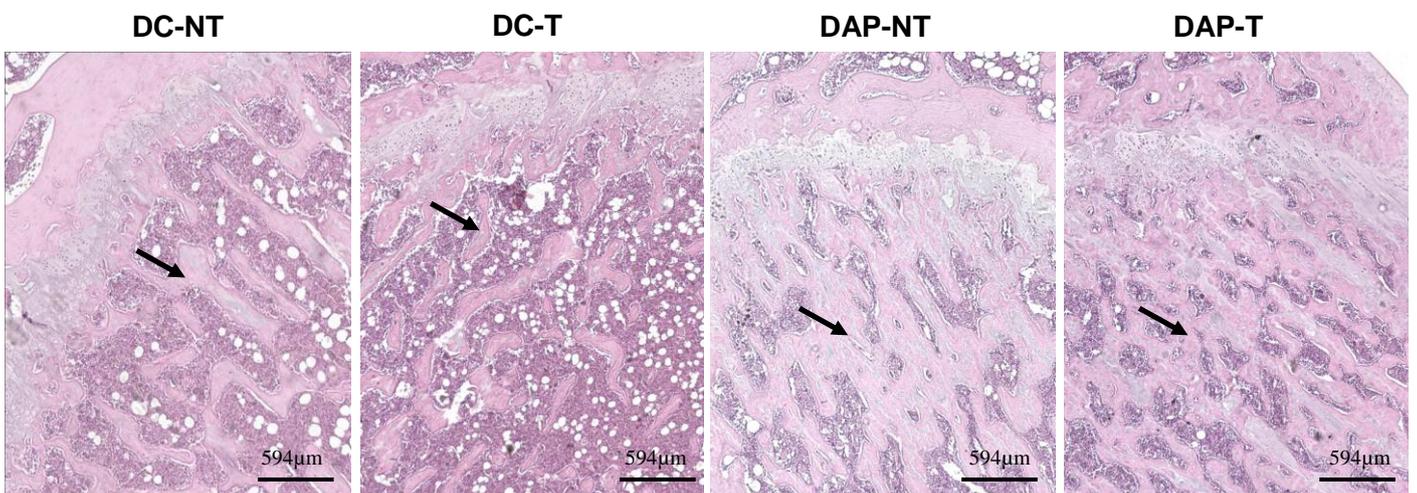


FIGURA 9. Análise histológica de seções do fêmur – barra=594µm. DC-NT (Dieta controle e não treinado); DC-T (Dieta controle e treinado); DAP-NT (Dieta palatável e não treinado); DAP-T (Dieta palatável e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

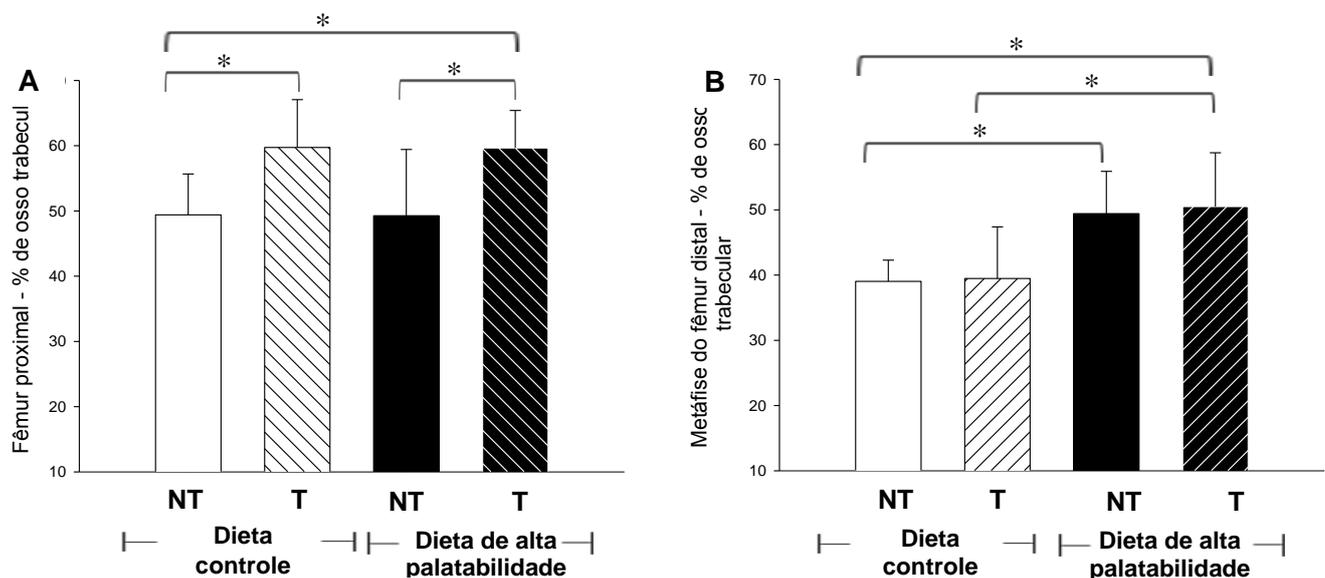


GRÁFICO 5. Análise de histomorfometria do fêmur proximal e metáfise do fêmur distal. A) Percentual de trabécula no fêmur proximal. B) Percentual de trabécula na metáfise do fêmur distal. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais. Para todas as variáveis,  $n=5$  para o grupo DC - T e  $n=6$ . NT: não treinado. T: treinado. Estes gráficos estão representados em tabelas no apêndice 10. Fonte: resultado do próprio autor.

Na tabela 6 e nas figuras apresentadas no apêndice 8 estão representadas o percentual de trabécula óssea na coluna torácica, na epífise dos ossos longos avaliados e na metáfise do úmero. Não houve diferença em nenhum dos grupos para as vértebras T1-T7 e para a metáfise do úmero; entretanto na região T8-T13, na epífise da tíbia proximal e na epífise do fêmur distal os animais do grupo DAP apresentaram maiores percentuais quando comparados aos seus respectivos controles. Não houve diferença para o treinamento físico sobre a quantidade de trabéculas ósseas da coluna torácica, bem como para o percentual de trabécula óssea na epífise e metáfise do úmero, em nenhum dos grupos.

TABELA 6. Percentual de trabécula óssea nas vértebras torácicas, epífise dos ossos

Variáveis (%)	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	NT	T	NT	T
Vértebras torácicas T1-T7	49,1±7,4	46,1± 3,3	45,5± 4,1	50,1± 5,6
Vértebras torácicas T8-T13	42,3±1,8	46,4± 4,3	52,9±3,5*	51,6±5,1* <sup>γ</sup>
Epífise do fêmur distal	22,6±3,5	28,5±7,1	32,4±6,1*	33,0±4,7*
Epífise da tíbia proximal	24,2±6,2	29,9±9,2	36,9±4,4*	34,8±8,0*
Epífise do úmero proximal	28,8± 4,1	26,9±11,0	30,1±5,0	29,8±8,0
Metáfise do úmero proximal	27,6± 6,4	33,4±6,9	36,0±8,5	34,3±9,3

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T). <sup>α</sup> Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T). <sup>γ</sup>Diferença entre o grupo DAP – T vs. DC-NT, *n*=5 para o grupo DC-T e *n*=6 para o restante dos grupos. NT: não treinado; T: treinado. As figuras referentes a esta tabela estão no apêndice 8. Fonte: resultado do próprio autor.

Em resumo, para as ratas alimentadas com a dieta controle, o treinamento físico aumentou o tecido ósseo trabecular nas vértebras L4-L6, no fêmur proximal e no osso nasal (DC-T>DC-NT). Em relação às ratas alimentadas pela dieta DAP, houve aumento da espessura do osso nasal e do percentual de tecido ósseo trabecular nas vértebras lombares, na metáfise e epífise da tíbia e do fêmur distal, nas vértebras T8-T13 (DAP-NT>DC-NT) e não houve alteração para o úmero. Além disso, a obesidade causou osteopetrose nas vértebras L1-L3, que foi revertida pelo treinamento físico. Para os animais alimentados pela dieta de alta palatabilidade, o

exercício físico não alterou o percentual de osso trabéculas nas vértebras L4-L6, nas vértebras torácicas, no osso nasal, na metáfise da tíbia e do fêmur distal (DAP-T=DAP-NT). Entretanto, o treinamento físico aumentou o percentual de osso trabecular do fêmur proximal (DAP-T>DAP-NT) – TABELAS 7 e 8.

TABELA 7: Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios em ratas alimentadas pela dieta controle ou dieta de alta palatabilidade

<b>Sítio ósseo</b>	<b>DC-T (DC-NT vs. DC-T)</b>	<b>DAP-T (DAP-NT vs. DAP-T)</b>
Vértebras L1-L3	Não altera	Diminui*
Vértebras L4-L6	Aumenta	Não altera
Vértebras T1-T7	Não altera	Não altera
Vértebras T8-T13	Não altera	Não altera
Fêmur proximal	Aumenta	Não altera
Osso nasal	Aumenta	Não altera
Metáfise da tíbia	Não altera	Não altera
Epífise da tíbia	Não altera	Não altera
Metáfise do fêmur distal	Não altera	Não altera
Epífise do fêmur distal	Não altera	Não altera
Metáfise do úmero	Não altera	Não altera
Epífise do úmero	Não altera	Não altera

\*Sítio que o treinamento físico reverteu a osteopetrose (DAP-T=DC-NT e DC-T). DC-T: dieta controle treinado. DAP-T: dieta de alta palatabilidade e não treinado.

TABELA 8: Efeito da dieta de alta palatabilidade sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios em ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade e não treinadas

<b>Sítio ósseo</b>	<b>DAP-NT (DAP-NT vs. DC-NT)</b>
Vértebras L1-L3	Aumenta*
Vértebras L4-L6	Aumenta
Vértebras T1-T7	Não altera
Vértebras T8-T13	Aumenta
Fêmur proximal	Não altera
Osso nasal	Aumenta
Metáfise da tíbia	Aumenta
Epífise da tíbia	Aumenta
Metáfise do fêmur distal	Aumenta
Epífise do fêmur distal	Aumenta
Metáfise do úmero	Não altera
Epífise do úmero	Não altera

\*Sítio com indução de osteopetrose.

## 2.6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que ingestão de uma dieta de alta palatabilidade aumenta a massa corporal, a adiposidade, a concentração sérica de leptina e a inflamação do tecido adiposo, além de induzir a uma condição de intolerância à glicose e resistência à insulina. Assim, essas respostas induzidas pela dieta resultaram na obesidade dos animais, o que influenciou tanto a quantidade de tecido ósseo trabecular em todo o esqueleto, como as suas características, pois causou osteopetrose de maneira sítio-dependente. Apesar do treinamento físico não ter alterado a adiposidade dos animais, bem como a massa corporal, as variáveis séricas e as citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo, o treinamento aumentou o percentual de tecido ósseo trabecular nas vértebras L4-L6, no fêmur proximal e a espessura do osso nasal das ratas DC-T e reverteu a osteopetrose nas vértebras lombares L1-L3 do grupo DAP-T.

A dieta de alta palatabilidade utilizada neste estudo tem sido empregada como um modelo de indução de obesidade em ratos, o que é corroborado por estudos do nosso grupo, que mostraram que esta dieta induziu o aumento da massa corporal, da adiposidade e das concentrações plasmáticas de triglicérides, leptina e insulina (LIMA *et al.*, 2008; BARCELLOS, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012). O aumento da adiposidade causado pela dieta de alta palatabilidade parece ser influenciado pela maior ingestão alimentar (APÊNDICE 9); entretanto, é possível especular os efeitos da composição da dieta sobre as respostas metabólicas, já que os nutrientes podem atuar sistemicamente como sinalizadores celulares (OLIVEIRA *et al.*, 2012; MULLER e KERSTEN, 2003). Essa hipótese é corroborada pelos dados que mostram a maior quantidade de sacarose presente na dieta de palatabilidade, em relação à ração controle (TABELA 3). A dieta com maior quantidade de sacarose pode promover maior ativação de enzimas lipogênicas devido maior ativação do ChREBP (proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato) e ainda maior resposta inflamatória e resistência à insulina (SCHENK *et al.*, 2008; RUTLEDGE e ADELI, 2007; UYEDA e REPA, 2006; ISHII *et al.*, 2004; IRITANI *et al.*, 1992). Além disso, HAO *et al.* (2012) destaca que a maior quantidade de sacarose na dieta determina

um maior índice glicêmico, o que resulta em aumento da concentração de glicose sanguínea e insulina pós-prandial, o que favorece o armazenamento de gordura. Logo, é possível sugerir que a diferença na composição do carboidrato presente na ração de alta palatabilidade, associado à maior ingestão alimentar, contribuiu para que os animais que a ingeriram apresentassem aumento da adiposidade e do índice HOMA, bem como maiores concentrações de leptina, triglicérides e de citocinas pró-inflamatórias quando comparados àqueles submetidos à dieta controle (GRÁFICO 1A, TABELA 5, APÊNDICE 6 e 9).

É conhecido que a expansão dos adipócitos leva à inflamação crônica de baixo grau e contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina, da dislipidemia e da obesidade (AHIMA, 2011; SUN *et al*; 2011). Uma consequência da hipertrofia dos adipócitos é a hipóxia, com subsequente aumento da migração de macrófagos para o tecido adiposo, que liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF-alfa e a IL-6, fatores conhecidos por ativarem vias intracelulares que promovem resistência à insulina (SCHENK *et al*; 2008). Essas respostas parecem explicar por que, neste estudo, os animais alimentados com dieta de alta palatabilidade apresentaram maior índice HOMA e maior concentração de insulina para a mesma quantidade de glicose sérica (GRÁFICO 1A e TABELA 5). Como as concentrações teciduais de TNF- alfa e IL-6 também foram maiores, é possível que essas citocinas tenham contribuído para a resistência à insulina observada nesses animais.

O treinamento físico não promoveu alteração na adiposidade, na massa corporal ou nos parâmetros metabólicos e hormonais avaliados neste estudo, tanto nos animais alimentados pela dieta controle, como nas ratas que ingeriram a dieta de alta palatabilidade. Roedores são muito utilizados pela literatura como modelos de animais para a pesquisa na área biológica. Na maior parte dos estudos, estes são abrigados sob condições de laboratório, mantendo-se sedentários, com acesso livre e ilimitado ao alimento. Quando comparados aos ratos que se exercitam ou que comem menos, estes animais confinados são obesos, hiperalimentados e com anormalidades metabólicas e endócrinas, tais como resistência à insulina e dislipidemia (MARTIN *et al.*, 2010). No grupo DC-T observou-se que mesmo com a realização do treinamento físico, a ingestão alimentar foi maior em relação aos

animais DC–NT. Além disso, esta variável foi maior em ambos os grupos alimentados com a dieta de alta palatabilidade em relação ao grupo DC-NT, independente do treinamento físico (APÊNDICE 9). A redução da ingestão alimentar ou o fornecimento de alimento de maneira intermitente, ao invés de contínua, altera significativamente estes parâmetros em ratos e camundongos (MARTIN *et al.*, 2010). Considerando que os animais durante o processo evolutivo, além de precisarem se exercitar para obter o alimento, o suprimento alimentar não ocorria de maneira *ad libitum*, é possível especular que se o treinamento físico do presente estudo fosse realizado associado a um fornecimento intermitente e menor de ração, a adiposidade, a massa corporal e os parâmetros metabólicos avaliados poderiam ter sido alterados. Além disso, destaca-se que tais modificações são dependentes da intensidade e duração do treinamento físico, logo pode ser que a realização de um exercício com maior carga de treinamento poderia ter alterado alguns dos parâmetros avaliados.

Neste trabalho, a avaliação dos efeitos da obesidade e do treinamento sobre o tecido ósseo foi realizada sobre o tecido ósseo trabecular. Este tecido por apresentar uma maior relação entre volume e superfície, quando comparado ao osso cortical, é apontado como possuidor de uma maior atividade metabólica e sensibilidade – o que o torna mais susceptível aos efeitos da obesidade e do treinamento físico e, portanto, mais sensível para a avaliação dos efeitos desses tratamentos (COMPSTON, 2001). Neste estudo, a dieta de alta palatabilidade alterou o tecido ósseo trabecular do esqueleto axial e apendicular de maneira sítio-dependente. Na coluna lombar, na coluna torácica, no fêmur distal (epífise e metáfise), na tíbia (epífise e metáfise) e no osso nasal os animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maiores percentuais de osso trabecular em relação aos seus controles (GRÁFICO 2A, 2B, TABELA 6 e APÊNDICE 8). Nas vértebras lombares L1-L3, além da maior quantidade de tecido ósseo trabecular, foram observadas características de osteopetrose. Esta patologia é definida como uma doença metabólica generalizada causada pela redução na reabsorção ou aumento na aposição óssea (SERAKIDES, 2011). Assim, há um desequilíbrio em favor da formação de osso, sendo que na macroscopia é observado aumento da DMO, da radiopacidade e da resistência óssea (SERAKIDES, 2011). Em animais

domésticos, a causa mais freqüente é o hipercalcitoninismo devido ao aumento da ingestão de cálcio. Para manter a isocalcemia, o processo de reabsorção óssea é retardado pela calcitonina, o que resulta em maior quantidade de osso (OCARINO, 2004; COUTINHO *et al.*, 2008). Em seres humanos, a osteopetrose tem sido mais associada às alterações genéticas (FATTORE *et al.*, 2008). Outros fatores também podem causar a osteopetrose, tais como alterações da concentração sanguínea de corticóides, hormônios sexuais e mutações genéticas (SERAKIDES, 2011; OCARINO *et al.*; 2008B).

No presente estudo, a ingestão alimentar das ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade foi maior àquela das ratas para as quais foi fornecida a dieta controle (APÊNDICE 9). Entretanto, a ração de alta palatabilidade possui menor quantidade de cálcio e fósforo quando comparada com a ração controle (TABELA 2) – o que foi verificado através de análises quantitativas da presença dos minerais fósforo e cálcio. Apesar dessa diferença, foi verificado que ambas as rações apresentam quantidades de minerais dentro das recomendações do NRC (1995), (*National Research Council - Nutrient Requirements of Laboratory Rat*). Dessa forma, os grupos tratados com a dieta de alta palatabilidade apresentaram menor ingestão desses minerais, quando comparados ao controle, mesmo que a ingestão alimentar total diária tenha sido maior nos grupos DAP (APÊNDICE 9). Além disso, a concentração sérica de cálcio foi similar entre os grupos (APÊNDICE 9). Portanto, a osteopetrose e a maior quantidade de osso trabecular encontrada no esqueleto não ocorreram devido ao excesso da ingestão de cálcio. COUTINHO *et al.* (2008) ressalta que há poucos relatos de casos de osteopetrose na literatura e dessa forma, mais estudos são necessários para que seja possível o aprofundamento da investigação sobre a etiologia da osteopetrose. Sendo assim, sugerimos que a dieta de alta palatabilidade utilizada no presente trabalho, pode representar uma ferramenta para uma padronização de um modelo de estudo dessa patologia em ratos Wistar.

A visão clássica apresentada pela literatura propõe que as mulheres obesas são possuidoras de uma “proteção” contra a osteoporose (REID *et al.*, 1992; DELAET *et al.*, 2005; REID, 2008). Entretanto, os trabalhos estabelecem essa conclusão a partir de resultados de apenas um sitio ósseo. Além disso, os dados são obtidos a partir

somente da análise da densitometria óssea, desconsiderando a qualidade do osso. No presente estudo, não houve efeito da dieta de alta palatabilidade sobre a quantidade de trabéculas no fêmur proximal, mas a dieta aumentou o percentual de tecido ósseo trabecular em toda a coluna lombar e torácica, na tíbia, no osso nasal e no fêmur distal. O maior percentual de tecido ósseo encontrada na coluna lombar das ratas obesas foi acompanhada pela presença de características de osteopetrose, observadas através da análise morfológica. A quantidade aumentada de trabéculas ósseas pode comprometer a nutrição dos osteocitos e levar a morte dessas células (OCARINO et al., 200B). Assim, sugerimos que para melhor elucidar a relação entre tecido ósseo e obesidade é necessária a avaliação de diferentes sítios ósseos, bem como parece ser fundamental o emprego de técnicas tanto para a quantificação do tecido ósseo trabecular - como a histomorfometria óssea - quanto para a avaliação da sua morfologia.

ALBALA *et al* (1996) conclui que a obesidade “protege” do desenvolvimento da osteoporose a partir da análise da densitometria óssea da cabeça do fêmur e da coluna lombar em mulheres, porém, a qualidade do osso não foi investigada. No presente trabalho, também foi encontrada maior quantidade de tecido ósseo na coluna lombar das ratas obesas; entretanto, através da análise morfológica foram observadas características de osteopetrose. O tecido ósseo apresentou trabéculas espessas nas extremidades da metáfise e não foi possível distinguir os limites entre o tecido ósseo trabecular e cortical. Houve formação de canais centrais no interior da trabecular mimetizando o canal de Harvers e linhas de cimentação em locais onde o tecido deveria ser do tipo trabecular (FIGURAS 5A e 6). Além disso, a hipertrofia osteoblástica observada sugere que a maior quantidade de osso encontrada ocorreu em função da maior formação óssea (SERAKIDES, 2011).

Dentre os mecanismos que podem auxiliar na compreensão desses resultados, destaca-se a maior massa corporal encontrada nos animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade, pois o impacto mecânico gerado estimula a formação óssea através da mecanotransdução e, dessa forma, pode resultar em aumento da densidade mineral óssea (ZHAO *et al*, 2007; 2008; REID,2008). Essa resposta é uma hipótese plausível porque a diferenciação da célula tronco mesenquimal pode

ocorrer em direção à formação de adipócito ou de osteoblasto. Segundo DAVID *et al* (2007) a carga mecânica promove *downregulation* do PPAR $\gamma$  e favorece a diferenciação osteogênica nas células tronco mesenquimais da medula óssea. Entretanto, a espessura do osso nasal das ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade também foi maior (GRÁFICO 3A), apesar desse sítio ser compreendido como aquele sobre o qual há menor impacto mecânico durante a marcha (OCARINO *et al.*, 2007). Dessa forma, sugere-se que fatores hormonais também podem ter contribuído para a maior massa óssea encontrada nos animais do grupo dieta de alta palatabilidade.

Dentre os fatores hormonais que podem influenciar o esqueleto, destacam-se o estrógeno, a insulina, a leptina, os corticóides e as citocinas pró-inflamatórias (ZHAO *et al.*, 2008; REID, 2008). O estrógeno influencia o tecido ósseo tanto de forma direta, por aumentar a formação de osteoblastos, favorecer a mineralização, e inibir a osteoclastogênese, como através de efeitos indiretos no esqueleto, pois inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias que favorecem a reabsorção óssea, tais como o TNF-alfa e IL-6 (WEITZMANN e PACIFICI, 2006). Na obesidade, a maior aromatização dos androgênios em estrógenos que ocorre no tecido adiposo e a inibição causada pela insulina da produção hepática de globulinas transportadoras de hormônios sexuais (SHBG) aumentam a fração livre do estrógeno no sangue, resultando em hiperestrogenismo (MESEGUER *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2008; REID, 2008). Assim, sugere-se que essa maior concentração de estrógeno represente um dos mecanismos para explicar a maior DMO apresentada por indivíduos obesos. Como nos resultados deste trabalho houve hipertrofia dos adipócitos e maior concentração sérica de insulina, sugere-se que tenha ocorrido uma elevação na concentração plasmática do estrógeno das ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade, o que pode ter contribuído para a maior quantidade de trabéculas e maior espessura do osso nasal neste grupo. Apesar da concentração sérica de estrógeno não ter sido mensurada no presente estudo, trabalhos futuros poderão ser conduzidos para a confirmação dessa hipótese.

A relação entre obesidade e tecido ósseo pode também ser modulada pelos hormônios insulina e leptina, já que ambos são positivamente correlacionados com a

DMO e encontram-se em maiores concentrações em indivíduos obesos (REID *et al.*, 1993; STOLK *et al.*, 1996; ROUX *et al.*, 2003; REID, 2008). A concentração sérica de ambos os hormônios foram maiores no grupo DAP-NT em relação aos animais alimentados pela dieta controle, além disso, houve correlação positiva e significativa entre a leptina e a quantidade de tecido ósseo trabecular nas vértebras L1-L3 (TABELA 5 e GRÁFICO 3). Portanto, esses resultados reforçam o papel da insulina e da leptina como hormônios que aumentam a mineralização óssea, a diferenciação osteogênica e, assim, influenciam a quantidade de osso observada nos animais obesos (THOMAS *et al.*; 1999; YANO *et al.*, 1994; GORDELADZE *et al.*; 2002; CORNISH *et al.*, 2002; REID, 2008).

Além desses fatores, destaca-se que o tipo de nutriente predominante na dieta possa ter efeitos sobre o esqueleto. Segundo MULLER e KERSTEN (2003), os nutrientes podem atuar com sinalizadores nas células e exercer efeitos na expressão de genes e produção de proteínas. LORINCZ *et al* (2010) encontraram que a ingestão de uma dieta rica em lipídeos e sacarose reduziu a espessura cortical e a resistência do osso. Entretanto, como a dieta utilizada possuía maiores quantidades de lipídeos e sacarose simultaneamente, não é possível concluir qual dos dois macronutrientes determinou esta resposta. Como FERREIRA *et al* (2010) mostraram que carboidratos e lipídeos podem modular diferentemente as respostas metabólicas e hormonais, é necessário distinguir os efeitos destes macronutrientes.

A tentativa de explicar a relação entre tecido ósseo e obesidade conduz também aos resultados obtidos com as investigações sobre TNF-alfa, IL-6 e os glicocorticóides. Esses fatores inibem a diferenciação osteogênica e estimulam a reabsorção óssea através da osteoclasia (ZHAO *et al*, 2008; MIGLIACCIO *et. al.*; 2007). Assim, apesar de muitos estudos proporem um efeito anabólico da obesidade sobre o tecido ósseo, esta perspectiva tem sido questionada devido à maior produção de citocinas pró-inflamatórias e de glicocorticóides presentes na obesidade. Como a homeostase do tecido ósseo depende do balanço entre formação e reabsorção, o resultado final no osso será determinado pela interação de fatores anabólicos e catabólicos. No presente estudo, as concentrações teciduais de TNF-alfa e de IL-6 foram maiores nas ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade, entretanto,

concomitantemente, esses animais apresentaram maior quantidade de trabécula óssea em todo o esqueleto. Dessa forma, é possível sugerir que os efeitos dos fatores anabólicos, tais como leptina, insulina e massa corporal preponderaram em relação às ações catabólicas dessas citocinas.

Estratégias atuais para a prevenção do desenvolvimento da osteoporose focam em maximizar o acúmulo de massa óssea durante a vida do indivíduo, especialmente antes da menopausa (IWAMOTO *et al.*, 2005; HAGIHARA *et al.*; 2009). OCARINO *et al* (2009) mostraram que, em ratas, a realização do treinamento físico três meses antes e três meses após ovariectomia foi mais efetiva em prevenir a osteopenia do que a realização do protocolo de treinamento somente após a deficiência hormonal. O efeito do treinamento sobre alguns ossos é insuficiente para prover conclusões sobre a resposta de todo esqueleto ao estímulo físico. Por isso, estudos de diferentes ossos e com metabolismos distintos são fundamentais para o melhor entendimento do efeito anabólico da atividade física.

Os mecanismos pelos quais o treinamento físico aumenta a massa óssea ainda não são completamente elucidados, mas sugere-se que os efeitos podem ocorrer via estímulo direto - através de forças mecânicas que aumentam a diferenciação osteogênica - e via estímulo indireto, por meio de hormônios - como o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) que aumentam durante o exercício e apresentam efeitos anabólicos sobre o tecido ósseo (OCARINO & SERAKIDES, 2006). Nos animais alimentados com a dieta controle, o treinamento físico aumentou a quantidade de tecido ósseo trabecular nas vértebras L4-L6, no fêmur proximal e no osso nasal e não influenciou os outros sítios ósseos avaliados neste trabalho. Para as vértebras lombares e para o fêmur proximal, é possível especular que as forças mecânicas do exercício físico possam ter contribuído para o aumento da formação óssea. Entretanto, fatores hormonais e os efeitos de vibração induzidos pelo exercício físico também podem ter influenciado, já que o osso nasal - um sítio com menor impacto mecânico - também aumentou em espessura com o treinamento físico (OCARINO *et al.*, 2007; OCARINO e SERAKIDES, 2006; OXLUND *et al.*, 2003).

Como demonstrado no gráfico 2A, no grupo DAP–T o treinamento físico reduziu a quantidade de tecido ósseo trabecular nas vértebras L1-L3 em relação ao grupo DAP–NT e não houve diferença em relação aos grupos alimentados pela dieta controle. Além disso, foi constatado que as ratas do grupo DAP–NT apresentaram características patológicas de osteopetrose que não foram observadas nos animais DAP – T. Este resultado evidencia que o treinamento físico reverteu a osteopetrose, que foi desenvolvida como consequência da obesidade, nas vértebras L1-L3 e restaurou o equilíbrio entre aposição e reabsorção óssea. Apesar de não ter sido encontrada diferença de dieta nos parâmetros de treinamento físico avaliados nesta dissertação (tempo de exercício, velocidade máxima e trabalho no último teste progressivo), é possível especular que a eficiência mecânica do animal obeso não treinado seja menor (CHEN *et al.*, 2004). Como os animais são geneticamente programados para se exercitar, é possível que o treinamento físico ‘restaure’ a homeostase do tecido ósseo, o que deixa o animal obeso menos distante do que é o ‘normal’. O treinamento físico restabelece o equilíbrio ósseo com o objetivo de tornar esse animal mais eficiente para se exercitar, já que o osso é cerca de duas vezes mais pesado que os outros tecidos, além de apresentar maior custo energético para o indivíduo. Assim, a redução da massa óssea pode estar associada com menor requerimento energético para os vertebrados se locomoverem (MARTIN, 2007).

Tanto no grupo DAP–NT, quanto no grupo DAP–T os osteoblastos apresentaram-se ativos, com núcleos arredondados e houve presença de hipertrofia osteoblástica. Essas características morfológicas indicam que a redução do percentual de trabécula óssea no grupo DAP–T não ocorreu devido a uma diminuição da formação óssea. No grupo DAP–T os osteócitos apresentaram-se ativos e alojados em lacunas alargadas, indicando que pode ter ocorrido aumento na reabsorção óssea profunda (osteólise osteocítica). Esse processo pode ser influenciado por fatores hormonais, tais como, o hormônio da paratireóide (PTH), glicocorticóides, hormônios sexuais e citocinas. Como as concentrações teciduais da IL-6 e TNF-alfa não foram alteradas pelo treinamento físico, provavelmente esses resultados foram influenciados pelos outros fatores que atuam na reabsorção óssea. O aumento da atividade do eixo hipotálamo – hipófise – adrenal induzido pelo exercício eleva as concentrações plasmáticas de glicocorticóides, que além de estimular a reabsorção

óssea de forma direta, aumentam a liberação de PTH (BOUASSIDA *et. al*, 2006; MIGLIACCIO *et. al.*; 2007).

## **2.7 CONCLUSÕES**

A obesidade aumentou o percentual de tecido ósseo trabecular de forma sítio-dependente. À primeira vista, este resultado parece corroborar a visão clássica da literatura de que “obesidade é benéfica para o osso”. Entretanto, o presente estudo mostrou pela primeira vez, através da análise qualitativa das características ósseas, que essa maior quantidade de trabéculas foi acompanhada de alterações patológicas de osteopetrose nas vértebras lombares.

Nas ratas não obesas, o treinamento físico aumentou a quantidade de trabécula óssea nas vértebras L4-L6, no fêmur proximal e no osso nasal sendo que esse resultado corrobora as recomendações da utilização do exercício físico como estratégia para prevenção da osteoporose. Já nos animais obesos, o presente trabalho mostra de maneira inédita que o treinamento físico reverteu as alterações ósseas induzidas pela obesidade.

### 3 Obesidade altera de forma sítio-dependente o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas

#### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito da ovariectomia sobre o tecido ósseo de ratas obesas. **Métodos:** 24 Ratas *Wistar* com idade de 21 dias foram distribuídas em quatro grupos: 1) Dieta controle (DC) – *sham* (NT); 2) Dieta controle e ovariectomia (OVX); 3) Dieta de alta palatabilidade (DAP) - *sham*; 4) DAP – OVX. Aos dois meses de idade as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral ou cirurgia – *sham* e mantidas por seis meses e dezesseis dias para indução da osteoporose. Os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Na última semana de experimento foi realizado um teste oral de tolerância à glicose e, após cinco dias, foi realizada a eutanásia, a pesagem dos coxins adiposos e a retirada e o armazenamento dos tecidos adiposos e do soro. O esqueleto foi colhido e armazenado em formolaldeído tamponado 10% para análise histomorfométrica do percentual de osso trabecular. As comparações entre os grupos foram realizadas através da ANOVA two way. O nível de significância foi  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** a massa corporal, o peso dos coxins adiposos, a área do tecido adiposo periuterino, as concentrações teciduais de TNF- $\alpha$  e IL-6 e as concentrações séricas de leptina, de insulina e o índice HOMA foram maiores nas ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade. O grupo DAP–OVX apresentou maior concentração de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo periuterino quando comparado com o grupo DAP–SHAM, e o grupo DC–OVX apresentou maiores concentrações teciduais de IL-6 em relação ao grupo DC-SHAM. O percentual de osso trabecular na coluna lombar, na coluna torácica, no fêmur proximal, na metáfise do fêmur distal, na metáfise da tíbia, na metáfise do úmero e a espessura do osso nasal foram menores para todas as ratas ovariectomizadas DC ou DAP quando comparados com os seus respectivos controles da castração (DC–SHAM vs. DC–OVX; DAP–SHAM vs. DAP–OVX). As ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade e ovariectomizadas apresentaram maior percentual de trabécula óssea, quando comparadas com os animais dieta controle e castrados, na coluna lombar, na coluna torácica, na metáfise do fêmur distal e na metáfise da tíbia. Esses animais apresentaram maior espessura do osso nasal em relação às ratas dieta controle. Entretanto, mesmo com a dieta de alta palatabilidade, a ovariectomia induziu a osteoporose nas vértebras L1-L3, metáfise da tíbia proximal, metáfise do fêmur distal, fêmur proximal e vértebras torácicas (DAP-OVX < DC-SHAM). **Conclusão:** independente da dieta, a ovariectomia induziu osteoporose. Entretanto, as ratas obesas apresentaram osteoporose em menor intensidade e extensão em comparação às ratas não obesas.

**Palavras-chave:** obesidade; osteoporose; ovariectomia.

## ABSTRACT

### Chapter 2: Obesity-induced site-dependent alterations in the skeleton of ovariectomized female rats

**Objective:** to investigate the effects of obesity on the skeletal in ovariectomized female rats. **Methods:** female *Wistar* rats (21 days old) were divided into four groups: 1) control diet (C) – *sham* surgery (SHAM); 2) high palatability diet (HP) – SHAM; 3) C – ovariectomy surgery (C-OVX); 4) HP-OVX. The rats received food and water *ad libitum* throughout the experiment. At 2<sup>th</sup> months of age, the rats were submitted to bilateral ovariectomy or *sham*-surgery and were kept during six months to induce osteoporosis. The rats received food and water *ad libitum*. On the last week of the experiment an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed. After five days, the rats were euthanasiated and blood samples, adipose tissue and the skeleton were collected. The skeleton was fixed in 10% buffered formalin to posterior histomorphometry of the trabecular bone. Two-way ANOVA was applied to detect differences between groups. Statistical significance was established at a value of  $p \leq 0,05$ . **Results:** body mass, adiposity, adipocyte area, serum leptin, serum insulin concentrations, HOMA-IR index and the levels of TNF-alpha and IL-6 in adipose tissue were greater for the rats fed HP diet. The concentration of TNF-alpha in adipose tissue was elevated in HP-OVX compared to HP-SHAM. The rats C-OVX had greater concentration of IL-6 in adipose tissue than C-SHAM. The percentage of trabecular bone in lumbar vertebrae, in thoracic vertebrae, in proximal and distal femur, in metaphyseal of tibia and humerus and the thickness of nasal bone were reduced in ovariectomized rats when contrasted to sham-rats irrespective of diet regimen (C-SHAM vs. C-OVX; HP-SHAM vs. HP-OVX). The percentage of trabecular bone was greater in lumbar vertebrae, in thoracic vertebrae, in methapyseal of tibia and distal femur in the obese ovariectomized rats compared to non-obese ovariectomized rats. The group HP-OVX exhibited increased thickness of nasal bone compared to the C-OVX group. However, the ovariectomy induced osteoporosis in lumbar vertebrae (L1-L3), in thoracic vertebrae, in proximal femur, in metaphyseal of the tibia and distal femur (HP-OVX < C-SHAM). **Conclusion:** Irrespective of diet treatment, ovariectomy induced osteoporosis. However, obese rats showed lesser intensive osteoporosis when compared to non-obese rats.

**Key-words:** obesity; osteoporosis; ovariectomy.

### 3.1 INTRODUÇÃO

#### **Tecido ósseo com osteoporose e os hormônios sexuais**

A osteoporose é uma doença metabólica generalizada, caracterizada por menor aposição óssea decorrente de insuficiência osteoblástica (NUNES e NUNES, 1988). Com base em evidências clínicas de que mulheres após a menopausa apresentavam uma redução da concentração sanguínea de estrógeno que correlaciona-se com uma menor DMO e um maior risco de fraturas, em 1940 foi proposto pela primeira vez que a deficiência estrogênica é crítica para o desenvolvimento da osteoporose (RAISZ, 2005). Como os hormônios sexuais regulam a maturação e a preservação do esqueleto em homens e mulheres, tem sido amplamente estudada a influência do hipogonadismo na regulação do tecido ósseo (VENKEN *et. al* , 2008). Para melhor compreensão dos mecanismos que medeiam essa relação, a ovariectomia em roedores tem sido utilizada como modelo de deficiência estrogênica e desenvolvimento da osteoporose (JEE e YAO, 2001).

