

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA  
MESTRADO EM BIOFÍSICA**

**ANGÉLICA DA SILVA TENÓRIO**

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO EM  
CAMUNDONGOS OVARIECTOMIZADAS**

**RECIFE  
2002**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA  
MESTRADO EM BIOFÍSICA

**ANGÉLICA DA SILVA TENÓRIO**

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO EM  
CAMUNDONGOS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biofísica do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Regina Arruda de Moraes.**

RECIFE  
2002

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO EM  
CAMUNDONGOS OVARIECTOMIZADAS**

**Angélica da Silva Tenório**

**Orientadora:** \_\_\_\_\_

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sílvia Regina Arruda de Moraes

**Examinadores:** \_\_\_\_\_

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria do Carmo Medeiros

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elizabeth da Silveira Neves

Dedico este trabalho aos meus pais, Moacir e Irailda, por todo o empenho na educação e formação do caráter de seus filhos.

## AGRADECIMENTOS

- A DEUS, a quem peço luz e força todas as manhãs, para que eu nunca desista dos meus objetivos;
- Aos meus pais, Moacir e Irailda de quem recebi durante toda a minha vida exemplos de caráter, força, dignidade e coragem para lutar pelo que se deseja;
- Aos meus irmãos Andréa e Fabinho, nos quais sempre pude me espelhar e dos quais sempre recebi todo o apoio e o incentivo necessários para estudar longe de casa;
- Às minhas tias Ivani (tia Didi) e Socorro, pela acolhida em seus lares com muito carinho e paciência;
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Regina Arruda de Moraes, pela orientação, amizade, paciência e pelos ensinamentos a mim transmitidos, sempre com muita ética, transparência e disciplina;
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho, que me recebeu em sua “casa” de braços abertos, me transmitindo não apenas ciência, mas exemplo de vida, além de cuidar de seus orientandos como verdadeiros filhos;
- À amiga Simone Bezerra, que além da amizade e incentivo, teve participação direta na realização deste trabalho;
- Aos demais colegas do Mestrado, em especial a João Muniz, pelo apoio e paciência nas disciplinas de cálculo, a Pedro Lemos e Caroline Wanderley pelo convívio sempre prestativo nesses dois anos;
- À família do LBCM, Grace Mary, Elaine Carvalho, Fátima Galdino, Andrezza Lemos e Edgar Vieira, com os quais aprendi muito, e a todos os “agregados” que por lá passaram nesses dois anos, sempre nos deixando algum conhecimento;
- À estagiária Flávia Barreto, pela amizade e colaboração direta na execução deste trabalho;
- Aos professores do Mestrado de Biofísica, pelos ensinamentos e experiências transmitidos;
- Aos funcionários do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, em especial a Valéria, por sua colaboração e gentileza e ao Sr. Fredson, que é um ser humano muito especial, que não apenas está sempre pronto a nos ajudar quando solicitamos, mas que na sua simplicidade tem muito a nos ensinar;

- Ao Prof. Tetsuo Tashiro, pela sua paciência e disponibilidade na realização das análises estatísticas;
- Ao Departamento de Patologia, em especial ao Prof. Nicodemos Telles Filho e ao mestrando Mário Ribeiro por terem sido sempre bastante prestativos e pacientes, dando colaboração indispensável a este trabalho;
- Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em especial à bióloga Fábiana Cristiane Melo, pela amizade e apoio na obtenção de nossas lâminas histológicas;
- Aos colegas do Mestrado de Morfologia, especialmente aos estagiários do LAMPE, Patrícia, Bergh, Jéssica e Ana Elisa, ao professor Diógenes e a Alex, pela atenção e disponibilidade em ajudar;
- Às amigas Natália Ferraz e Rita Lucena, que de maneira indireta também participaram da realização deste trabalho, com compreensão e incentivo;
- À UFPE e à CAPES, pelo acesso ao Mestrado e pela concessão de bolsa;
- A todos que de alguma forma me permitiram chegar até aqui, e com certeza não foram esquecidos, apenas é impossível citar todos os nomes neste momento.

## RESUMO

Alterações endócrinas decorrentes da falência ovariana estão relacionadas a um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, que caracterizam a osteoporose, doença óssea que afeta principalmente mulheres no período pós-menopausa. O objetivo deste estudo é verificar os efeitos do treinamento físico sobre o metabolismo ósseo em camundongos fêmeas submetidas a ovariectomia e avaliar as possíveis alterações endócrinas e morfológicas. Foram utilizados 50 camundongos fêmeas, com 90 dias de idade, divididos em 5 grupos (n=10): controle, pseudo-operado sedentário (POS), pseudo-operado treinado (POT), ovariectomizado sedentário (OVS) e ovariectomizado treinado (OVT). Inicialmente, os grupos OVS e OVT foram submetidos a ovariectomia, e os grupos POS e OVS a uma pseudo-cirurgia. Os grupos POT e OVT foram submetidos ao exercício físico, após 30 dias de cirurgia, durante 5 semanas em esteira elétrica a uma velocidade de 20 m/min., os demais animais permaneceram sedentários no mesmo período. A massa corpórea dos animais era verificada duas vezes por semana. Em seguida, os animais foram sacrificados, coletando-se o sangue por punção cardíaca para realização de dosagens das concentrações séricas do hormônio estradiol, cálcio e fosfatase alcalina, e os fêmures direitos foram coletados, pesados, medidos e processados histologicamente, realizando-se análise histomorfométrica da região cortical proximal para avaliação da densidade, área e perímetro de osteócitos e verificação da morfologia do tecido ósseo. Os resultados mostram que o grupo controle apresentou ganho de massa corpórea de 12,53%, o grupo POS, 15,39%, o grupo POT, 12,18% e o grupo OVS, 23,27% ( $p < 0,05$ ). A concentração sérica de estradiol esteve 11,35% menor no grupo OVT em relação ao grupo controle e 9,79% inferior ao grupo OVS ( $p < 0,05$ ). A concentração sérica de cálcio apresentou-se mais baixa no grupo OVT ( $5,6 \pm 1,06$  mg/dL), 36% inferior ao grupo controle, 24,32% em relação ao grupo OVS e cerca de 30% em relação aos grupos POS e POT ( $p < 0,05$ ). A concentração sérica de fosfatase alcalina esteve mais alta nos grupos treinados, OVT ( $43,19 \pm 9,88$  U/L) e POT ( $35,93 \pm 10,38$  U/L), em relação aos demais grupos, verificando-se um aumento de 48,81% entre os grupos OVT e controle ( $p < 0,05$ ). No grupo OVT o aumento foi de 52,53% quando comparado ao OVS e no grupo POT 46,14% superior ao POS ( $p < 0,05$ ). A massa dos fêmures do grupo POT foi 8,15% superior em relação ao grupo controle, semelhante ao grupo OVT ( $70,28 \pm 3,81$  mg), no qual o aumento foi de 8,81% ( $p < 0,05$ ). No comprimento ósseo não houve diferenças estatisticamente significantes. A densidade média de osteócitos esteve mais alta no grupo OVS ( $18,10 \pm 1,78$ ), estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $12,87 \pm 1,9$ ) ( $p < 0,05$ ). A área média dos osteócitos esteve similar nos grupos controle, POT e OVT, havendo diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos POS ( $15,77 \pm 1,84 \mu\text{m}^2$ ) e OVS ( $12,98 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ ) ( $p < 0,05$ ). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas no perímetro dos osteócitos. Morfologicamente, observou-se que os animais do grupo OVT em relação ao grupo OVS apresentaram lacunas osteocitárias de contorno mais regular e presença de linhas cementantes mais evidentes na matriz óssea. Com estes resultados conclui-se que o treinamento físico em animais ovariectomizados foi capaz de aumentar a atividade metabólica óssea, alterando as concentrações séricas de cálcio, fosfatase alcalina e estradiol, além de modificar o padrão morfológico do tecido ósseo, sendo o exercício físico importante na prevenção e tratamento da osteoporose.