Os receptores para hormônios sexuais estão presentes nos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, condrócitos e células tronco mesenquimais da medula óssea, o que sugere que estes hormônios modulam o esqueleto através da ligação com estes receptores (VENKEN *et al*, 2008). A menor aquisição óssea durante o crescimento e a redução da formação óssea com a idade são fatores que determinam o desenvolvimento da osteoporose. Ambos os processos são regulados por fatores hormonais, nutricionais, genéticos e ambientais (DOWNEY e SIEGEL, 2006). O estrógeno é um dos estímulos reguladores da formação óssea, pois atua diretamente no tecido ósseo aumentando a formação de osteoblastos, favorecendo a mineralização, inibindo a osteoclastogênese e induzindo a apoptose de osteoclastos. Dentre as evidências experimentais que reiteram essas ações, destaca-se que, quando ovariectomizado, o animal tem seu potencial osteogênico diminuído (OCARINO *et al*, 2008), além de apresentar maior apoptose dos osteócitos, o que é revertido após reposição hormonal (FONSECA *et al*, 2011). O estrógeno apresenta ainda efeitos indiretos no esqueleto, pois inibe a produção de

citocinas pró-inflamatórias que favorecem a reabsorção óssea e estão aumentadas após ovariectomia e na osteoporose, tais como o TNF-alfa e IL-6 (WEITZMANN e PACIFICI, 2006).

### **Relação entre obesidade e osteoporose**

Osteoporose e obesidade são epidemias mundiais que inicialmente eram estudadas como comorbidades distintas. Entretanto, como apresentado anteriormente no capítulo 1 desta dissertação, evidências clínicas, evolutivas e experimentais têm destacado que ambas as doenças compartilham vários aspectos em comum. A associação de todas essas evidências mostra que há uma correção entre o esqueleto, o tecido adiposo e a reprodução (KARSENTY e OURI, 2012). Têm sido propostos mecanismos para explicar essas evidências, tais como a maior formação óssea devido à carga mecânica resultante da massa corporal aumentada, a maior conversão de androgênios em estrógeno pelo tecido adiposo, menores concentrações de SHBG (globulina transportadora dos hormônios sexuais), função anabólica da insulina no osso e a ação das adipocinas secretadas pelo tecido adiposo (ZHAO *et al.*, 2008).

Após a menopausa as gônadas reduzem a secreção dos hormônios sexuais e tecidos extragonadais aumentam a aromatização e, assim, a produção de estrógeno (MESEGUER *et al.*, 2002). Em função da presença da aromatase em diversos tecidos do organismo, tais como nas gônadas, no osso e nos adipócitos, tem sido proposto que o estrógeno apresenta ação parácrina e autócrina nestes órgãos. Com a redução da produção estrogênica após a menopausa, a concentração de estrógeno circulante é derivada principalmente da conversão dos androgênios adrenais através da aromatase, sobretudo no tecido adiposo (VENKEN *et al.*, 2008; MESEGUER *et al.*, 2002). Os adipócitos produzem aromatase e, na obesidade, esta secreção é aumentada devido à hipertrofia destas células (ZHAO *et al.*, 2008; REID, 2008). O estrógeno produzido a partir da aromatização no tecido adiposo representa uma fonte importante deste hormônio no hipogonadismo e sugere-se que esta fonte

represente um dos mecanismos para explicar o menor risco de fraturas encontradas em mulheres obesas (ZHAO *et al*, 2008; REID, 2008).

Existem evidências de que a leptina participa da regulação do apetite, do balanço energético (FRIEDMAN, 2009) e também do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (AHIMA *et al*, 1997). A partir das considerações clínicas e evolutivas discutidas no capítulo 1 desta dissertação, é possível hipotetizar que essa adipocina influencie tanto o tecido adiposo como a regulação da reprodução e do esqueleto. Já foi demonstrado que a leptina sérica é diretamente correlacionada com a densidade mineral óssea em mulheres no período da menopausa (ROUX *et al*, 2003). Estudos experimentais apoiam essa hipótese, pois a administração periférica de leptina atenua a redução da massa óssea após a ovariectomia (BURGUERA *et al*, 2001). Além disso, já foi demonstrado que a leptina inibe a diferenciação adipogênica das células tronco mesenquimais e que esta função está reduzida em indivíduos com osteoporose (AUTUDILLO *et al*, 2008).

Outro mecanismo proposto para explicar a relação entre obesidade e osteoporose é a hiperinsulinemia. Estudos clínicos mostram que a concentração de insulina correlaciona-se positivamente com a DMO (REID, 2008; ZHAO *et al.*, 2008). Segundo esses autores, a insulina aumenta a diferenciação de osteoblastos e inibe a atividade dos osteoclastos, promovendo assim um efeito anabólico no tecido ósseo.

A associação entre marcadores inflamatórios e DMO tem sido estudada no contexto da menopausa. Embora o estrógeno apresente efeitos diretos no tecido ósseo, evidências mostram que suas ações também podem ocorrer através da inibição de citocinas pró-inflamatórias (WEITZMANN e PACIFICI, 2006). Experimentos em humanos e em animais indicam que as citocinas pró-inflamatórias são mediadores da redução da massa óssea que ocorre no hipogonadismo (PFEILSCHIFTER *et al*, 2002). Estudos clínicos reforçam essa visão, pois concentrações elevadas de IL-6, TNF-alfa e Proteína C - Reativa (PCR) são preditores de fraturas e correlacionam-se negativamente com a DMO (DING *et al*, 2009; LENCEL e MAGNE, 2011). Além das células do sistema imune, o tecido adiposo também representa uma fonte de

citocinas pró-inflamatórias na menopausa. Macrófagos presentes nos adipócitos secretam IL-6 e TNF-alfa que, por sua vez, estimulam a osteoclastogênese e inibem a diferenciação osteogênica (LENCEL e MAGNE, 2011; CAO, 2010).

Após a ovariectomia ocorre *upregulation* na secreção do TNF-alfa e este representa um dos possíveis mecanismos que explicam a redução da massa óssea observada nas situações de deficiência estrogênica, já que o estrógeno suprime diretamente sua secreção (ROGGIA *et al*, 2001). Evidências experimentais corroboram essa hipótese, pois a administração de antagonista desta citocina atenua a diminuição da massa óssea após ovariectomia (MUNDY, 2007). Além disso, camundongos que apresentam maior expressão do receptor solúvel de TNF-alfa, um antagonista das ações do TNF-alfa, não tem redução da massa óssea após castração (AMMANN *et al*, 1996). Observam-se estes mesmos efeitos para a IL-6: camundongos *knockout* para IL-6 não apresentaram redução da massa óssea após a ovariectomia (POLI *et al*; 1994). Dessa forma, a redução do estrógeno presente em mulheres na menopausa e em ratas ovariectomizadas pode diretamente induzir a maior produção destas citocinas que possuem função catabólica no tecido ósseo.

Portanto, a obesidade é associada com um quadro de inflamação crônica e tem sido estabelecido que citocinas pró-inflamatórias medeiam a redução da massa óssea presente no hipogonadismo (CAO, 2010). Entretanto, apesar do efeito anabólico que a obesidade exerce sobre o tecido ósseo, tem sido questionado se a inflamação crônica de baixo grau e a concentração elevada de glicocorticóides presentes na obesidade influenciam as alterações no tecido ósseo que ocorrem na osteoporose (CAO, 2010; ZHAO *et al*, 2008).

### **3.2 OBJETIVO**

Verificar o efeito da ovariectomia sobre diferentes sítios ósseos do esqueleto de ratas obesas e sua associação com as adipocinas.

### **HIPÓTESES**

As hipóteses a serem testadas são as seguintes:

Em relação aos efeitos da ovariectomia nos animais com obesidade induzida pela dieta de alta palatabilidade:

$H_0$ : A ovariectomia não altera a quantidade de osso trabecular de ratas obesas.

$H_1$ : A ovariectomia altera a quantidade de osso trabecular de ratas obesas.

### 3.3 MÉTODOS

#### Amostra e descrição dos grupos

Foram utilizadas 24 ratas *Wistar* com a idade de 21 dias, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno (30 x 20 x 19cm) com água e ração *ad libitum* sob as mesmas condições ambientais do experimento descrito no capítulo anterior. A distribuição dos grupos foi realizada conforme descrito abaixo (FIGURA 1).

- Grupo DC-SHAM: Animais alimentados com a dieta controle e submetidos à cirurgia - *sham*;
- Grupo DC-OVX: Animais alimentados com a dieta controle e submetidos à cirurgia de ovariectomia;
- Grupo DAP-SHAM: Animais alimentados com ração de alta palatabilidade e submetidos à cirurgia - *sham*;
- Grupo DAP-OVX: Animais alimentados com ração de alta palatabilidade e submetidos à cirurgia de ovariectomia;

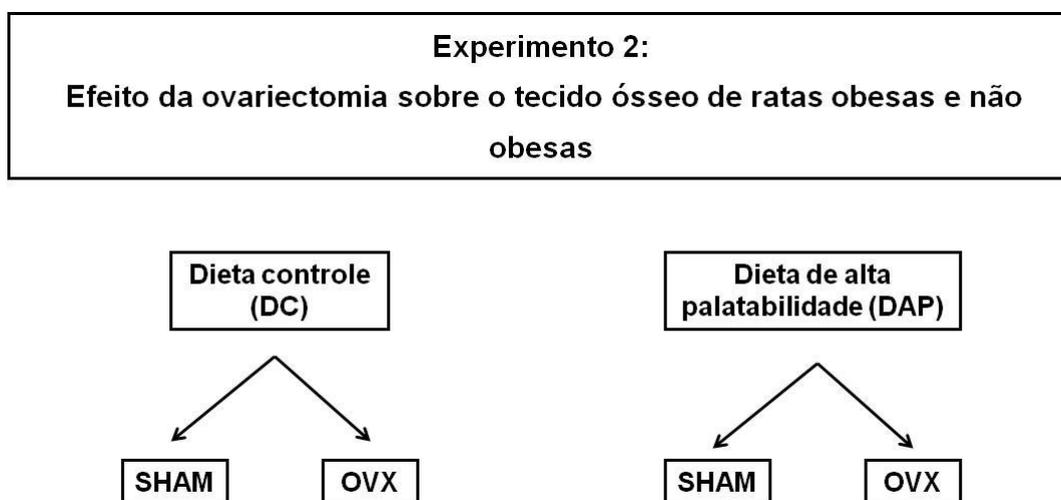


FIGURA 1. Representação esquemática dos grupos experimentais DC: Dieta controle. DAP: Dieta de alta palatabilidade. SHAM: Cirurgia – *sham*. OVX: Cirurgia ovariectomia. Fonte: criação do próprio autor.

## **Delineamento experimental**

Aos 21 dias de idade, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: animais que se alimentaram com ração controle (DC) ou com ração de alta palatabilidade (DAP) e iniciou-se o tratamento com as respectivas dietas. Ao completarem dois meses de idade, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral ou cirurgia - *sham* (controle). Após a castração, os animais foram mantidos no biotério durante seis meses para indução da osteoporose, conforme descrito em OCARINO *et. al* (2007). Segundo esses autores, ratas *Wistar* com dois meses de idade, ao serem ovariectomizadas e mantidas por seis meses apresentam redução da porcentagem de osso trabecular, hipotrofia osteoblástica e osteoporose no esqueleto quando comparados aos animais *sham*. Na última semana de experimento foi realizado um teste oral de tolerância à glicose. A eutanásia foi realizada após jejum noturno, cinco dias depois do TOTG. Todos os animais foram eutanasiados o período da manhã (7h30min-12h). Este delineamento experimental está representado na figura 2. Informações complementares do delineamento experimental e da distribuição dos grupos estão disponíveis no apêndice 1.

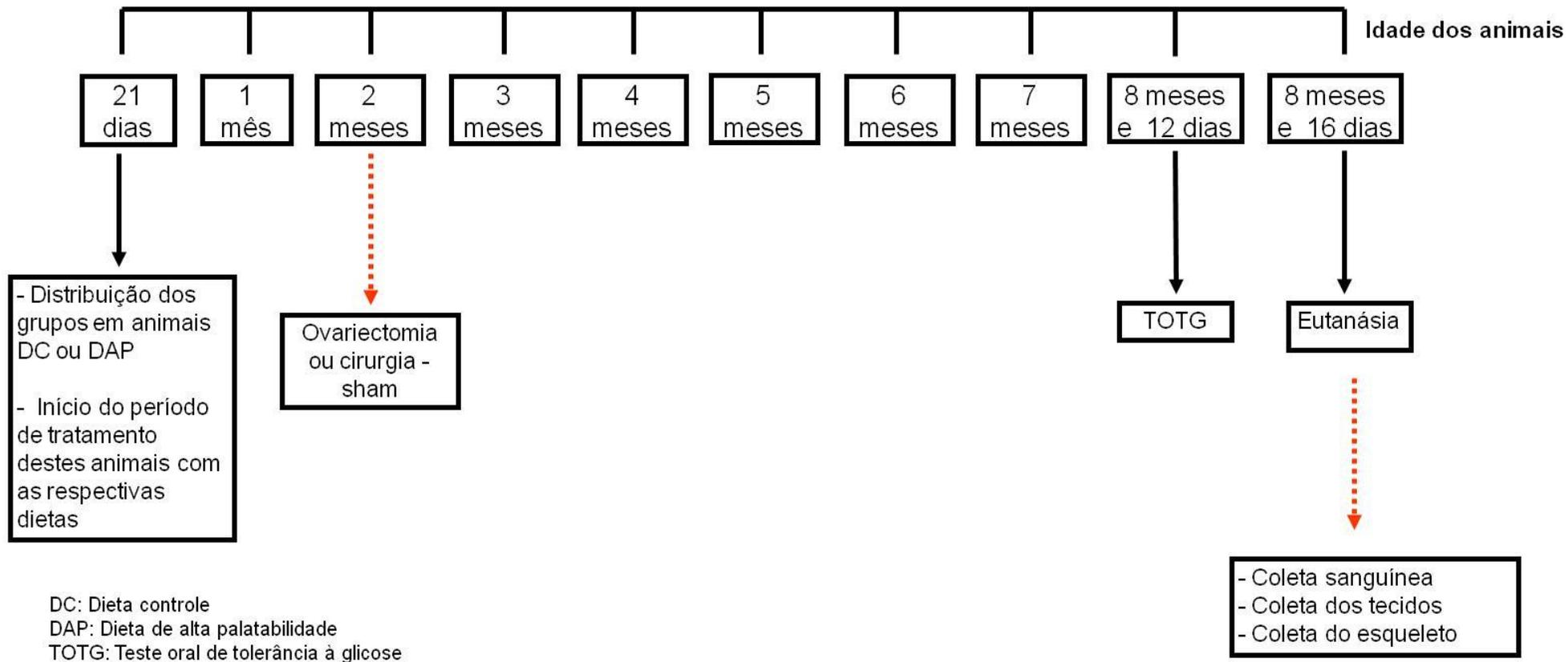


FIGURA 2: Representação esquemática do delineamento experimental. Fonte: resultado do próprio autor.

## **Procedimentos cirúrgicos e indução da osteoporose**

As ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral ou cirurgia - *sham*, sendo anestesiadas com ketamina e xilazina por via intramuscular. Realizou-se uma incisão bilateral de aproximadamente 1 cm na região látero-dorsal. Em seguida, foi feita, em ambos os grupos, a exteriorização das gônadas, sendo que apenas nos animais ovariectomizados foi realizada a extirpação dos ovários. Foi administrado o antibiótico terramicina por gavagem dois dias antes e dois dias após a cirurgia. Na necropsia dos animais, no dia da eutanásia, o sucesso da ovariectomia foi confirmado através da atrofia do útero em todas as ratas castradas.

## **Dieta, teste oral de tolerância a glicose, eutanásia, procedimentos gerais com as amostras sanguíneas e teciduais**

Estes procedimentos foram realizados conforme descrito nos métodos do capítulo 1 desta dissertação (páginas 20-21 e página 23).

## **Variáveis medidas e calculadas**

Todas as variáveis medidas e calculadas deste capítulo (a massa corporal, a coleta dos coxins adiposos, processamento e histomorfometria do tecido adiposo periuterino, o índice de adiposidade, as concentrações séricas de glicose, de leptina e de insulina, o índice HOMA, as concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino e a histomorfometria do tecido ósseo) foram coletadas e avaliadas conforme descrito nos métodos do capítulo 1 dessa dissertação (páginas 25-28).

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). O nível de significância adotado foi  $\alpha \leq 0,05$ . Inicialmente foi verificada a normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. As análises foram realizadas em programas estatísticos Statistica e Sigma Plot 11 – Sigma Stat. Foi utilizada a análise de variância *two way* considerando duas fontes de variação (dieta e ovariectomia).

Em seguida, foi aplicado um teste *post-hoc* de acordo com o número de grupos (tratamentos) e coeficiente de variação (CV) da análise de variância, que foi calculado através da seguinte equação:

$$CV = \frac{\sqrt{QME}}{X \text{ geral}}$$

CV= coeficiente de variação da análise de variância

QME: quadrado médio do erro

X geral: média de todos os dados

Para as variáveis com instabilidade baixa (CV<15%) foi utilizado o teste SNK e para aquelas com instabilidade média e alta (CV=15-30% e CV> que 30%) foi utilizado o Teste Fischer LSD (Teste t) - (SAMPAIO, 2007). Quando necessário, foi realizada a transformação logarítmica para a normalidade dos dados.

### 3.5 RESULTADOS

#### Índice de adiposidade e área dos adipócitos

As ratas alimentadas com a dieta de alta de palatabilidade tanto as submetidas à cirurgia *sham* como as ovariectomizadas apresentaram maior adiposidade quando comparadas com os animais alimentados com a dieta controle (DC- SHAM vs. DAP- SHAM,  $p < 0,001$ ; DC-OVX vs. DAP-OVX,  $p = 0,02$ ) – GRÁFICO 1A. Os tecidos adiposos periuterino e retroperitoneal, todos relativizados pela massa corporal, foram maiores nos grupos dieta de alta palatabilidade e não houve diferença para o tecido adiposo mesentérico (APÊNDICE 11). Ao avaliar o efeito da ovariectomia sobre o índice de adiposidade, não foi encontrada diferença entre os grupos (DC-SHAM vs. DC-OVX,  $p = 0,08$ ; DAP-SHAM vs. DAP-OVX,  $p = 0,6$ ) – GRÁFICO 1A. A ovariectomia não alterou os tecidos adiposos periuterino, retroperitoneal e mesentérico, todos relativizados pela massa corporal (APÊNDICE 11). A análise histológica mostrou uma maior área dos adipócitos tanto para os animais alimentados pela dieta de alta palatabilidade como para aqueles que foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (DC-SHAM vs. DAP- SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX,  $p \leq 0,01$ ; DC-SHAM vs. DC-OVX,  $p = 0,01$  e DAP-SHAM vs. DAP-OVX,  $p = 0,03$ ) – GRÁFICO 1B e FIGURA 3.

#### Massa corporal

As ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maior ganho de massa corporal quando comparados aos seus respectivos controles (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX). Em relação aos efeitos da castração, os animais ovariectomizados apresentaram maior ganho de massa corporal em relação aos animais submetidos à cirurgia – *sham* (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX) – TABELA 1. Esses mesmos resultados foram encontrados para a massa corporal e estão apresentados no apêndice 11.

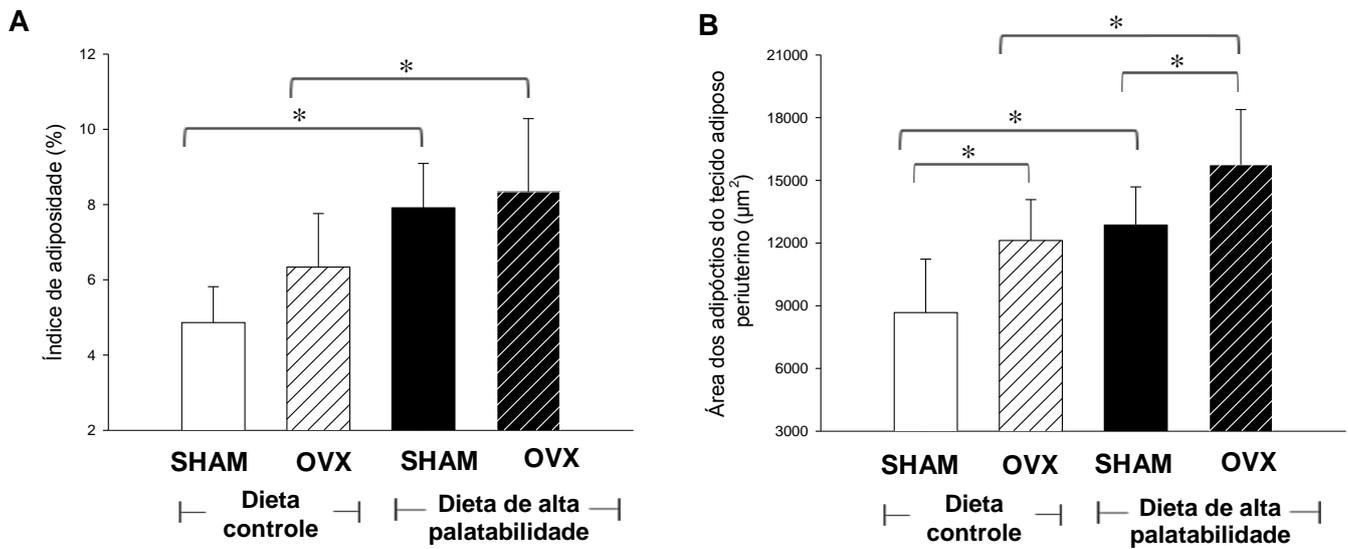


GRÁFICO 1. Índice de adiposidade e área dos adipócitos. A) Índice de adiposidade. B) Área dos adipócitos. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. SHAM: Cirurgia *sham*; OVX: Cirurgia de ovariectomia. Fonte: resultado do próprio autor.

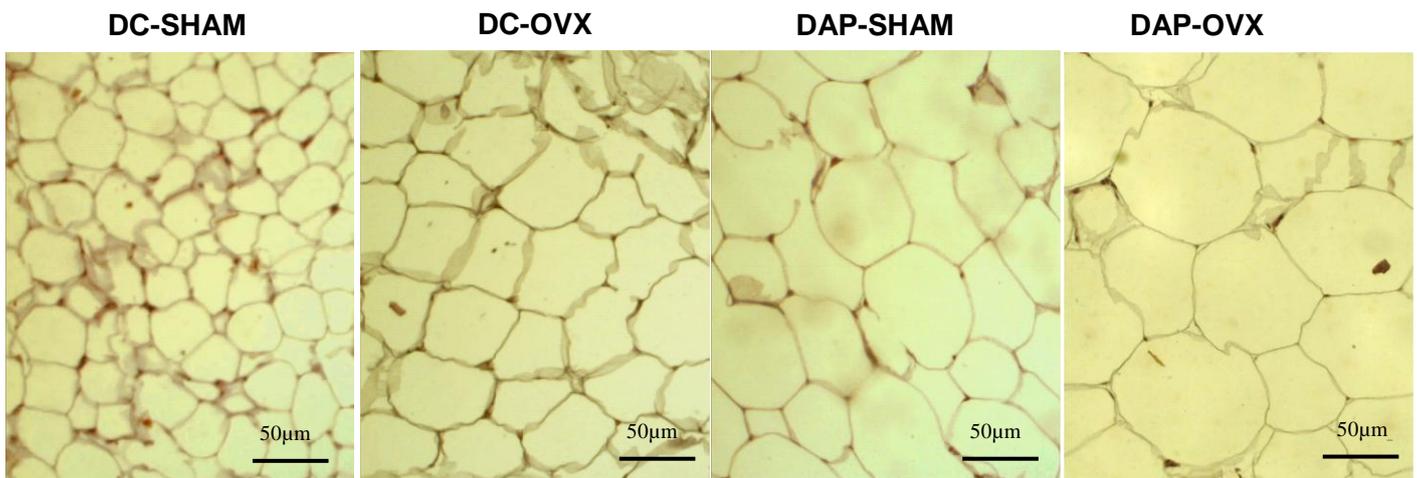


FIGURA 3. Análise histológica de seções do tecido adiposo periuterino. DC-SHAM (Dieta controle e cirurgia SHAM); DC-OVX (Dieta controle e cirurgia de ovariectomia); DAP-SHAM (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia SHAM); DAP-OVX (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia de ovariectomia). Fonte: resultado do próprio autor.

## **Teste oral de tolerância à glicose**

As comparações ao longo do tempo do teste oral de tolerância à glicose estão representadas no apêndice 12. A tabela 1 apresenta a área sob a curva da concentração sanguínea de glicose ao longo do tempo. As ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade apresentaram maiores valores quando comparados com seus respectivos controles (DC- SHAM vs. DAP-SHAM,  $p=0,02$  / DC-OVX vs. DAP-OVX,  $p=0,03$ ). Não houve diferença para a área sob a curva nas comparações referentes ao efeito da castração – TABELA 1.

## **Variáveis séricas, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino**

Os animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maiores concentrações séricas de leptina, insulina e maior índice HOMA quando comparados aos seus controles da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM,  $p<0,001$  para a leptina,  $p=0,01$  para insulina e  $p=0,03$  para o índice HOMA; DC-OVX vs. DAP-OVX,  $p=0,01$  para leptina e  $p<0,001$  para insulina e índice HOMA). Não houve diferença na comparação referente ao efeito da ovariectomia (DC- SHAM vs. DC-OVX,  $p=0,07$  para a leptina,  $p=0,2$  para insulina e  $p=0,3$  / DAP- SHAM vs. DAP-OVX,  $p=0,1$ ,  $p=0,3$  para insulina e índice HOMA) – TABELA 1. Variáveis séricas complementares estão apresentadas no apêndice 11.

As ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maiores concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino em relação aos animais submetidos à dieta controle (DC-SHAM vs. DAP-SHAM,  $p<0,001$ ; DC -OVX vs. DAP-OVX,  $p\leq 0,01$ ). Em relação aos efeitos da ovariectomia, o grupo DAP-OVX apresentou maior concentração de TNF-alfa em relação ao grupo DAP-SHAM, e não houve diferença entre DC-SHAM vs. DC-OVX ( $p=0,07$ ). Para IL-6, as ratas ovariectomizadas alimentadas com a dieta controle apresentaram maiores

concentrações em relação ao grupo DC–SHAM,  $p \leq 0,05$  e não houve diferença na comparação DAP–SHAM vs. DAP–OVX,  $p = 0,3$  - (TABELA 1).

TABELA 1. Ganho de massa corporal, variáveis séricas, área sob a curva do TOTG, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino.

Variáveis	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
$\Delta$ MC (g)	259,8 $\pm$ 21,2	346,6 $\pm$ 45,7 <sup>#</sup>	341,4 $\pm$ 57,8*	436,5 $\pm$ 67,0 <sup>*#</sup>
Área sob a curva da glicose no TOTG (mg.dl <sup>-1</sup> x 120min)	15085 $\pm$ 908,6	16234,5 $\pm$ 1477,7	17852,5 $\pm$ 1519,5*	18077,5 $\pm$ 1543,6*
Glicose (mg.dl <sup>-1</sup> )	56,7 $\pm$ 4,2	60,7 $\pm$ 10,5	63,0 $\pm$ 9,4	61,3 $\pm$ 9,7
Insulina (ng/ml)	1,09 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,6*	2,7 $\pm$ 1,3*
HOMA-IR	3,8 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 2,2	8,3 $\pm$ 2,9*	10,4 $\pm$ 5,3*
Leptina (ng.dl <sup>-1</sup> )	7,4 $\pm$ 4,4	15,3 $\pm$ 8,8	19,7 $\pm$ 4,3*	25,9 $\pm$ 9,5*
TNF-alfa (ng.massa de TAP)	69,5 $\pm$ 14,2	121,0 $\pm$ 45,8	224,5 $\pm$ 112,0*	354,0 $\pm$ 280,0 <sup>*#</sup>
IL-6 (ng.massa de TAP)	134,3 $\pm$ 75,7	226,0 $\pm$ 77,4 <sup>#</sup>	327,8 $\pm$ 73,3*	489,6 $\pm$ 375,2*

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX).

<sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX),  $n=6$  para todos os grupos e comparações, exceto para o grupo DC–OVX na variável área sob a curva do TOTG e para o grupo DC–SHAM para a variável insulina e índice de HOMA. Para as concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino foi necessária a realização da transformação logarítmica para a normalidade dos dados. SHAM: Cirurgia *sham*; OVX: Cirurgia de ovariectomia. TAP: tecido adiposo periuterino. TOTG: teste oral de tolerância a glicose.  $\Delta$ MC: ganho de massa corporal. Fonte: resultado do próprio autor.

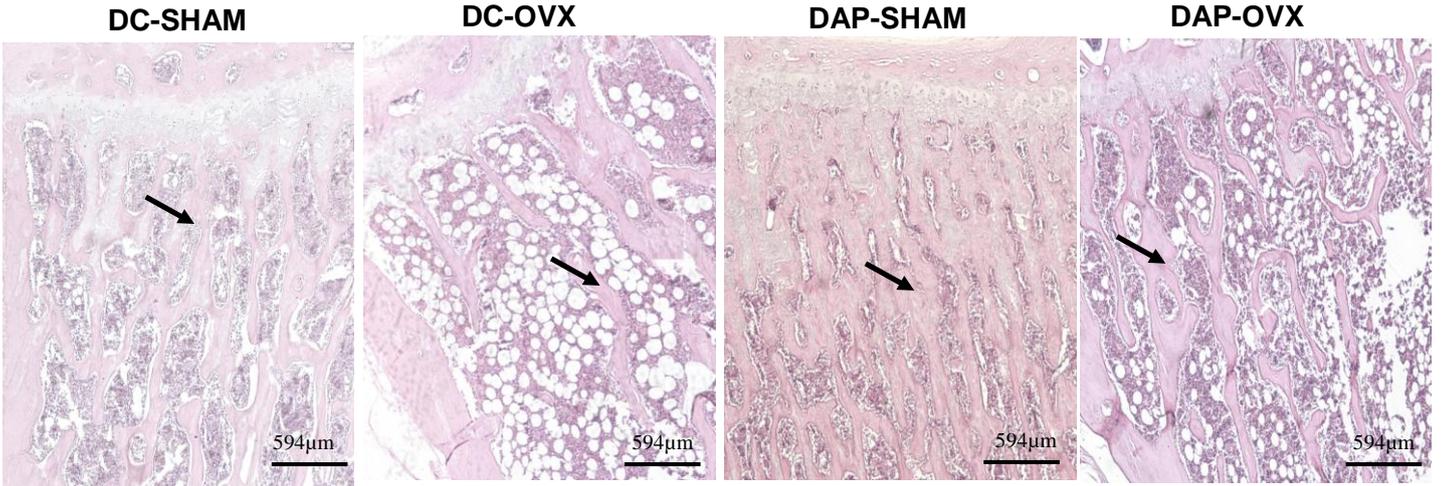
### Histomorfometria do tecido ósseo: Vértebras, osso nasal e ossos longos

Nos gráficos 2A e 2B e nas figuras 4A e 4B estão representados o percentual de trabécula óssea nas vértebras L1-L3 e L4-L6. Os grupos submetidos à cirurgia de ovariectomia apresentaram menores percentuais em relação aos animais *sham* em ambos os sítios ósseos (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX,  $p \leq 0,01$  para todas as comparações). Os animais alimentados com a dieta de alta

palatabilidade apresentaram maior quantidade de osso trabecular em toda a coluna lombar, quando comparados aos seus respectivos controles da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX,  $p \leq 0,001$ ). Entretanto, apesar do grupo DAP-OVX ter apresentado maior percentual de trabécula óssea que o grupo DC-OVX, foi observado na análise morfológica que ambos os grupos ovariectomizados apresentaram características histológicas de osteoporose na coluna lombar. Os osteoblastos apresentaram-se achatados, com núcleos fusiformes na superfície das trabéculas, que estavam delgadas e em menor quantidade tanto no grupo DAP-OVX como no grupo DC-OVX, quando comparados com as ratas DC-SHAM. Houve menor percentual de trabécula óssea em relação aos animais DC-SHAM em ambos os grupos castrados independentemente da dieta (DC-OVX vs. DC-SHAM; DAP-OVX vs. DC-SHAM,  $p < 0,01$  para ambas as comparações) – (GRÁFICO 2A - FIGURA 4A). Entretanto, para as vértebras L4-L6 não houve diferença na comparação DAP-OVX vs. DC-SHAM,  $p = 0,1$  (GRÁFICO 2B – FIGURA 4B).

A espessura do osso nasal, o percentual de trabécula óssea na metáfise da tíbia, no fêmur proximal e na metáfise do fêmur distal foi menor em todos os animais que foram submetidos à cirurgia de ovariectomia quando comparados aos seus controles *sham* (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX) – GRÁFICOS 3A, 3B, 4A e 4B / FIGURAS 5A, 5B, 6A e 6B. Não houve efeito da ovariectomia na epífise da tíbia e na epífise do fêmur distal – TABELA 2. Para o osso nasal, para a metáfise da tíbia, para a metáfise e epífise do fêmur distal estes parâmetros foram maiores nos grupos DAP em relação aos animais DC (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX) – (GRÁFICO 3A, 3B e 4B / FIGURA 5A, 5B e 6B). Apesar desse efeito da dieta, houve osteoporose na metáfise da tíbia e na metáfise do fêmur distal das ratas deste grupo, já que o grupo DAP-OVX apresentou menores percentuais de trabécula óssea em relação ao grupo DC-SHAM (GRÁFICO 3B e 4B / FIGURAS 5B e 6B). Diferentemente, a espessura do osso nasal foi maior para o grupo DAP-OVX quando comparados com o grupo DC-NT – GRÁFICO 3A / FIGURA 5A. Não houve efeito da dieta no fêmur proximal – (GRÁFICO 4A e FIGURA 6A).

**A: Vértebras lombares L1-L3**



**B: Vértebras lombares L4-L6**

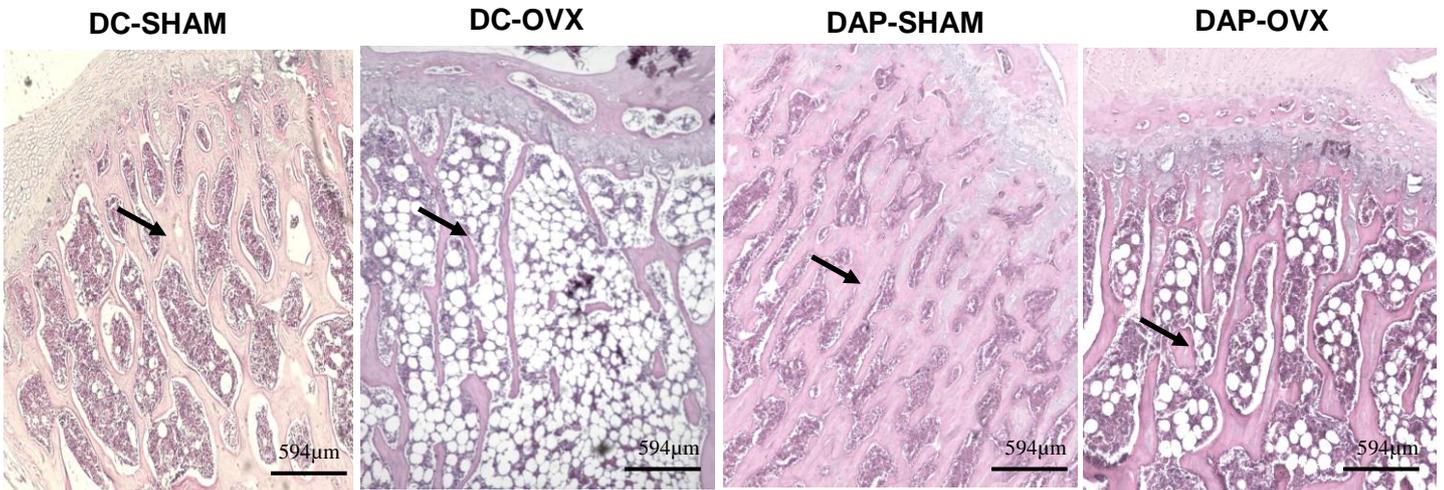


FIGURA 4. Análise histológica de seções das vértebras lombares, barra=594µm. A) Vértebras lombares L1-L3. B) Vértebras lombares L4-L6. DC-SHAM (Dieta controle e cirurgia *sham*); B: DC-OVX (Dieta controle e cirurgia de ovariectomia); C: DAP- SHAM (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia *sham*); D: DAP-OVX (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia de ovariectomia). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

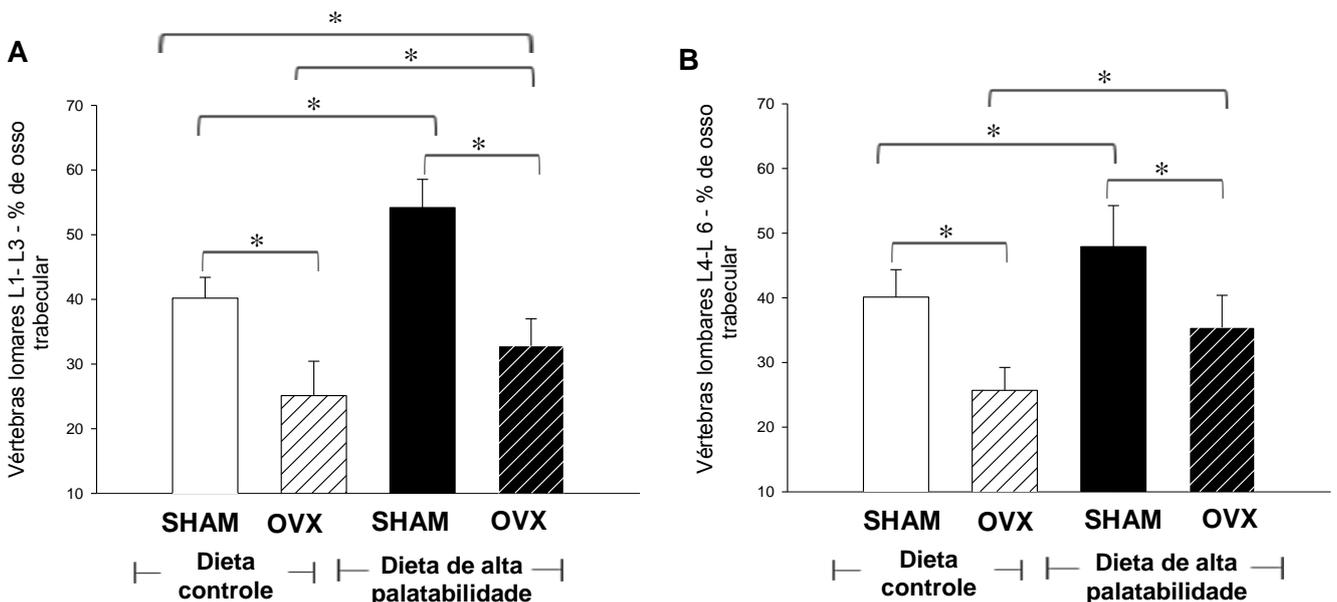
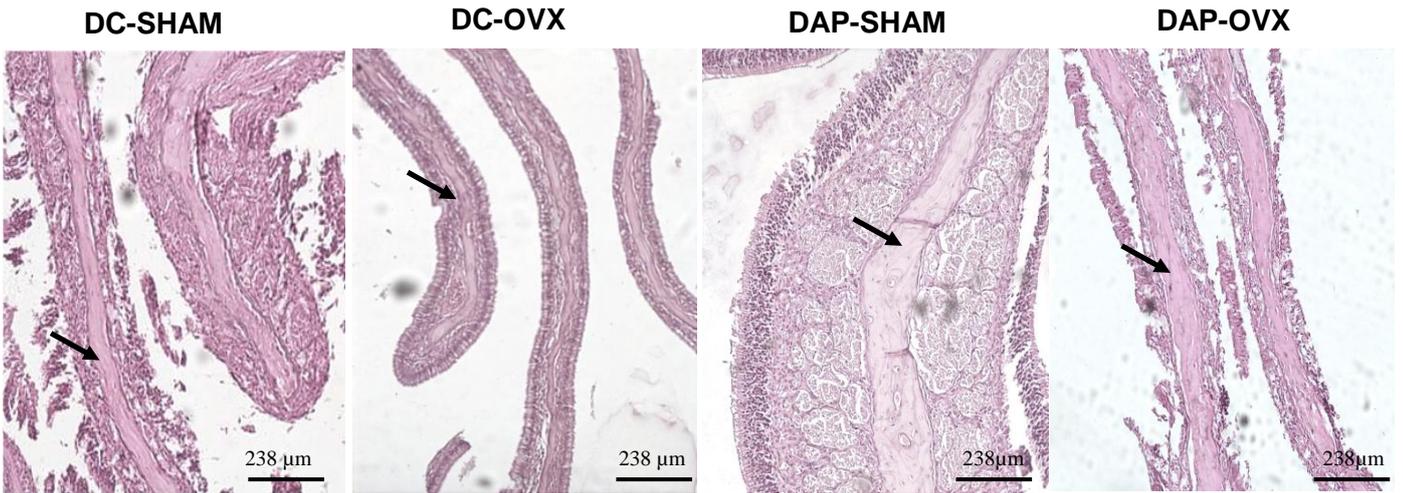


GRÁFICO 2. Análise de histomorfometria das vértebras lombares. A) Percentual de trabécula nas vértebras L1-L3. B) Percentual de trabécula nas vértebras L4-L6. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. SHAM: Cirurgia *sham*; OVX: Cirurgia de ovariectomia. Estes gráficos estão representados em tabelas no apêndice 14. Fonte: resultado do próprio autor.

**A: Osso Nasal**



**B: Metáfise da tíbia proximal**

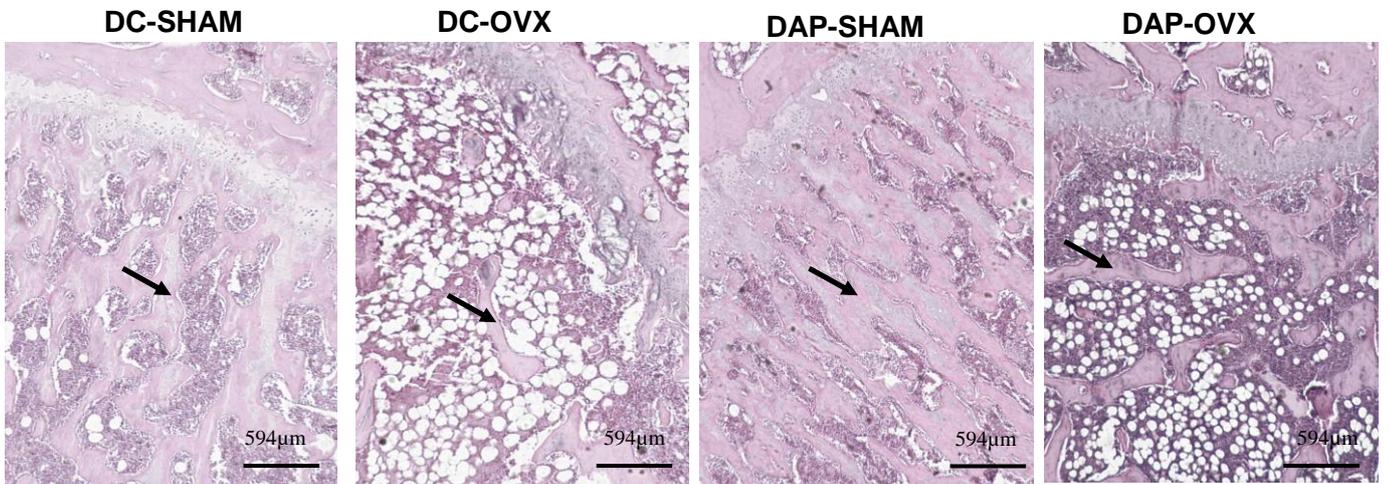


FIGURA 5. Análise histológica de seções do osso nasal e da metáfise da tíbia proximal. A) Osso nasal. B) Metáfise da tíbia proximal. DC - SHAM (Dieta controle e cirurgia *sham*); DC - OVX (Dieta controle e cirurgia de ovariectomia); DAP - SHAM (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia *sham*); DAP - OVX (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia de ovariectomia). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

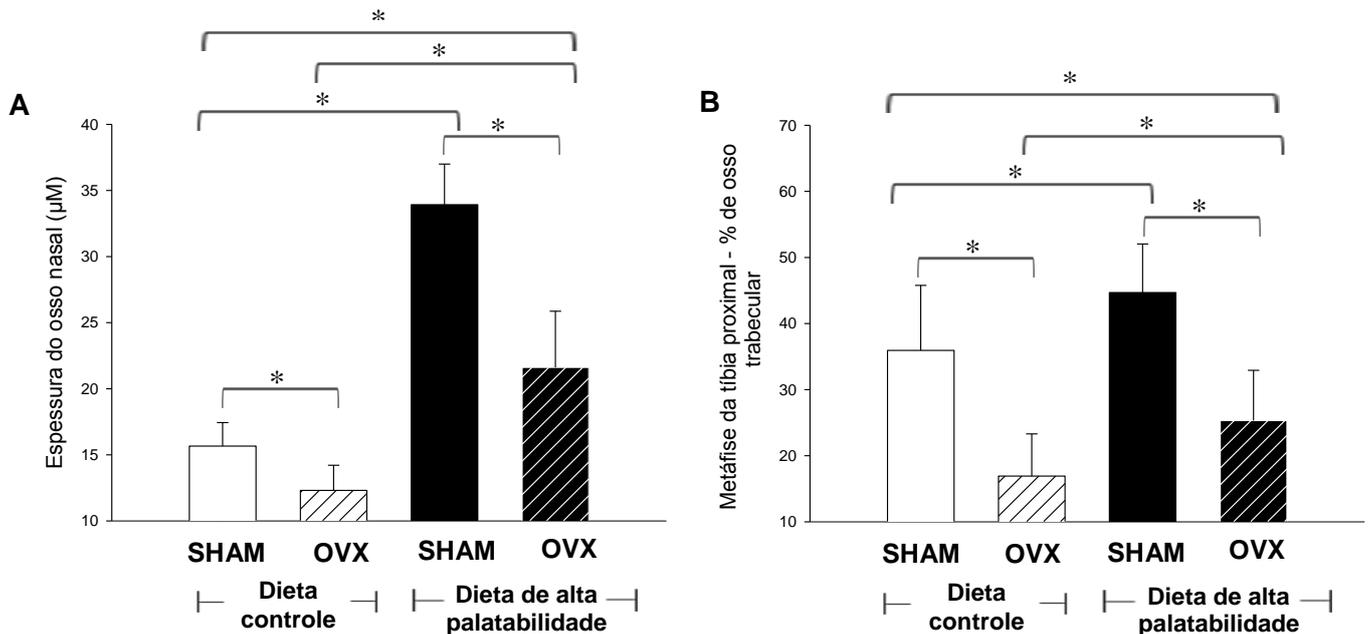
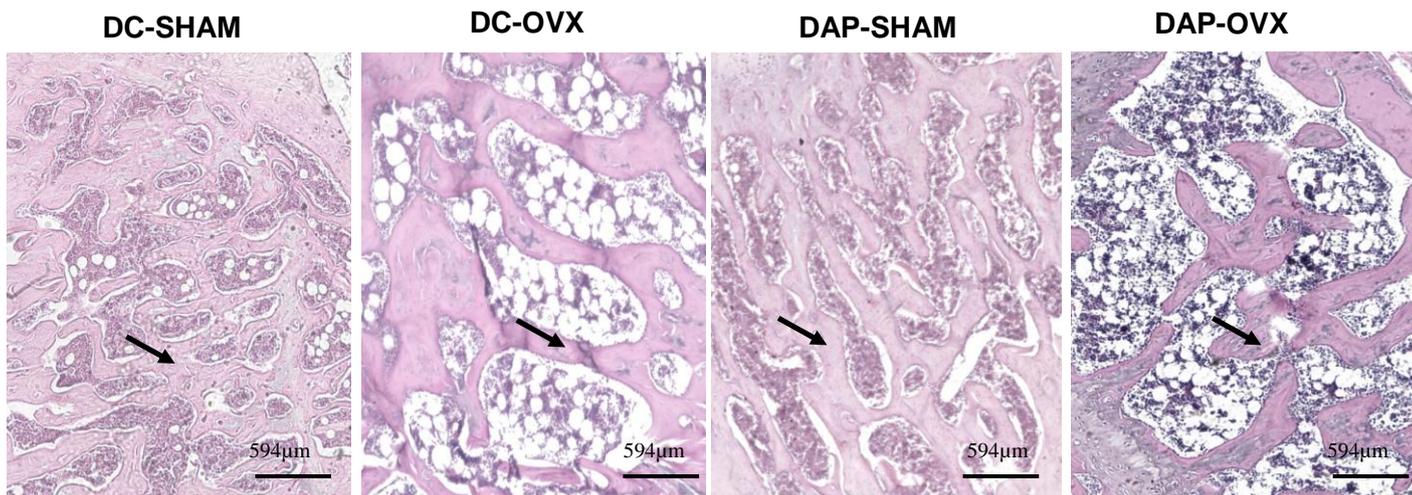


GRÁFICO 3. Análise de histomorfometria do osso nasal e metáfise da tíbia proximal. A) Espessura do osso nasal. B) Percentual de trabécula na metáfise da tíbia proximal. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. SHAM: Cirurgia *sham*; OVX: Cirurgia de ovariectomia. Estes gráficos estão representados em tabelas no apêndice 14. Fonte: resultado do próprio autor.

### A. Fêmur proximal



### B. Metáfise do Fêmur distal

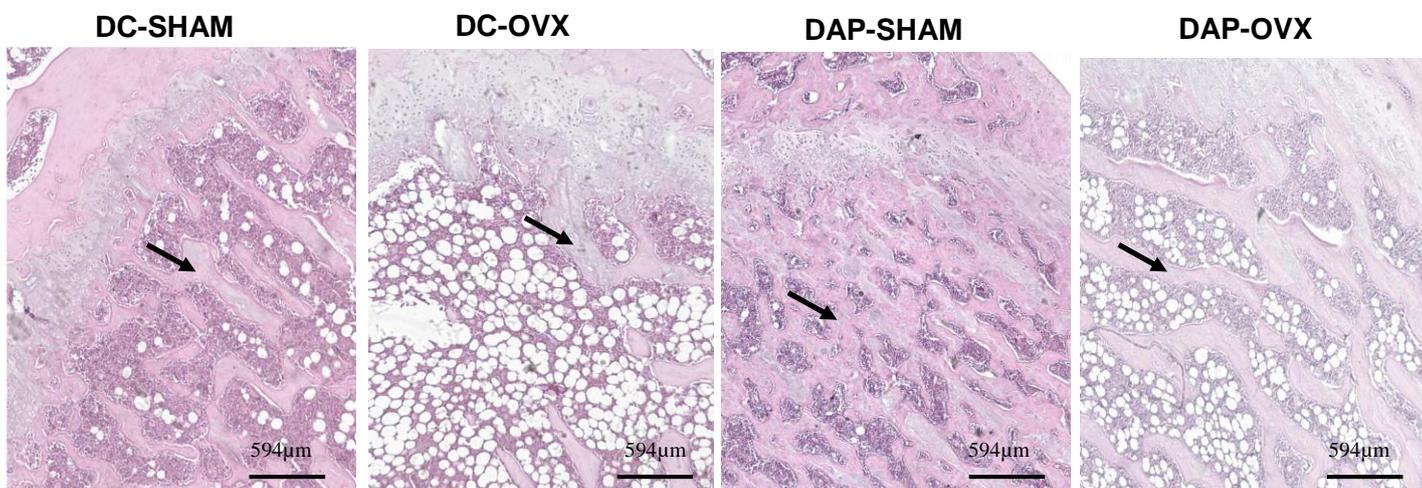


FIGURA 6. Análise histológica de secções do fêmur proximal e da metáfise do fêmur distal. DC-SHAM (Dieta controle e cirurgia sham); DC-OVX (Dieta controle e cirurgia de ovariectomia); DAP-SHAM (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia sham); DAP-OVX (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia de ovariectomia). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

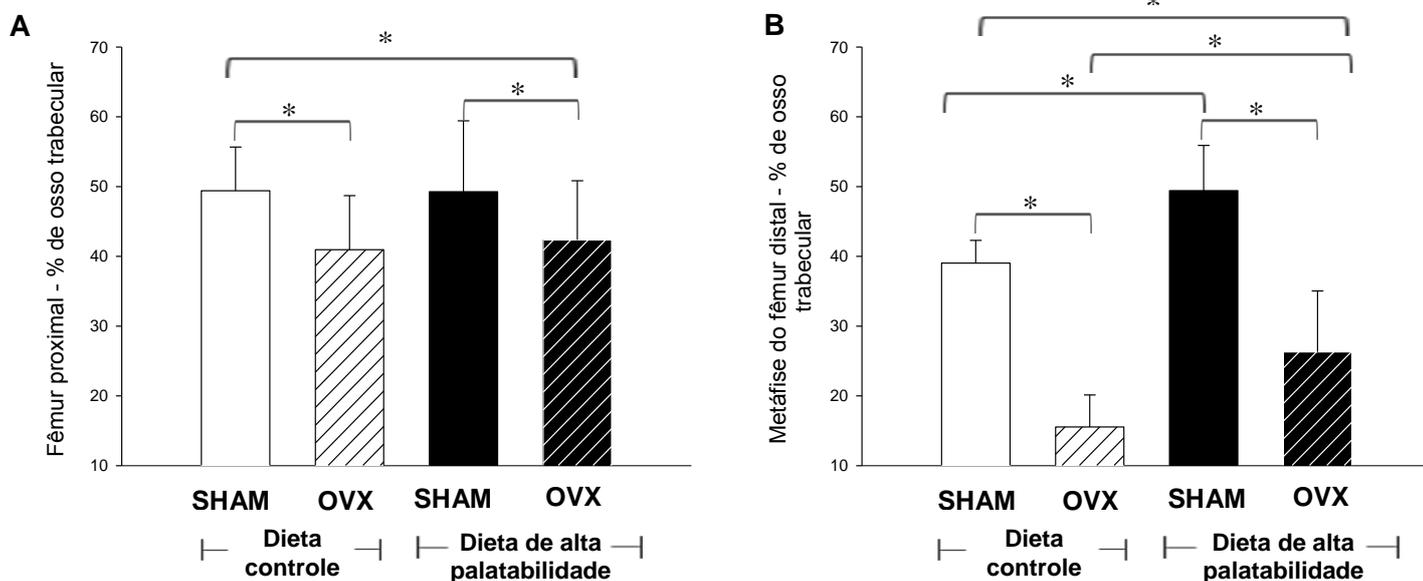


GRÁFICO 4. Análise de histomorfometria do fêmur proximal e da metáfise do fêmur distal. A) Percentual de trabécula no fêmur proximal. B) Percentual de trabécula na metáfise do fêmur distal. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais indicadas,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. SHAM: Cirurgia sham; OVX: Cirurgia de ovariectomia. Estes gráficos estão representados em tabelas no apêndice 14. Fonte: resultado do próprio autor.

Para as vértebras torácicas e metáfise do úmero proximal, todos os animais castrados apresentaram redução da quantidade de trabéculas, quando comparados aos animais cirurgia *sham* (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX) – TABELA 2 e APÊNDICE 15. Para as vértebras torácicas, o grupo DAP-OVX apresentou maiores percentuais de trabécula óssea quando comparado ao grupo castrado alimentado com a dieta controle em toda a coluna (DC-OVX vs. DAP-OVX). Todavia, os animais do grupo DAP-SHAM apresentaram maior quantidade de osso trabecular em relação ao grupo DC-SHAM apenas na T8-T13. Apesar da maior quantidade de osso nas vértebras torácicas do grupo DAP-OVX vs. DC-OVX, o grupo DAP-OVX apresentou características histológicas de osteoporose e menores percentuais de trabécula óssea para toda a coluna torácica quando comparado com o grupo DC-SHAM. Não houve diferença para as comparações referentes ao efeito da dieta na epífise e metáfise do úmero (TABELA 2 e APÊNDICE 13).

TABELA 2. Percentual de trabécula óssea nas vértebras torácicas, epífise dos ossos

Variáveis (%)	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
Vértebras T1-T7	49,1±7,4	31,6±4,9 <sup>#</sup>	45,5±4,1	38,3±3,0 <sup>**# β</sup>
Vértebras T8-T13	42,3±1,8	31,0± 3,9 <sup>#</sup>	52,9±3,5*	36,4±5,1 <sup>**# β</sup>
Epífise do fêmur distal	22,6±3,5	22,5±6,4	32,4±6,1*	40,8±15,2 <sup>* β</sup>
Epífise da tíbia proximal	24,2±6,2	27,4±8,9	36,9±4,4*	35,3±5,3 <sup>β</sup>
Epífise do úmero proximal	28,8±4,1	22,8±6,6	30,1±5,0	24,8±10,0
Metáfise do úmero proximal	27,6±6,4	17,1±5,5 <sup>#</sup>	36,0±8,5	24,1±10,9 <sup>#</sup>

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX).

<sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX), <sup>β</sup> Diferença entre o grupo DAP-OVX vs. DC-SHAM, *n*=6 para todos os grupos e comparações. SHAM: Cirurgia *sham*; OVX: Cirurgia de ovariectomia. TAP: tecido adiposo periuterino. As figuras referentes a esta tabela estão no apêndice 13. Fonte: resultado do próprio autor.

Em resumo, os animais ovariectomizados apresentaram osteoporose no esqueleto axial e apendicular, independentemente da dieta, com exceção da epífise dos ossos longos (DC-OVX < DC-SHAM; DAP-OVX < DAP-SHAM). Animais obesos apresentam maior percentual de osso trabecular nas vértebras lombares, na coluna torácica, na metáfise da tíbia proximal, na metáfise do fêmur distal, no osso nasal, na epífise da tíbia e na epífise do fêmur distal (DAP-OVX>DC-OVX). Entretanto, mesmo com a dieta de alta palatabilidade, a ovariectomia induziu a osteoporose nas vértebras L1-L3, metáfise da tíbia proximal, metáfise do fêmur distal, fêmur proximal e vértebras torácicas (DAP-OVX<DC-SHAM) – TABELA 3.

TABELA 3: Efeito da ovariectomia sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios em ratas alimentadas pela dieta controle ou dieta de alta palatabilidade

Sítio ósseo	DC-OVX (DC-OVX vs. DC-SHAM)	DAP-OVX (DAP-OVX vs. DAP-SHAM)	DAP-OVX (DAP-OVX vs. DC-SHAM)
Vértebras L1-L3	Diminui	Diminui	Menor que DC-SHAM
Vértebras L4-L6	Diminui	Diminui	Não tem diferença
Vértebras T1-T7	Diminui	Diminui	Menor que DC-SHAM
Vértebras T8-T13	Diminui	Diminui	Menor que DC-SHAM
Fêmur proximal	Diminui	Diminui	Menor que DC-SHAM
Osso nasal	Diminui	Diminui	Maior que DC-SHAM
Metáfise da tíbia	Diminui	Diminui	Menor que DC-SHAM
Epífise da tíbia	Não altera	Não altera	Maior que DC-SHAM
Metáfise do fêmur distal	Diminui	Diminui	Menor que DC-SHAM
Epífise do fêmur distal	Não altera	Não altera	Maior que DC-SHAM
Metáfise do úmero	Diminui	Diminui	Menor que DC-SHAM
Epífise do úmero	Não altera	Não altera	Não tem diferença

DC-OVX: dieta controle e ovariectomizado. DAP-OVX: Dieta de alta palatabilidade e ovariectomizado. DC-SHAM: dieta controle e cirurgia *sham*. DAP-SHAM: dieta de alta palatabilidade e cirurgia *sham*. Fonte: resultado do próprio autor.

### 3.7 DISCUSSÃO

A ovariectomia resultou em aumento da massa corporal, da área dos adipócitos, da concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias, sendo estes efeitos potencializados pela associação entre castração e dieta de alta palatabilidade. Os resultados deste trabalho mostram que a ovariectomia induziu à redução da quantidade de trabéculas ósseas e osteoporose em ambos os grupos, de forma sítio-dependente. Apesar do grupo DAP–OVX ter apresentado maiores percentuais de trabécula óssea em relação ao grupo DC–OVX, ambos apresentaram osteoporose e menor quantidade de osso trabecular em relação ao controle *sham*, tanto no esqueleto axial, como apendicular, com exceção do osso nasal, da epífise do fêmur distal e tíbia proximal.

A ovariectomia mimetiza o período após a menopausa, no qual a concentração de estrógeno está reduzida, o que promove efeitos tanto no sistema esquelético, como no metabolismo (JIANG *et al.*, 2008). Camundongos *knockout* para o receptor de estrógeno apresentam maior adiposidade e menor gasto energético que àqueles controles (HEINE *et al.*, 2000). Além disso, evidências têm mostrado que o estrógeno regula a ingestão alimentar e o balanço energético, pois atua de forma anorexígena ao estimular a saciedade e aumentar o gasto calórico (LIANG *et al.*, 2002; GAO *et al.*, 2007; AINSLIE *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2008). Dentre os mecanismos que explicam a obesidade induzida pela ovariectomia, destaca-se a hiperfagia transitória associada com o aumento da expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e com a redução da sensibilidade à leptina no hipotálamo – (AINSLIE *et al.*, 2001), a redução da atividade da enzima lípase hormônio sensível (LPL) – (TOTH *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2008) e a redução da oxidação lipídica (PAQUETTE *et al.*, 2008). Apesar dos efeitos do estrógeno no apetite, tem sido proposto que a hiperfagia induzida pela ovariectomia é apenas transitória e contribui para a maior adiposidade apenas nas primeiras semanas após a cirurgia (JIANG *et al.*, 2008; AINSLIE *et al.*, 2001). A manutenção da maior massa corporal nesses animais parece estar associada a outros mecanismos, tais como a redução da taxa metabólica e a diminuição da oxidação de gordura (JIANG *et al.*, 2001; D'EON, 2005; WOHLERS *et al.*, 2011).

Nossos resultados corroboram os trabalhos anteriores que encontraram indução de obesidade após a castração, pois os animais ovariectomizados tanto os alimentados com a dieta controle, como com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maior área dos adipócitos e maior massa corporal. A comparação entre os grupos DC–OVX vs. DC–SHAM apresentou  $p=0,07-0,08$  para os coxins adiposos, para o índice de adiposidade, para a concentração sérica de leptina e para a concentração tecidual de TNF-alfa (GRÁFICO 1A, TABELA 1 e APÊNDICE 15). Como essas variáveis são consideradas altamente instáveis (CV da análise de variância= 19,1-40,01%), é possível que a quantidade de unidades experimentais utilizadas não tenha sido suficiente para que a variabilidade da medida não influenciasse o resultado. Em relação à ingestão alimentar não houve efeito da ovariectomia (APÊNDICE 15); entretanto, considerando que a hiperfagia induzida pela castração é transitória (2-5 semanas) – (AINSLIE *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2008) este resultado corrobora a literatura, pois a ingestão alimentar foi mensurada nas sete últimas semanas de experimento (20 semanas após a cirurgia). De acordo com os mecanismos já discutidos no capítulo 1 que fazem com que a dieta de alta palatabilidade cause obesidade (aumento da ingestão alimentar e composição da dieta), é possível sugerir que esses efeitos também estiveram presentes e que a interação entre a dieta de alta palatabilidade e a ovariectomia potencializou a obesidade nos animais, que é evidenciado pela maior massa corporal e área dos adipócitos do grupo DAP–OVX vs. DC-OVX (TABELA 1 e GRÁFICO 1B).

Apesar dos animais ovariectomizados apresentarem maior adiposidade e maior massa corporal, não houve diferença na concentração sérica de glicose e de insulina, bem como no índice HOMA e na área sob a curva do TOTG (TABELA 1). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por DAMIRCHI *et al.* (2010) e refletem que a maior adiposidade visceral induzida pela ovariectomia é apenas um dos fatores que determinam a resistência à insulina e que outras alterações parecem ser mais determinantes para o seu desenvolvimento, tais como a composição da dieta ingerida e o acúmulo ectópico de gordura (KIENS, 2006; FERREIRA *et al.*, 2010; SHENK *et al.*, 2008; RUTLEDGE e ADELI, 2007; UYEDA e REPA, 2006; ISHII *et al.*, 2004).

Experimentos tanto na espécie humana, como em roedores, têm mostrado que na menopausa ou após a ovariectomia ocorre aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias que são mediadoras da diminuição da DMO induzida pela deficiência estrogênica (DING *et al.*, 2008; MUNDY, 2007; CAO, 2011; LENCEL e MAGNE, 2011). Em concordância com isso, experimentos conduzem a resultados que mostram que estrógeno possui efeitos diretos nas células do tecido ósseo – como a estimulação da formação óssea - e indiretos, pois reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF-alfa e IL-6 que favorecem a reabsorção óssea e inibem a osteoblastogênese (WEITZMANN e PACIFICI, 2006). A associação do hipogonadismo com a expansão do tecido adiposo presente nos animais castrados aumentou a produção de TNF-alfa no tecido adiposo periuterino (DAP–OVX vs. DAP–SHAM,  $p \leq 0,05$ ) e de IL-6 tecidual (DC–OVX vs. DC–SHAM,  $p \leq 0,05$ ). A comparação entre os grupos DC–OVX vs. DC–SHAM apresentou  $p=0,08$  para o TNF-alfa, logo é possível que o número de unidades experimentais utilizadas neste estudo tenha influenciado este resultado. Além de modificar a DMO por fatores mecânicos, a obesidade também pode modular o *turnover* ósseo em decorrência de respostas endócrinas e da inflamação aumentada no sistema (MUNDY, 2007). Assim, é possível sugerir a concentração no plasma dessas citocinas tenha elevado e, portanto contribuído para a menor quantidade de osso trabecular encontrada nos animais castrados. Entretanto, o grupo DAP–OVX apresentou maior inflamação e, concomitantemente, maior percentual de trabéculas em relação aos animais dieta controle. Logo, sugere-se que, nos animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade, outros fatores anabólicos, tais como o aumento nas concentrações de leptina e de insulina, podem ter sido preponderantes no balanço entre reabsorção e aposição óssea.

A ovariectomia é um modelo de indução de osteoporose bem estabelecido pela literatura (JEE e YAO, 2001; LELOVAS *et al.*, 2008; OCARINO *et al.*, 2007; 2008A). O estrógeno, além de atuar no remodelamento ósseo, pois regula nos osteoblastos a expressão de genes que codificam o colágeno tipo 1 e as proteínas não colagênicas, aumenta a diferenciação osteogênica, a síntese e a mineralização do tecido ósseo (RIBEIRO *et al.*, 2003). Além disso, o estrógeno atua também na manutenção da viabilidade dos osteócitos, na inibição da reabsorção óssea e da

síntese de citocinas pró-inflamatórias (RIBEIRO *et al.*, 2003). Dessa forma, a deficiência estrogênica induzida pela ovariectomia reduz a diferenciação osteogênica e promove a osteoporose em ratas *Wistar* (OCARINO *et al.*, 2008 A), o que está de acordo com o presente trabalho, pois os animais ovariectomizados - independentemente da dieta consumida-apresentaram menor quantidade de trabécula óssea em todo o esqueleto axial e apendicular em comparação aos seus respectivos controles SHAM (DC–SHAM vs. DC–OVX e DAP–SHAM vs. DAP–OVX), com exceção da epífise dos ossos longos.

Tem sido estabelecido pela literatura, com base em estudos epidemiológicos, que indivíduos obesos apresentam maior DMO (REID *et al.*, 1992, 2008; ABALA *et al.*, 1996). Dessas observações, surgiu a clássica premissa de que a obesidade “protege” contra o desenvolvimento da osteoporose. Realmente, nossos resultados mostraram que houve efeito da dieta de alta palatabilidade, pois o grupo DAP–OVX apresentou maior quantidade de trabécula óssea em relação ao grupo DC–OVX, exceto para o úmero e o fêmur proximal. Apesar disso, os animais alimentados pela DAP obtiveram menores percentuais de trabécula óssea em comparação ao grupo DC–SHAM nas vértebras L1-L3, em toda a coluna torácica, na metáfise da tíbia e do fêmur distal, ou seja, houve osteoporose mesmo na presença da obesidade. Assim, a afirmação de que “a obesidade é benéfica para o osso” deve ser analisada com cautela, pois as ratas obesas também apresentaram osteoporose, embora em menor intensidade que as ratas alimentadas pela dieta controle. Considerando as alterações endócrinas, metabólicas e a maior adiposidade nas ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade observadas neste estudo, destaca-se que a presença de osteoporose, embora em menor intensidade que o grupo DC–OVX, é mais dispendiosa para o indivíduo do que benéfica. Além disso, reitera-se que os estudos epidemiológicos que estabelecem essa afirmação não avaliam as características do osso, conforme discutido no capítulo 1.

Diferentemente desses resultados, na epífise do fêmur distal e no osso nasal, o grupo DAP–OVX apresentou maiores percentuais de trabécula óssea em relação ao grupo DC–SHAM. A ovariectomia não influenciou a massa óssea da epífise dos ossos longos (TABELA 2), o que acorda com a literatura que mostra que não há

efeito da castração na epífise dos ossos longos (WESTERLING *et al.*, 1997; JEE e YAO, 2001; LELOVAS *et al.*, 2008). WESTERLING *et al.* (1997) ressalta que a epífise aparenta maior “estresse mecânico” e, por isso, sua massa óssea é mais facilmente preservada após a ovariectomia. Como não houve diferença da castração na epífise em ambos os grupos ovariectomizados, é possível que, neste sítio, o efeito da obesidade (fatores hormonais, tais como a leptina, bem como a maior massa corporal) foi preponderante sobre o balanço entre aposição e reabsorção óssea. Diferentemente, houve efeito da castração na espessura do osso nasal, entretanto, o grupo DAP-OVX apresentou maiores valores em relação a todos os animais dieta controle, até mesmo que os não castrados. É estabelecido pela literatura que o osso nasal é um sítio submetido a um menor impacto mecânico, sujeito apenas a efeitos hormonais e vibratórios (OCARINO *et al.*, 2007; OCARINO e SERAKIDES, 2006; OXLUND *et al.*, 2003). Dessa forma, sugere-se que, no osso nasal, os efeitos hormonais, tais como maior concentração de leptina, insulina e estrógeno tenham contribuído para esse resultado.

Dentre os mecanismos que explicam a maior quantidade de osso trabecular nos animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade e castrados destacam-se a maior concentração de leptina e insulina (TABELA 1). A administração periférica de leptina atenua a redução da massa óssea após a ovariectomia em ratas (BURGUERA *et al.*, 2001). Além disso, já foi demonstrado que a leptina inibe a diferenciação adipogênica e estimula a osteogênica, sendo que esta função está reduzida em indivíduos eutróficos com osteoporose (THOMAS *et al.*, 1999; AUTUDILLO *et al.*, 2008). A concentração sérica de insulina também é associada com a maior DMO, já que este hormônio aumenta a formação óssea (YANO *et al.*, 1994; STOLK *et al.*, 1996). Assim, sugerimos que a maior concentração sérica desses hormônios possa ter contribuído para a maior quantidade de tecido ósseo encontrada nas ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade. A tentativa de explicar esses resultados também conduz para a maior fração livre de estrógeno encontrada em indivíduos obesos, que ocorre devido à hipertrofia dos adipócitos e à diminuição da concentração sérica de SHBG induzida pela insulina, já que este hormônio aumenta a formação óssea (ALBALA *et al.*, 1996). Apesar da

concentração sérica de estrógeno não ter sido mensurada no presente estudo, trabalhos futuros poderão ser conduzidos para a confirmação dessa hipótese.

A maior massa corporal é conhecida por estimular vias de sinalização que aumentam a mecanotransdução e, assim, a diferenciação osteogênica (REID et. al., 1993; 2008). Entretanto, no presente estudo, os animais castrados apresentaram maior massa corporal em relação aos controles *sham* independentemente da dieta (TABELA 1 e APÊNDICE 11). Segundo JIANG *et al.* (2008), o aumento de massa corporal induzido pela ovariectomia em animais alimentados com a dieta controle não influencia o tecido ósseo pois, nessa situação, o efeito do hipogonadismo parece suplantar os demais resultando em redução da formação óssea e, conseqüentemente, na indução da osteoporose. Todavia, como o grupo DAP-OVX apresentou maior massa corporal em relação ao grupo DC-OVX, é possível que para as ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade a maior massa corporal possa ter influenciado nos resultados.

### **3.8 CONCLUSÕES**

Independente da dieta, a ovariectomia induziu a osteoporose. Logo, é necessário ter cautela na afirmação de que a “obesidade é benéfica para o osso”, já que as ratas obesas também apresentaram osteoporose, embora em menor intensidade e extensão que as ratas eutróficas. Além disso, ressaltamos que as alterações endócrinas e metabólicas avaliadas no presente estudo e a adiposidade foram potencializadas na interação entre obesidade e ovariectomia, o que sugere que essa associação pode ser mais dispendiosa para o indivíduo do que benéfica.

## 4 Treinamento físico modifica de forma sítio-dependente o esqueleto de ratas ovariectomizadas obesas e não obesas

### RESUMO

**Objetivo:** Verificar o efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo trabecular de ratas obesas e não obesas com osteoporose. **Métodos:** 36 ratas *Wistar* com idade de 21 dias foram distribuídas em seis grupos: 1) Dieta controle (DC) - cirurgia *sham* (SHAM) - não treinadas (NT); 2) Dieta de alta palatabilidade (DAP)-SHAM-NT; 3) DC - cirurgia de ovariectomia (OVX)-NT; 4) DAP-OVX-NT; 5) DC-OVX- treinadas (T); 6) DAP-OVX- T. Os animais tiveram água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia ou cirurgia *sham* aos dois meses de idade e mantidos por três meses para indução da osteoporose. Após esse período, foi realizado o teste progressivo (TP) para avaliação da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e determinação da intensidade do treinamento. Em seqüência, os animais foram submetidos ao treinamento físico a 60-65% da  $V_{max}$  do TP durante 30 min/ dia por 13 semanas. Na 14ª semana foi realizado um teste oral de tolerância a glicose (TOTG). 72h após o último TP foi realizada a eutanásia, pesagem dos coxins adiposos, retirada e armazenamento do tecido adiposo e do soro. O esqueleto foi colhido e armazenado em formaldeído tamponado 10% para análise histomorfométrica do percentual de osso trabecular. As comparações entre os grupos foram realizadas através do ANOVA two way. O nível de significância foi  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** os animais treinados apresentaram maior tempo de exercício (min), trabalho (kgm) e velocidade máxima ( $\text{km.h}^{-1}$ ). A massa corporal, o peso dos coxins adiposos, a área do tecido adiposo periuterino, a concentração sérica de leptina, de insulina, o índice HOMA e as concentrações teciduais IL-6 foram maiores nas ratas DAP em relação às ratas DC. O treinamento físico não alterou a adiposidade, a concentração sérica de leptina e insulina, o índice HOMA e a concentração tecidual de IL-6. Os animais ovariectomizados apresentaram maior massa corporal e maior área dos adipócitos em relação às ratas submetidas à cirurgia *sham* independente da dieta. A massa corporal e a concentração de TNF-alfa no tecido adiposo periuterino foram menores para o grupo DAP-OVX-T em relação ao DAP-OVX-NT. Para os animais dieta controle e ovariectomizados, o treinamento físico aumentou o percentual de osso trabecular e atenuou as características de osteoporose nas vértebras lombares, no osso nasal, no fêmur proximal e na metáfise da tíbia. O treinamento físico, apesar de não ter alterado o tecido ósseo das ratas DAP-OVX-T em relação às ratas DAP-OVX-NT, atenuou a osteoporose nas vértebras L1-L3, na metáfise da tíbia proximal, no fêmur proximal e nas vértebras T8-T13 (DAP-OVX-T=DC-SHAM-NT; DAP-OVX-NT<DC-SHAM-NT). **Conclusão:** Independente da dieta, o treinamento físico atenuou ou até mesmo reverteu as alterações ósseas induzidas pela osteoporose de forma sítio-dependente. Entretanto, esses efeitos foram menos evidentes nas ratas obesas, sendo que este resultado pode estar associado com a maior inflamação encontrada nesses animais.