## ABSTRACT

Endocrinous alterations resulting from ovarian failure are related to an unbalance between bone formation and resorption, which characterizes the osteoporosis, bone disease that affect mainly postmenopausal women. The aim of this study is to ascertain the effects of physical training on bone metabolism from mice submitted to ovariectomy and evaluate possible endocrinous and morphological alterations. 50 female mice were utilized, 90 days old, divided into 5 groups (n = 10): control, sedentary sham-operated (POS), trained sham-operated (POT), sedentary ovariectomized (OVS) and trained ovariectomized (OVT). OVS and OVT groups were submitted to ovariectomy, and POS and POT groups to a sham-surgery. POT and OVT groups were submitted to physical training, 30 days after surgery, during 5 weeks, in an electric treadmill, with velocity of 20m/min, the other groups remained sedentary for the same period. The corporal mass of the animals were verified twice a week. After that, the animals were sacrificed, the blood was collected by cardiac puncture to dose serum concentrations of estradiol 17- $\beta$ , calcium and alkaline phosphatase, and right femurs were collected, weighted, measured and histologically processed, for histomorphometrical analyse of proximal cortical area, obtaining osteocyte's density, area and perimeter and verification of bone tissue morphology. The results showed that the control group presented increase of corporal mass in 12,53%, the POS group, 15,39%, the POT group, 12,18% and the OVS, 23,27% ( $p < 0,05$ ). Serum concentration of estradiol 17- $\beta$  was in OVT group 11,35% lesser than control group and 9,79% lesser than OVS group ( $p < 0,05$ ). Serum concentration of calcium was slower in OVT group, 36% lesser than control group, 24,32% lesser than OVS group and about 30% lesser than POS and POT groups ( $p < 0,05$ ). Serum concentration of alkaline phosphatase was higher in trained groups, in comparison to other groups, verifying an increase in 48,81% between OVT and control groups ( $p < 0,05$ ). In OVT group the increase was 52,53% relating to OVS and in POT group, it was 46,14% higher than POS ( $p < 0,05$ ). Femoral mass of POT group was 8,15% higher than control group, similar to OVT group, which the increase was 8,81% ( $p < 0,05$ ). At bone length there aren't statistically significant differences. Osteocyte's density was higher in OVS group ( $8,10 \pm 1,78$ ), statistically significant in comparison to control group ( $12,87 \pm 1,9$ ), ( $p < 0,05$ ). Osteocyte's area are similar in control, POT and OVT groups, there was statistically significant difference between POS ( $15,77 \pm 1,84 \mu\text{m}^2$ ), and OVS ( $12,98 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ ), ( $p < 0,05$ ). Morphologically, was observed that the OVT group animal's relating to OVS group showed osteocytic lacunae with more regular contour and presence of cementant lines on bone matrix. With this results, it was concluded that the physical training on ovariectomized animals was able to increase the bone metabolic activity, altering serum concentrations of calcium, alkaline phosphatase and estradiol 17- $\beta$ , and modified the morphological standard of bone tissue. So, the practical of physical exercises is important for osteoporosis's prevention and treatment.

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>AGRADECIMENTOS</b>	iv
<b>RESUMO</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
<b>2.1 Hormônios ovarianos</b>	16
<u><b>Biossíntese e metabolismo dos hormônios esteróides</b></u>	18
<b>2.2 Fisiologia do tecido ósseo</b>	19
<u><b>Ciclo de remodelação óssea</b></u>	20
<u><b>Controle da remodelação óssea</b></u>	23
<b>2.3 Osteoporose</b>	25
<b>2.4 Hormônios estrogênicos e metabolismo ósseo</b>	27
<b>2.5 Exercício físico e metabolismo ósseo</b>	30
<b>2.6 Metabolismo do cálcio</b>	33
<b>2.7 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo</b>	35
<b>2.8 Histomorfometria óssea</b>	37
<b>3 OBJETIVOS</b>	39
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	39
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
<b>4.1 Animais</b>	40
<b>4.2 Método</b>	40
<b>4.2.1 Grupos de estudo</b>	40
<b>4.2.2 Obtenção da massa corpórea dos animais</b>	40
<b>4.2.3 Procedimento cirúrgico</b>	40
<b>4.2.4 Treinamento físico</b>	41
<b>4.2.5 Sacrifício dos animais e coleta de material</b>	42
<b>4.2.6 Verificação da massa e comprimento femoral</b>	42

4.2.7 Determinação da concentração sérica de estradiol	43
4.2.8 Determinação da concentração sérica de cálcio	44
4.2.9 Determinação da concentração sérica de fosfatase alcalina	44
4.2.10 Processamento histológico das amostras ósseas	44
4.2.11 Análise histomorfométrica do tecido ósseo	45
4.2.12 Tratamento estatístico	45
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
5.1 Massa corpórea	46
5.2 Concentração sérica de estradiol	47
5.3 concentração sérica de cálcio	48
5.4 concentração sérica de fosfatase alcalina total	49
5.5 Comprimento femoral	51
5.6 Massa femoral	51
5.7 Medidas morfométricas	52
5.7.1 Densidade de osteócitos	52
5.7.2 Área de osteócitos	53
5.7.3 Perímetro de osteócitos	54
5.8 Morfologia do tecido ósseo	54
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1- Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea .....	23
Figura 2 - Esteira elétrica confeccionada para a realização do treinamento físico dos animais.....	42
Figura 3- Curva-padrão obtida para dosagem da concentração sérica de estradiol (pg/ml) nos diversos grupos de estudo.....	43
Figura 4 – Análise da massa corpórea (mg) .....	48
Figura 5 – Análise da concentração sérica de estradiol (pg/mL) .....	49
Figura 6 – Análise da concentração sérica de cálcio (mg/dL) .....	50
Figura 7 - Análise da concentração sérica de fosfatase alcalina total (U/L) .....	50
Figura 8 – Análise do comprimento médio (cm) dos fêmures direitos dos animais ..	51
Figura 9 – Análise da massa (mg) dos fêmures direitos dos animais .....	52
Figura 10- Análise da densidade média de osteócitos por campo microscópico visualizado.....	53
Figura 11 – Análise da Área dos osteócitos ( $\mu\text{m}^2$ ). .....	54
Figura 12 – Análise do Perímetro dos osteócitos ( $\mu\text{m}$ ).....	55
Figura 13 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo controle .....	56
Figura 14 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo POS .....	56
Figura 15 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo POT .....	57
Figura 16 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo OVS .....	57
Figura 17 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo OVT.....	58

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BMU	Unidade Básica Multicelular
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E <sub>2</sub>	Estradiol ou 17β-estradiol
E <sub>1</sub>	Estrona
E <sub>3</sub>	Estriol
EGF	Fator de crescimento epidermal
ER-α	Receptor estrogênico-α
ER-β	Receptor estrogênico-β
FA	Fosfatase alcalina
FEC	Fluido extracelular
GH	Hormônio do crescimento
HE	Hematoxilina e eosina
IGF-I	Fator de crescimento insulínico-I
IGF-II	Fator de crescimento insulínico-II
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-11	Interleucina-11
LH	Hormônio Luteinizante
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófago
OPG	Osteoprotegrina
OPGL	Ligante de osteoprotegrina
OVS	Ovariectomizado sedentário
OVT	Ovariectomizado treinado
PTH	Hormônio paratireóide
POS	Pseudo-operado sedentário
POT	Pseudo-operado treinado
SHBG	Globulina Ligante de Hormônio Sexual
TGF-α	Fator de crescimento e transformação-α
TGF-β	Fator de crescimento e transformação-β
TNF	Fator de necrose tumoral

TNF- $\alpha$  Fator de necrose tumoral- $\alpha$

17 HSD 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase

1,25(OH) $_2$  D $_3$  1,25 dihidroxi-vitamina D

## 1 INTRODUÇÃO

O hormônio estrogênico é um dos hormônios sistêmicos mais importantes na manutenção do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (RAISZ, 1999), mecanismos pelos quais o osso se mantém em constante renovação, que é essencial para a integridade estrutural do esqueleto e para sua função metabólica na manutenção da homeostase mineral (MACEDO; ARAÚJO, 1997).