**Palavras-chave:** obesidade; osteoporose; ovariectomia; treinamento físico.

## ABSTRACT

### Chapter 3: Physical training-induced site-dependent alterations in the skeleton of obese and non obese female rats with osteoporosis

**Objective:** to investigate the effects of physical training on the skeletal in obese female rats and non-obese female rats with osteoporosis. **Methods:** Female *Wistar* rats (21 days old) were divided into six groups: 1) control diet (C) – *sham* surgery (SHAM)–non trained (NT); 2) high palatability diet (HP)–SHAM -NT; 3) C – ovariectomy surgery (OVX)-NT; 4) HP-OVX-NT; 5) C-OVX-trained (T); 6) HP-OVX-T. The rats received food and water *ad libitum*. At 2 months of age, the rats were submitted to bilateral ovariectomy or *sham*-surgery and during three months the osteoporosis were induced. At 5 months of age, the rats were familiarized with treadmill running and submitted to the first maximal graded exercise testing to evaluate of the maximal velocity ( $V_{max}$ ) and also to obtain the intensity of the physical training. The animals were submitted to physical exercise for 30min a day during 13 weeks. On the 14<sup>th</sup> week an oral glucose tolerance test (OGTT) and the 5<sup>th</sup> maximal graded exercise testing was realized. After 72h, the rats were euthanasiated and blood samples, adipose tissue and the skeleton were collected. The skeleton was fixed in 10% buffered formalin to posterior histomorphometry of the trabecular bone. Two-way ANOVA was applied to detect differences among groups. Statistical significance was established at a value of  $p \leq 0,05$ . **Results:** All exercise-trained rats presented higher exercise time (min), work (kgm) and maximal velocity ( $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Body mass, adiposity, adipocyte area, serum leptin, serum insulin, HOMA-IR index and the levels of TNF-alpha and IL-6 in adipose tissue were greater for the rats fed HP diet. Exercise training did not alter the adiposity, adipocyte area, serum leptin, triglycerides, insulin concentrations, HOMA-IR and the levels of IL-6 in adipose tissue. The ovariectomized rats had greater body mass and adipocyte area compared to the surgery sham rats independent of the diet. Physical training reduced the body mass and the levels of TNF-alpha in adipose tissue in the group HP-OVX-T vs. HP-OVX-NT. Physical training increased the percentage of trabecular bone and attenuated the osteoporosis in the lumbar vertebrae, nasal bone, proximal femur and metaphyseal of tibia to control diet trained rats compared to control diet non trained rats. Exercise training did not alter the trabecular bone in the HP-OVX-T when compared to HP-OVX-NT; however, the physical training attenuated the osteoporosis in lumbar vertebrae, in metaphyseal of tibia, in the proximal femur and in the thoracic vertebrae T8-T13 (HP-OVX-T=C-SHAM-NT; HP-OVX-NT<C-SHAM-NT). **Conclusion:** According the bone site, independent of the diet, the physical training attenuated or reverted the bone alterations induced by osteoporosis. However, these effects were minor evident in obese rats and it is associated with the greater inflammation.

**Key-words:** obesity; osteoporosis; ovariectomy; physical training.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Para compreendermos os mecanismos fundamentais da relação entre atividade física, obesidade e osteoporose é importante retomarmos a reflexão de que, durante o processo evolutivo, os animais necessitavam se exercitar para conseguirem o alimento e fugirem dos predadores – necessidades básicas para garantir a sobrevivência (BELLISARI, 2007; BOOTH e LEES, 2007). Portanto, caso o animal permanecesse em repouso, ele não conseguiria se alimentar. Entretanto, essa relação modificou-se com os avanços tecnológicos, já que hoje é possível o ser humano alimentar-se continuamente sem gastar energia (BELLISARI, 2007; BOOTH e LEES, 2007). Essa mudança de hábitos resultou em um aumento do risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas, tais como a obesidade e a osteoporose. Considerando esse raciocínio evolutivo, juntamente com as evidências experimentais que mostram que o exercício físico pode reverter ou atenuar ambas as patologias, é plausível supor que o treinamento físico possa ser uma intervenção suficiente para fazer com que o sistema atinja uma situação metabólica de ‘normalidade’ – aquela selecionada evolutivamente.

Evidências experimentais reiteram a visão dos efeitos do exercício físico sobre o tecido ósseo. Ratos selecionados por sua alta capacidade aeróbica apresentam intrinsecamente atenuação da redução da massa óssea após a ovariectomia em função da maior atividade osteoblástica presente nesses animais (GOULET *et. al*, 2011). Na avaliação dos efeitos do treinamento físico no tecido ósseo com osteoporose, evidências têm mostrado que o exercício pode prevenir, (OCARINO *et. al*, 2009), atenuar e até mesmo reverter a redução da massa óssea que ocorre como resultado da ovariectomia tanto nos ossos submetidos ao impacto mecânico, como também nos sítios que não apresentam este efeito diretamente, tais como o osso nasal (OCARINO *et. al*, 2007; 2008; 2009). Um dos mecanismos para explicar o efeito anabólico do exercício na massa óssea é a estimulação da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais (OCARINO *et al*, 2008). O efeito indireto da atividade física sobre o osso ocorre devido à atuação de hormônios, tais como o hormônio do crescimento (GH) e produção de citocinas (OCARINO e SERAKIDES, 2006). Ressalta-se que a avaliação do efeito do treinamento físico em

apenas um sítio ósseo é insuficiente para prover conclusões sobre a resposta de todo esqueleto ao estímulo físico. Por isso, estudos de diferentes ossos e que apresentem metabolismos distintos são fundamentais para o melhor entendimento do efeito anabólico da atividade física (OCARINO & SERAKIDES, 2006).

Apesar da relevância de se estudar a relação entre obesidade, osteoporose e exercício físico, há poucos estudos que avaliaram os efeitos do treinamento físico no tecido ósseo com osteoporose de indivíduos com obesidade. Como o exercício físico pode prevenir, atenuar ou até reverter estas patologias (OCARINO et al., 2007; TOUATI et al., 2011) é notável a necessidade do entendimento das respostas ósseas ao exercício em busca da elucidação dos efeitos do treinamento físico sobre a obesidade e osteoporose.

## 4.2 OBJETIVO

Verificar os efeitos do treinamento físico sobre diferentes sítios ósseos do esqueleto de ratas obesas e não obesas e sua associação com as adipocinas.

## HIPÓTESES

Em relação aos efeitos do treinamento físico nos animais ovariectomizados e alimentados com a dieta controle:

H<sub>0</sub>: O treinamento físico não altera o tecido ósseo trabecular de ratas alimentadas com a dieta controle e ovariectomizadas.

H<sub>1</sub>: O treinamento físico altera o tecido ósseo trabecular de ratas alimentadas com a dieta controle e ovariectomizadas.

Em relação aos efeitos do treinamento físico nos animais ovariectomizados e com obesidade induzida pela dieta de alta palatabilidade:

H<sub>0</sub>: O treinamento físico não altera o tecido ósseo trabecular de ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade e ovariectomizadas.

H<sub>1</sub>: O treinamento físico altera o tecido ósseo trabecular de ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade e ovariectomizadas.

## 4.3 MÉTODOS

### Amostra e descrição dos grupos

Foram utilizadas 36 ratas *Wistar*, com idade de 21 dias, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG, que foram aleatoriamente distribuídas em 6 grupos como representado abaixo.

- Grupo DC-SHAM-NT: Animais alimentados com a dieta controle, submetidos à cirurgia *sham* e que não realizaram o treinamento físico;
- Grupo DAP-SHAM-NT: Animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade, submetidos à cirurgia *sham* e que não realizaram o treinamento físico;
- Grupo DC-OVX-NT: Animais alimentados com a dieta controle, ovariectomizados e que não realizaram o treinamento;
- Grupo DC-OVX-T: Animais alimentados com a dieta controle, ovariectomizados e que realizaram o treinamento;
- Grupo DAP-OVX-NT: Animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade, ovariectomizados e que não realizaram o treinamento;
- Grupo DAP-OVX-T: Animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade, ovariectomizados e que realizaram o treinamento;

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno (30 x 20 x 19cm) com água e ração *ad libitum*, sob as mesmas condições ambientais descritas nos capítulos anteriores.

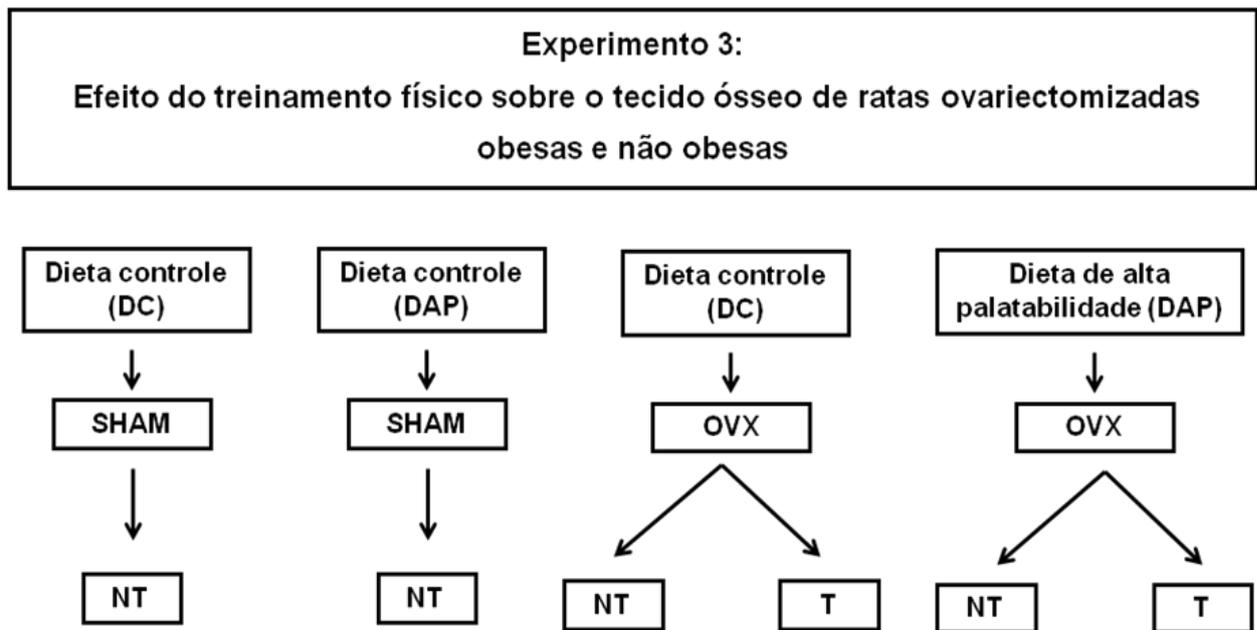


FIGURA 1. Representação esquemática dos grupos experimentais DC: Dieta controle. DAP: Dieta de alta palatabilidade. OVX: cirurgia ovariectomia. SHAM: cirurgia *sham*; NT: não treinado. T: treinado. Fonte: criação do próprio autor.

### **Delineamento experimental**

Ratas com 21 dias de idade foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: animais que se alimentaram com ração controle (DC) ou com ração de alta palatabilidade (DAP) e iniciou-se o tratamento com as respectivas dietas que durou até o final do experimento. Ao completarem dois meses de idade, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Após a castração, os animais foram mantidos no biotério durante três meses, para a indução da osteoporose conforme realizado por OCARINO *et. al.*, (2004; 2007). Segundo esses autores, após três meses de castração em ratas *Wistar* com dois meses de idade, ocorre redução da porcentagem de osso trabecular, hipotrofia osteoblástica e osteoporose no esqueleto, em relação aos animais *sham*. Essas características são intensificadas seis meses após a castração, conforme descrito em OCARINO *et. al* (2004; 2007).

Três meses após a ovariectomia, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: animais que realizaram o treinamento físico (T) ou animais que não

realizaram o treinamento físico (NT). Inicialmente, realizou-se o primeiro teste progressivo (TP) para determinação da intensidade de exercício de cada animal e em seguida, iniciou-se o treinamento físico por treze semanas. No final da quarta, oitava e décima segunda semana de treinamento, realizou-se o teste progressivo para adequação da intensidade de exercício. Setenta e duas horas depois da última sessão de treinamento foi realizado o teste oral de tolerância à glicose. Dois dias posteriores a este procedimento, foi feito o último teste progressivo. Setenta e duas horas após, os animais foram eutanasiados após jejum overnight. Todos os animais foram eutanasiados o período da manhã (7h30min-12h). Este delineamento experimental está representado na figura 2. Informações complementares do delineamento experimental e da distribuição dos grupos estão disponíveis no apêndice 1.

.

### **Procedimentos cirúrgicos e indução da osteoporose**

As ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral ou cirurgia - *sham*, sendo anestesiadas com ketamina e xilazina por via intramuscular. Realizou-se uma incisão bilateral de aproximadamente 1 cm na região látero-dorsal. Em seguida, foi feita, em ambos os grupos, a exteriorização das gônadas, sendo que apenas nos animais ovariectomizados foi realizada a extirpação dos ovários. Foi administrado o antibiótico terramicina por gavagem dois dias antes e dois dias após a cirurgia. Na necropsia dos animais, no dia da eutanásia, o sucesso da ovariectomia foi confirmado através da atrofia do útero em todas as ratas castradas.

**Dieta, teste oral de tolerância a glicose, familiarização ao exercício, teste progressivo, descrição do treinamento físico, eutanásia, procedimentos gerais com as amostras sanguíneas e teciduais**

Estes procedimentos foram realizados conforme descrito nos métodos do capítulo 1 desta dissertação (páginas 20-24).

**Variáveis medidas e calculadas**

Todas as variáveis medidas e calculadas deste capítulo (a massa corporal, a colheita dos coxins adiposos, o processamento e a histomorfometria do tecido adiposo periuterino, o índice de adiposidade, as concentrações séricas de glicose, de leptina, de insulina, o índice HOMA, as concentrações teciduais de TNF-alfa e IL-6 e a histomorfometria do tecido ósseo) foram coletadas e avaliadas conforme descrito nos métodos do capítulo 1 desta dissertação (páginas 25-28).

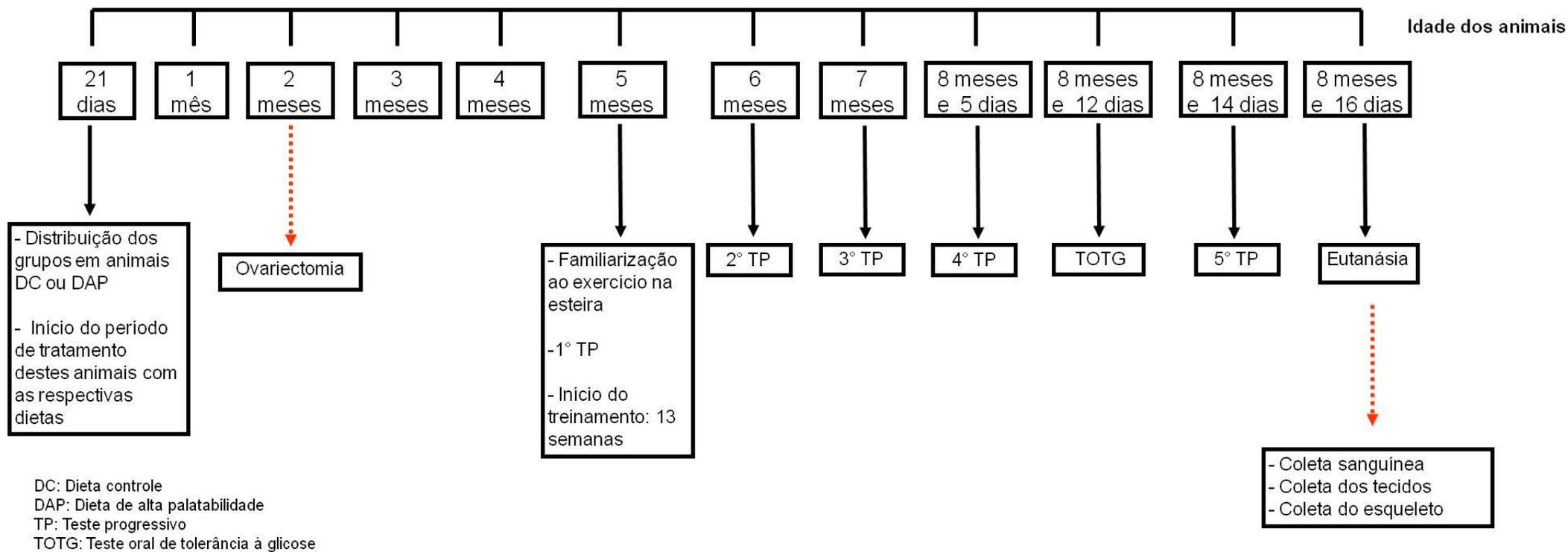


FIGURA 2. Representação esquemática do delineamento experimental. Fonte: resultado do próprio autor.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). O nível de significância adotado foi  $\alpha \leq 0,05$ . Inicialmente, foi verificada a normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. As análises foram realizadas em programas estatísticos Statistica e Sigma Plot 11 – Sigma Stat. Foi utilizada a análise de variância *three way* considerando três fontes de variação (dieta, treinamento e ovariectomia).

Em seguida, foi aplicado um teste *post-hoc* de acordo com o número de grupos (tratamentos) e coeficiente de variação (CV) da análise de variância, que foi calculado através da seguinte equação:

$$CV = \frac{\sqrt{QME}}{X \text{ geral}}$$

CV= coeficiente de variação da análise de variância

QME: quadrado médio do erro

X geral: média de todos os dados

Para as variáveis com instabilidade baixa (CV<15%) foi utilizado o teste SNK e para aquelas com instabilidade média e alta (CV=15-30% e CV> que 30%) foi utilizado o Teste Fischer LSD (Teste t) - (SAMPAIO, 2007). Quando necessário, foi realizada a transformação logarítmica para a normalidade dos dados.

## 4.5 RESULTADOS

### Variáveis de treinamento

Antes do início do treinamento físico, o TE, a  $V_{max}$  e o trabalho não foram diferentes entre os grupos. Na avaliação após as 13 semanas de treinamento físico, os grupos DC-OVX-T e DAP-OVX-T apresentaram maiores valores para todos os parâmetros de treinamento em relação aos seus respectivos controles (TABELA 1).

TABELA 1: Parâmetros de treinamento antes e depois do treinamento físico

Parâmetros	Dieta controle			Dieta de alta palatabilidade		
	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T
TE pré-treinamento (min)	22,1±3,1	17,8±3,7	19,4±4,0	18,1± 3,8	17,4 ±2,5	18,6±2,4
TE pós-treinamento (min)	17,8±3,0	16,3±2,8	27,8±3,6 <sup>α</sup>	15,2±4,2	14,9±3,2	24,5±7,1 <sup>α</sup>
Velocidade máxima pré-treinamento (km. h <sup>-1</sup> )	1,5±0,2	1,3±0,2	1,4±0,2	1,3±0,2	1,2±0,1	1,3±0,1
Velocidade máxima pós-treinamento (km. h <sup>-1</sup> )	1,3±0,1	1,2±0,2	2,0±0,2 <sup>α</sup>	1,2±0,2	1,1±0,2	1,8±0,4 <sup>α</sup>
Trabalho pré-treinamento (kgm)	7,9±3,6	8,1±3,1	9,5±2,8	8,3± 2,55	8,8±2,6	8,3±2,7
Trabalho pós-treinamento(kgm)	5,9±0,9	7,4±2,3	18,5±5,5 <sup>α</sup>	6,9±1,1	7,7±3,0	18,0±8,1 <sup>α</sup>

<sup>α</sup> Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T),  $n= 5$  para o grupo DC-OVX-NT no pós-treinamento e  $n=6$  para todos os outros grupos e comparações. Para a variável velocidade máxima e TE pré-treinamento foi realizada a transformação logarítmica para normalidade dos dados. SHAM: animais submetidos à cirurgia *sham*. OVX: animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. NT: animais não treinados. T: animais treinados. TE: tempo de exercício. Fonte: resultado do próprio autor.

### Índice de adiposidade e área dos adipócitos

O índice de adiposidade não foi diferente entre os grupos que realizaram o treinamento físico (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T,

$p=0,1-0,9$  – GRÁFICO 1A). Entretanto, as ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maiores percentuais em relação às controles (DC–OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC- OVX-T- vs. DAP-OVX-T) – TABELA 1. O tecido adiposo periuterino (TAP) e retroperitoneal (TAR) também foram maiores nesses grupos e o tecido adiposo mesentérico (TAM) não foi diferente (APÊNDICE 16). A análise morfológica mostrou resultados similares à adiposidade. Não houve diferença para o treinamento físico (DC–OVX-NT vs. DC–OVX–T; DAP-OVX-NT vs. DAP–OVX-T,  $p=0,4 - 0,6$ ) – (GRÁFICO 1B e FIGURA 3). A área dos adipócitos foi maior nas ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade em relação aos grupos DC (DC–OVX-NT vs. DAP –OVX– NT; DC–OVX-T- vs. DAP–OVX-T).

### **Massa corporal**

O treinamento físico não alterou o ganho de massa corporal dos animais DC-OVX-NT vs. DC–OVX-T. Entretanto, o grupo DAP– OVX-NT apresentou maiores valores em relação ao grupo DAP–OVX-T – TABELA 2. Não houve diferença ao comparar os animais DAP-OVX-T vs. DC-OVX–T. Conforme evidenciado no experimento 2, as ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade e não treinadas apresentaram maior ganho de massa corporal. A ovariectomia resultou em uma maior  $\Delta$ MC quando comparado aos animais submetidos à cirurgia *sham* – (TABELA 2). Esses mesmos resultados foram encontrados para a massa corporal e estão apresentados no apêndice 16.

### **Teste oral de tolerância à glicose**

Para a área sob a curva da concentração sanguínea de glicose, não houve diferença para o treinamento físico (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T,  $p=0,7$ ; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T,  $p=0,3$ ), bem como na comparação entre DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T,  $p=0,1$  - TABELA 2. As comparações ao longo do tempo estão apresentadas no apêndice 17.

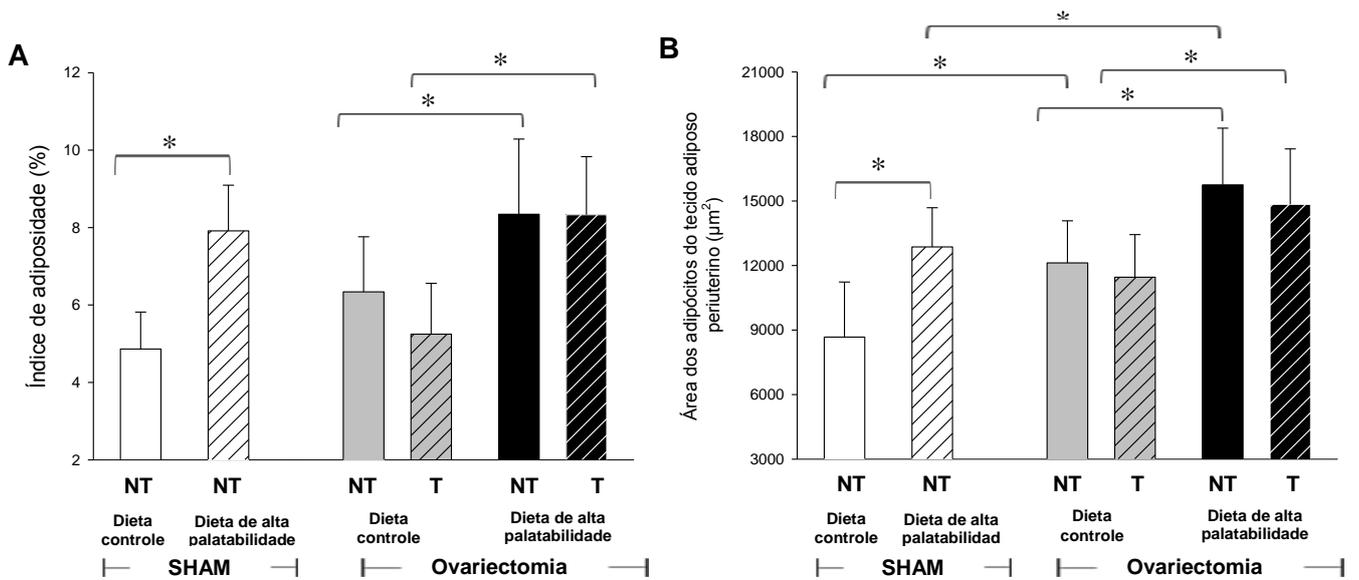


GRÁFICO 1. Índice de adiposidade e área dos adipócitos. A) Índice de adiposidade. B) Área dos adipócitos. \* Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais, n= 6 para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Fonte: resultado do próprio autor.

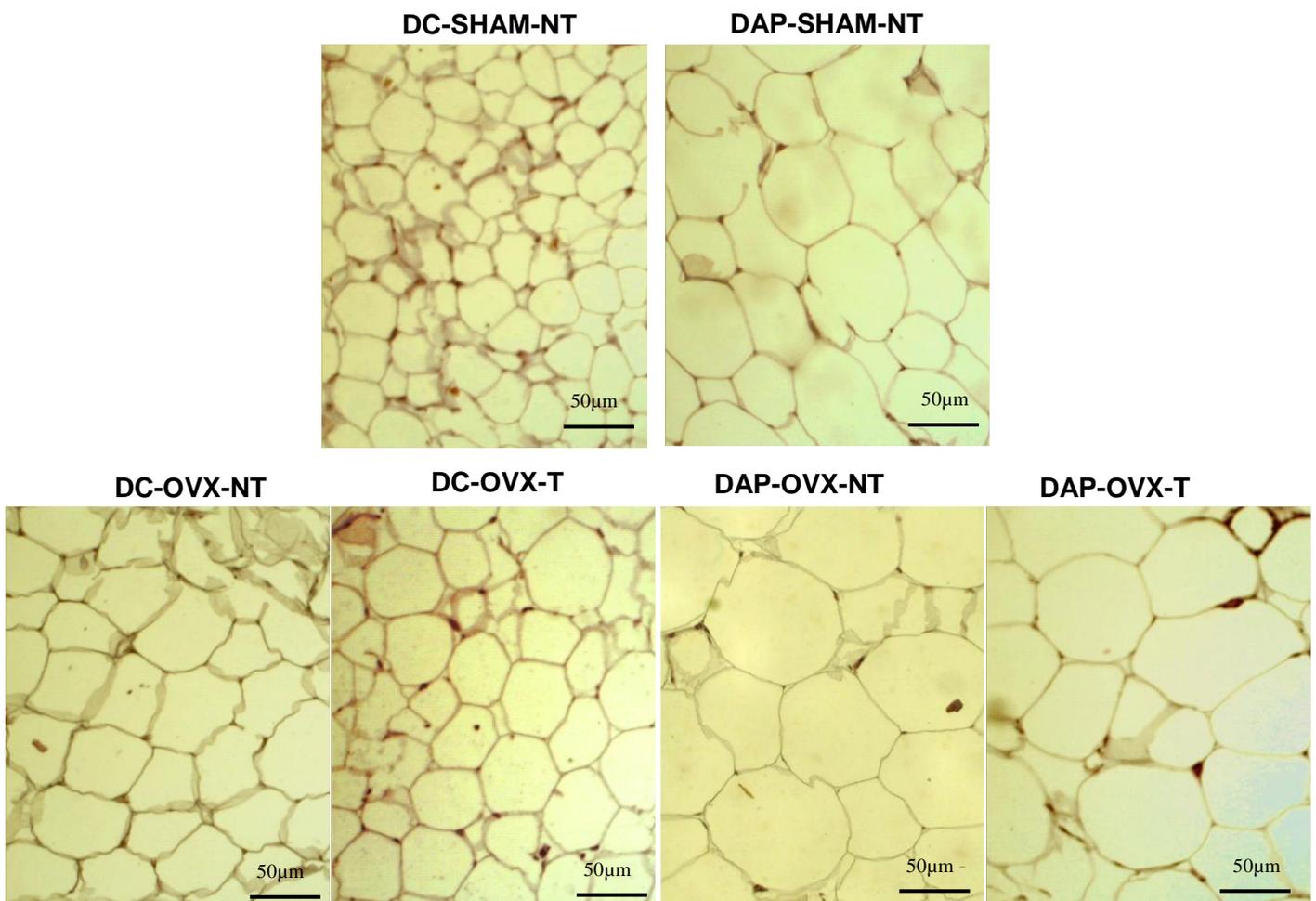


FIGURA 3. Análise histológica de seções do tecido adiposo peritúterno. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia sham e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta de alta palatabilidade, cirurgia sham e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). Fonte: resultado do próprio autor.

## **Variáveis séricas, área sob a curva do TOTG, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino**

Não houve diferença para a concentração sérica de leptina, insulina e índice HOMA entre os grupos que realizaram o treinamento físico e seus respectivos controles (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T / DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T,  $p=0,3-0,9$ ) - (TABELA 2). Entretanto, a leptina, insulina e o índice HOMA foram maiores em todas as ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade em relação aos animais alimentados pela dieta controle. Não houve diferença em nenhuma das comparações referentes à glicose sérica - (TABELA 2). O TNF-alfa avaliado no tecido adiposo periuterino foi menor no grupo DAP-OVX-T, quando comparado aos animais DAP-OVX-NT ( $p=0,01$ ), entretanto, ambos os grupos apresentaram maiores concentrações em relação ao grupo DC-SHAM-NT. Não houve diferença em relação ao efeito do treinamento para as ratas alimentadas com a dieta controle (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T,  $p=0,7$ ), bem como para as comparações referentes a IL-6 (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T,  $p=0,5$ ; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T,  $p=0,4$ ). As ratas DAP-NT apresentaram maiores concentrações de TNF-alfa e IL-6 (DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT,  $p=0,02$  para TNF-alfa e  $p=0,01$  para IL-6). A concentração de TNF-alfa não foi diferente entre os grupos DAP-OVX-T vs. DC-OVX-T,  $p=0,2$ . A IL-6 dos animais do grupo DAP-OVX-T foi maior que o grupo DC-OVX-T e também em comparação aos animais DC-SHAM-NT - TABELA 2. Variáveis séricas complementares estão apresentadas no apêndice 16.

## **Histomorfometria do tecido ósseo: Vértebras, osso nasal e ossos longos**

Como evidenciado no experimento 2, os animais submetidos à cirurgia de ovariectomia apresentaram menor percentual de trabécula óssea em relação aos animais *sham* em todos os sítios da coluna vertebral, no osso nasal e nos ossos longos (GRÁFICOS 2-7 / FIGURAS 4-9).

TABELA 2. Ganho de massa corporal, variáveis séricas, área sob a curva do TOTG, índice HOMA e concentrações de TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo periuterino

Parâmetros	Dieta controle (DC)			Dieta de alta palatabilidade (DAP)		
	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T
ΔMC (g)	259,8± 21,2	346,6±45,7 <sup>#</sup>	314,0±52,1	341,4± 57,8*	436,5± 67,0 <sup>*#β</sup>	378,0±59,9 <sup>*α</sup>
Área sob a curva da glicose no TOTG (mg.dl <sup>-1</sup> x 120min)	15085±908,6	16234,5±1477,7	15562,5±623,5	17852,5±1519,5*	18077,5±1543,6 <sup>*β</sup>	17250,0±1999,5*
Glicose (mg.dl <sup>-1</sup> )	56,7±4,2	60,2±10,5	50,7±4,6	61,2±8,7	61,3±9,6	66,6±4,2
Insulina (ng/ml)	1,09±0,1	1,2±0,3	1,1±0,1	2,1±0,6*	2,7±1,3 <sup>*β</sup>	2,3±0,7 <sup>*γ</sup>
HOMA-IR	3,8±0,5	4,6±2,2	3,5±0,3	8,3±2,9*	10,4±5,3 <sup>*β</sup>	9,6±3,1 <sup>*γ</sup>
Leptina (ng.dl <sup>-1</sup> )	7,47±4,4	15,3±8,8	13,5±9,2	19,7±4,3*	25,9±9,5 <sup>*β</sup>	28,0±5,3 <sup>*γ</sup>
TNF-alfa (ng.massa de TAP)	69,5±14,2	121,0±45,8	109,3±60,4	224,5±112,0*	354,0±280,0 <sup>*#β</sup>	167,1±80,0 <sup>αγ</sup>
IL-6 (ng.massa de TAP)	134,3±75,7	226,0±77,4 <sup>#</sup>	198,7±66,8	327,8±73,3*	489,6±375,2 <sup>*β</sup>	342,0±66,4 <sup>*γ</sup>

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM-NT vs. DAP-SHAM-NT; DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T). <sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM-NT vs. DC-OVX-NT; DAP-SHAM-NT vs. DAP-OVX-NT). <sup>α</sup> Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T), <sup>β</sup>Diferença entre o grupo DAP-OVX-NT vs. DC-SHAM-NT; <sup>γ</sup>Diferença do grupo DAP-OVX-T vs. DC-SHAM-NT. *n*= 6 para todos os grupos e comparações, exceto para o grupo DC-OVX-NT na variável área sob a curva do TOTG e para o grupo DC-SHAM-NT na variável insulina e índice de HOMA, *n*=5. TAP: tecido adiposo periuterino. SHAM: animais submetidos à cirurgia *sham*. OVX: animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. NT: animais não treinados. T: animais treinados. TAP: tecido adiposo periuterino. TOTG: teste oral de tolerância a glicose. ΔMC: ganho de massa corporal. Para as concentrações de insulina sérica, IL-6 no tecido adiposo periuterino e índice de HOMA foi necessária a realização da transformação logarítmica para a normalidade dos dados. Para as concentrações de TNF-alfa no tecido adiposo periuterino foi realizada a transformação radicial para a normalidade dos dados. Fonte: resultado do próprio autor.

No presente experimento, foi observado que na coluna lombar, as ratas alimentadas com a dieta controle que realizaram o treinamento físico, mesmo que castradas, apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea quando comparado com os animais não treinados ( $p < 0,001$  para L1-L3 e L4-L6) – GRÁFICOS 2 e 3 / FIGURAS 4 e 5. Para L4-L6, o percentual de trabécula óssea do grupo DC-OVX-T assemelhou-se ao grupo DC-SHAM-NT. Diferentemente, nas vértebras L1-L3, o grupo DC-OVX-T apresentou menores percentuais em relação ao DC-SHAM-NT, apesar de ter maior quantidade de trabécula em comparação com o DC-OVX-NT. Não houve diferença para o treinamento físico nas ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade (DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T,  $p = 0,06$  para L1-L3 e  $p = 0,1$  para L4-L6). Apesar disso, nas vértebras L1-L3, o grupo DAP-OVX-T apresentou valores similares ao grupo DC-SHAM-NT, sendo que o grupo DAP-OVX-NT obteve menores percentuais em relação ao DC-SHAM-NT. Os animais DAP-OVX-NT apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea quando comparado DC-OVX-NT. No entanto, o grupo DAP-OVX-NT apresentou características morfológicas de osteoporose e obteve menores percentuais de trabécula óssea em relação ao grupo DC-SHAM-NT para as vértebras L1-L3, e não houve diferença nesta comparação para as vértebras L4-L6 ( $p = 0,2$ ), bem como na comparação entre os grupos DC-OVX-T e DAP-OVX-T – (GRÁFICO 2 e 3 / FIGURAS 4 e 5).

As ratas alimentadas com a dieta controle e que realizaram treinamento físico apresentaram maior espessura do osso nasal, maior percentual de trabécula óssea na metáfise da tíbia e fêmur proximal (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T) – GRÁFICOS 4, 5 e 6 / FIGURAS 6, 7 e 8). Para o osso nasal, o grupo DC-OVX-T obteve maior espessura em relação ao grupo DC-SHAM-NT. Para a metáfise da tíbia e fêmur proximal o treinamento físico reverteu a osteoporose, pois não houve diferença entre DC-OVX-T vs. DC-SHAM-NT. Os animais DAP-OVX-NT não foram diferentes do grupo DAP-OVX-T para a epífise e metáfise da tíbia, bem como, para o fêmur proximal e para o osso nasal. Entretanto, apesar de não ter sido encontrado efeito de treinamento físico, o grupo DAP-OVX-T apresentou maior espessura do osso nasal e maior percentual de trabécula para a epífise da tíbia em relação aos animais DC-SHAM-NT. Não houve diferença para a metáfise da tíbia e para o fêmur proximal nesta comparação.