A densidade óssea no esqueleto adulto representa a soma de dois processos: a aquisição do pico de massa óssea e a manutenção da densidade óssea na vida adulta (BECK; SHOEMAKER, 2000; LERNER, 2000). A saúde óssea tem influências do estresse físico (mecânico) ao qual os ossos são submetidos e de níveis adequados de cálcio, hormônios paratireóide, estrogênio e glicocorticóides. Segundo diversos autores, a insuficiência estrogênica é considerada como elemento crítico de mudança na taxa de reabsorção para um nível mais alto, levando à perda de massa óssea (ERICKSON; SERVIER, 1997; YEH; CHEN; ALOIA, 1997; RAISZ et al., 1999).

A ação do hormônio estrogênico sobre o tecido ósseo ainda não foi claramente definida, mas sabe-se que ele influencia a diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas em osteoclastos e participa da regulação de citocinas e de fatores locais envolvidos nos mecanismos de remodelação óssea (JILKA, 1998; RAISZ, 1999). Segundo Lima et al. (2001) durante a deficiência estrogênica haveria uma maior atuação de várias citocinas, acelerando o processo de reabsorção óssea.

A osteoporose é uma patologia óssea sistêmica caracterizada por um desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, resultando em perda óssea e deterioração da microarquitetura esquelética, levando à fragilidade óssea (GODDARD; KLEEREKOPER, 1998; ROSEN; TENENHOUSE, 1998). Segundo Bortoli et al. (1996) a deficiência estrogênica é a causa mais comum de osteoporose, e o modelo animal que melhor representa a redução de massa óssea após a menopausa é a rata ovariectomizada, pois a redução de estrógenos observada neste modelo produz aumento na taxa de remodelação óssea com reabsorção superando a formação.

O exercício físico, por promover estímulo mecânico que leva à osteogênese, tem sido utilizado em diversas modalidades para se obter manutenção

ou aumento da massa esquelética, tanto em estudos utilizando animais, como em humanos, sendo considerado uma estratégia para reduzir o risco de osteoporose (KANNUS et al., 1992; HART et al., 2001). Estudos têm demonstrado que a prática de exercício físico regular é um fator importante na prevenção e tratamento da osteoporose (ANDREWS, 1998), porém, o mecanismo exato pelo qual a atividade física aumenta a massa óssea ainda não está esclarecido.

Segundo Tamaki et al. (1998) o exercício físico aumenta a formação óssea tanto em ratos como em humanos, sendo o exercício com suporte de carga o que promove estresse mecânico efetivo na manutenção da densidade mineral óssea em mulheres no período logo após a menopausa, e em animais experimentais tem-se demonstrado que a corrida aumenta a densidade mineral óssea por melhorar o estresse mecânico sobre o osso e induzir hipertrofia do osso cortical. Além deste efeito mecânico, o exercício também promove alterações nos níveis hormonais, tais como estímulo à secreção de hormônios sexuais, hormônio do crescimento e catecolaminas, e estimula o recrutamento osteoblástico. Macedo; Araújo (1997) citam o estímulo piezo-elétrico como um dos efeitos do exercício que determinam este aumento na atividade osteoblástica.

Há décadas têm sido desenvolvidos estudos a respeito da influência do exercício físico sobre a Densidade Mineral Óssea tanto em humanos (DALÉN; OLSSON, 1974; FORWOOD; BURR, 1993), como experimentalmente (BOURRIN et al., 1995; KIUCHI; ARAI; KATSUTA, 1997). Pesquisas demonstraram que exercício físico moderado, tal como corrida, (BOURRIN et al., 1995; HORCAJADA et al., 1997; HUANG et al., 2002); natação (HART, 2001) e salto (UMEMURA et al., 1995 apud HORCAJADA et al., 1997) aumentam a massa óssea em ratos.

Bourrin et al. (1995) examinaram os efeitos do exercício em esteira sobre a rede trabecular óssea e as adaptações celulares em áreas diferentes da tíbia de ratos Wistar machos, tendo verificado alterações significativas a partir da 3ª semana de treino.

Em estudo realizado por Kiuchi; Arai; Katsuta (1998) foram analisados os efeitos do treino físico sobre a massa óssea de ratos Wistar machos e as alterações após período de cessação do treinamento, havendo ganho de massa óssea e manutenção após suspensão do exercício.

Peng et al. (1997) apud Kiuchi; Arai; Katsuta (1998) em estudos realizados com ratas ovariectomizadas, sugerem que treinamento físico através de corrida previne a perda óssea após deficiência estrogênica.

Tamaki et al. (1998) avaliaram os efeitos do exercício em esteira associado à reposição hormonal em ratas Wistar ovariectomizadas, tendo verificado que o exercício potencializa os efeitos benéficos do hormônio estrogênico sobre o tecido ósseo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hormônios ovarianos

O ovário maduro sintetiza e secreta ativamente diversos hormônios. Entre eles estão os esteróides sexuais: estrógenos, progesterona, andrógenos e seus precursores, além de produzir relaxina, inibina, ativinas e agentes com ação local, como a folistatina e as prostaglandinas (GOLDFIEN; MONROE, 2000).

Os estrógenos pertencem à classe dos hormônios esteróides e são produzidos pelo ovário, pelo córtex adrenal, e por conversão periférica da androstenediona no tecido adiposo. O ovário é a fonte principal de estrógenos, embora a conversão de precursores dos andrógenos em outros tecidos seja significativa após distúrbios da função ovariana (RUGGIERO; LIKIS, 2002).

Todos os hormônios esteróides são derivados do colesterol, e causam alterações na atividade biológica através da ligação a receptores dentro do citoplasma celular. O complexo esteróide-receptor liga-se a seqüências de ácido desoxirribonucléico (DNA) no núcleo da célula, promovendo a ativação de genes específicos. Pequenas mudanças na molécula do colesterol produzem três tipos diferentes de esteróides: mineralocorticóides, como a aldosterona, que agem sobre o balanço mineral; glicocorticóides, tais como o cortisol, que agem sobre o metabolismo da glicose; e gonadocorticóides, ou estrógenos, progesterona e testosterona, que são agrupados como uma família por causa dos seus efeitos mútuos sobre a função reprodutiva (RUGGIERO; LIKIS, 2002).

Três tipos de estrógenos são produzidos naturalmente no corpo feminino. O  $17\beta$ -estradiol (Estradiol ou  $E_2$ ) produzido pelo ovário, é o estrógeno em maior quantidade e também o mais potente, por possuir alta afinidade pelos receptores estrogênicos. A estrona ( $E_1$ ), um metabólito do estradiol, é produzida pela conversão de androstenediona no tecido adiposo, é menos potente que o estradiol. O terceiro estrógeno endógeno é o estriol ( $E_3$ ), que também é um metabólito do estradiol na periferia, é o principal estrógeno produzido pela placenta durante a gravidez. Quando o ovário cessa a produção de estradiol, a glândula adrenal continua produzindo androstenediona, precursor imediato da estrona, fazendo com que os níveis de estrona permaneçam inalterados (RUGGIERO; LIKIS, 2002). Segundo Vihko; Isomaa; Gohsh (2001) o ovário é a fonte primária do estradiol presente na

circulação de mulheres no período pré-menopausa, porém, a estrona e os andrógenos circulantes com origem na glândula adrenal também são convertidos em estradiol em tecidos periféricos, como o tecido adiposo, e após a menopausa a biossíntese de estrógenos em tecidos periféricos tem papel principal na ação estrogênica. Corroborando com estes autores, Simpson (2002) relata que além do tecido adiposo, outras áreas onde há produção de estradiol durante esta fase são os osteoblastos e condrócitos do tecido ósseo, células do músculo liso do endotélio vascular, e numerosas áreas cerebrais, onde o estradiol irá atuar localmente como fator parácrino ou autócrino.

Como todos os esteróides, os estrógenos são altamente solúveis em lipídios, e uma vez produzidos, difundem-se facilmente através das membranas celulares dentro da corrente sangüínea. No órgão-alvo, o estrógeno se difunde dentro da célula e através da membrana nuclear, ligando-se ao receptor estrogênico dentro do núcleo. O complexo receptor-ligante une-se ao DNA e inicia a transcrição gênica, direcionando a produção de proteínas específicas que efetuarão a ação fisiológica iniciada pelo estrógeno no tecido-alvo. O estradiol é um hormônio pleiotrópico devido à propriedade do complexo receptor-estrógeno atuar com um fator de transcrição nuclear para uma série de genes diferentes, estando assim, envolvido na fisiopatologia de uma série de doenças, dentre as quais, hipertensão, arteriosclerose, endometriose, câncer de mama e osteoporose (HUBER; SCHNEEBERGER; TEMPFER, 2002; RUGGIERO; LIKIS, 2002).

Na circulação sangüínea, a maior parte do estrógeno está ligada a uma proteína denominada globulina ligante de hormônio sexual (SHBG). Aproximadamente 2% dos estrógenos no plasma estão livres. Apenas os estrógenos livres são biologicamente ativos e estão aptos a entrar nas células. As funções fisiológicas dos estrógenos não estão restritas ao sistema reprodutivo, tendo sido observados seus efeitos sobre o trato genital, mama, pele, músculos, ossos, fígado, cérebro e sistema cardiovascular (RUGGIERO; LIKIS, 2002).

## Biossíntese e metabolismo dos hormônios esteróides

Os hormônios esteróides são sintetizados a partir do colesterol, presente na glândula tanto em estado livre quanto esterificado com ácidos graxos (ésteres colesteril). O colesterol derivado das lipoproteínas circulantes ou dos ésteres colesteril na glândula é convertido em pregnenolona pela enzima P450cc, que remove um fragmento de seis carbonos, o ácido isocapróico. Tal reação ou grupo de reações é a etapa limitante de velocidade no processo de biossíntese, sendo controlada pelo hormônio luteinizante (LH) na hipófise anterior (GOLDFIEN; MONROE, 2000).

A pregnenolona, formada por esta reação pode ser convertida em progesterona ou em  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona. A conversão em progesterona requer a ação da  $3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase e  $\Delta^{5,4}$ -cetosteróide isomerase, que desloca a ligação dupla da posição  $\Delta^5$  para a posição  $\Delta^4$ . A progesterona é secretada pelo corpo lúteo em grandes quantidades após a ovulação e também atua como precursor dos androgênios e estrogênios. O estradiol é sintetizado a partir dos androgênios pela enzima P450 aromatase. O processo envolve três etapas: hidroxilação do grupo metil no carbono 19, oxidação deste grupo e hidroxilação na posição  $3\alpha$ . A regulação da biossíntese e da liberação dos estrógenos é controlada pelas gonadotrofinas e também por fatores locais (GOLDFIEN; MONROE, 2000).

Um grupo de enzimas que afeta a disponibilidade de estrógenos e andrógenos biologicamente ativos é a família das  $17\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenases (17HSD's). Estas catalizam as interconversões entre  $17\beta$ -hidroxiesteróides e 17-cetosteróides e devido a maior afinidade de estrógenos e andrógenos por seus receptores na forma de  $17\beta$ -hidroxi, as enzimas 17HSD regulam a atividade biológica dos hormônios sexuais. Outras enzimas, tais como a P450 aromatase, a sulfatase estrogênica e a sulfotransferase estrogênica também modulam andrógenos e estrógenos. Conseqüentemente, a concentração de hormônios esteróides biologicamente ativos na célula depende do transporte de hormônios e da ação de diferentes tipos de enzimas (VIHKO; ISOMAA; GHOSH, 2001).

O estradiol circulante é convertido no fígado em estrona pela 17 HSD. Parte da estrona entra novamente na circulação; entretanto, a maior parte dela é

metabolizada, ainda em  $16\alpha$ -hidroxiestrona (convertida em estradiol) ou 2- ou 4-hidroxiestrona (estrogênio catecol). Os estrogênios catecóis, que possuem atividade biológica, são convertidos nas substâncias 2- e 4-metóxi pela catecol-O-metiltransferase. Grande parte da estrona remanescente é conjugada, para formar o sulfato de estrona. O estriol é convertido principalmente em estriol 3-sulfato-16-glicuronídeo antes da excreção renal (GOLDFIEN; MONROE, 2000).

## **2.2 Fisiologia do tecido ósseo**

O esqueleto é uma estrutura altamente especializada e dinâmica que sofre constante regeneração. Consiste em um tecido conectivo rígido composto por células especializadas, matriz mineralizada e não-mineralizada, e espaços que incluem a cavidade medular óssea, canais vasculares, canalículos e lacunas (MANOLAGAS, 2000). O tecido esquelético calcificado é composto por uma matriz extracelular que contém moléculas orgânicas e cristais de hidroxiapatita. A presença de minerais faz deste um tecido único, não apenas do ponto de vista biossintético, mas também em termos de catabolismo (LERNER, 2000).

Durante o desenvolvimento e crescimento corpóreo, o esqueleto é esculpido para atingir sua forma e tamanho, através da remoção de osso de um local e deposição em outro diferente, num processo denominado de modelação. Quando a maturidade esquelética é alcançada, a regeneração continua a ocorrer na forma de uma reposição periódica de osso velho por osso novo, este processo é chamado remodelação, cuja função mais provável é prevenir o acúmulo de osso velho, embora a remodelação que ocorre nos ossos em crescimento possua a função de expandir a cavidade medular, aumentando assim, a espessura trabecular (MANOLAGAS, 2000). A quantidade de tecido ósseo durante o crescimento fisiológico e a remodelação esquelética são determinadas pelo equilíbrio entre a taxa de formação e de reabsorção óssea (BECK; SHOEMAKER, 2000; LERNER, 2000).

A remodelação óssea é um mecanismo fundamental para manter a integridade estrutural do esqueleto, bem como para funções metabólicas, como a armazenagem de cálcio, fosfato e magnésio. Ela pode ser desencadeada por mudanças nas forças mecânicas ou microlesões e por respostas hormonais a alterações no suprimento de cálcio e fósforo (RAISZ, 1999). Vários componentes do

ciclo de remodelação óssea são suscetíveis a alterações locais ou fatores sistêmicos, que quando perturbados podem conduzir a mudanças deletérias na massa óssea. Em particular, a ativação da remodelação óssea e o recrutamento de osteoclastos representam os dois pontos mais vulneráveis do ciclo (LIMA et al., 2001).