## Vértebras lombares L1-L3

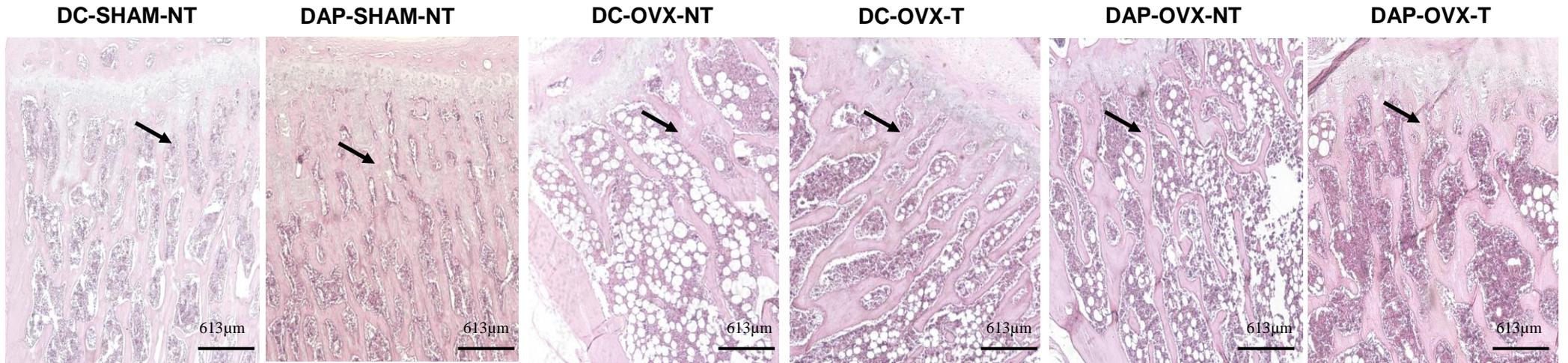


FIGURA 4. Análise histológica de secções das vértebras lombares L1-L3, barra= 613µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

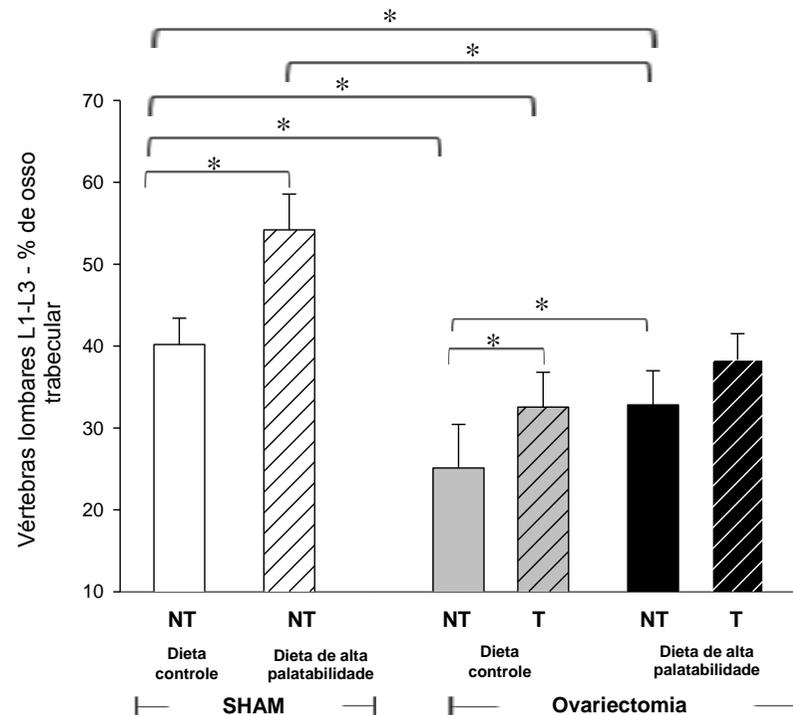


GRÁFICO 2. Análise de histomorfometria das vértebras lombares L1-L3. \*Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Este gráfico está representado em tabela no apêndice 19. Fonte: resultado do próprio autor.

## Vértebras lombares L4-L6

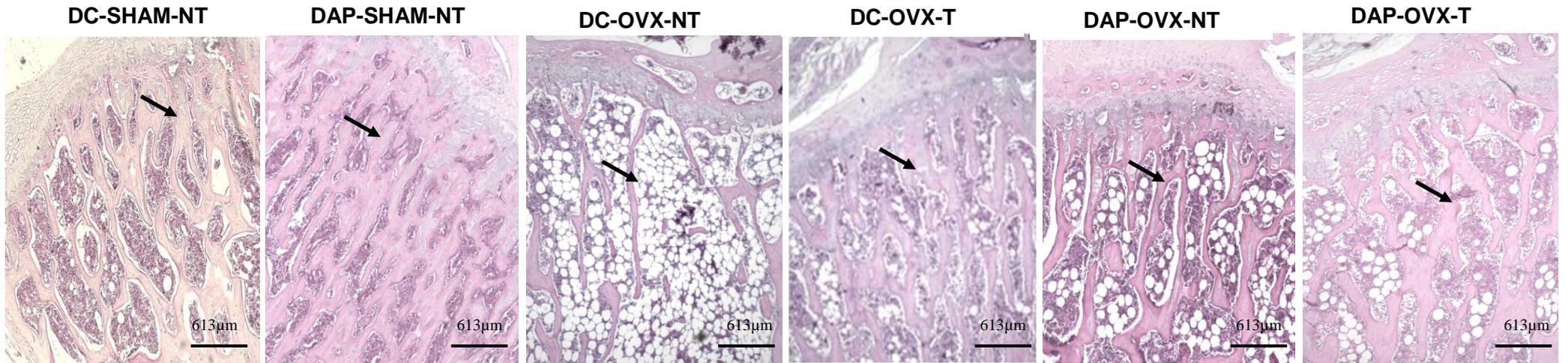


FIGURA 5. Análise histológica de seções das vértebras lombares L4-L6, barra= 613µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

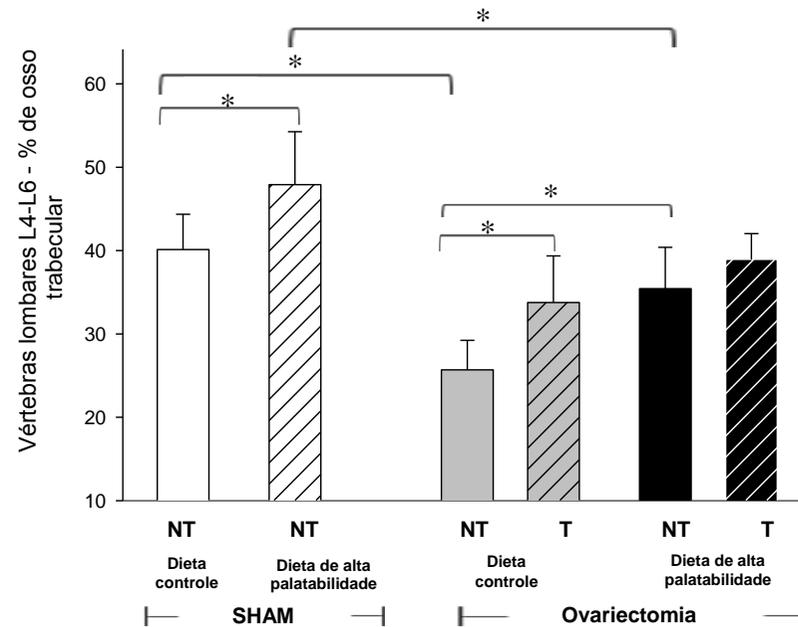


GRÁFICO 3. Análise de histomorfometria das vértebras lombares L4-L6. \*Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n= 6$  para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Este gráfico está representado em tabela no apêndice 19. Fonte: resultado do próprio autor.

Os animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade não treinados apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea no osso nasal, na epífise e metáfise da tíbia quando comparados com o grupo DC-OVX-NT. Não houve diferença no percentual de trabécula óssea para a dieta de alta palatabilidade no fêmur proximal, bem como, para a comparação DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T (GRÁFICOS 4, 5 e 6 e TABELA 3 / FIGURAS 6, 7 e 8). Na região distal do fêmur não foi observado efeito do treinamento físico na quantidade de trabécula óssea na epífise e na metáfise (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T) e o grupo DC-OVX-T apresentou menores percentuais em relação a DC-SHAM-NT – GRÁFICO 7, FIGURA 9 e TABELA 3. A dieta de alta palatabilidade aumentou o percentual de trabécula óssea na metáfise do fêmur distal (DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T) – GRÁFICO 7 e FIGURA 9. Para a epífise, os grupos DAP-OVX-NT e DAP-OVX-T apresentaram maiores percentuais de trabécula em relação aos animais DC-SHAM-NT (TABELA 3 e APÊNDICE 18). Entretanto, para a metáfise do fêmur distal foi observado que estes dois grupos castrados apresentaram menores percentuais que o grupo DC-SHAM-NT (GRÁFICO 7, FIGURA 9).

Na coluna torácica e na metáfise do úmero, o treinamento físico não alterou o percentual de trabécula óssea em nenhum dos grupos (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP - OVX - NT vs. DAP-OVX-T) – TABELA 3. Entretanto, o grupo DAP-OVX-T apresentou percentuais de trabécula óssea similares ao grupo DC-SHAM-NT para T8-T13, apesar do grupo DAP-OVX-NT ter obtido menores percentuais em relação a DC-SHAM-NT. Já nas vértebras T1-T7, mesmo após a realização do treinamento físico, os animais DAP-OVX-T apresentaram menores percentuais em relação ao DC-SHAM-NT. Para a coluna torácica, as ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea em relação aos animais que ingeriram a dieta controle (DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T). O percentual de trabécula óssea na epífise do úmero foi maior no grupo DAP-OVX-T vs. DAP-OVX-NT; DAP-OVX-T vs. DC-OVX-T,  $p < 0001$  e não houve diferença para o restante das comparações - (TABELA 3 e APÊNDICE 18).

## Metáfise da tibia proximal

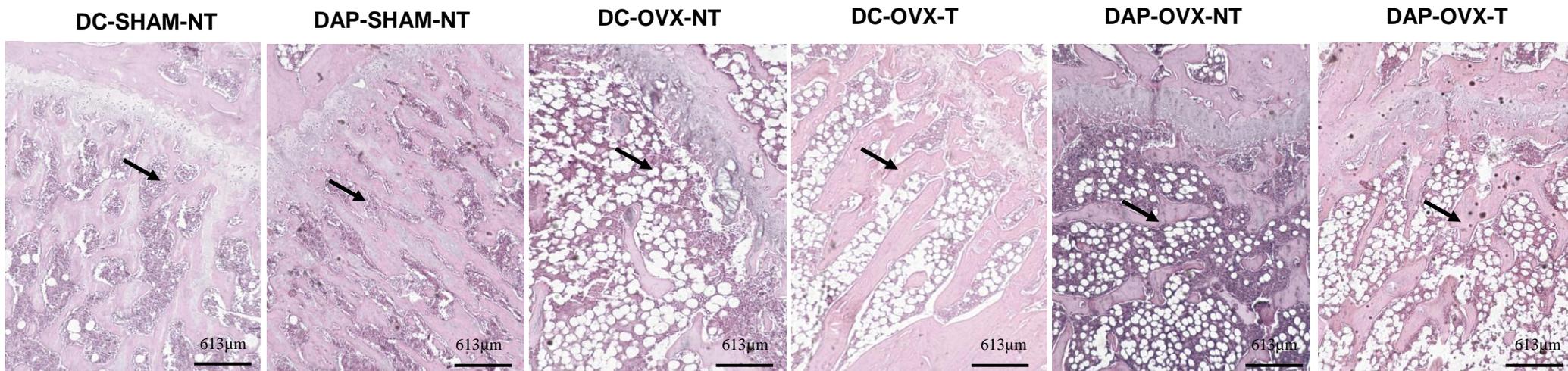


FIGURA 6. Análise histológica de seções da metáfise da tíbia proximal, barra= 613µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta de alta palatabilidade, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

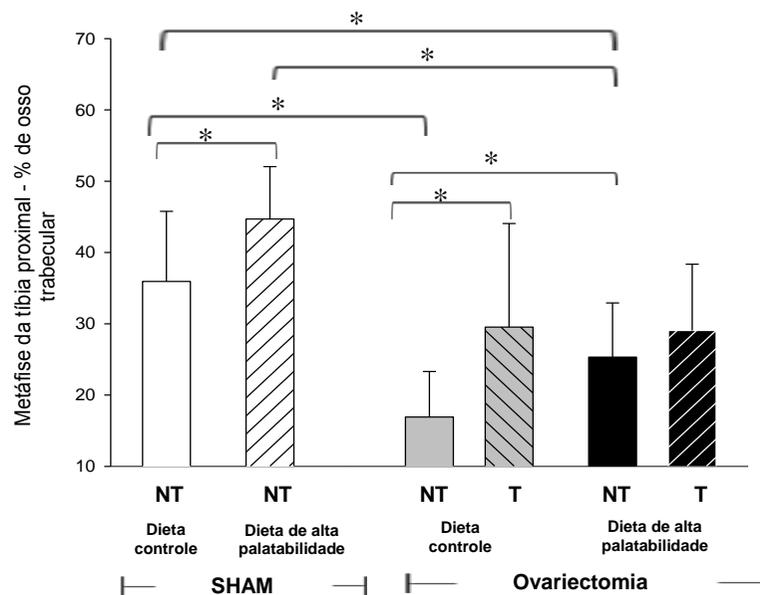


GRÁFICO 4. Análise de histomorfometria da metáfise da tíbia proximal. \*Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n= 6$  para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Este gráfico está representado em tabela no apêndice 19. Fonte: resultado do próprio autor.

## Osso nasal

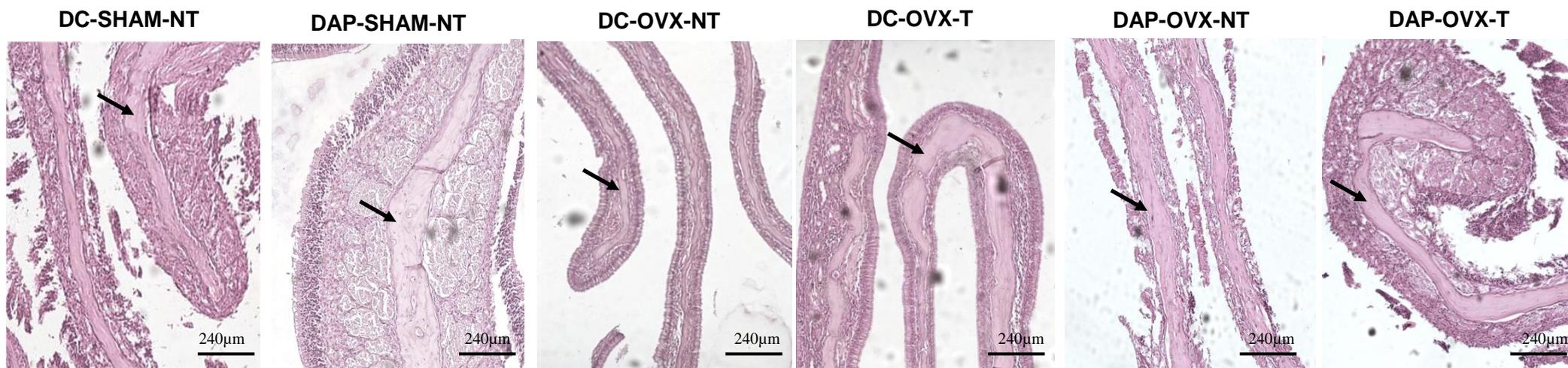


FIGURA 7. Análise histológica de secções do osso nasal, barra=240µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta de alta palatabilidade, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). Fonte: resultado do próprio autor.

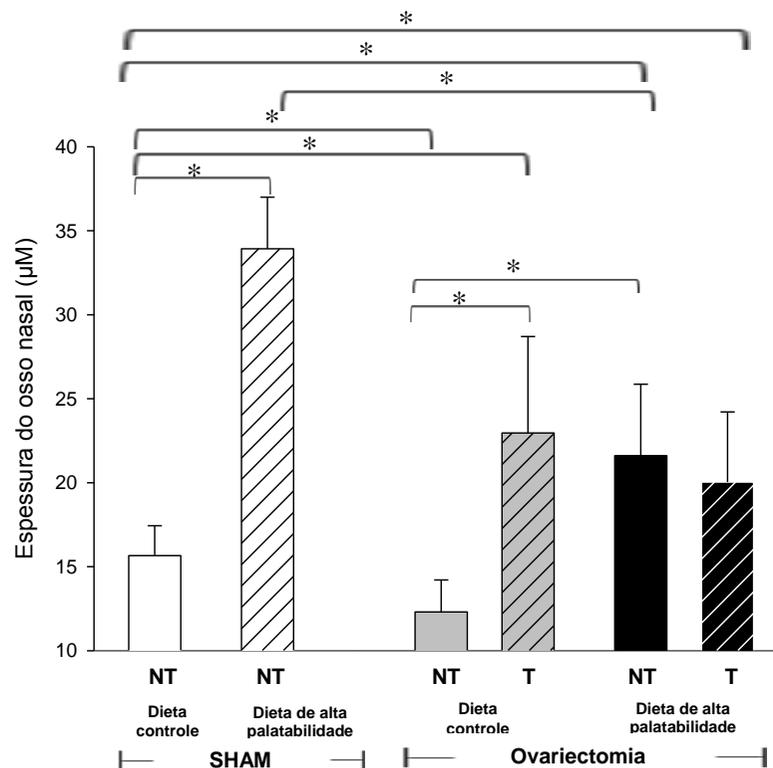


GRÁFICO 5. Análise de histomorfometria do osso nasal. \*Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Este gráfico está representado em tabela no apêndice 19. Fonte: resultado do próprio autor.

## Fêmur proximal

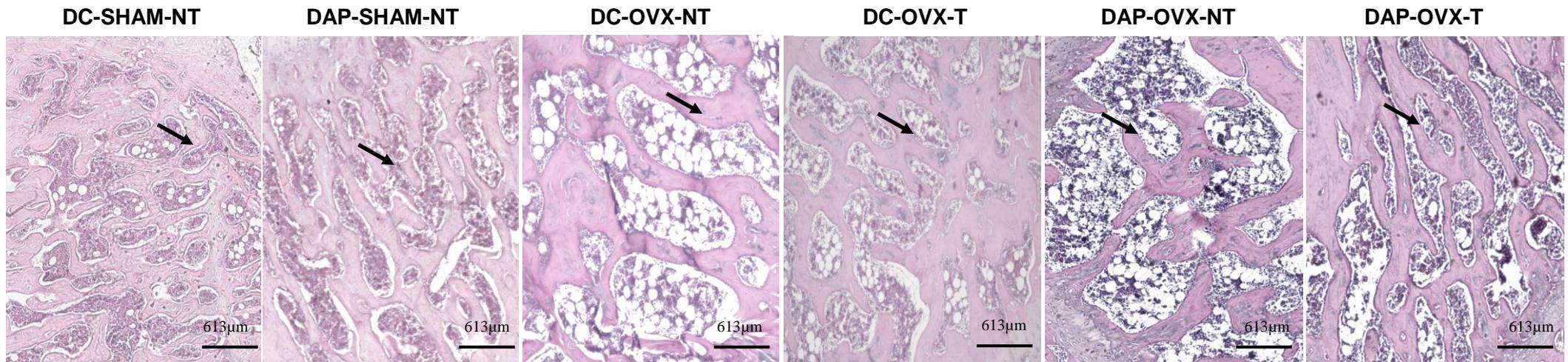


FIGURA 8. Análise histológica de secções do fêmur proximal, aumento, barra= 613µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta de alta palatabilidade, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

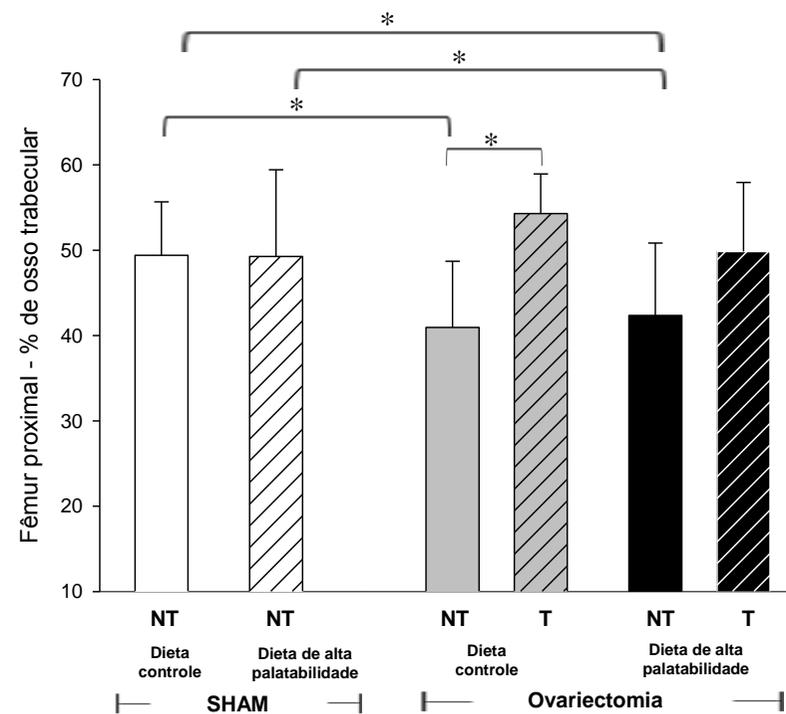


GRÁFICO 6. Análise de histomorfometria do fêmur proximal. \*Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Este gráfico está representado em tabela no apêndice 19. Fonte: resultado do próprio autor.

## Metáfise do Fêmur distal

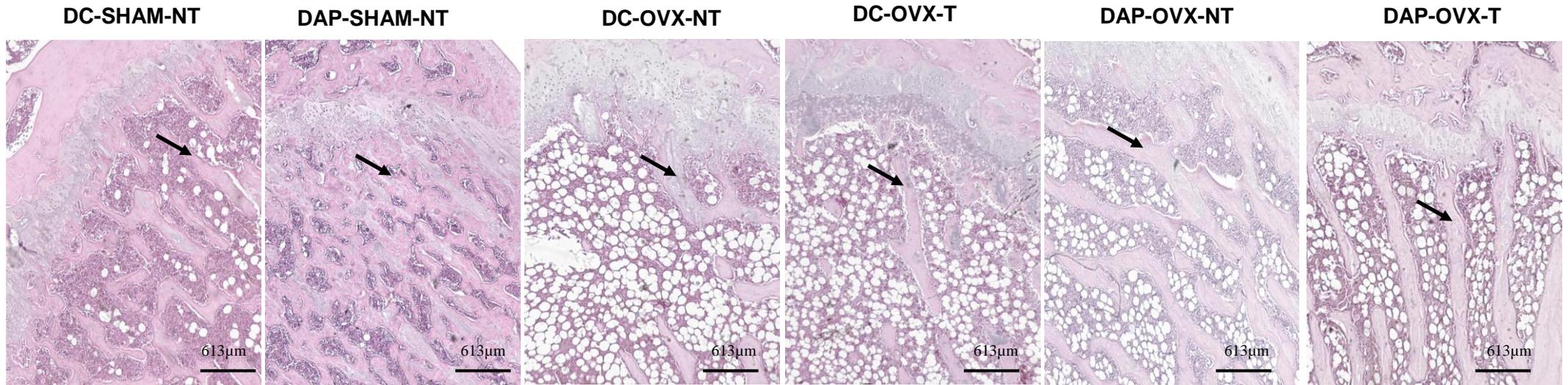


FIGURA 9. Análise histológica de seções da metáfise do fêmur distal, barra=613µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta de alta palatabilidade, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

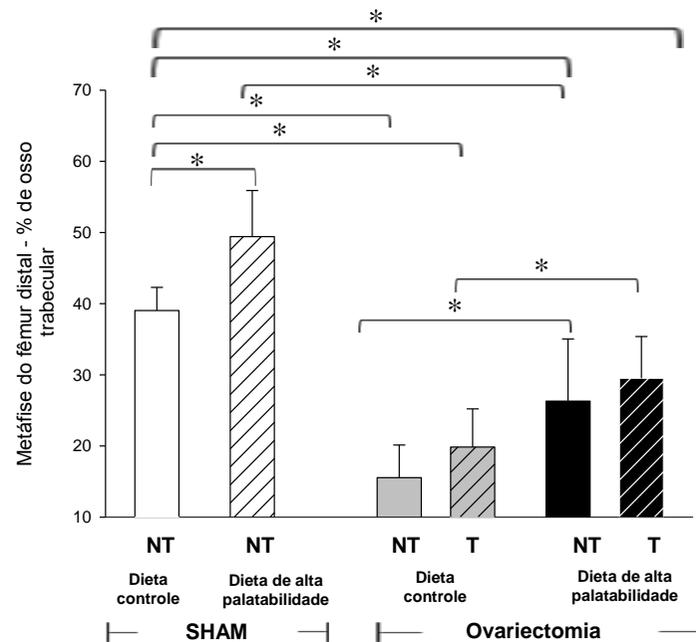


GRÁFICO 7. Análise de histomorfometria da metáfise do fêmur distal. \*Diferença entre os grupos indicadas pelas barras horizontais,  $n=6$  para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Este gráfico está representado em tabela no apêndice 19. Fonte: resultado do próprio autor.

TABELA 3. Vértices torácicas, epífise dos ossos longos e metáfise do úmero

Variáveis (%)	Dieta controle			Dieta de alta palatabilidade		
	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T
Vértices T1-T7	49,1±7,4	31,6±4,9 <sup>#</sup>	31,0±3,8 <sup>Σ</sup>	45,5±4,1	38,3±3,0 <sup>*#β</sup>	39,0±3,9 <sup>*γ</sup>
Vértices T8-T13	42,3±1,8	31,0±3,9 <sup>#</sup>	34,5±4,5 <sup>Σ</sup>	52,9±3,5 <sup>*</sup>	36,4±5,1 <sup>*#β</sup>	39,7±4,0 <sup>*</sup>
Epífise do fêmur distal	22,6±3,5	22,5±6,4	27,4±8,3	32,4±6,1 <sup>*</sup>	40,8±15,2 <sup>*β</sup>	40,2±13,7 <sup>*γ</sup>
Epífise da tíbia proximal	24,2±6,2	27,4±8,9	36,4±12,4	36,9±4,4 <sup>*</sup>	35,3±5,3 <sup>β</sup>	40,0±4,5 <sup>γ</sup>
Epífise do úmero	28,8± 4,1	22,8±6,6	22,9±4,9	30,1±5,0	24,8±10,0	37,6±11,9 <sup>αγ</sup>
Metáfise do úmero	27,6± 6,4	17,1±5,5 <sup>#</sup>	19,1±2,8	36,0±8,5	24,1±10,9 <sup>#</sup>	23,2±5,6

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM-NT vs. DAP-SHAM-NT; DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T). <sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM-NT vs. DC-OVX-NT; DAP-SHAM-NT vs. DAP-OVX-NT). <sup>α</sup>Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T), <sup>β</sup>Diferença entre o grupo DAP-OVX-NT vs. DC-SHAM-NT; <sup>γ</sup>Diferença do grupo DAP-OVX-T vs. DC-SHAM-NT, <sup>Σ</sup>Diferença entre DC-OVX-T vs. DC-SHAM-NT, n= 6 para todos os outros grupos, exceto para a variável epífise da tíbia para os grupos DC-OVX-T (n=4) e DAP-OV-T (n=5). SHAM: animais submetidos à cirurgia *sham*. OVX: animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. NT: animais não treinados. T: animais treinados. As figuras referentes a esta tabela estão no apêndice 18. Fonte: resultado do próprio autor.

Em resumo, para os animais alimentados com a DC, o treinamento físico atenuou a osteoporose nas vértebras L1-L3 e na metáfise da tíbia (DC-OVX-T>DC-OVX-NT; DC-OVX-T<DC-SHAM-NT), reverteu a osteoporose nas vértebras L4-L6, no fêmur proximal e no osso nasal (DC-OVX-T≥DC-SHAM-NT/DC-OVX-T>DC-OVX-NT) e não alterou o tecido ósseo trabecular na metáfise do fêmur, na metáfise do úmero e nas vértebras torácicas – TABELA 4. Para as ratas alimentadas com a DAP, o treinamento físico, apesar de não ter alterado o tecido ósseo das ratas DAP-OVX-T em relação às ratas DAP-OVX-NT, atenuou a osteoporose nas vértebras L1-L3, na metáfise da tíbia, no fêmur proximal e nas vértebras T8-T13 (DAP-OVX-T=DC-SHAM-NT; DAP-OVX-NT<DC-SHAM-NT; DAP-OVX-T=DAP-OVX-NT) e no osso nasal, os animais treinados apresentaram maiores percentuais de trabécula óssea em relação ao grupo DC-SHAM-NT. O treinamento físico não alterou a osteoporose das ratas obesas e castradas nas vértebras T1-T7, na metáfise do fêmur distal e na metáfise do úmero proximal (DAP-OVX-T=DAP-OVX-NT/DAP-OVX-T<DC-SHAM-NT) – TABELA 5.

TABELA 4: Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios ósseos de ratas não obesas e com osteoporose

Sítio ósseo	DC-OVX-T (DC-OVX-T vs. DC-OVX-NT)	DC-OVX-T (DC-OVX-T vs. DC-SHAM-NT)	DC-OVX-NT (DC-OVX-NT vs. DC-SHAM-NT)
Vértebras L1-L3	Aumenta	Menor que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Vértebras L4-L6	Aumenta	Similar ao DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Vértebras T1-T7	Não altera	Menor que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Vértebras T8-T13	Não altera	Menor que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Fêmur proximal	Aumenta	Similar ao DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Osso nasal	Aumenta	Maior que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Metáfise da tíbia	Aumenta	Menor que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Epífise da tíbia	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Não altera
Metáfise do fêmur distal	Nao altera	Menor que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Epífise do fêmur distal	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Não altera
Metáfise do úmero	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Epífise do úmero	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Não altera

DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). Fonte: resultado do próprio autor.

TABELA 5: Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo trabecular de diferentes sítios ósseos de ratas obesas e com osteoporose

<b>Sítio ósseo</b>	<b>DAP-OVX-T (DAP-OVX-T vs. DAP-OVX-NT)</b>	<b>DAP-OVX-T (DAP-OVX-T vs. DC-SHAM-NT)</b>	<b>DAP-OVX-NT (DAP-OVX-NT vs. DC-SHAM-NT)</b>
Vértebras L1-L3	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Vértebras L4-L6	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Similar a DC-SHAM-NT
Vértebras T1-T7	Nao altera	Menor que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Vértebras T8-T13	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Fêmur proximal	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Osso nasal	Nao altera	Maior que DC-SHAM-NT	Maior que DC-SHAM-NT
Metáfise da tíbia	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Epífise da tíbia	Nao altera	Maior que DC-SHAM-NT	Maior que DC-SHAM-NT
Metáfise do fêmur distal	Nao altera	Menor que DC-SHAM-NT	Menor que DC-SHAM-NT
Epífise do fêmur distal	Nao altera	Maior que DC-SHAM-NT	Maior que DC-SHAM-NT
Metáfise do úmero	Nao altera	Similar ao DC-SHAM-NT	Similar a DC-SHAM-NT
Epífise do úmero	Aumenta	Maior que DC-SHAM-NT	Maior que DC-SHAM-NT

DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). Fonte: resultado do próprio autor.

## 4.6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que o treinamento físico altera de forma sítio-dependente o esqueleto axial e apendicular das ratas com osteoporose, tanto das obesas, quanto das eutróficas. Além disso, o treinamento físico resultou em redução da massa corporal e da concentração tecidual de TNF-alfa, apesar de não ter induzido alterações na adiposidade, no índice HOMA e nas concentrações séricas de leptina e de insulina.

Conforme discutido no segundo capítulo, a ovariectomia aumenta a massa corporal, a área dos adipócitos e a inflamação no tecido adiposo. Neste experimento, o treinamento físico reduziu a massa corporal e a concentração tecidual de TNF-alfa nas ratas castradas e alimentadas com a dieta de alta palatabilidade, entretanto, não alterou o peso dos coxins adiposos e o peso do gastrocnêmio (GRÁFICO 1A e APÊNDICE 16). GLOY *et al.* (2011) encontraram que o aumento da adiposidade induzido pela castração é menor para o tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo. SHINODA *et al.* (2002) mostraram que o treinamento físico reduziu o peso do tecido adiposo subcutâneo de ratas castradas. Apesar de, no presente trabalho esse tecido não ter sido avaliado, é possível especular que a redução na massa corporal tenha ocorrido em função de uma diminuição no tecido adiposo subcutâneo, já que não houve diferença para o peso dos coxins adiposos e para o gastrocnêmio. Em relação às alterações no TNF-alfa, é conhecido que a expansão dos adipócitos que ocorre na obesidade aumenta a migração para o tecido adiposo de macrófagos que produzem citocinas pró-inflamatórias (SCHENK *et al.*, 2008). Isso foi evidenciado pela maior concentração tecidual de TNF-alfa e IL-6 encontrada nas ratas alimentadas pela dieta de alta palatabilidade (TABELA 2). O treinamento físico reduziu a concentração tecidual de TNF-alfa no grupo DAP-OVX-T em relação à DAP-OVX-NT. Dentre os mecanismos que podem explicar esse resultado, destaca-se o aumento da concentração de citocinas antiinflamatórias induzido pelo exercício físico, tais como a IL-6 derivada do músculo esquelético, a interleucina 10 (IL-10) e o antagonista do receptor de interleucina 1 (IL1ra), pois estas inibem a produção de TNF-alfa - (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; 2006). Além disso, a hipoadiponectinemia que ocorre na obesidade é associada com o aumento da

concentração de TNF-alfa (SWARBRICK e HAVEL, 2008; VU *et al.*, 2007). Como o treinamento físico pode aumentar a produção de adiponectina, trabalhos futuros devem ser conduzidos para explicar se a maior síntese desta adipocina contribuiu para a redução do TNF-alfa encontrada no grupo DAP-OVX-T (VU *et al.*, 2007).

O treinamento físico não promoveu alterações na adiposidade, na área dos adipócitos, nas concentrações séricas de triglicérides, leptina e de insulina (GRÁFICO 1A, TABELA 2 e APÊNDICE 16). De acordo com o que foi discutido no primeiro capítulo, o fornecimento de alimento de maneira *ad libitum* e não intermitente favorece aos roedores tornarem-se hiperalimentados (MARTIN *et al.*, 2010). Assim, mesmo com a realização do treinamento físico, o balanço entre a ingestão alimentar e o custo energético não foi suficiente para promover um maior gasto calórico e reduzir a adiposidade visceral. Além disso, destaca-se que a dieta de alta palatabilidade apresenta maior quantidade de sacarose (TABELA 3 – capítulo 1) - nutriente que pode atuar como sinalizador, aumentando a expressão de fatores que estimulam enzimas lipogênicas, tais como o ChREBP e as vias de sinalização que promovem resistência à insulina (HAO *et al.*, 2012; SHENK *et al.*, 2008; RUTLEDGE e ADELI, 2007; UYEDA e REPA, 2006; ISHII *et al.*, 2004; IRITANI *et al.*, 1992). Assim, como os animais DAP, mesmo com a realização do treinamento físico, permaneceram ingerindo a dieta de alta palatabilidade, o estímulo da própria sacarose em aumentar a adiposidade, a produção de leptina e a de triglicérides podem ter suplantado o efeito do treinamento físico.

Quando o animal é submetido a um protocolo de exercício físico, o tecido ósseo é modulado por vias de sinalização, tanto as que dependem diretamente do estresse mecânico sobre o tecido, derivado do impacto mecânico, quanto àquelas indiretas, mediadas por fatores hormonais. O efeito do treinamento físico sobre apenas um sítio ósseo e a avaliação somente por densitometria óssea é insuficiente para estabelecer conclusões sobre a resposta de todo o esqueleto (OCARINO e SERAKIDES, 2006). Assim, a análise histológica de diferentes ossos é fundamental para melhor compreensão dos efeitos do exercício físico sobre todo o esqueleto, já que os ossos têm metabolismo diferenciado e podem apresentar respostas distintas aos variados estímulos, sejam eles hormonais ou físicos (OCARINO e SERAKIDES, 2006). Como evidenciado no segundo capítulo desta dissertação a ovariectomia

causou osteoporose de forma sítio-dependente nos esqueletos axial e apendicular, com exceção das epífises dos ossos longos. O treinamento físico, iniciado após três meses de castração, (neste período os animais já apresentavam osteoporose - OCARINO *et al.*, 2007) promoveu, nos animais alimentados com a dieta controle, atenuação da osteoporose nas vértebras L1-L3 e na metáfise da tíbia proximal, reversão da osteoporose nas vértebras L4-L6, no fêmur proximal e no osso nasal e nenhuma alteração do tecido ósseo trabecular na metáfise do fêmur, na metáfise do úmero e nas vértebras torácicas. Já nos animais alimentados com a dieta de alta palatabilidade, o treinamento físico, embora não tenha alterado o percentual de osso trabecular dos grupos DAP-OVX-T vs. DAP-OVX-NT, parece ter atenuado a osteoporose nas vértebras L1-L3, na metáfise da tíbia proximal, no fêmur proximal e nas vértebras T8-T13. Essa afirmação parece plausível porque nesses sítios, houve osteoporose no grupo não treinado (DAP-OVX-NT < DC-SHAM-NT) e o percentual de trabéculas ósseas do grupo que realizou o treinamento foi igual ou até maior em relação ao grupo DC-SHAM-NT.

Como pode ser observado, os efeitos do treinamento físico ocorreram nos animais alimentados com ambas as dietas, entretanto, foram menos pronunciados nas ratas obesas e castradas em relação às não obesas ovariectomizadas. Uma das tentativas de explicar estes resultados conduz o olhar para os dados que mostram a maior inflamação apresentada pelos animais alimentados pela dieta de alta palatabilidade. Considerando que a homeostasia do tecido ósseo depende do balanço entre fatores anabólicos - tais como a leptina e a insulina - e catabólicos - tais como as citocinas pró-inflamatórias e os glicocorticóides - o estado final do osso dependerá da interação entre estes fatores (ZHAO *et al.*, 2007). Apesar da redução da concentração tecidual de TNF-alfa apresentada no grupo DAP-OVX-T em relação ao grupo DAP-OVX-NT, não houve diferença nesta comparação para a IL-6. Essa citocina aumenta a osteoclastogênese e inibe a formação óssea (JILKA *et al.*, 1992; POLI *et al.*, 1994; YHIHIU *et al.*, 2000). Assim, sugerimos que a maior inflamação encontrada nos animais obesos dificultou o aumento da formação óssea induzida pelo treinamento físico. O protocolo de treinamento físico do presente estudo foi escolhido baseando em OCARINO *et al.* (2007; 2008; 2009), por ser conhecido por promover adaptações ósseas nos tecidos com e sem osteoporose que foi o objeto principal de estudo desta dissertação. Entretanto, estudos indicam que se a duração

e/ou intensidade do exercício fossem maiores, poderiam ter ocorrido outras alterações metabólicas, dentre elas a redução da produção de IL-6, o que favoreceria, nos animais obesos, o anabolismo ósseo decorrente do treinamento físico (LEMOS *et al.*, 2009).