### Ciclo de remodelação óssea

A remodelação óssea ocorre seguindo um mecanismo complexo e altamente regulado dependente da ação de uma estrutura denominada Unidade Básica Multicelular (BMU), composta por um grupo de células – os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea; os osteoblastos, pela formação óssea; e os osteócitos, que são osteoblastos mais velhos circundados por osso. A BMU atua deslocando-se através do osso, escavando e repondo o tecido ósseo (WEINSTEIN; MANOLAGAS, 2000; PARFITT, 2002).

Os osteoclastos foram originalmente descritos em 1873 por Albert Köliker (ILVESARO, 2001). Estas são células gigantes, multinucleadas, e as únicas capazes de reabsorver osso. São formadas pela fusão de células mononucleadas derivadas do tecido hematopoiético. Seus precursores são células intimamente relacionadas com células da linhagem monócito-macrófago, e assim como elas, os osteoclastos apresentam grande motilidade. Sua atividade é essencial para a reabsorção óssea fisiológica durante o crescimento e a remodelação esquelética, bem como para a manutenção da homeostasia do cálcio. Apresentam grande número de mitocôndrias, lisossomos, ribossomos livres e extensos complexos de Golgi. Podem ser encontrados na superfície trabecular e na região endosteal dos ossos, presos firmemente à matriz óssea calcificada. Uma característica própria do osteoclasto é a presença de receptores de calcitonina (LERNER, 2000; ILVESARO, 2001).

Os osteoblastos originam-se de células primitivas mesenquimais, que também são capazes de originar condrócitos, adipócitos e células estromais fibroblásticas da medula hematopoiética. Os pré-osteoblastos são as células mais imaturas pertencentes à linhagem osteogênica que podem ser facilmente reconhecidas no osso. Encontram-se próximos à camada de osteoblastos, que cobre a superfície óssea, e apresentam aspectos semelhantes ao osteoblasto maduro, como a capacidade de secretar fosfatase alcalina. As células primitivas pluripotentes

continuam presentes na medula óssea do indivíduo adulto, porém diminuem com o aumento da idade. Os precursores osteogênicos estão presentes no periósteo e no endósteo, em contato com a medula óssea. A função primária dos osteoblastos é a formação da matriz óssea e sua posterior mineralização, além de atuarem também sobre a regulação da formação e reabsorção ósseas (SZEJNFELD, 2000).

Da mesma forma que os osteoclastos, uma variedade de fatores de crescimento e hormônios sistêmicos estimulam a proliferação e a diferenciação dos progenitores de osteoblastos. Receptores para o hormônio paratireóide (PTH) e 1,25 dihidroxi-vitamina D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] foram detectados em células estromais, estando relacionados à diferenciação destas células para células osteoblásticas. Dentre os fatores de crescimento possivelmente envolvidos na diferenciação de osteoblastos, destacam-se o TGF- $\beta$  (fator de crescimento e transformação- $\beta$ ), as proteínas óssea morfogenéticas, IGF-I e IGF-II (fator de crescimento insulínico I e II), EGF (fator de crescimento epidermal) e TGF- $\alpha$  (fator de crescimento e transformação- $\alpha$ ). A maior parte desses fatores está presente na matriz óssea. Durante o processo de formação óssea, alguns osteoblastos são incorporados na matriz óssea e, gradualmente, diferenciam-se em osteócitos (SZEJNFELD, 2000).

Os osteócitos, por sua vez, representam o último estágio na diferenciação da linhagem osteoblástica e originam-se quando os osteoblastos, no processo de formação óssea, se tornam envolvidos em lacunas dentro da matriz calcificada. Através de seus processos dendríticos, os osteócitos formam uma rede de comunicação entre células individuais e as células de revestimento da superfície óssea (POWER et al., 2002; QIU et al., 2002). Devido a esta intercomunicação celular, os osteócitos têm sido considerados como células sensoriais que transportam informações entre osteoclastos e osteoblastos, participando da manutenção da matriz óssea (PALUMBO et al., 2001; VASHISHTH; GIBSON; FYHRIE, 2001). São as células mais abundantes no tecido ósseo, e têm características mecanosensoriais, sendo capazes de detectar a necessidade de aumentar ou reduzir a formação óssea durante a adaptação funcional do esqueleto, bem como no reparo de microlesões (MAROTTI, 2000; LOVERIDGE et al., 2002). Segundo Cullinane (2002), os osteócitos também têm importante papel na regulação da homeostase mineral. Devido a esta gama de atividades, os osteócitos são considerados como células pluripotentes (BONEWALD, 2002).

Os sinais para que ocorra o ciclo de remodelação óssea incluem mudanças na concentração sérica de vários fatores sistêmicos tais como hormônio paratireóide, tiroxina, hormônio do crescimento e estrógenos. Citocinas e fatores de crescimento desencadeiam a atividade de síntese óssea pelos osteoblastos. Uma vez ativados os osteoblastos, a síntese e secreção de citocinas resultam no recrutamento e diferenciação de osteoclastos na superfície de remodelação (ROSEN; TENENHOUSE, 1998).

O ciclo de remodelação óssea é desencadeado com uma fase de ativação, a qual envolve a interação de células precursoras de osteoclastos e osteoblastos, resultando na diferenciação, migração e fusão de grandes osteoclastos multinucleados. Em seguida, na fase de reabsorção, os osteoclastos fixam-se à superfície óssea mineralizada e promovem a reabsorção óssea através da secreção de íons hidrogênio e enzimas lisossômicas, produzindo cavidades irregulares sobre a superfície óssea, que são denominadas lacunas de Howship, ou canais cilíndricos Haversianos (RAISZ, 1999). Após a fase de reabsorção, há uma fase de reversão, correspondente ao término da remoção óssea pelos osteoclastos, quando estes morrem por apoptose (morte celular programada) e são removidos por fagócitos, podendo-se verificar a presença de células mononucleadas e da linhagem do macrófago sobre a superfície óssea. Com o avanço do deslocamento das BMU's, os osteoclastos abandonam o local da reabsorção e os osteoblastos movem-se para cobrir a área escavada e iniciam a formação óssea pela secreção osteóide, a qual é mineralizada em osso novo (fase de formação). O contínuo suprimento de novos osteoclastos e osteoblastos a partir de seus progenitores é essencial para a origem de novas BMU's e sua progressão sobre a superfície óssea, conseqüentemente, o balanço entre o suprimento de novas células e o tempo de vida destas são determinantes na quantidade de cada tipo celular e de sua ação, ambos essenciais para a manutenção da homeostase óssea (MANOLAGAS, 2000).

O ciclo de remodelação óssea está representado esquematicamente na figura 1.