Para ambas as dietas, as diferenças na sensibilidade hormonal e as variações na magnitude do impacto mecânico podem ter contribuído para que os resultados encontrados no presente estudo fossem sítio-dependentes (OCARINO e SERAKDIES, 2006; IWAMOTO *et al.*, 2005). Além disso, destaca-se que uma das funções do estrógeno é aumentar a sensibilidade do osso ao impacto mecânico, sendo que esta resposta pode variar de acordo com o sítio do esqueleto avaliado (LEE e LANYON, 2004; OCARINO, 2004). Logo, o hipogonadismo associado com as divergências de aplicação das forças mecânicas no esqueleto pode ter contribuído para os efeitos sítio-dependentes do treinamento físico.

Dentre as causas para o desenvolvimento da osteoporose, destacam-se a deficiência estrogênica e o sedentarismo. Em acordo com o raciocínio evolutivo discutido nesta dissertação, é possível assentirmos que o treinamento físico pode prevenir, atenuar ou até mesmo reverter a osteoporose (IWAMOTO *et al.*, 2005; OCARINO *et al.*, 2007; 2009), já que as forças mecânicas aumentam a diferenciação osteogênica e estão associadas à maior resistência óssea, ao aumento da quantidade de trabéculas e ao espessamento da cortical induzido pela atividade física (OCARINO *et al.*, 2007; 2008A; KOSTENUIK *et al.*, 1997). Diferentemente do bípede, que apresenta maior impacto mecânico em toda extremidade inferior, para o quadrúpede a incidência das forças mecânicas durante a marcha sobre os ossos longos, tais como a tíbia e o fêmur são maiores em relação às vértebras lombares (IWAMOTO *et al.*, 2005). Apesar disso, o treinamento físico atenuou e/ou reverteu a osteoporose em ambos os sítios. Assim, parece que, além do impacto mecânico, outros fatores podem ter influenciado o efeito anabólico do treinamento físico sobre o tecido ósseo. Em concordância com isso, observou-se que o grupo DC-OVX-T não somente reverteu a osteoporose, como também aumentou a espessura do osso nasal para valores superiores ao grupo DC-SHAM-NT (GRÁFICO 5). Como o impacto mecânico desencadeado sobre o osso nasal é menor em comparação a todos os outros sítios (OCARINO *et al.*, 2007), sugere-se que os fatores hormonais e

que os efeitos de vibração induzidos pela movimentação da corrida também contribuíram para as alterações no tecido ósseo (OCARINO *et al.*, 2007; OXLUND *et al.*, 2003). Durante o exercício físico, ocorre aumento da liberação do hormônio do crescimento (GH), que apresenta efeitos anabólicos diretos sobre o tecido ósseo e indiretos mediados pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). A partir disso, sugerimos que para além dos efeitos da mecanotransdução, esses hormônios possam ter influenciado o esqueleto das ratas treinadas (OCARINO e SERAKDIES, 2006).

## **4.7 CONCLUSÕES**

Independente da dieta, o treinamento físico atenuou ou até mesmo reverteu as alterações ósseas induzidas pela osteoporose de forma sítio-dependente. Entretanto, esses efeitos foram menos evidentes nas ratas obesas, sendo que este resultado pode estar associado com a maior inflamação encontrada nesses animais.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como evidenciado nos três capítulos deste trabalho, a obesidade aumenta a quantidade de osso trabecular de forma sítio-específica e causa osteopetrose nas vértebras L1-L3. A visão clássica apresentada pela literatura estabelece que a “obesidade protege contra a osteoporose”, sendo esta conclusão é baseada apenas em análises de densitometria óssea de um único sítio do esqueleto. Realmente, nossos resultados mostram que as ratas obesas apresentam maior quantidade de trabéculas em relação às eutróficas. À primeira vista, esses dados corroborariam a visão epidemiológica de que “a obesidade é benéfica para o osso”. Entretanto, alguns aspectos necessitam ser considerados.

No capítulo 1, mostramos que a avaliação das características qualitativas do tecido ósseo associada com a análise de todo o esqueleto é necessária para que, de fato, possamos concluir o efeito da obesidade sobre o osso. Este trabalho mostra pela primeira vez que o maior percentual de trabéculas ósseas dos animais obesos foi acompanhado, a partir da análise qualitativa, do desenvolvimento de osteopetrose nas vértebras lombares. Dessa forma, questionamos até que ponto a maior densidade óssea encontrada em mulheres obesas realmente representa um aspecto vantajoso. Além disso, no capítulo 2, mostramos que independente da dieta, a ovariectomia induziu a osteoporose. Logo, é necessário ter cautela na afirmação de que a “obesidade é benéfica para o osso”, já que as ratas obesas também apresentaram osteoporose, embora em menor intensidade e extensão que as ratas eutróficas. Além disso, ressaltamos que as alterações endócrinas e metabólicas avaliadas no presente estudo e a adiposidade foram potencializadas na interação entre obesidade e ovariectomia, o que sugere que essa associação pode ser mais dispendiosa para o indivíduo do que benéfica.

O desenvolvimento da obesidade e da osteoporose está diretamente associada às alterações no estilo de vida dos indivíduos. Considerando que os animais foram evolutivamente selecionados para se exercitar, é possível especular que o treinamento físico possa promover atenuar ou até mesmo reverter às alterações induzidas por estas patologias. Para os animais eutróficos, o presente estudo

corroborar a literatura ao mostrar que o treinamento físico aumenta a quantidade de tecido ósseo trabecular de forma sítio-específica. Já nos animais obesos e não castrados, este trabalho mostra um resultado inédito que é a reversão da osteopetrose induzida pela obesidade e a restauração do equilíbrio entre aposição e reabsorção óssea.

## REFERÊNCIAS

- AHIMA R.S. *et al.* Leptin accelerates the Onset of Puberty in Normal Female Mice. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 99, p. 391–395, 1997.
- AHIMA R.S. Digging deeper into obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 121, p. 2076-2079, 2011.
- AINSLIED D.A. *et al.* Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *International journal of obesity*, volume 25, p. 1680-1688, 2001.
- ALBALA C. *et al.* Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis. *International journal of obesity related metabolic disorders*, volume 20, p. 1027-1032, 1996.
- AMMANN P. *et al.* Transgenic Mice Expressing Soluble Tumor Necrosis Factor-Receptor are Protected Against Bone Loss Caused by Estrogen Deficiency. *The journal of clinical investigation*, volume 99, 1699–1703, 1997.
- ASTUDILLO P. *et al.* Increased adipogenesis of osteoporotic human mesenchymal stem cells (MSCs) is characterized by impaired leptin action. *Journal of Cellular and Biochemistry*, volume 103(4), p.1054-65, 2008.
- BARCELLOS L. A. M. *Sistema serotoninérgico está envolvido na modulação da ingestão alimentar e massa corporal de maneira dependente da dieta e treinamento físico*.2011. 102F. (Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós graduação em Ciências do Esporte) - EEEFTO-UFMG, Belo Horizonte, 2011.
- BELLISARI A. Evolutionary origins of obesity. *Obesity reviews*, Volume 9, p. 165–180, 2007.
- BERTOLINI D.R *et al.* Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, volume 319, p. 516-8, 1986.
- BOELONI, J.N. *et al.* Dose-dependent effects of triiodothyronine on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Hormone Research*, volume 71, p.88-97, 2009.
- BOELONI, J.N. *et al.* Efeitos sítio-ósseo dependentes no fêmur e vértebras lombares de ratas com disfunções tireoidianas. *Acta Orthopaedic. Brasileira*, volume18, p.291-294, 2010.
- BOELONI N.J *Efeitos in vivo e in vitro dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas*. 2012. 262F. (Tese de doutorado apresentada no Programa de pós graduação em Patologia Veterinária) - Escola de Veterinária – UFMG), Belo Horizonte, 2012.

BONEWALD L. Osteocytes as multicuncional cells. *Journal Musculoskeletal Neuronal Interaction*, volume 6, p. 331-333, 2006.

BOOTH F.W.; LEES S.J. Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. *Physiological Genomics*, volume 28, p.146–157, 2007.

BORER K.T. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women. Interaction of Mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports Medicine*, volume 35, p. 779-830, 2005.

BOUASSIDA A. *et al.* Parathyroid Hormone And Physical Exercise: A Brief Review. *Journal of Sports Science and Medicine*, volume 5, p. 367-374, 2006.

BROOKS G.A.; White T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*, volume 45, p. 1009–1015, 1978.

BURGUERA B *et al.* Obesity is associated with decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes*, volume 49,p. 1219-1223, 2000.

CAO J.J.; GREGOIRE B.R.; GAO H. High fat diet decreases cancelous bone mass but has no effects on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone*, volume 44,p. 1097-1104, 2009.

CAO J. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, volume 6, p.1-7, 2011.

CAREY A.L ; M. A. FEBBRAIO. Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia*, volume 47, p. 1135–1142, 2004.

CARVALHO, J.F., MASAKO, M.O, POMPEU, F.A.M.S. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, volume 140, p.409-413, 2005.

CHAKRAVARTHY M.V.; BOOTH F.W. Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *Journal of Applied Physiology*, 96: 3–10, 2004.

CHEN Y. *et al.* Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR $\gamma$  expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *European Journal of Applied Physiology*, volume 111,p. 1759-1767, 2011.

CHEN K.Y.; ACRA S.A.; DONAHUE C.L.; SUN M.; BUCHWOSKY M.S. Efficiency of Walking and Stepping: Relationship to Body Fatness. *Obesity Research*, Volume 12, p. 982-989, 2004.

CIRMANOVÁ V.; BAYER M.; STARKA L.; SAJÍCKOVÁ. The effect of leptin on bone-an involving concept of action. *Physiological Research.*, volume 57, p. S143-S151, 2008.

COLEMAN D.L. Effects of Parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, volume 9, p.294-298, 1973.

COMPSTON J.E. Sex steroids and Bone. *Physiological Reviews*. Volume 81, p. 419-447, 2001.

CONFRAVREUX C.B; LEVINE R.L.; KARSENTY F. A paradigm of the integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, volume 310, .p. 21-9, 2009.

CONSIDINI R.V *et al.* Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, volume 334, p. 292-5, 1996.

CORNISH J. *et al.* Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *Journal of Endocrinology*, volume175, p. 405-415, 2002.

COUTINHO P.S. *et al.* Familial osteopetrosis in Agouti paca: report of nine cases. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, volume 60, p. 1454-1460, 2008.

CZERNIK B.L. Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. *Bone*, volume 50,p. 534-539, 2012.

DALLAS S.L.; BONEWALD L. F.; Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Annals of the New York of sciences*, volume 1192,p. 437-443, 2010.

DAMIRIRCHI A. *et al.* Effects of aerobic exercise training on visceral fat serum adiponectin concentration in ovariectomized rats. *Climateric*, volume 13, p. 171-178, 2010.

DATTA H.K.; NG W.F.; WALKER J.A.; TUCK S.P.; VARANASI S.S. The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology*, volume 61,p.577-587, 2008.

DAVID V. *et al.* A. Mechanical loading down-regulates peroxide proliferator active receptor  $\gamma$  in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology*, volume 148, p. 2553-2562, 2007.

De LAET, C. *et al.* Body mass index as a predictor of fracture risk: A meta-analysis. *Osteoporosis International*, volume 16, p.1330-1338, 2005.

D'EON. T.M. *et al.* Estrogen Regulation of Adiposity and Fuel Partitioning: evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, volume 280, p. 35983–35991, 2005.

DING, C. *et al.* Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. *Journal of Clinical and Endocrinology and Metabolism*, volume 93, p.1952–1958, 2008.

DUCY, P; AMLING, M; TAKEDA, S *et al.* Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, volume 100, p. 197-207, 2000.

ELEFTERIOU, F; et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, volume 434, p. 514:520, 2005.

FATTORE A.D.; CAPPARIELLO A.; TETI A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone*, volume 42, p. 19-29, 2008.

FERREIRA V. A. et al. High-Carbohydrate Diet Selectively Induces Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production in Mice Liver Inflammation. *Inflammation*. Volume 34, p.139-45, 2011.

FERRON M.; HINOI E.; KARSENTY G.; DUCY P. Osteocalcin differentially regulates  $\beta$  cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild -type mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American*, volume 105, p. 5266-5270, 2008.

FERRON M. et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*, 142, p. 296-308, 2010.

FLORES M.B.S. et al. Exercise Improves Insulin and Leptin Sensitivity in Hypothalamus of Wistar Rats. *Diabetes*, volume. 55,, p. 2554-2561, 2006

FONSECA H. et al. Voluntary exercise has long-term in vivo protective effects on osteocyte viability and bone strength following ovariectomy. *Calcified Tissue International*, volume 88, p. 443-454, 2011.

FRIEDMAN J. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *American Journal of Clinical Nutrition*, volume 89, p. 973S–979S, 2009.

FRUHLBERG G; GOMEZ-AMBROSI J. Rationale for the existence of additional adipostatic hormones. *The FASEB Journal*, volume 15, 2001.

FUKUMOTO S.; MARTIN J.M. Bone as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Volume 20, Issue 5, 230-236, 22 June 2009.

FULZELE K. et al. Insulin receptor signalling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*, volume142, p. 309-319, 2010.

GAO Q. et al. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nature Medicine*, volume 13, p. 89-94, 2007.

DOWNEY P.A.; SIEGEL M.I. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Physical Therapy* . Volume 86 , p. 77-91, 2006.

GASPERIC R.; STIBLAR-MARTINCIC A.; OSREDKAR J.; SKALERIC U. In vivo administration of recombinant TNF- $\alpha$  promotes bone resorption in mice. *Journal of Periodontology Research*, volume 38, p. 446–448, 2006.

GARCIA Z.M. *Participação do receptor do fator de ativação plaquetária nas alterações metabólicas e na secreção de citocinas em animais com aumento de adiposidade*. 2010. 83 F (Dissertação apresentada no Programa de pós graduação em fisiologia e farmacologia) - ICB – UFMG, Belo Horizonte, 2010.

GLOY V. *et al.* Ovariectomy and overeating palatable, energy dense food increase subcutaneous adipose tissue more than intra-abdominal adipose tissue in rats. *Biology of Sex Differences*, volume 2, p. 1-12, 2011.

GLUNT S.; KROOK A. Role of interleukin-6 in glucose and lipid metabolism. *Acta Physiology*, volume 192, p. 37-48, 2008.

GORDELADZE J.O.; CHRISTIAN A.D.; SYVERSEN U.; RESELAND J.E. Leptin Stimulates Human Osteoblastic Cell Proliferation, De Novo Collagen Synthesis, and Mineralization: Impact on Differentiation Markers, Apoptosis, and Osteoclastic Signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, volume 85, v. 825–836 (2002).

GOULET G.C. *et al.* Osteoblast response to ovariectomy is enhanced in intrinsically high aerobic capacity rats. *Calcified Tissue International*, volume 88,p. 325-335, 2011.

HAMIRICK M.W.; SKEDROS J.G.; PENNINGTON C.; MCNELI P.L. Increased osteogenic response to exercise in metaphyseal versus diaphyseal cortical bone. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interaction*, volume 6, p.258-263, 2006.

HAMIRICK M.W. *et al.* Caloric Restriction Decreases Cortical Bone Mass but Sparing Trabecular Bone in the Mouse Skeleton: Implications for the Regulation of Bone Mass by Body Weight. *Journal of Bone and Mineral Research*, volume 23, p. 870-878, 2008.

HAO Q. *et al.* High glycemic index carbohydrates abrogate the anti-obesity effect of fish oil in mice. *American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism*, ahead of print February 14, 2012.

HAGIHARA Y.H. *et al.* Running exercise for short duration increases bone mineral density of loaded long bones in young growing rats. *The Tokohu Journal of experimental medicine*, volume 219, p. 139-143, 2009.

HEINE P.A. *et al.* Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. *PNAS*, volume 97, p. 12729–12734, 2000.

HERVEY B.G.F. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *Journal of Physiology*, volume 145, p. 336-352, 1959.

HOLLOWAY W.R. *et al.* Leptin Inhibits Osteoclast Generation, *Journal of Bone and Mineral Research*, volume 17, p. 200-2009, 2002.

HOTAMISLIGIL G.S.; SHARGILL N.S.; SPIEGELMAN B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity – linked insulin resistance. *Science*, volume 259, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL G.; S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, volume 144, p. 860-867, 2006.

IRITANI N.; KOMIYA M.; FUKUDA H.; SUGINOTO T. Lipogenic Enzyme Gene Expression Is Quickly Suppressed in Rats by a Small Amount of Exogenous Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition*, volume 122, p.28-36, 1992.

ISHII S.; ILZUKA K.; MILLER B.C.; UEDA K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *PNAS*, volume 101, p. 15597-15602, 2004.

ISHIMI Y, MIYAURA C, JIN C.H. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *Journal of Immunology*, volume 145, 145:3297–3303, 1990.

IWAMOTO J. *et al.* Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism and calciotropic hormones in young growing rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, volume 22, p. 26-31, 2004.

IWAMOTO J.; TAKEDA T.; SATO Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Experimental animals*, volume 54, p.1-6, 2005.

JEE W.S.S. YAO W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *Journal of Musculoskeletal Neuron Interaction*, volume 1, p. 193-207, 2001.

JIANG M.Y.; SACCO S.M.; WARD W.E. Ovariectomy-Induced Hyperphagia Does Not Modulate Bone Mineral Density or Bone Strength in Rats. *The Journal of Nutrition*, volume 138, p. 2106-10, 2008.

JILKA R.L. *et al.* Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, volume 257, p. 88-91, 1992.

KADOWAKI T. *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 116, p. 1784-1792, 2006.

KARSENTY G. Convergence between bone and energy homeostases: Review Leptin regulation of bone mass. *Cell Metabolism*, volume 4, p. 341–348, 2006.

KARSENTY G.; OURI F. The Central Regulation of Bone Mass, The First Link between Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Journal of Clinical and Endocrinology and Metabolism*, volume 95, p. 4795–4801, 2010.

KARSENTY G. Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. *Comptes rendus biology*, volume 334, p. 720-4, 2011.

- KARSENTY G.; FERRON M. A contribution of bone to whole – organism physiology. *Nature*, volume 481, p. 314-320, 2012.
- KARSENTY G, OURY F. Biology without walls: the novel endocrinology of bone. *Annuals Review Physiology*, volume 74,p .87-105, 2012.
- KENEDY G.C. The role of depot fat in the hypothalamus control of food intake in the rats. *Proceeding of the Royal Society on London*, volume 140, p. 578-596, 1953.
- KIENS B. Skeletal Muscle Lipid Metabolism in Exercise and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, volume 86, p. 205–243, 2006.
- KIMURA M. *et al.* Long-term exercise down regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. *Neuroreport*, volume 15, p. 713-6,2004,
- KLOVER PJ, ZIMMERS T.A, KONIARIS L.G, MOONEY RA.. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*, volume 52, p. 2784–2789, 2003.
- KOSTENUIK P.; HALLORAN B.P.; HOLTON E.R.M.; BILKE D.D. Skeletal unloading inhibits the in vitro proliferation and differentiation of rat osteoprogenitor cells. *American journal of physiology endocrinology and metabolism*, volume 273, p. 1133-1139, 1997.
- LAHARRAGUE P. *et al.* High expression of letpin by human bone marrow adipocytes in primary cultures. *FASEB journal*, volume 12, p. 747-752, 1998.
- LANE N.E. Epidemiology, etiology and diagnosis of osteoporosis. *American Journal of obstetrics and gynecology*, volume 194, p. 53-11, 2006.
- LENCEL P.; MAGNE D. Inflammaging: The driving force in osteoporosis? *Medical Hypotheses*, volume 76, p. 317–321, 2011.
- LEE K.C.; LANYION L.E. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor  $\alpha$ . *Exercise Sport Sciences Reviews*, volume 32, p. 64-68, 2004.
- LEE N. K. *et al.* Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, volume 130, p. 456–469, 2007.
- LEMOS E.T. *et al.* Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rat. *Nutrition*, volume 25, pp 330–339, 2009.
- LEOVAS P.P. *et al.* THE Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comparative Medicine*, volume 58, p. 424-430, 2008.
- LIANG Y.Q. *et al.* Estrogen receptor  $\beta$  is involved in the anorectic action of estrogen. *International Journal of Obesity*, volume 26, p.1103–1109, 2002.

LIMA D.C.; SILVEIRA S.A.; HAIABARA A.S.; COIMBRA C.C. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metabolic Brain Disease*, volume 23, p. 361-373, 2008.

LONG F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews*, volume 13, p. 27-38, 2012.

LORINCZ C.; REIMER R.A.; BOYD S.K.; ZERNICKE R.F. High fat sucrose diet impairs geometrical and mechanical properties of cortical bone in mice. *British Journal of Nutrition*, volume 103, p. 1302-1308, 2010.

MA H. *et al.* Effects of diet induced obesity and voluntary wheel running on bone properties in young male C57BL/6J mice. *Calcified Tissue International*, volume 86, p. 411-419, 2010.

MARGETIC S, GAZZOLA C, PEGG G.G, HILL R.A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity Related Metabolism Disorders*, volume 26, p. 1407-33, 2002.

MARTIN A. *et al.* Opposite Effects of Leptin on Bone Metabolism: A Dose-Dependent Balance Related to Energy Intake and Insulin-Like Growth Factor-I Pathway. *Endocrinology*, volume 148, p. 3419–3425, 2007.

MARTIN B.; JI S.; MAUDSLEY S.; MATTSON M.P. “Control” laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. *PNAS*, volume 107, p. 6127-6133, 2010.

MESEGUER A, PUCHE C, CABERO A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Hormone Metabolic Research*, volume 34, p. 731-6, 2002.

MIGLIACCIO S. *et al.* Glucocorticoid-induced osteoporosis: an osteoblastic disease *Aging Clinical Experimental Research*, volume 19, p. 5-10 2007.

MOHAMED-ALI V. *et al.* Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Volume 82, p. 4196-200, 1997.

MORGAN E.F. BARNES G.L. EINHORN T.A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS R.; FELDMAN D.; NELSON D.A.; ROSEN C.J. *Fundamentals of osteoporosis*, California, E.U.A, Elsevier, capítulo 1, 1-2, 2010.

MULLER M.; KERSTEN S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nature Reviews | Genetics*, Volume 4, p. 315-322, 2003.

MUNDY G.R. Osteoporosis and Inflammation. *Nutrition Reviews*, volume 65, p. S147-S141, 2007.

MÜNZBERG H.; MYERS G.M. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance, *Nature Neuroscience*, volume 8, p. 566-570, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of laboratory animals. (Fourth Revised Edition, 1995). Washington : National Academy Press, 1995, 173p. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/4758.html>, data de acesso: 12 de maio de 2012.

NANES M.S. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Genes*, volume, p. 321, 1-15, 2003.

NUNES JI, NUNES VA. Doenças metabólicas do osso. *Caderno Técnico da Escola de Veterinária*, UFMG, volume 3, p.1-66, 1988.

OCARINO N. M. *Atividade física no tratamento da osteoporose: histomorfometria do esqueleto axial e apendicular de ratas*. 2004. 78F (Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de pós graduação em Patologia Veterinária) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2004.

OCARINO N.M.; SERAKIDES R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, volume 12, p. 149-152, 2006.

OCARINO, N.M. *et al.* Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. *Journal Musculoskeletal Neuronal Interaction*, volume 7, p. 84-93, 2007.

OCARINO N.M. *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*, volume 19, p. 320-325, 2008 A.

OCARINO N.M. *et al.* Osteopetrosis and osteonecrosis in snake *Boa constrictor*. *Arquivos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia*, volume 60, p.1284-1287, 2008 B.

OCARINO N.M. *et al.* Treadmill training before and/ or after ovariectomy is more effective in preventing osteopenia in adult females rats. *Science & Sports*, 24, 52-55, 2009.

OLIVEIRA, M.C. *et al.* Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by normocaloric – carbohydrate diet in mice, *Obesity*, 2012 – Inédito.

OURY F. *et al.* Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. *Cell*, volume 144, p. 796–809, 2011.

OXLUND B.S.; ANDREASSEN O.T.T.; OXLUND H. Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. *Bone*, volume 32, p. 69–77, 2003.

PAQUETTE A.; DONGHAO M.S.; JANKOWSKI M.; GUTKOWSKA J. Effects of ovariectomy on PPAR $\alpha$ , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *The Journal of the North American Menopause Society*, volume 15, pp. 1169/1175, 2008.

PARFIT A.M. Misconceptions (2): Turnover Is Always Higher in Cancellous Than in Cortical Bone. *Bone*, volume 30, p. 807–809, 2002.

PARFIT A.M. Skeletal heterogeneity and purposes of bone remodeling: implications for the understanding of osteoporosis. In: MARCUS R.; FELDMAN D.; NELSON D.A.; ROSEN C.J. *Fundamentals of osteoporosis*, California, E.U.A, Elsevier, capítulo 3, 35-38, 2010.

PAULA F. J.A Horowitz M.C.; ROSEN C.J. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. *Diabetes/Metabolism Research And Reviews*, 26: 622–630, 2010.

PFEILSCHIFTER J, KODITZ R, PFOHL M, SCHATZ H. Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. *Endocrine Reviews*, volume 23, p. 90–119, 2002.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, volume 98, p. 1154-1162, 2005.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The Role Of IL-6 In Mediating The Anti-Inflammatory Effects Of Exercise. *Journal of Physiology and Pharmacology*, volume 57, p. 43.51, 2006.

POLIL V.F. *et al.* Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *The EMBO Journal*, volume 1-3, p. 1 189 - 1196, 1994.

POPA C. *et al.* The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*, volume 48, p. 751-762, 2007.

QI C.; PEKALA P.H. Tumor Necrosis factor -  $\alpha$  induced insulin resistance in adipocytes. *SEBM*, volume 223, p. 128-135, 2000.

RAISZ L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 115, p. 3318-3325, 2005.

REID I.R. *et al.* Determinants of Total Body and Regional Bone Mineral Density in Normal Postmenopausal Women-A Key Role for Fat Mass. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, volume 75, p. 45-51, 1992.

REID R.I.; COMISH J. Direct Actions of Leptin on Bone Remodeling. *Calcified Tissue International*, volume 74, p. 313-316, 2004.

REID, IR. Relationship between fat and bone. *Osteoporosis International*, volume 19, p. 595-606, 2008.

RIBEIRO A.F.C.; SERAKIDES R.; OCARINO N.M.; NUNES V.A. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e glândulas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, volume 47, p. 228-236, 2003.

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

ROCHEFORT G.Y.; PALLU S.; BENHAMOU C.L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International*, volume 21,p. 1457-1469, 2010.

RODRIGUES, L. O. C.; OLIVEIRA, A.; LIMA, N. R. V.; MACHADO-MOREIRA, C.A.. Heat storage rate and acute fatigue in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Volume 36,p.131-135, 2003.

ROSELAND J. *et al.* Leptin Is Expressed in and Secreted from Primary Cultures of Human Osteoblasts and Promotes Bone Mineralization, *Journal of Bone And Mineral Research*, volume 16, p. 1426-1433, 2001.

ROUX,C.; ARABI,A.; PORCHER,R.L.; GARNERO P. Serum leptin as a determinant of bone resorption in healthy postmenopausal women. *Bone*, volume 33, 847–852, 2003.

ROZEN N. *et al.* Interleukin-6 modulates trabecular and endochondral bone turnover in the nude mouse by stimulating osteoclast differentiation. *Bone*, volume 26, p. 469-474, 2000.

RUTLEDGE A.C. ADELI K. Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms. *Nutrition Reviews*, volume 65, 2007.

SACKMANN-SALA L. *et al.* Heterogeneity Among White Adipose Tissue Depots in Male C57BL/6J Mice. *Obesity*, volume 20, 101-111, 2012.

SAMPAIO I B M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 3ª ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

SCHENK S.; SABERI M.; OLEFSKY J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 118, p. 2992–3002, 2008.

SCHERER P. E. *et al.* A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biology and Chemistry*, volume 270, p. 26746–26749, 1995.

SERAKIDES R. Ossos e articulações. In: SANTOS R.L.; ALESSI A.C. *Patologia Veterinária*. Belo Horizonte, ROCA, capítulo 11, 647-646, 2011.

SHINODA M.; LATOUR M.G.; LAVOIE J.N. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *International Journal of Obesity*, volume 26, p. 335–343, 2002.

SOARES, D.D., LIMA, N.R.V., COIMBRA, C.C.; MARUBAYASHI, U. Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, volume 74, p. 357-362, 2003.

SOARES, D.D., COIMBRA, C.C. and MARUBAYASHI, U. Tryptophan-induced central fatigue in exercising rats is related to serotonin content in preoptic area. *Neuroscience Letters*, volume 415, p. 274-278, 2007.

STEENBERG A. *et al.* Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *Journal of Physiology*, volume 529, p.237–242, 2000.

STEPHAN C.M. *et al.* Leptin is a potent stimulator of bone growth in *ob/ob* mice. *Regulatory Peptides*, volume 92, p. 73–78, 2000.

STOLK R.P. *et al.* Hyperinsulinemia and Bone Mineral Density in an Elderly Population: The Rotterdam Study. *Bone*, Volume 18, p. 545-549, 1996.

SUN K.; KUSMINSKI C.M.; SCHERER P.E. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 121, p. 2094-2101, 2011.

SWARBRICK M.M.; D.V.M P J. HAVEL. Physiological, Pharmacological, and Nutritional Regulation of Circulating Adiponectin Concentrations in Humans. *Metabolic Syndrome And Related Disorders*, Volume 6, p. 87-102, 2008.

TAKEDA S. *et al.* Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, volume 111, p. 305-17, 2002.

TENG K. Premenopausal osteoporosis, an overlooked consequence of anorexia nervosa. *Cleveland Clinical Journal of Medicine*, volume 28, p. 50-8, 2011.

THOMAS, T. *et al.* Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, volume 140, p.1630-1638, 1999.

THOMAS T. *et al.* Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone*. Volume 29, p. 114-20, 2001.

TOUATI S. *et al.* Exercise reverses metabolic syndrome in high fat diet induced obese rats. *Medicine and science in sports and exercise*, volume 43, p. 398-407, 2011.

TRAYHURN P; BING C. Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Science*, volume 361, p. 1237-49, 2006.

UYEDA K.; REPA J.J. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metabolism*, volume 4, p. 107-10, 2006.

VENKEN K.; CALLWAERT F.; BOONEN S.; VANDERSCHEREN D. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporosis International*, volume 19, p. 1517–1525, 2008.

- VU V; RIDDELL M.C; SWEENEYL G. Circulating adiponectin and adiponectin receptor expression in skeletal muscle: effects of exercise. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*; volume 23, p. 600–611 2007.
- WEITZMANN M.N.; PACIFICI R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 116, p. 1186-1194, 2006.
- WESTERLIND K. *et al.* Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. *PNAS*, volume 94, p. 4199-4204, 1997.
- WILLIAMS G.A. *et al.* In Vitro and in Vivo Effects of Adiponectin on Bone. *Endocrinology*, volume 150, p. 3603–3610, 2009.
- WOHLERS L.; JACKSON K.C.; SPANGENBURG E.E. Lipolytic Signaling in Response to Acute Exercise is Altered in Female Mice Following Ovariectomy. *Journal of Cellular Biochemistry*, volume 112, p. 3675–3684, 2011.
- YADAV J.V. *et al.* A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell*, volume 138, p. 976–989, 2009.
- YANO H.; OHYA K.; AMAGASA T. Effects of Insulin Parietal Bone on In Vitro Bone Formation in Fetal Rat. *Endocrine Journal*, volume 41, p. 293-300, 1994.
- YHIHUI T.; JINGYRUAN S.U.; YANG A. Expression and cellular localization of interleukin-6 mRNA in ovariectomized rats. *Journal of Tongji Medical University*, volume 20, p. 145-147, 2000.
- ZAIDI M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine*, volume 13, p. 791-801, 2007.
- ZENG Q, *et al.* Effects of exercise on adiponectin and adiponectin receptor levels in rats. *Life Science*, volume 80, p. 454–459, 2007.
- ZHANG Y, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, volume 372, p. 425-32, 1994;
- ZHAO. *et al.* Relationship of obesity with osteoporosis. *Journal of Clinical and Endocrinology and Metabolism*, volume 92, p. 1640-1646, 2007.
- ZHAO, L.J. *et al.* Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, volume 23, p. 17-29, 2008.
- ZHENG S.X. *et a.* Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 26: 63–71, 1997.

**ANEXO 1**  
**Parecer do CETEA**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
**- C E T E A -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 226/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito do treinamento físico sobre a massa óssea de ratas obesas com osteoporose: papel das adipocitocinas**", que tem como responsável(is) **Danusa Dias Soares**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 12/2010**.

Este certificado expira-se em **14/ 12/ 2015**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 226/2010**, related to the project entitled "**Effects of physical activity on bone mass in rats with obesity and osteoporosis: role of adipocytokines**", under the supervisors of **Danusa Dias Soares**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 14, 2010**.

This certificate expires in **December 14, 2015**.

Belo Horizonte, 17 de Dezembro de 2010.

**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)

## APÊNDICE 1

### Informações complementares acerca da descrição dos grupos experimentais e do delineamento experimental

Os três experimentos apresentados nesta dissertação foram coletados simultaneamente. Foram utilizadas 48 ratas *Wistar* com idade de 21 dias provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno (30 x 20 x 19cm) em uma sala da Escola de Veterinária da UFMG sob um ciclo claro/escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*. A temperatura do ambiente foi registrada diariamente ( $25,4^{\circ}\text{C} \pm 3,4$ ) e as ratas foram divididas em 8 grupos experimentais (FIGURA 1).

- Grupo 1 (DC-SHAM-NT): Animais que se alimentaram com a dieta controle, submetidos à cirurgia - *sham* e que não realizaram o treinamento;
- Grupo 2 (DC-SHAM-T): Animais que se alimentaram com a dieta controle, submetidos à cirurgia - *sham* e que realizaram o treinamento;
- Grupo 3 (DC-OVX-NT): Animais que se alimentaram com a dieta controle, que foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e que não realizaram o treinamento;
- Grupo 4 (DC-OVX-T): Animais que se alimentaram com a dieta controle, que foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e que realizaram o treinamento;
- Grupo 5 (DAP-SHAM-NT): Animais que se alimentaram com a dieta de alta palatabilidade, submetidos à cirurgia - *sham* e que não realizaram o treinamento;
- Grupo 6 (DAP-SHAM-T): Animais que se alimentaram com a dieta de alta palatabilidade, submetidos à cirurgia - *sham* e que realizaram o treinamento;
- Grupo 7 (DAP-OVX-NT): Animais que se alimentaram com a dieta de alta palatabilidade, que foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e que não realizaram o treinamento;

- Grupo 8 (DAP-SHAM-T): Animais que se alimentaram com a dieta de alta palatabilidade, que foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e que realizaram o treinamento;

Para fins didáticos, os grupos foram distribuídos em três experimentos que foram apresentados nesta dissertação em três capítulos como mostrado na figura 2.

Como a coleta do segundo capítulo foi realizada concomitante ao experimento do primeiro capítulo, os grupos que não realizaram o treinamento físico foram utilizados como grupos controle deste experimento. O grupo dieta controle não treinado do primeiro capítulo foi denominado no segundo capítulo como grupo dieta controle submetido à cirurgia *sham* e o grupo dieta de alta palatabilidade não treinado do capítulo 1 foi chamado no capítulo 2 de grupo dieta de alta palatabilidade submetido à cirurgia *sham* (DC-NT = DC-SHAM / DAP-NT = DAP-SHAM).

A coleta do terceiro capítulo foi realizada concomitante aos experimentos do capítulo 1 e 2. Dessa forma, os grupos que foram ovariectomizados no capítulo 2 foram utilizados como controles. O grupo dieta controle ovariectomizado do segundo capítulo foi denominado, no terceiro capítulo, de grupo dieta controle que não realiza o treinamento físico; e o grupo dieta de alta palatabilidade ovariectomizado do capítulo 2 foi chamado, no capítulo 3, de grupo dieta de alta palatabilidade que não realizou o treinamento físico (DC-OVX = DC-NT / DAP-OVX = DAP-NT).

### **Delineamento experimental**

Foram utilizadas ratas *Wistar* com 21 dias de idade que foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: animais que se alimentaram com ração controle (DC) ou com ração de alta palatabilidade (DAP). Ao completarem dois meses de idade, vinte e quatro ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral e vinte e quatro ratas a cirurgia - *sham* (controle). Após a castração, os animais foram mantidos no biotério durante três meses, para a indução da osteoporose (OCARINO *et al*, 2007; 2008). Três meses após a ovariectomia, as ratas castradas ou que realizaram a cirurgia *sham* foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: animais que

realizaram o treinamento físico (T) ou animais que não realizaram o treinamento físico (NT). Inicialmente, foi realizada a familiarização a corrida na esteira. Em seguida, os animais realizaram o primeiro teste progressivo (TP) para avaliação do trabalho realizado (W), do tempo total de exercício (TTE) e da velocidade máxima inicial (Vmax), sendo que a partir deste último valor, foi calculada a intensidade de exercício de cada animal e iniciado o treinamento físico por treze semanas. Os animais do grupo não treinado eram levados à sala onde era realizado o exercício e mantidos em suas respectivas gaiolas em repouso sob mesmas condições ambientais. No final da quarta, oitava e décima segunda semana de treinamento, foi realizado o teste progressivo para adequação da intensidade de exercício. Setenta e duas horas depois da última sessão de treinamento foi realizado um teste oral de tolerância a glicose. Dois dias posteriores a esse procedimento, foi realizado o último teste progressivo para avaliação do trabalho, do tempo total de exercício e da velocidade máxima após o período de treinamento. Setenta e duas horas após os animais foram eutanasiados após jejum noturno. Este delineamento experimental está representado na figura 3.

A coleta dos três experimentos desta dissertação foi realizada concomitantemente. Como as ratas do capítulo 2 foram utilizadas como grupo controle no experimento do capítulo 1, foi necessário que a cirurgia – *sham* fosse realizada também nos grupos submetidos ao treinamento físico do capítulo 1. A eutanásia dos animais nos três experimentos foi realizada seis meses após a cirurgia – *sham*, logo não é esperado que o estresse cirúrgico possa ter influenciado os resultados desta dissertação.