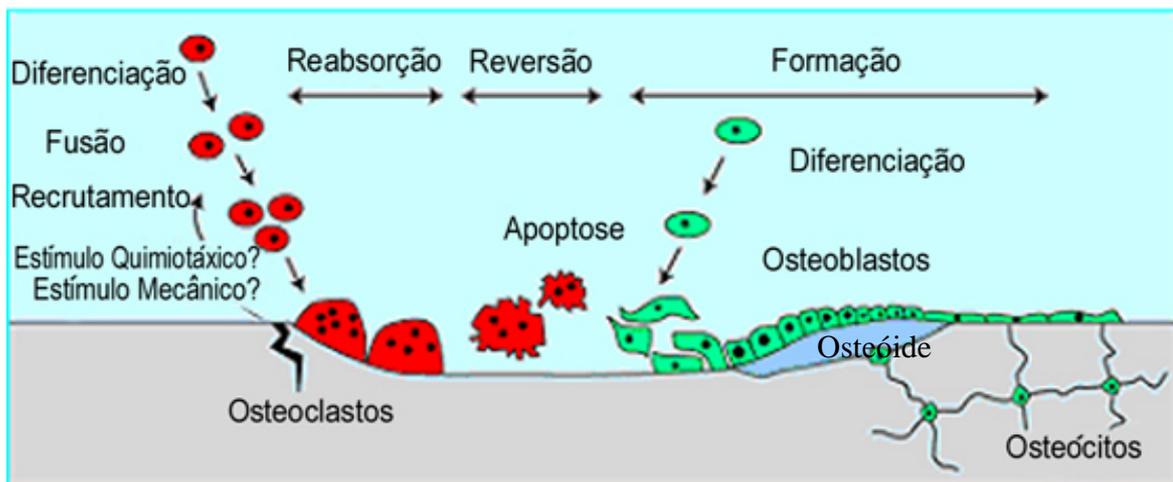


Figura 1- Ciclo de remodelação óssea: Fase de Ativação - Diferenciação de células precursoras hematopoiéticas em osteoclastos; Fase de reabsorção - Escavação da matriz óssea pelos osteoclastos; Fase de Reversão - Osteoclastos abandonam o local de reabsorção, ocorrência de apoptose; Fase de Formação: Diferenciação de osteoblastos e migração para a superfície óssea, repondo a área anteriormente escavada pelos osteoclastos e iniciando o processo de formação óssea através da secreção osteóide; Osteócitos: último estágio na diferenciação da linhagem osteoblástica.

### Controle da remodelação óssea

A remodelação óssea é influenciada por hormônios, citocinas, fatores de crescimento e diversas outras moléculas, através de mecanismos bastante complexos, que têm sido objeto de estudo de diversos pesquisadores (PARFITT, 2002).

Além do hormônio estrogênico, estão envolvidos no controle endócrino da remodelação óssea, o hormônio paratireóide (PTH), a vitamina D, a calcitonina, o hormônio do crescimento (GH), glicocorticóides e hormônios tireoidianos (DOURADOR et al., 1997; KUNDU; KHARE; SINGH, 1999; SZEJNFELD, 2000; AHLEN et al., 2002).

Existem evidências de que o hormônio paratireóide atua através da ligação do seu receptor na superfície da membrana plasmática, elevando o cálcio plasmático através de ação no intestino (indiretamente, via estímulo da vitamina D), nos rins (aumenta a reabsorção de cálcio nos túbulos distais e alça de Henle) e no osso (estímulo à atividade osteoclástica, aumentando a reabsorção). Porém, quando o PTH é administrado intermitentemente, age estimulando os osteoblastos, daí o estudo do seu uso no tratamento da osteoporose. O PTH e a vitamina D são

sensíveis a flutuações nas concentrações séricas de cálcio, o qual controla a secreção e transcrição gênica do PTH (DOURADOR et al., 1997; KHOSLA et al., 1997).

A vitamina D, em sua forma mais ativa [1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D] , como todos os hormônios esteróides, age através da ligação ao seu receptor nuclear, aumentando a reabsorção intestinal de cálcio e a reabsorção renal no túbulo proximal (SZEJNFELD, 2000).

A calcitonina é produzida pelas células tireoidianas parafoliculares C, é um hormônio inibidor da reabsorção óssea capaz de reduzir a mobilidade do cálcio no osso, atuando sobre pré-osteoclastos, diminuindo seu número e atividade (KUNDU; KHARE; SINGH, 1999).

A ação dos glicocorticóides tem sido verificada diretamente sobre o osso, diminuindo a síntese de colágeno e o recrutamento e diferenciação dos osteoblastos, além de aumentarem a atividade osteoclástica, e também indiretamente, sobre os rins, aumentando a excreção renal de cálcio; no intestino, diminuindo a absorção do cálcio; nas gônadas, diminuindo a esteroidogênese e na hipófise, suprimindo a secreção do hormônio do crescimento e de gonadotrofinas, levando a hipogonadismo; além de inibirem o fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1) e o fator de crescimento e transformação-β (TGF-β) (LIMA et al., 2001).

Sabe-se que o hormônio do crescimento (GH) promove o crescimento ósseo longitudinal antes de haver o fechamento das epífises, no entanto, sua ação sobre os ossos após a fase de crescimento ainda é questionada, apesar de ser utilizado no tratamento da osteoporose pós-menopausa (KUNDU; KHARE; SINGH, 1999).

Têm sido descritos na literatura efeitos importantes dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo ósseo, estimulando a reabsorção óssea, principalmente na ausência de estrógenos (MANOLAGAS, 2000).

As citocinas interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) atuam estimulando a reabsorção óssea pelos osteoclastos, promovendo sua diferenciação e a maturação de seus precursores (ROZEN et al., 2000).

As prostaglandinas são fortes moduladores do metabolismo ósseo e sua administração a roedores resulta em aumento da massa óssea, a prostaglandina E-2

apresenta-se como potente agente anabólico no tecido ósseo (AKHTER et al., 2001).

O TGF- $\beta$  atua diminuindo a reabsorção óssea através de uma redução no número de osteoclastos, promovendo sua apoptose a partir de um estímulo estrogênico (LIMA et al., 2001).

A osteoprotegrina (OPG) é um peptídeo solúvel originalmente descrito como um fator que inibia a reabsorção óssea e a diferenciação osteoclástica *in vivo*. Descobriu-se, recentemente, que essa proteína é um membro da superfamília de receptores TNF e atua como um receptor simulado por um ligante conhecido como ligante da OPG (OPGL ou RANKL). Este é um peptídeo de superfície que, quando expresso no osteoblasto, pode ligar-se ao verdadeiro receptor de OPG no osteoclasto e iniciar o contato célula-célula necessário para a ativação do osteoclasto e subsequente reabsorção óssea (LIMA et al., 2001).

### 2.3 Osteoporose

A densidade óssea no esqueleto adulto representa a massa óssea formada durante o crescimento menos a que é perdida subsequente (BECK; SHOEMAKER, 2000; LERNER, 2000). Normalmente, da infância à adolescência existe um predomínio de formação e conseqüente ganho de massa óssea, enquanto que, na fase adulta, a reabsorção passa a aumentar gradualmente, podendo levar a um balanço negativo. O pico de massa óssea, em humanos, é atingido em torno dos 20 a 30 anos, sofrendo influências de fatores genéticos e ambientais, tais como: raça, sexo, ingestão de cálcio e atividade física. A partir dos 35 a 45 anos, a fase de reabsorção passa a predominar e há perda de tecido ósseo (MACEDO; ARAÚJO, 1997).

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada por um desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, resultando em perda óssea e deterioração da microarquitetura esquelética, levando à fragilidade esquelética e aumento da suscetibilidade a fraturas (GODDARD; KLEEREKOPER, 1998; ROSEN; TENENHOUSE, 1998).

A origem da osteoporose é multifatorial, com contribuição de fatores genéticos, sedentarismo, nutrição inadequada e deficiências endócrinas (INMAN et al., 1999).

Na literatura, a osteoporose tem sido classificada em primária ou secundária. A osteoporose primária se subdivide nas formas involutivas tipo I ou pós-menopausa, tipo II ou senil e na forma idiopática juvenil ou do adulto jovem. A osteoporose secundária aparece como resposta a fatores identificáveis, como doenças endócrinas, reumatológicas, renais, gastrointestinais e neoplásicas, ou mesmo uso crônico de drogas tais como corticosteróides, anticonvulsivantes, hormônio tireoidiano, entre outras (MEIRELLES, 1995).

A osteoporose ocorre em ambos os sexos, porém, é muito mais freqüente no sexo feminino, sendo a perda de massa óssea nas mulheres maior e mais rápida do que nos homens, se acentuando no período posterior à menopausa (ZERBINI, 1998). Isto ocorre porque a deficiência de hormônios ovarianos após a menopausa resulta em alta renovação óssea e conseqüente aumento da perda óssea. A osteoporose pós-menopausa tem sido considerada um sério problema, afetando principalmente mulheres mais idosas (YEH; CHEN; ALOIA, 1997).

A rata e o camundongo fêmea ovariectomizadas exibem uma diminuição na densidade mineral, volume e resistência óssea, além de aumento na taxa de reabsorção óssea semelhantes ao que é visto nas mulheres (MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; TAMAKI et al., 1998; JEE; YAO, 2001). Por esse motivo, diversos estudos têm utilizado estes animais como modelo experimental para o estudo da osteoporose conseqüente à deficiência estrogênica (BORTOLI et al., 1996; YEH; CHEN ; ALOIA, 1997; KAWATA et al., 1998; CHEN et al., 2001; LATOUR, 2001).

A importância clínica da osteoporose é bastante significativa devido ao aumento da suscetibilidade a fraturas, que são mais freqüentes nas vértebras torácicas e lombares, resultando em alteração de postura e dores lombares crônicas, além de estar relacionada também ao aumento da ocorrência de fraturas na região proximal do fêmur, que resultam em 15 a 20% de taxa de mortalidade e alta incidência de incapacitação física (KATZ; SHERMAN, 1998; KLEEREKOPER, 1998).

Devido a esta importância, diversos estudos têm sido desenvolvidos nos sentidos de diagnóstico, tratamento e prevenção da osteoporose (ANDREWS, 1998).

## 2.4 Hormônios estrogênicos e metabolismo ósseo

Os hormônios esteróides sexuais participam da regulação endócrina do metabolismo ósseo, juntamente com os hormônios calciotrópicos – PTH, calcitonina e vitamina D (1,25 dihidroxi vitamina D), com o hormônio do crescimento e o hormônio tireoidiano. Tanto os estrógenos, quanto os andrógenos representam importantes papéis no metabolismo esquelético. Os esteróides sexuais exercem efeitos benéficos sobre o desenvolvimento e a manutenção do esqueleto, isto inclui controle da maturação e fechamento da placa epifisária durante o crescimento ósseo longitudinal, regulação do metabolismo do osso cortical e esponjoso, aquisição do pico de massa óssea e inibição da perda óssea (GENNARI et al., 2002).

Achados recentes sugerem que logo após a puberdade, os estrógenos são necessários para a manutenção da densidade mineral óssea durante o crescimento esquelético (TOBIAS; COMPSTON, 1999).

Ongphiphadhanakul et al. (2002) chamam a atenção para os efeitos do estrógeno no organismo masculino, apesar de ser normalmente considerado um hormônio feminino, sabe-se que também tem importância na fisiologia masculina, inclusive no metabolismo ósseo.

O estrógeno exerce suas funções através da ligação e ativação a receptores específicos. Dois tipos de receptores estrogênicos: alfa e beta ( $ER_{\alpha}$  e  $ER_{\beta}$ ) foram identificados. Estes receptores têm diferentes distribuições nos tecidos, estando presentes nos órgãos reprodutivos, sistema cardiovascular, fígado, rins, cérebro e tecido ósseo. Porém, suas funções moleculares em órgãos específicos ainda não estão completamente esclarecidas (RUGGIERO; LIKIS, 2002). Em pesquisa desenvolvida por Singh; Shaul; Gupta (2002) detectou-se a presença de receptores alfa na membrana plasmática de células do epitélio vaginal de ratas.

Segundo Windahl; Andersson; Gustafsson (2002) estudos com camundongos têm sido desenvolvidos para esclarecer as atividades dos receptores estrogênicos, tendo demonstrado a presença de ambos ( $ER_{\alpha}$  e  $ER_{\beta}$ ) no tecido ósseo. A atuação destes receptores é de grande importância nos efeitos do estrógeno sobre o metabolismo ósseo, tanto no sexo masculino, como no sexo feminino. Estes dois tipos de receptores já foram identificados nos osteoblastos e em células estromais da medula óssea, porém a sua expressão nos osteoclastos ainda

é controversa (GENNARI et al., 2002). Estudos desenvolvidos por Holzer; Einhorn; Majeska (2002) têm sugerido que muitos efeitos do estrógeno sobre o osso são mediados através da sua ação sobre células da linhagem osteoblástica, incluindo osteoblastos, osteócitos e progenitoras osteoblásticas da medula óssea estromal, sendo esta ação ligada à presença dos receptores estrogênicos.

Os efeitos fisiológicos dos estrógenos dependem de vários fatores. O fator principal é a potência do tipo de estrógeno, a qual depende da sua afinidade pelos receptores estrogênicos e da quantidade de hormônio livre disponível para atravessar a membrana celular, que está relacionada à produção de SHBG pelo fígado. Outro fator importante é a resposta do agonista ou antagonista que ocorre após a ligação do receptor estrogênico dentro da célula-alvo (RUGGIERO; LIKIS, 2002).

Em mulheres, a deficiência estrogênica causada pela menopausa ou ovariectomia, resulta em perda de massa óssea devido ao aumento da reabsorção osteoclástica, podendo ser restaurada com a terapia de reposição estrogênica. Segundo Dourador et al. (1997), desde a década de 60, vários autores postulam que a osteoporose nas mulheres pós-menopausa ocorreria por alterações na regulação dos hormônios calciotrópicos, levando ao balanço negativo de cálcio e perda de densidade mineral óssea. Esses autores propõem que o estrógeno seria um potente inibidor natural da ação do PTH na reabsorção óssea, com a menopausa, a deficiência estrogênica mudaria a sensibilidade do tecido ósseo ao PTH, resultando em maior reabsorção e conseqüente perda óssea.

Em estudos relacionados aos mecanismos celulares da ação do estrógeno sobre o tecido ósseo, tendo como base o efeito protetor deste hormônio sobre o esqueleto subsequente à terapia de reposição hormonal, várias evidências demonstraram que o estrógeno atua suprimindo a reabsorção óssea osteoclástica, sendo que em doses mais altas, ele pode atuar como um regulador fisiológico da atividade osteoblástica. Estudos em animais também confirmam que o estrógeno pode estimular a função osteoblástica, dependendo do local do esqueleto, sugerindo que sua ação é adaptar o esqueleto para as demandas de reprodução, promovendo a formação de estoques de cálcio necessários para o crescimento esquelético (TOBIAS; COMPSTON, 1999).

Alguns autores consideram o estrógeno como o hormônio sistêmico mais importante na manutenção do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea,

estando sua ação relacionada à alteração da produção ou da atividade de fatores locais que regulam precursores de osteoblastos e osteoclastos, exercendo influência sobre a diferenciação de progenitores hematopoiéticos em osteoclastos, a regulação de citocinas que apóiam esta diferenciação e a ocorrência de apoptose osteoclástica (JILKA, 1998; RAISZ, 1999).

Estudos desenvolvidos em camundongos têm revelado que a perda de esteróides sexuais estimula a formação de osteoclastos e osteoblastos na medula por alteração da produção e ação de citocinas que são responsáveis pela osteoclastogênese e osteoblastogênese. De fato, tanto estrógenos quanto andrógenos suprimem a produção de IL-6, que é uma citocina relacionada à reabsorção óssea, bem como a expressão de subunidades de receptores de IL-6 em células da medula óssea de linhagem estromal/osteoblástica. Além do IL-6, o estrógeno também suprime TNF (fator de necrose tumoral) e M-CSF (fator estimulante de colônias de macrófago); estimula a produção de OPG (osteoprotegrina), que tem importância na ação antiosteoclastogênica do estrógeno sobre o osso; e ainda promove apoptose de osteoclastos, mediada pelo TGF- $\beta$  (fator de crescimento de transformação- $\beta$ ) (PAPAIIOANNOU et al., 1999; WEINSTEIN; MANOLAGAS, 2000).