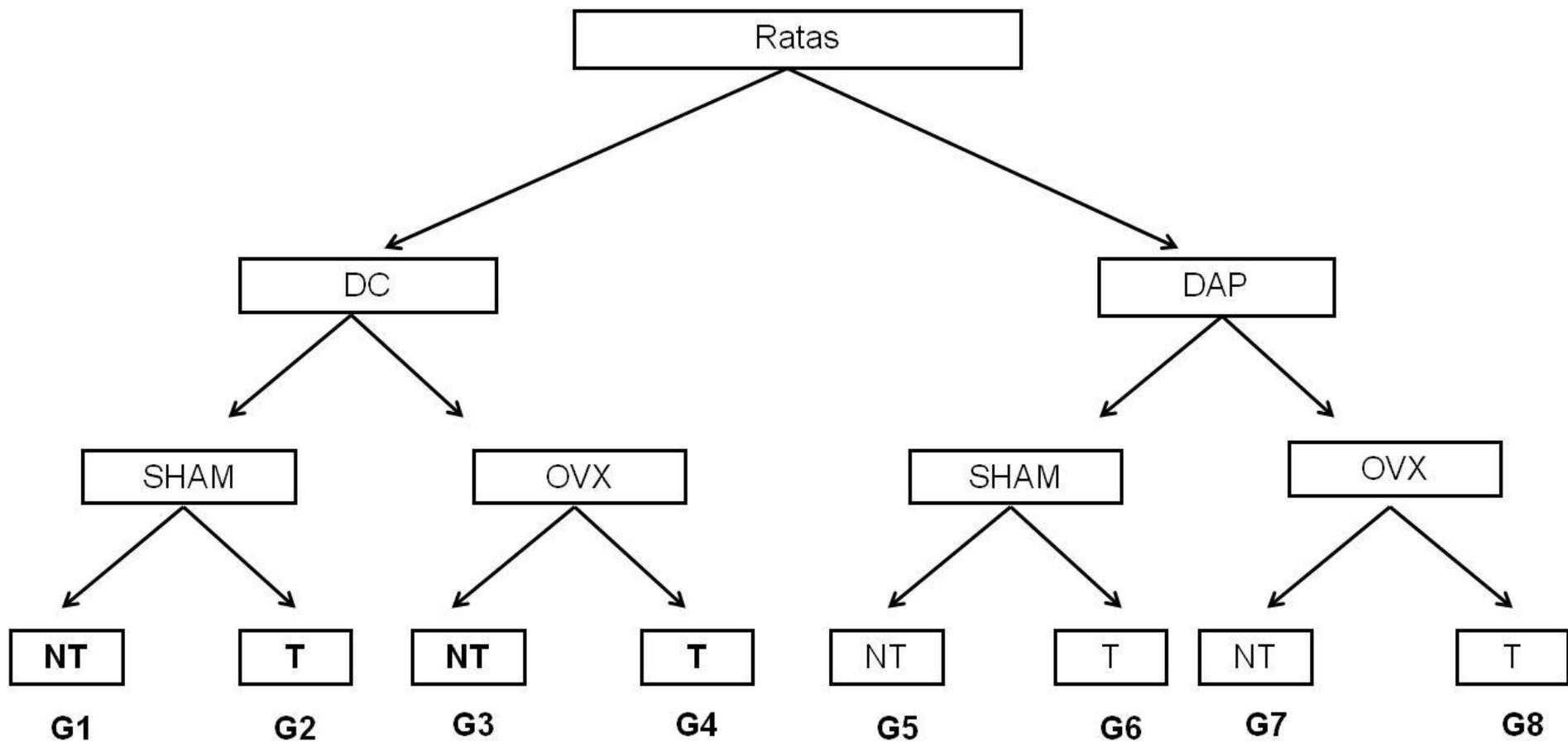
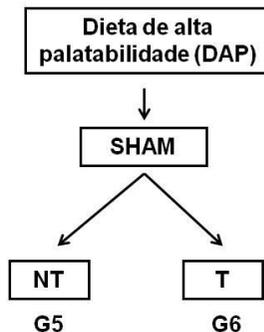
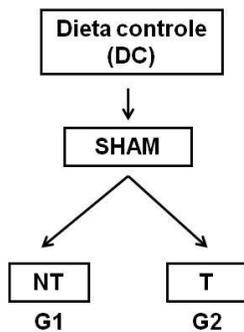
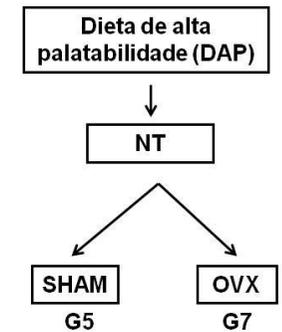
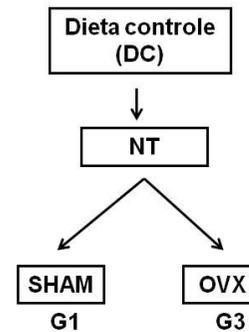


FIGURA 1. Representação esquemática dos grupos experimentais DC: Dieta controle. DAP: Dieta de alta palatabilidade. SHAM: Cirurgia - *sham*. OVX: Cirurgia ovariectomia. NT: não treinado. T: treinado. G1: grupo 1. G2: grupo 2. G3: grupo 3. G4: grupo 4. G5: grupo 5. G6: grupo 6. G7: grupo 7. G8: grupo 8. Fonte: criação do próprio autor.

**Experimento 1:**  
Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo de ratas obesas



**Experimento 2:**  
Efeito da ovariectomia sobre o tecido ósseo de ratas obesas



**Experimento 3:**  
Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo de ratas obesas com osteoporose

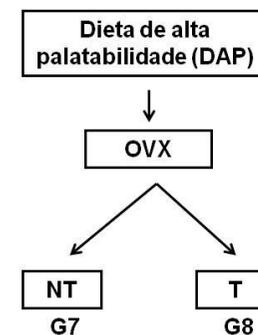
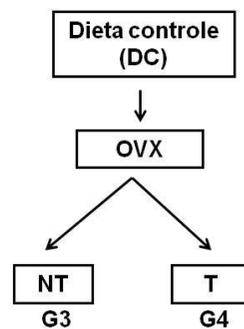


FIGURA 2. Representação esquemática dos grupos experimentais DC: Dieta controle. DAP: Dieta de alta palatabilidade. SHAM: Cirurgia – sham. OVX: Cirurgia ovariectomia. NT: não treinado. T: treinado. G1: grupo 1. G2: grupo 2. G3: grupo 3. G4: grupo 4. G5: grupo 5. G6: grupo 6. G7: grupo 7. G8: grupo 8. Fonte: criação do próprio autor.

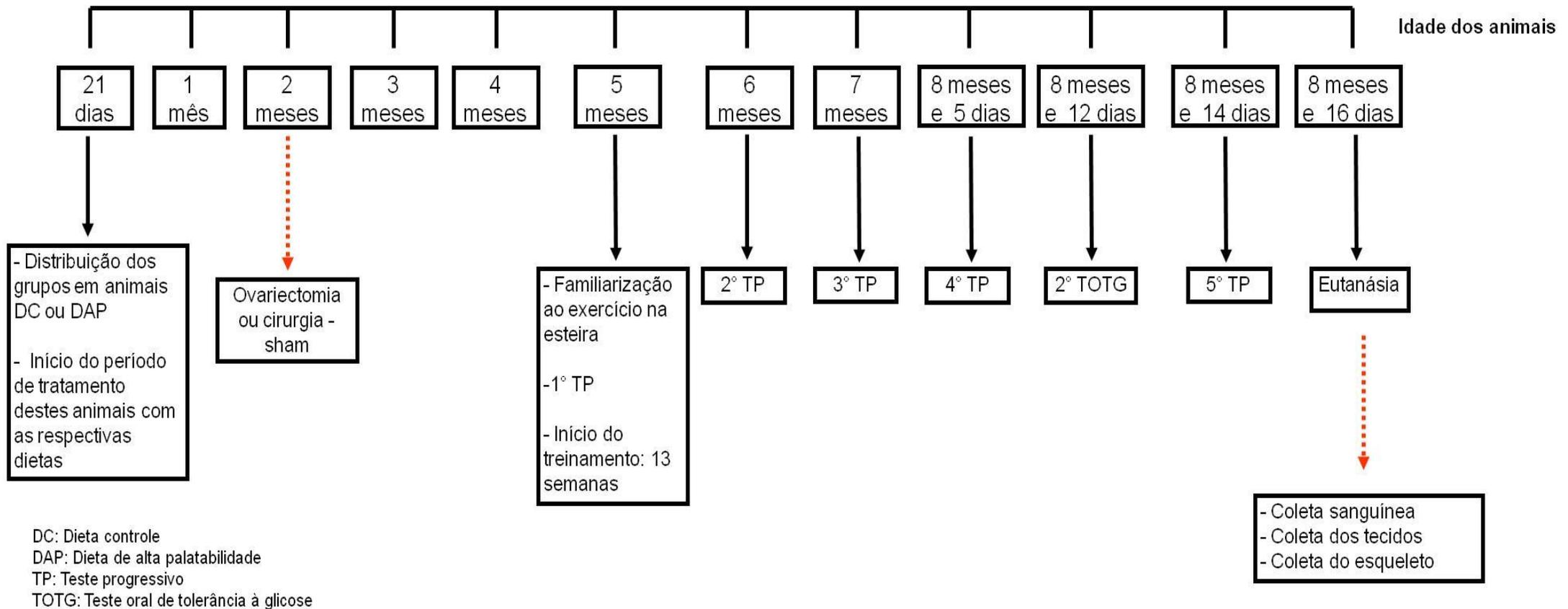


FIGURA 3. Representação esquemática do delineamento experimental. Fonte: criação do próprio autor.

## APÊNDICE 2.

### A. Protocolo de Coloração de lâminas do Tecido Adiposo

	<b>Procedimentos</b>	<b>Duração</b>
<b>Hidratação</b>	Estufa	Mínimo 1h
	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
	Xilol III	8min
	Álcool absoluto I	1min
	Álcool absoluto II	1 min
	Álcool 90	1min
	Álcool 80	1 min
	Álcool 70	1min
	Água corrente	5 min
	Hematoxilina	50seg
	Lavar em água corrente	-
	Eosina	1 min 30seg
		Lavar o excesso em água
Secar em temperatura ambiente		
<b>Desidratação</b>	Álcool 70	Mergulhar 3 x
	Álcool 80	Mergulhar 3 x
	Álcool 90	Mergulhar 3 x
	Álcool II	Mergulhar 3 x
	Álcool I	Mergulhar 3 x
	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
	Xilol III	8 min
Montar o balsamo	-	

Fonte: criação do próprio autor.

## B. Protocolo de processamento do Tecido adiposo

<b>Procedimentos</b>	<b>Duração</b>
Álcool 70	30min
Álcool 80	30min
Álcool 90	30min
Álcool 95	30min
Álcool absoluto I	30min
Álcool absoluto II	30min
Álcool absoluto III	30min
Xilol II	30min
Xilol II	30min
Parafina 66°	Aproximadamente 30min

### C. APÊNDICE 3.

#### Protocolo de coloração do tecido ósseo

	<b>Número</b>	<b>Procedimentos</b>	<b>Duração</b>
<b>Hidratação</b>	1	Estufa	15min
	2	Xilol I	10min
	3	Xilol II	10min
	4	Álcool absoluto I	05min
	5	Álcool absoluto II	05min
	6	Álcool absoluto III	05min
	7	Álcool 90	05min
	8	Álcool 80	05min
	9	Água destilada	03min
	10	Hematoxilina	20 segundos
	11	Água corrente	15min
	12	Eosina	10 segundos
	13	Lavar o excesso em água	-
<b>Desidratação</b>	14	Álcool 95 I	20 segundos
	15	Álcool 95 II	30 segundos
	16	Álcool absoluto I	10 minutos
	17	Álcool absoluto II	10 minutos
	18	Álcool absoluto III	10 minutos
	19	Xilol I	02 minutos
	20	Xilol II	02 minutos
	21	Montar em bálsamo	-

Fonte: criação do próprio autor.

**APÊNDICE 4.**  
**Quantidade de campos avaliados por sítio ósseo na histomorfometria óssea**

TABELA 3: Quantidade de campos avaliados por sítio ósseo na análise de histomorfometria

<b>Sítio avaliado</b>	<b>Número de campos</b>	<b>Total de pontos</b>
Osso nasal	30	-
Fêmur proximal	3-4	363 - 484
Epífise dos ossos longos (fêmur distal, úmero e tíbia)	3-4	363 - 484
Metáfise dos ossos longos (fêmur distal, úmero e tíbia)	8-10	968 - 1210
Vértebras lombares	8-10	968 - 1210
Vértebras torácicas	7-8	848 - 968

Fonte: criação do próprio autor.

## APÊNDICE 5. Representação esquemática da análise do tecido ósseo

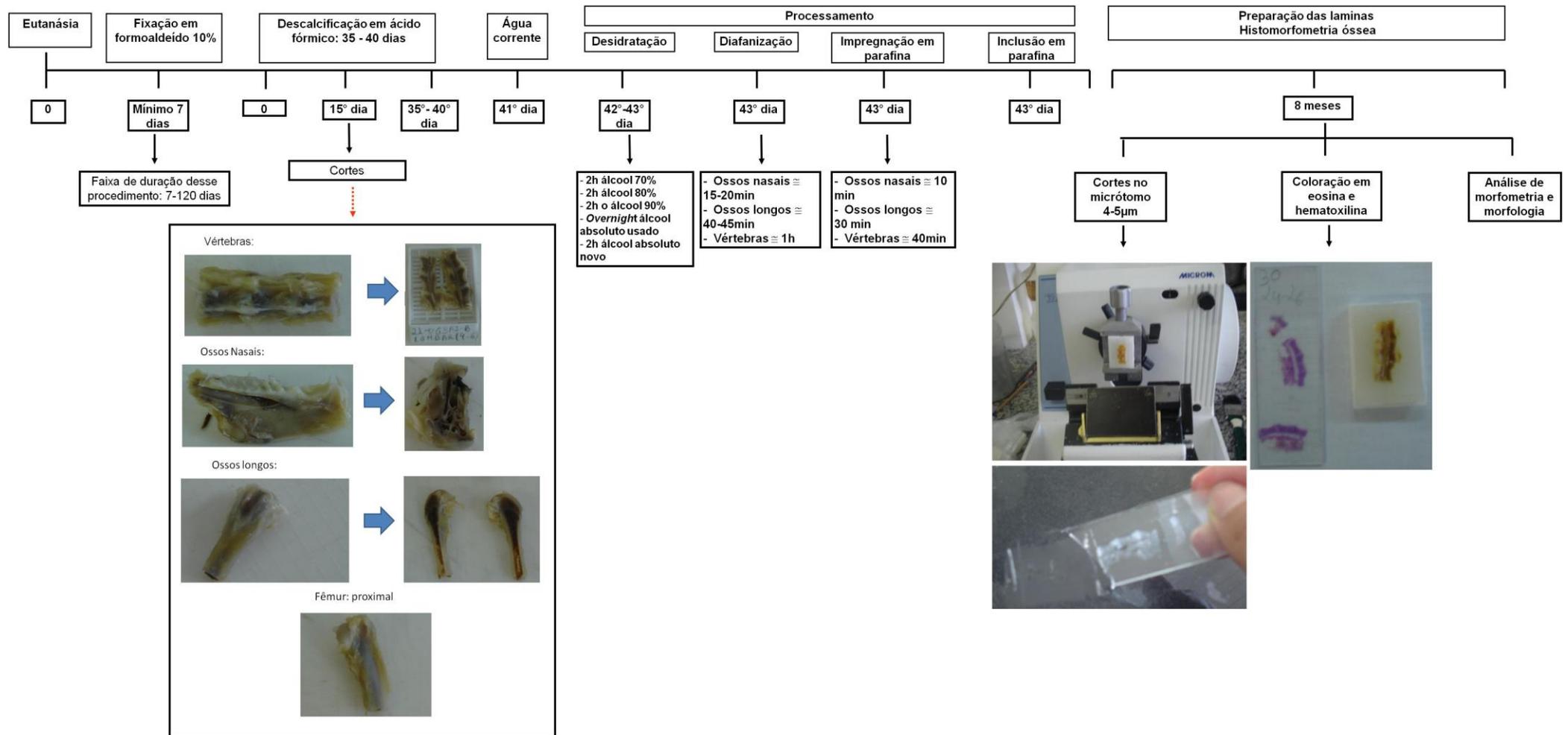


FIGURA 1. Protocolo de processamento do tecido ósseo.  
Fonte: criação do próprio autor.

**APÊNDICE 6.**  
**Resultados complementares do capítulo 1**

TABELA 1. Massa corporal, variáveis séricas complementares, peso dos coxins adiposos e do gastrocnêmio

Variáveis	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	NT	T	NT	T
Massa corporal pós-treinamento físico (g)	315,2±20,1	351,7±18,9	391,9±57,4*	400,9±51,8 <sup>Y</sup>
Massa corporal pré-treinamento físico (g)	300,5±18,5	325,5±17,0	357,6±24,6*	344,7±35,4 <sup>Y*</sup>
Colesterol total (mg.dl <sup>-1</sup> )	154,5±31,7	176,4±40,4	162,5±39,0	191,4±68,2
HDL-C (mg.dl <sup>-1</sup> )	7,2±2,9	8,0±3,0	5,8±2,0	10,8±4,2 <sup>α</sup>
Triglicérides (mg.dl <sup>-1</sup> )	245,4±59,1	365,5±178,2	511,46±296,5*	538,7±195,4 <sup>Y</sup>
Corticosterona (pg/ml)	36755,0±19313,8	35193,1±12567,2	60342,1±19616,3*	47500,8±11087,7
Adiponectina (ng/ml)	24997,4±8008,4	20124,5±11396,5	32355,0±5947,7	33774,0±9621,6*
Estradiol (pg/ml)	20,8±3,0	20,9±3,9	18,5±4,8	21,2±4,6
TAP (g)	1,66±0,3	1,93±0,5	3,79±0,4*	3,87±1,0 <sup>Y</sup>
TAR (g)	1,97±0,1	1,55±0,1	2,79±0,2*	2,59±0,2 <sup>Y</sup>
TAM (g)	0,91±0,1	1,2±0,6	1,84±1,2*	1,43±0,3 <sup>Y</sup>
Gastrocnêmio (g)	4,1±0,2	4,6±0,4	4,5±0,4	4,2±0,6

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T).

<sup>α</sup>Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T).

<sup>Y</sup>Diferença entre o grupo DAP – T vs. DC-NT. TAP: tecido adiposo periuterino. TAR: tecido adiposo retroperitoneal. TAM: tecido adiposo mesentérico. NT: não treinado; T: treinado. A concentração sérica de corticosterona foi determinada pelo método ELISA e as concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e HDL-C foram determinadas por métodos colorimétricos. Fonte: resultado do próprio autor.

Os tecidos adiposos periuterino (TAP), retroperitonal (TAR) e mesentérico (TAM), todos relativizados pela massa corporal, foram maiores nas ratas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade: DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T. O treinamento físico não alterou a massa dos tecidos adiposos TAP, TAR e TAM, todos relativizados pela massa corporal (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T). Não houve diferença entre os grupos para a concentração sérica de colesterol total e para o peso do gastrocnêmio. A corticosterona foi maior para o grupo DAP-NT em relação ao grupo DC-NT,  $p=0,4$ ). Os grupos DAP-NT e DAP-T apresentaram concentrações maiores de triglicérides quando comparado ao DC-NT. Não houve diferença entre o grupo DC-T e DAP-T ( $p=0,07$ ), bem como nas comparações referentes ao efeito do treinamento (DC-NT vs. DC-T / DAP-NT vs. DAP-T,  $p=0,6 - 0,8$ ). O HDL-C foi maior no grupo DAP-T e não houve diferença para o restante das comparações – TABELA 1.

## APÊNDICE 7. Gráficos ao longo do tempo do TOTG no capítulo 1

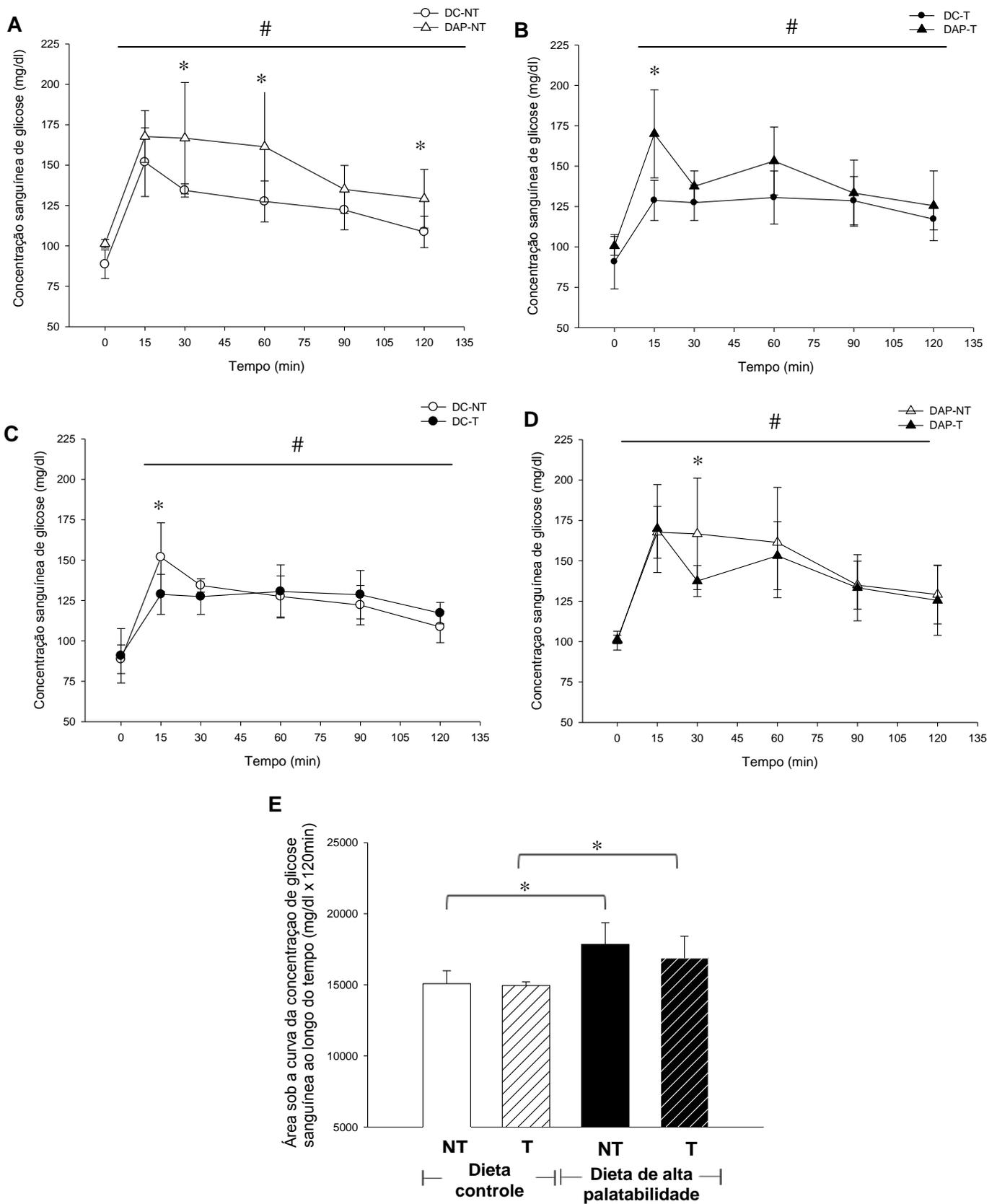
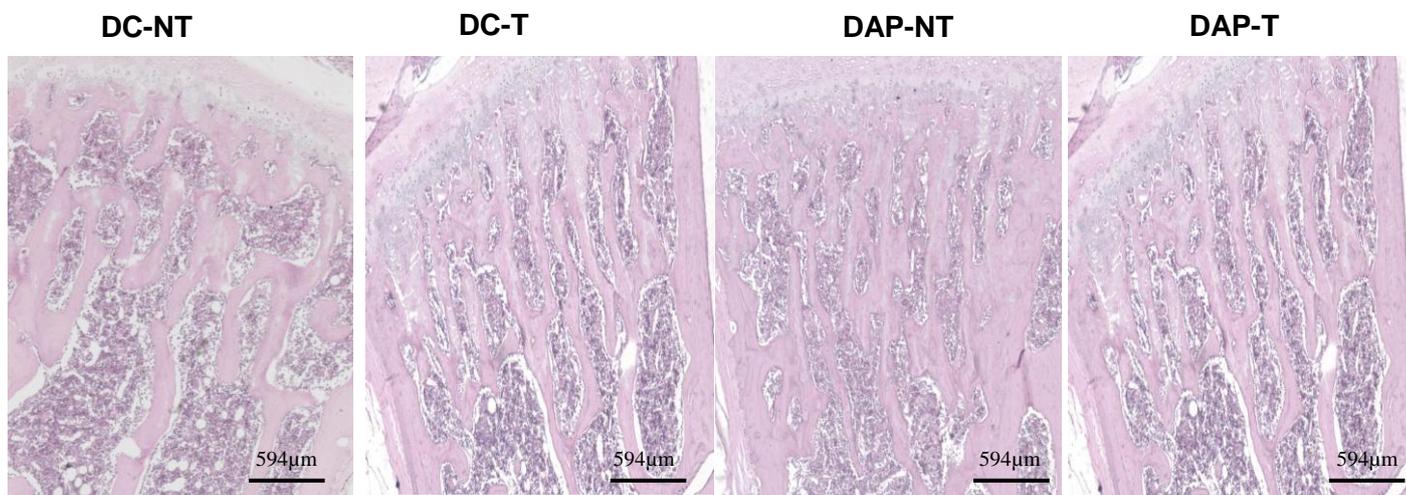


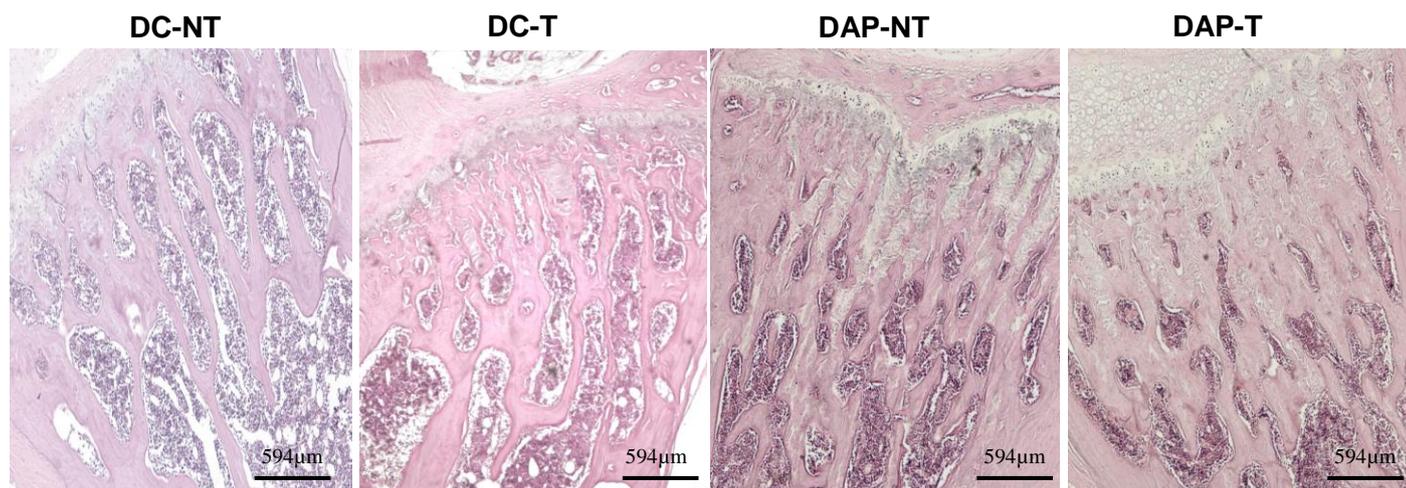
GRAFICO 1. Teste oral de tolerância a glicose. A) Comparação referente ao grupo DC - NT vs. DAP - NT. B) Comparação referente ao grupo DC - T vs. DAP - T. C) Comparação referente ao grupo DC - NT vs. DC - T. D) Comparação referente ao grupo DAP - NT vs. DAP - T. E) Área sob a curva da concentração sanguínea de glicose. \* Diferença entre os grupos nos respectivos tempos indicados (gráfico A, B, C e D) e entre as barras horizontais para o gráfico E, #Diferença em relação ao basal.  $n=5$  para o grupo DC-T e  $n=6$  para o restante dos grupos. NT: não treinado; T: treinado. Para as comparações ao longo do tempo, foi utilizado um ANOVA two way com medidas repetidas considerando como fonte de variação o tempo e a dieta (gráfico 1A e 1C) ou o tempo e o treinamento físico (gráfico 1B). Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 8.**  
**Figuras complementares do capítulo 1**

**A. Vértex T1-T7**



**B. Vértex T8-T13**



**C. Epífise do fêmur distal**

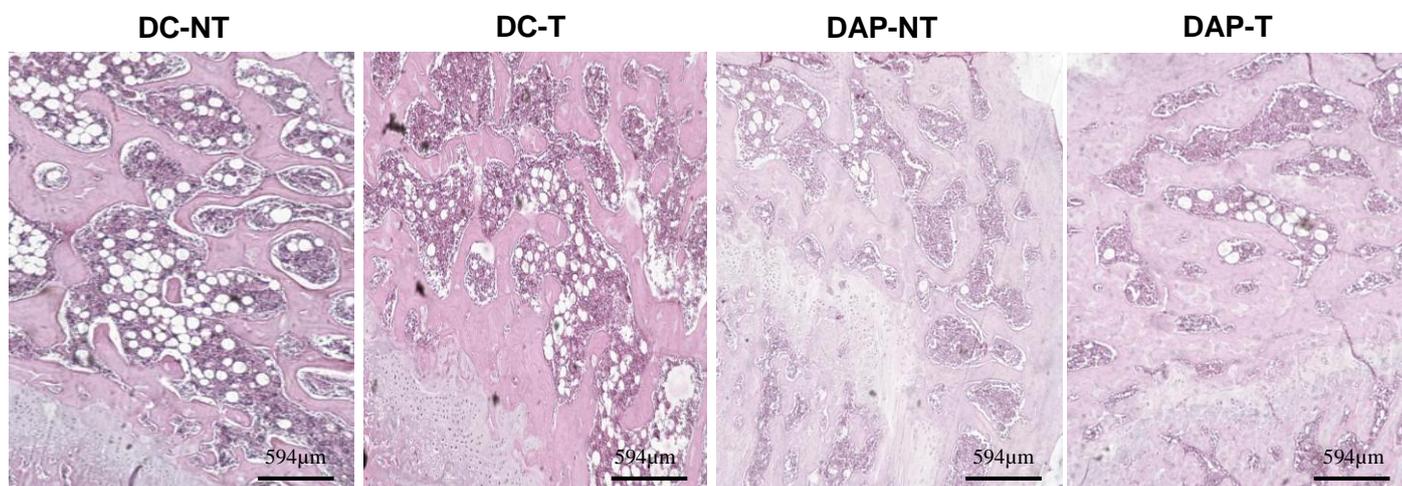


FIGURA 1. Análise histológica de secções das vértebras torácicas e epífise do fêmur distal. Barra=594µm. DC-NT (Dieta controle e não treinado); DC-T (Dieta controle e treinado); DAP-NT (Dieta de alta palatabilidade e não treinado); DAP-T (Dieta de alta palatabilidade e treinado). Fonte: resultado do próprio autor.

## **APÊNDICE 9.**

### **Concentração sérica de cálcio, ingestão alimentar e ingestão de minerais do capítulo 1**

Para certificar que os efeitos decorridos da dieta apresentados no tecido ósseo não foram devido à maior ingestão diária de cálcio e fósforo, foi realizada a análise quantitativa desses minerais apresentadas na ração. Durante as sete últimas semanas de experimento a ingestão alimentar foi avaliada semanalmente como a diferença entre a quantidade de ração ofertada diariamente e a quantidade restante na gaiola dos animais. Foi calculada a média das sete semanas e esse valor foi utilizado como ingestão alimentar diária total. A partir da determinação do percentual de cálcio e fósforo de ambas as rações e do cálculo da ingestão alimentar diária total, foi avaliada a quantidade de cálcio e fósforo ingerida diariamente pelos animais. A ingestão alimentar foi maior no grupo DAP – NT quando comparada ao grupo DC-NT. Não houve diferença na comparação entre os grupos DC-T vs. DAP -T,  $p= 0,3$ . A ração de alta palatabilidade possui menor quantidade de cálcio e fósforo quando comparada com a ração controle (cálcio: 1,4% e fósforo: 1,04% na DC vs. cálcio: 1,0% e fósforo: 0,63% na DAP). Dessa forma, os grupos DAP apresentaram menor ingestão desses minerais, quando comparados ao controle, mesmo que a ingestão alimentar total diária tenha sido maior nos grupos DAP (DC-NT vs. DAP-NT,  $p<0,01$  para ambas as comparações). A concentração sérica de cálcio também foi avaliada e não houve diferença entre os grupos.

TABELA 1: Concentração sérica de cálcio, ingestão alimentar e de minerais

Parâmetros	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	NT	T	NT	T
Ingestão alimentar diária (g/dia)	17,9±0,6	20,3±1,7 <sup>α</sup>	21,3±2,7*	21,3±1,6
Ingestão de cálcio diária (g/dia)	0,26±0,01	0,27±0,03 <sup>α</sup>	0,21±0,01*	0,21±0,02*
Ingestão de fósforo diária (g/dia)	0,18±0,06	0,21±0,01 <sup>α</sup>	0,13±0,01*	0,13±0,01*
Concentração sérica de cálcio (mg/dl)	11,0±0,3	11,3±0,9	11,8±1,0	12,5±1,9

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T). <sup>α</sup>Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T), *n*=5 para o grupo DC-T e *n*=6 para o restante dos grupos. TAP: tecido adiposo periuterino. NT: não treinado; T: treinado. A concentração sérica de cálcio foi avaliada por meio de um método enzimático. Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 10.**  
**Percentuais de trabécula óssea dos sítios ósseos apresentados em gráficos do capítulo 1**

TABELA 1. Percentuais de trabécula óssea das vértebras lombares, da metáfise da tíbia proximal, do osso nasal, metáfise do fêmur distal e fêmur proximal

Variáveis (%)	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	NT	T	NT	T
Vértebras L1-L3	40,1±3,2	45,1±4,0	54,1± 4,3*	45,2± 4,3 <sup>α</sup>
Vértebras L4-L6	40,1±4,2	51,0±5,4 <sup>α</sup>	47,9±6,3*	46,2±4,6*
Metáfise da tíbia proximal	35,9±9,8	40,8±9,7	44,6±7,3*	46,3±5,3*
Ossos nasal	15,6±2,4	30,2±4,3	33,9±3,0*	34,8±2,8*
Metáfise do fêmur distal	39,0±3,2	39,4±7,8	49,4±6,4*	50,4±8,2*
Fêmur proximal	49,4± 6,2	59,7±7,3 <sup>α</sup>	49,2±10,1	59,6±5,7 <sup>α</sup>

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-NT vs. DAP-NT; DC-T vs. DAP-T). <sup>α</sup> Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-NT vs. DC-T; DAP-NT vs. DAP-T). <sup>γ</sup>Diferença entre o grupo DAP – T vs. DC-NT, *n*=5 para o grupo DC-T e *n*=6 para o restante dos grupos. NT: não treinado; T: treinado. Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 11.**  
**Resultados complementares do capítulo 2**

TABELA 1. Massa corporal, variáveis séricas complementares, peso dos coxins adiposos e do gastrocnêmio

Variáveis	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
Massa corporal (g)	315,2±20,1	398,2±46,6 <sup>#</sup>	391,9±57,4 <sup>*</sup>	489,9±66,5 <sup>*#</sup>
Colesterol total (mg.dl <sup>-1</sup> )	154,5±31,7	183,7±20,7	162,5±39,0	240,9±162,8 <sup>*#</sup>
HDL-C (mg.dl <sup>-1</sup> )	7,2±2,9	10,9±8,5	5,8±2,0	11,7±7,5
Triglicérides (mg.dl <sup>-1</sup> )	245,4±59,1	244,9±70,1	503,7±308,2 <sup>*</sup>	482,7±243,4 <sup>*</sup>
Corticosterona (pg/ml)	36755,0±19313,8	52281,4±26185,3	60342,1±19616,3	50089,3±49330,1
Adiponectina (ng/ml)	24997,4±8008,4	44824,5±18368,6 <sup>#</sup>	32355,0±5947,7	58945,7±18987,3 <sup>#</sup>
Estradiol (pg/ml)	20,8±3,0	19,3±2,5	18,5±4,8	20,3±2,5
TAP (g)	1,6±0,3	2,5±0,5	3,7±0,4 <sup>*</sup>	3,2±0,7 <sup>*</sup>
TAR (g)	1,9±0,1	2,4±0,6	2,7±0,2 <sup>*</sup>	3,4±0,7 <sup>*</sup>
TAM (g)	0,9±0,1	1,3±0,4	1,8±1,2 <sup>*</sup>	1,9±1,0
Gastrocnêmio (g)	4,1±0,2	4,6±0,4	4,5±0,4	4,2±0,6

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX). <sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX), *n*=6 para todos os grupos e comparações. ΔMC: variação da massa corporal; TAP: tecido adiposo periuterino; TAR: tecido adiposo retroperitoneal; TAM: tecido adiposo mesentérico. SHAM: cirurgia *sham*; OVX: cirurgia de ovariectomia. Para a concentração sérica de corticosterona foi necessária a transformação logarítima para a normalidade dos dados. A concentração sérica de corticosterona foi determinada pelo método ELISA e as concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e HDL-C foram determinadas por métodos colorimétricos. Fonte: resultado do próprio autor.

Os tecidos adiposos periuterino e retroperitoneal, todos relativizados pela massa corporal, foram maiores nos grupos dieta de alta palatabilidade (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX). Para o tecido adiposo mesentérico, não houve diferença no grupo DC-OVX vs. DAP-OVX ( $p=0,1$ ). Ao avaliar o efeito da ovariectomia no peso dos coxins adiposos, não houve diferença em nenhuma das comparações (DC-SHAM vs. DC-OVX,  $p=0,07$  para o TAP;  $p=0,2$ , para o TAR e  $p=0,08$  para o TAM; DAP-SHAM vs. DAP-OVX,  $p=0,1$  para os três sítios). O colesterol total foi maior no grupo DAP-OVX em relação ao grupo DC-OVX e ao grupo DAP-SHAM. Os animais alimentados pela dieta de alta palatabilidade apresentaram maiores concentrações séricas de triglicérides quando comparados aos seus controles da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX). Não houve diferença na comparação referente ao efeito da ovariectomia (DC-SHAM vs. DC-OVX,  $p=0,8$ ; DAP-SHAM vs. DAP-OVX,  $p=0,9$ ), bem como para o peso do gastrocnêmio, a concentração sérica de HDL-C e de corticosterona (TABELA 1).

## APÊNDICE 12. Gráficos ao longo do tempo do TOTG no capítulo 2

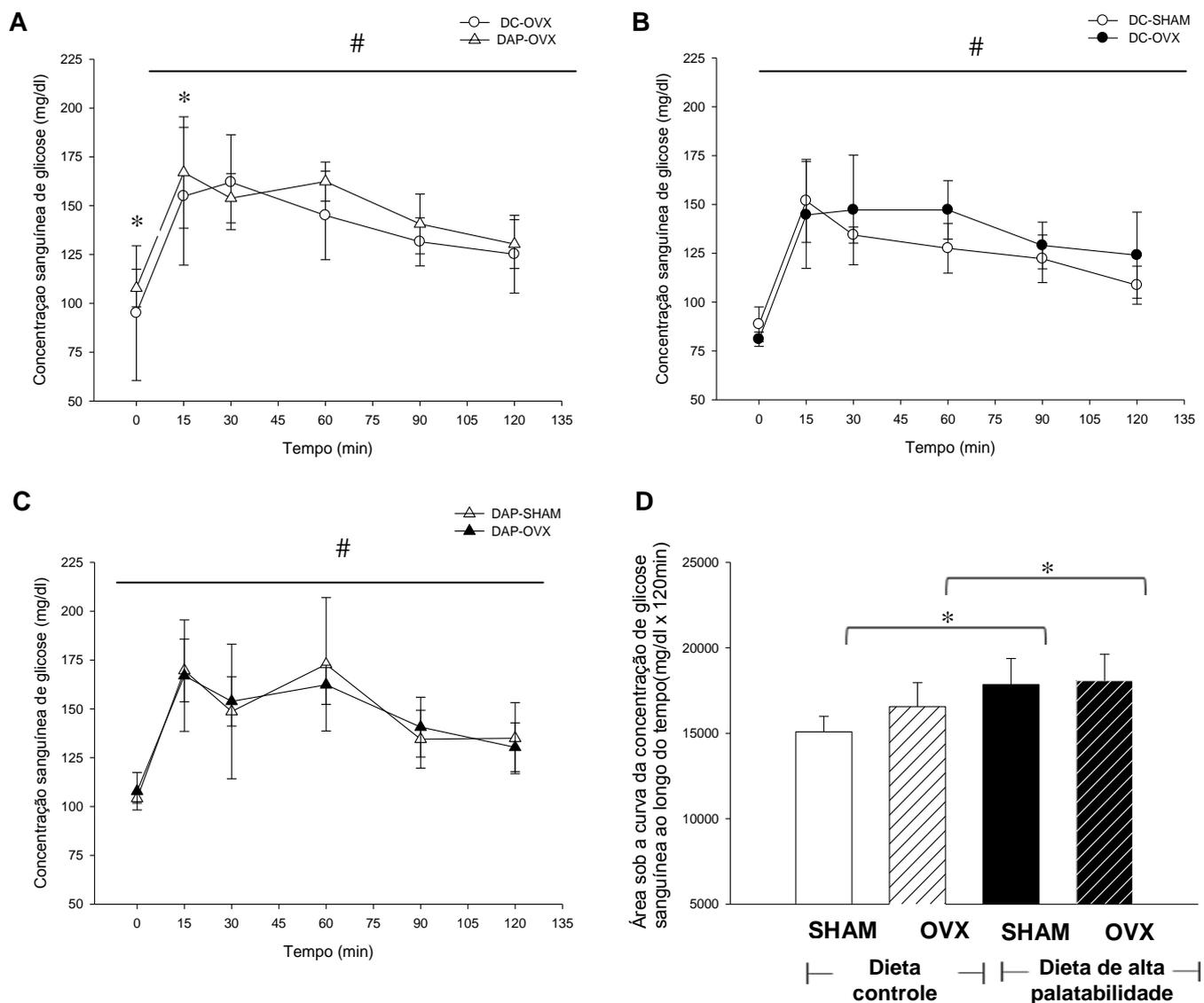
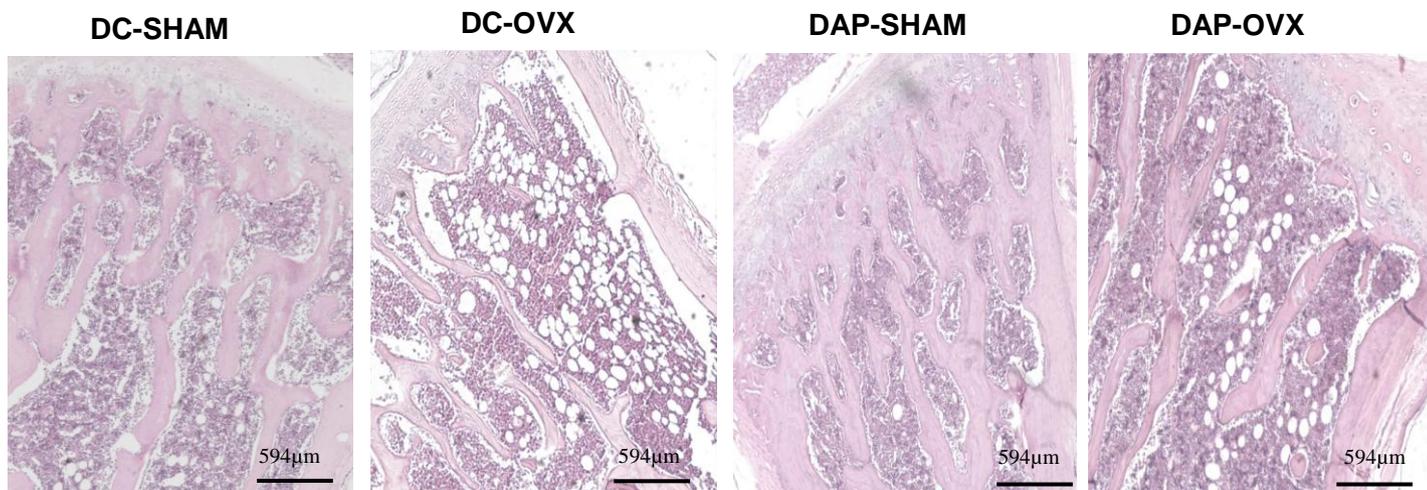


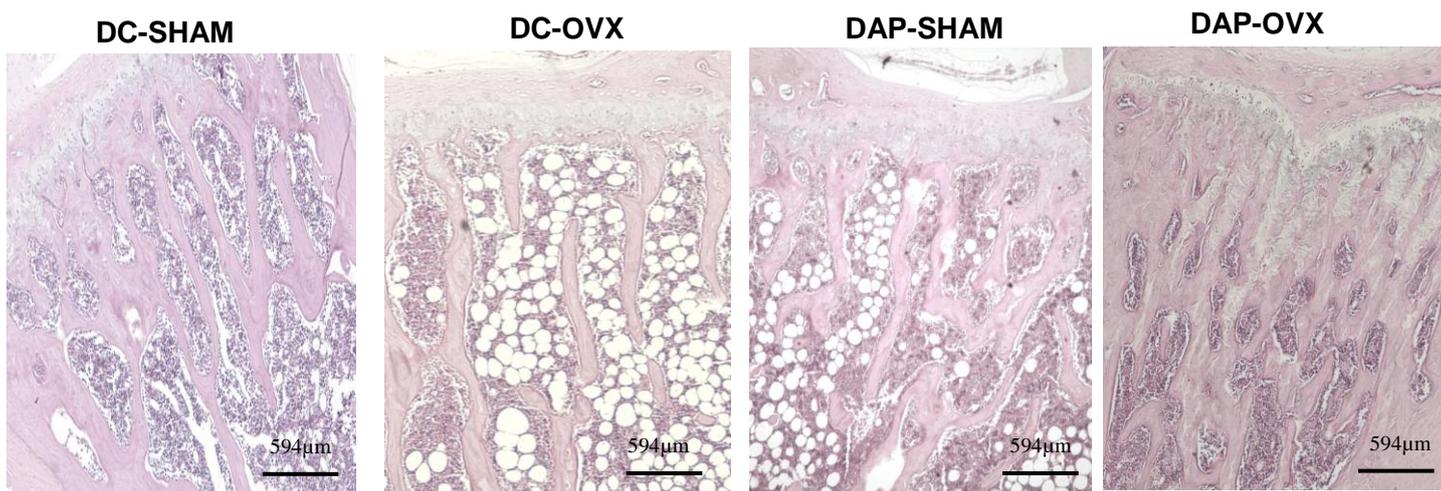
Gráfico 1. Teste oral de tolerância a glicose. A) Comparação referente aos grupos DC-OVX vs. DAP-OVX. B) Comparação referente aos grupos DC-SHAM vs. DC-OVX. C) Comparação referente aos grupos DAP-SHAM vs. DAP-OVX. D) Área sob a curva da concentração sanguínea de glicose. DC - SHAM (Dieta controle e cirurgia SHAM); DC - OVX (Dieta controle e cirurgia de ovariectomia); DAP-SHAM (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia SHAM); DAP-OVX (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia de ovariectomia). \*Diferença entre os grupos nos respectivos tempos indicados (gráfico A, B e C) e entre as barras horizontais para o gráfico D, #Diferença em relação ao basal, n=5 para o grupo DC-OVX e n=6 para o restante dos grupos. SHAM: cirurgia *sham*; OVX: cirurgia de ovariectomia. Para as comparações ao longo do tempo, foi utilizado um ANOVA two way com medidas repetidas considerando como fonte de variação o tempo e a dieta (gráfico 1A ou o tempo e a ovariectomia (gráfico 1B e 1C). Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 13.**  
**Figuras complementares do capítulo 2**

**A. Vértebras T1-T7**



**B. Vértebras T8-T13**



**C. Epífise do fêmur distal**

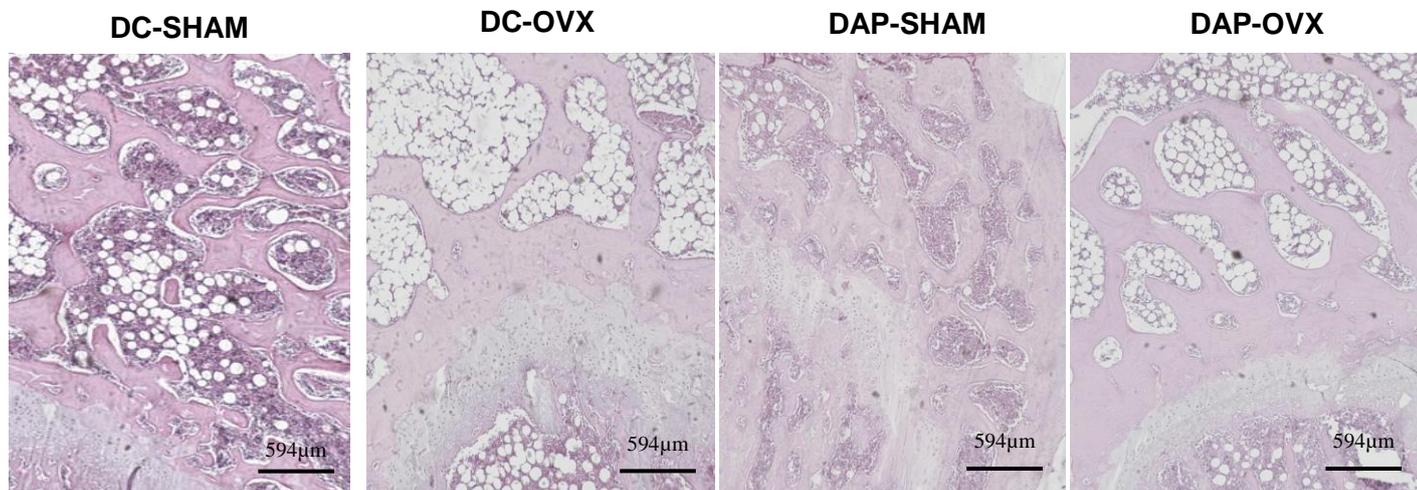


FIGURA 1. Análise histológica de secções das vértebras torácicas e epífise do fêmur distal. Barra= 594µm. A) Vértebras torácicas T1-T7. B) Vértebras torácicas T8-T13. C) Epífise do fêmur distal. DC-SHAM (Dieta controle e cirurgia sham); B) DC-OVX (Dieta controle e cirurgia de ovariectomia); C) DAP-SHAM (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia sham); D) DAP-OVX (Dieta de alta palatabilidade e cirurgia de ovariectomia). Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 14.**  
**Percentuais de trabécula óssea dos sítios ósseos apresentados em**  
**gráficos do capítulo 2**

TABELA 1. Percentuais de trabécula óssea das vértebras lombares, da metáfise da tíbia proximal, do osso nasal, metáfise do fêmur distal e fêmur proximal

Variáveis (%)	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
Vértebras L1-L3	40,1±3,2	25,1±5,3 <sup>#</sup>	54,1± 4,3 <sup>*</sup>	32,8±4,1 <sup>* #β</sup>
Vértebras L4-L6	40,1±4,2	25,6±3,5 <sup>#</sup>	47,9±6,3 <sup>*</sup>	35,4±4,9 <sup>*#</sup>
Metáfise da tíbia proximal	35,9±9,8	16,4±6,0 <sup>#</sup>	44,6±7,3 <sup>*</sup>	25,7±7,2 <sup>*# β</sup>
Oso nasal	15,6±2,4	12,3±1,0 <sup>#</sup>	33,9±3,0 <sup>*</sup>	21,6±1,7 <sup>*# β</sup>
Metáfise do fêmur distal	39,0±3,2	15,5±4,5 <sup>#</sup>	49,4±6,4 <sup>*</sup>	26,3±8,7 <sup>*# β</sup>
Fêmur proximal	49,4± 6,2	40,9±7,7 <sup>#</sup>	49,2±10,1	42,3±8,4 <sup># β</sup>

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX).

<sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM vs. DC-OVX; DAP-SHAM vs. DAP-OVX), <sup>β</sup>Diferença entre o grupo DAP-OVX vs. DC-SHAM, *n*=6 para todos os grupos e comparações. SHAM: Cirurgia *sham*; OVX: Cirurgia de ovariectomia. TAP: tecido adiposo periuterino. Fonte: resultado do próprio autor.

## APÊNDICE 15.

### Concentração sérica de cálcio, ingestão alimentar e ingestão de minerais do capítulo 2

Conforme verificado no experimento 1, os animais que ingeriram a dieta de alta palatabilidade submetidos à cirurgia *sham* apresentaram maior ingestão alimentar comparados aos animais submetidos à dieta controle *sham*. Este resultado também foi encontrado nas ratas ovariectomizadas alimentadas com a dieta de alta palatabilidade (DC-OVX vs. DAP-OVX,  $p=0,02$ ). Não houve diferença da ovariectomia na ingestão alimentar dos animais (DC-SHAM vs. DC-OVX,  $p=0,5$  e DAP-SHAM vs. DAP-OVX,  $p=0,6$ ). Apesar da maior ingestão alimentar total, os animais do grupo dieta de alta palatabilidade e castrados apresentaram menor ingestão de cálcio e fósforo quando comparados aos animais DC-OVX (DC-OVX vs. DAP-OVX,  $p<0,01$  para todas as comparações). Não houve diferença para a concentração sérica de cálcio em nenhum dos grupos.

TABELA 1: Concentração sérica de cálcio, ingestão alimentar e de minerais

Variáveis	Dieta controle		Dieta de alta palatabilidade	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
Ingestão alimentar diária (g/dia)	17,9±0,6	18,5±1,4	21,3±2,7*	20,9±1,4*
Ingestão de cálcio diária (g/dia)	0,26±0,01	0,25±0,01	0,21±0,01*	0,20±0,0*
Ingestão de fósforo diária (g/dia)	0,18±0,06	0,19±0,01	0,13±0,01*	0,13±0,09*
Concentração sérica de cálcio (mg/dl)	11,0±0,3	11,1±1,6	11,8±1,0	12,1±2,3

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM vs. DAP-SHAM; DC-OVX vs. DAP-OVX),  $n=6$  para todos os grupos e comparações. SHAM: Cirurgia *sham*; OVX: Cirurgia de ovariectomia. Para a variável concentração sérica de cálcio foi necessária a transformação radicial para a normalidade dos dados. A concentração sérica de cálcio foi avaliada por meio de um método enzimático. Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 16.**  
**Resultados complementares do capítulo 3**

TABELA 1. Massa corporal, variáveis séricas complementares, peso dos coxins adiposos e do gastrocnêmio

Parâmetros	Dieta controle			Dieta de alta palatabilidade		
	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T
Massa corporal (g)	315,2±20,1	398,2±46,6 <sup>#</sup>	381,5±46,0	391,9±57,4 <sup>*</sup>	489,9±66,5 <sup>*#β</sup>	429,7±58,9 <sup>*αγ</sup>
Colesterol total (mg.dl <sup>-1</sup> )	154,5±31,7	183,6±20,4	177,5±22,7	162,5 ± 39,0	240,9±162,8 <sup>*#β</sup>	201,2±31,3
HDL-C (mg.dl <sup>-1</sup> )	7,2 ± 2,9	10,9±8,5	7,1±4,6	5,8±2,0	11,7±7,5	8,3 ±1,8
Triglicérides (mg.dl <sup>-1</sup> )	245,4±59,1	244,9±70,1	248,2±88,3	503,4±308,2 <sup>*</sup>	482,7±243,0 <sup>*β</sup>	356,4±179,1
Corticosterona (pg/ml)	36755,0±19313,8	52281,4±26185,3	61223,1±43360,1	60342,1±19616,3	50089,3±49330,1	49024,9±25290,6
Adiponectina (ng/ml)	24997,4±8008,4	44824,5±18368,6 <sup>#</sup>	54276,4±18569,5	32355,0±5947,7	58945,7±18987,3 <sup>#</sup>	42363,1±37582,6
Estradiol (pg/ml)	20,8±3,0	20,9±3,9	18,9±2,8	21,2±4,6	21,2±4,6	17,5±4,2
TAP (g)	1,6±0,3	2,5± 0,5	2,2±0,5	3,7±0,4 <sup>*</sup>	3,2±0,7 <sup>*</sup>	3,6±0,4 <sup>*</sup>
TAR (g)	1,9± 0,1	2,4±0,6	1,9 ±0,6	2,7±0,2 <sup>*</sup>	3,4±0,7 <sup>*</sup>	3,2±0,9 <sup>*</sup>
TAM (g)	0,9±0,1	1,3±0,4	1,0±0,2	1,8±1,2 <sup>*</sup>	1,9±1,0	1,4±0,2 <sup>*</sup>
Gastrocnêmio(g)	4,1±0,2	4,6±0,6	4,5±0,4	4,5±0,4	5,0±0,4	4,5±0,4

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM-NT vs. DAP-SHAM-NT; DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T). <sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM-NT vs. DC-OVX-NT; DAP-SHAM-NT vs. DAP-OVX-NT). <sup>α</sup>Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T), <sup>β</sup> Diferença entre o grupo DAP–OVX-NT vs. DC–SHAM-NT. <sup>γ</sup> Diferença entre DAP–OVX–T vs. DC–SHAM–NT, n= 6 para todos os outros grupos TAP: tecido adiposo periuterino. TAR: tecido adiposo retroperitoneal. TAM: tecido adiposo mesentérico. SHAM: animais submetidos à cirurgia *sham*. OVX: animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. NT: animais não treinados. T: animais treinados. A concentração sérica de corticosterona foi determinada pelo método ELISA e as concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e HDL-C foram determinadas por métodos colorimétricos. Fonte: resultado do próprio autor.

Não houve efeito de treinamento físico para as comparações referentes ao peso dos coxins adiposos (TABELA 1). A concentração sérica de colesterol e triglicérides foi similar entre os grupos que realizaram o treinamento e seus respectivos controles. Entretanto, como evidenciado nos capítulos anteriores houve efeito da dieta, pois estas variáveis foram maiores nos grupos DAP-OVX-NT e DAP-SHAM-NT em relação aos seus respectivos controles. O grupo DAP-OVX-NT apresentou maiores concentrações em relação ao DC-SHAM-NT ( $p < 0,001$  para ambas as variáveis) e o grupo DAP-OVX-T não foi diferente do grupo DC-SHAM-NT ( $p = 0,06$  para o colesterol e  $p = 0,2$  para o triglicérides). Em relação aos efeitos da ovariectomia o grupo DAP-OVX-NT apresentou maiores concentrações séricas de colesterol total em comparação ao grupo DAP-SHAM-NT e não houve diferença para as triglicérides. O HDL-C, a concentração sérica de corticosterona e o peso dos gastrocnêmio não foram diferentes entre os grupos – (TABELA 1).

## APÊNDICE 17. Gráficos ao longo do tempo do TOTG no capítulo 3

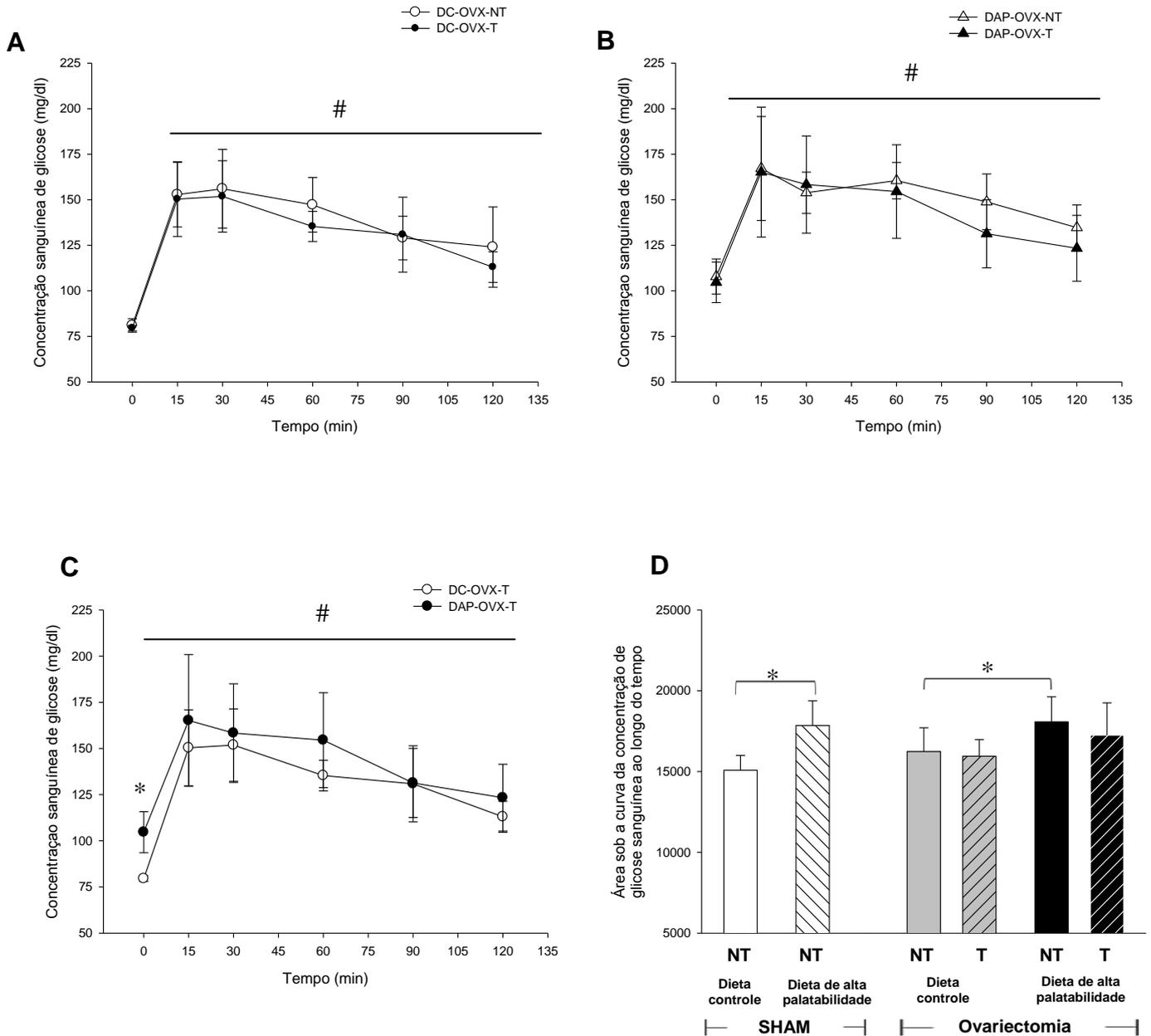
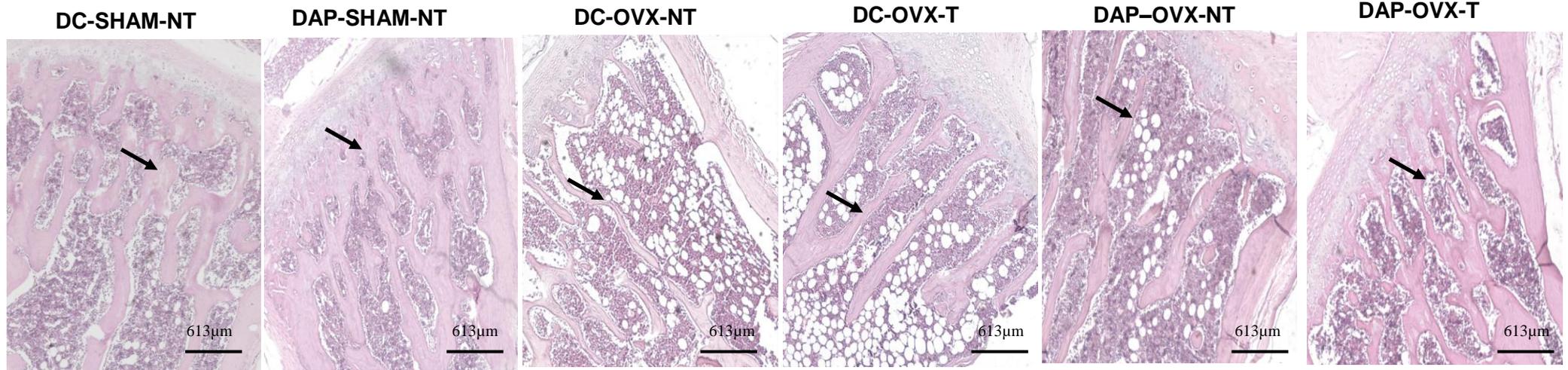


GRAFICO 1. Teste oral de tolerância a glicose. A) Comparação referente ao grupo DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T. B) Comparação referente ao grupo DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T. C) Comparação referente ao grupo DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T. D) Área sob a curva da concentração sanguínea de glicose. DC - OVX - NT (Dieta controle, ovariectomizado e não treinado); DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomizado e treinado); DAP - OVX - NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomizado e não treinado); DAP- OVX - T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomizado e treinado). \*Diferença entre os grupos nos respectivos tempos indicados (gráfico A, B e C) e entre as barras horizontais para o gráfico D, #Diferença em relação ao basal.,  $n=5$  para o grupo DC-OVX-NT e  $n=6$  para todos os grupos e comparações. NT: não treinado. T: Treinado. Para as comparações ao longo do tempo, foi utilizado um ANOVA two way com medidas repetidas considerando como fonte de variação o tempo e a dieta (gráfico 1A e 1C ou o tempo e o treinamento físico (gráfico 1B)). Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 18.**  
**Figuras complementares do capítulo 3**

**A. Vértebras T1-T7**



**B. Vértebras T8-T13**

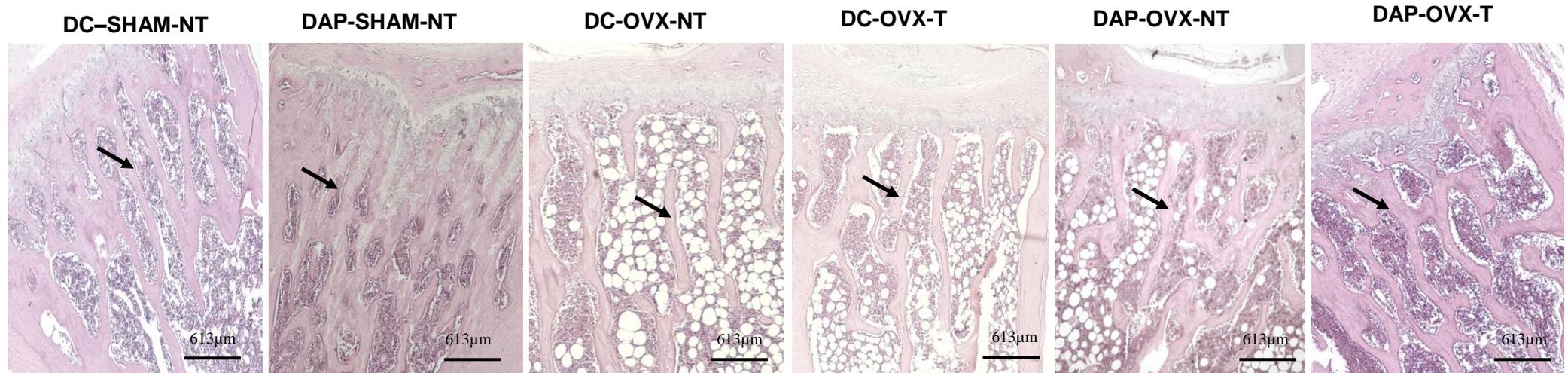


FIGURA 1. Análise histológica de secções das vértebras torácicas, Barra= 613µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta de alta palatabilidade, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

## Epífise do fêmur distal

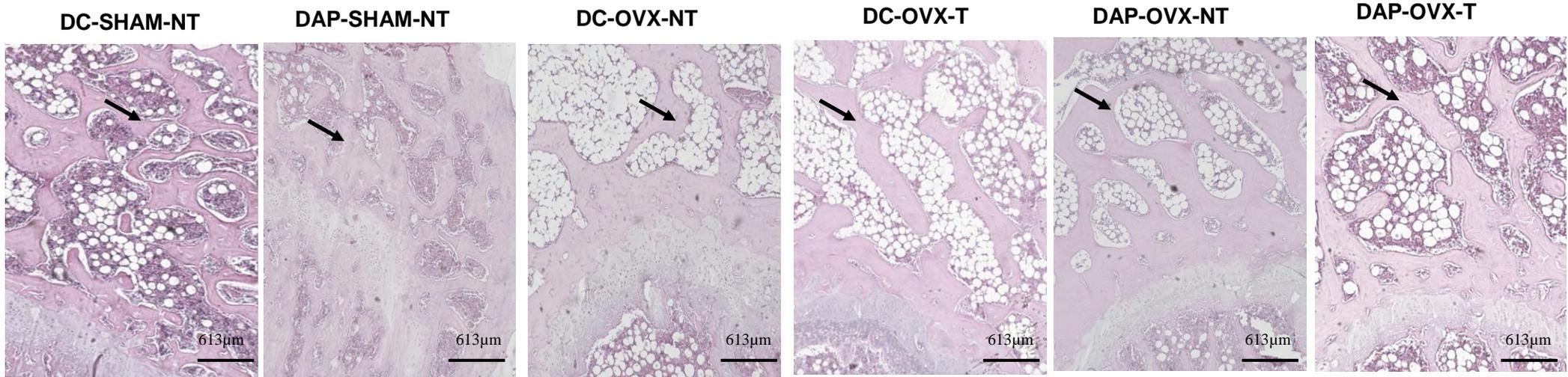


FIGURA 2. Análise histológica de seções da epífise do fêmur distal. Barra= 613µm. DC-SHAM-NT (Dieta controle, cirurgia *sham* e não treinado). DAP-SHAM-NT (Dieta de alta palatabilidade, cirurgia *sham* e não treinado). DC-OVX-NT (Dieta controle, ovariectomia e não treinado). DC-OVX-T (Dieta controle, ovariectomia e treinado). DAP-OVX-NT (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e não treinado). DAP-OVX-T (Dieta de alta palatabilidade, ovariectomia e treinado). As setas indicam as trabéculas ósseas. Fonte: resultado do próprio autor.

**APÊNDICE 19.**  
**Percentuais de trabécula óssea dos sítios ósseos apresentados em**  
**gráficos do capítulo 3**

TABELA 1. Percentuais de trabécula óssea das vértebras lombares, da metáfise da tíbia proximal, do osso nasal, metáfise do fêmur distal e fêmur proximal

Variáveis (%)	Dieta controle			Dieta de alta palatabilidade		
	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T
Vértebras L1-L3	40,1±3,2	19,8±5,3 <sup>#</sup>	32,5±4,2 <sup>αΣ</sup>	54,1± 4,3 <sup>*</sup>	32,8±4,1 <sup>* #β</sup>	38,0±3,1 <sup>γ</sup>
Vértebras L4-L6	40,1±4,2	25,6±3,5 <sup>#</sup>	33,7±5,5 <sup>α #</sup>	47,9±6,3 <sup>*</sup>	35,4±4,9 <sup>*#</sup>	38,9±3,0
Metáfise da tíbia proximal	35,9±9,8	16,4±6,0 <sup>#</sup>	29,5±14,5 <sup>α</sup>	44,6±7,3 <sup>*</sup>	25,7±7,2 <sup>*# β</sup>	29,2±9,4
Ossos nasal	15,6±2,4	12,3±1,0 <sup>#</sup>	22,9±5,7 <sup>αΣ</sup>	33,9±3,0 <sup>*</sup>	21,6±1,7 <sup>*# β</sup>	20,0±4,1 <sup>γ</sup>
Metáfise do fêmur distal	39,0±3,2	15,5±4,5 <sup>#</sup>	19,4±5,3 <sup>Σ</sup>	49,4±6,4 <sup>*</sup>	26,3±8,7 <sup>*# β</sup>	29,5±5,8 <sup>γ</sup>
Fêmur proximal	49,4± 6,2	40,9±7,7 <sup>#</sup>	54,2±4,6 <sup>α</sup>	49,2±10,1	42,3±8,4 <sup># β</sup>	49,8±8,1

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM-NT vs. DAP-SHAM-NT; DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T). <sup>#</sup>Diferença em relação ao respectivo controle da ovariectomia (DC-SHAM-NT vs. DC-OVX-NT; DAP-SHAM-NT vs. DAP-OVX-NT). <sup>α</sup>Diferença em relação ao respectivo controle do treinamento (DC-OVX-NT vs. DC-OVX-T; DAP-OVX-NT vs. DAP-OVX-T), <sup>β</sup> Diferença entre o grupo DAP-OVX-NT vs. DC-SHAM-NT. <sup>γ</sup> Diferença entre DAP-OVX-T vs. DC-SHAM-NT, <sup>Σ</sup>Diferença entre DC – OVX-T vs. DC-SHAM-NT, n= 6 para todos os outros grupos, exceto para a variável epífise da tíbia para os grupos DC-OVX-T (n=4) e DAP-OVX-T (n=5). SHAM: animais submetidos à cirurgia *sham*. OVX: animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. NT: animais não treinados. T: animais treinados. Fonte: resultado do próprio autor.

## APENDICE 20.

### Concentração sérica de cálcio, ingestão alimentar e ingestão de minerais do capítulo 3

Conforme evidenciado nos experimentos anteriores os animais DAP apresentaram maior ingestão alimentar diária em relação aos seus respectivos controles, entretanto menor ingestão diária de cálcio e fósforo. No experimento 3, o grupo DAP-OVX-T também apresentou esta resposta (DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T,  $p=0,05$  para a ingestão total diária,  $p<0,001$  para a ingestão dos minerais) e não houve diferença para o treinamento físico, bem como para as concentrações séricas de cálcio.

TABELA 1: Concentração sérica de cálcio, ingestão alimentar e de minerais

Parâmetros	Dieta controle			Dieta de alta palatabilidade		
	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T	SHAM-NT	OVX-NT	OVX-T
Ingestão alimentar diária (g/dia)	17,9±0,6	18,5±1,4	17,7±2,6	21,3±2,7*	20,9±1,4*	19,8±1,2*
Ingestão de cálcio diária (g/dia)	0,26±0,01	0,25±0,01	0,24±0,03	0,21±0,01*	0,20±0,01*	0,19±0,01*
Ingestão de fósforo diária (g/dia)	0,18± 0,06	0,19±0,01	0,18±0,02	0,13±0,01*	0,13±0,09*	0,12±0,01*
Concentração sérica de cálcio (mg/dl)	11,0±0,3	11,3±0,9	11,0±0,7	11,8±1,0	12,5±1,9	11,8±1,7

\*Diferença em relação ao respectivo controle da dieta (DC-SHAM-NT vs. DAP-SHAM-NT; DC-OVX-NT vs. DAP-OVX-NT; DC-OVX-T vs. DAP-OVX-T).  $n= 6$  para todos os outros grupos. SHAM: animais submetidos à cirurgia *sham*. OVX: animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. NT: animais não treinados. T: animais treinados. Para a variável concentração sérica de cálcio, foi necessária a transformação logarítmica para a normalidade dos dados. A concentração sérica de cálcio foi avaliada por meio de um método enzimático. Fonte: resultado do próprio autor.