A deficiência dos esteróides sexuais promove aumento na taxa de remodelação óssea, havendo aumento da osteoclastogênese e da osteoblastogênese, estas mudanças são temporariamente associadas ao aumento da formação e da reabsorção óssea, porém, o processo de perda de mineralização óssea é acelerado, porque a reabsorção ocorre mais rapidamente que a formação óssea e o novo osso se torna mais frágil que o osso mais velho, além disso, o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea se deve à extensão do tempo de vida e atividade dos osteoclastos e redução do tempo de vida e atividade dos osteoblastos, provocadas pela alteração hormonal (MANOLAGAS, 2000).

Existem controvérsias se os estrógenos também participam da regulação do IGF-1 (fator de crescimento insulínico-1), um dos principais fatores de crescimento anabólico do osso, cuja concentração no tecido ósseo é controlada por vários hormônios sistêmicos, tais como o hormônio do crescimento e o paratormônio. Estudos *in vitro* têm apresentado evidências do efeito estimulatório direto do estradiol sobre a síntese protéica e expressão de IGF-1 por células

osteoblásticas. Porém, contrariando esses achados *in vitro*, tem-se observado que a ovariectomia não promove alteração ou até aumenta a concentração esquelética de IGF-1 (ERDMANN et al., 1998).

## 2.5 Exercício físico e metabolismo ósseo

Sabe-se que a tensão mecânica tem importante papel na regulação de funções celulares em diversos tecidos. A influência deste fator na remodelação óssea tem sido estudada em experimentos com animais, mostrando que o estímulo mecânico é necessário para manter a massa e a densidade óssea (USHIDA; UEMURA; TATEISHI, 2001).

A morfologia óssea, tanto microscópica quanto macroscópica, depende de circunstâncias físicas, tais como o estresse mecânico. O estímulo de carga sobre o osso causa deformação da matriz óssea e gera força de tensão, através da qual se inicia uma transdução mecânica, que resulta no deslocamento do fluido na matriz óssea (BARLET; GAUMET-MEUNIER; HORCAJADA-MOLIENI, 1999; NOMURA; TAKANO-YAMAMOTO, 2000; NICOLELLA; LANKFORD, 2002). As atividades de canais iônicos, adesão focal de quinases, bem como a estrutura do citoesqueleto das células ósseas, são também moduladas pelo estresse mecânico. Imagina-se que a remodelação óssea resulta desses eventos moleculares causados pelo estresse mecânico, e para investigar melhor esta relação, diversos sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos para gerar o estímulo mecânico fisiológico sobre o osso, através dos quais tem se demonstrado que os osteócitos têm papel fundamental na transdução de sinais entre as células e conseqüente adaptação do osso ao estresse mecânico (NOMURA; TAKANO-YAMAMOTO, 2000). Os estímulos físicos são transmitidos em forma de sinais bioquímicos nas células ósseas, resultando em um efeito anabólico com adaptação estrutural, tanto em tecidos animais quanto humanos (STERCK et al., 1998).

O osso normalmente ajusta sua massa e arquitetura para garantir que sejam suficientemente resistentes para suportar, sem danos, tanto a cargas produzidas durante atividades habituais, como também durante acidentes comuns de uma vida normal. Pesquisas levam a crer que esta relação estrutura/função ocorre por meio de um mecanismo adaptativo, no qual as células ósseas controlam a modelação e remodelação de modo homeostático para regular tensões funcionais.

Este mecanismo de resposta mecanicamente adaptativa é influenciado direta ou indiretamente pela presença de estrógenos, estando as respostas a tensões mecânicas relacionadas à presença de receptores estrogênicos nas células ósseas (ZAMAN et al., 2000).

O exercício físico, por promover estímulo mecânico que leva à osteogênese, tem sido utilizado em diversas modalidades para se obter manutenção ou aumento da massa esquelética, tanto em estudos em animais, como em humanos, sendo considerado uma estratégia para reduzir o risco de osteoporose (KANNUS et al., 1992; HART et al., 2001).

O exercício físico é considerado como um agente anabólico devido a seus efeitos que conduzem a um ganho de massa óssea, tais como o aumento do cálcio intracelular e do AMP cíclico (AMPc) e o acúmulo de prostaglandinas e óxido nítrico (BARLET; GAUMET-MEUNIER; HORCAJADA-MOLIENI, 1999; JEE, 2000).

O osso em crescimento parece ser mais sensível ao aumento da carga mecânica do que o osso maduro. Partindo deste princípio, a atividade física durante a infância e adolescência deve ser um dos principais determinantes do pico de massa óssea. Porém, o mecanismo através do qual o exercício influencia a massa óssea envolve diversos fatores e ainda não foi totalmente esclarecido, tendo-se observado em trabalhos experimentais que os efeitos do exercício sobre o tecido ósseo dependem da idade e do gênero dos animais, bem como da intensidade, duração, frequência e período do exercício a eles aplicado (IWAMOTO; YEH; ALOIA, 1999).

Estudos demonstram que a carga mecânica, tal como no exercício de alto-impacto, que produz tensão dinâmica sobre os ossos, exerce importante papel no controle da massa e resistência óssea, podendo influenciar a distribuição da massa óssea em diferentes locais, não só em ratas ovariectomizadas submetidas a treinamento em esteira, como também em mulheres no período pós-menopausa submetidas a exercícios tais como o salto, sendo estes efeitos mais evidentes quando a atividade física é combinada com a terapia de reposição hormonal (TAMAKI et al., 1998; CHENG et al., 2002).

Tem sido relatado na literatura que o exercício em esteira parcialmente previne a perda óssea no fêmur de ratos orquidectomizados, aumenta a massa de osso esponjoso em animais esqueleticamente imaturos, e aumenta a formação

óssea periosteal sem afetar significativamente a massa óssea esponjosa em ratos esqueleticamente maduros (YAO et al., 2000).

A natação, apesar de ser considerada uma atividade física de baixo impacto, também tem apresentado efeitos de aumento na massa óssea, como demonstraram Hart et al. (2001), em estudo utilizando ratas Wistar ovariectomizadas.

Alguns autores têm induzido ratos a realizarem movimentos em postura ereta bípede para obtenção de alimento, atividade física que também tem apresentado efeitos benéficos sobre o metabolismo ósseo, inclusive em animais machos submetidos a orquidectomia ou em fêmeas submetidas a ovariectomia (YAO et al., 2000; CHEN et al., 2001).

Poucos estudos foram desenvolvidos sobre a resposta do tecido ósseo ao exercício físico após período de cessação do treinamento. Com este objetivo, Kiuchi; Arai; Katsuta (1998) realizaram uma análise da massa óssea de ratos Wistar machos submetidos ao treinamento em esteira e as alterações após período de cessação do treino, tendo verificado que as adaptações da estrutura óssea podem ser mantidas mesmo após período de abandono do exercício.

Estudos utilizando camundongos C57BL ovariectomizadas mantidas em suspensão (hipomobilidade) têm também enfatizado a importância do estresse mecânico sobre a remodelação óssea, estando a diminuição do estresse mecânico, relacionada a um aumento da reabsorção óssea, que é acelerada pela presença de deficiência estrogênica (KAWATA et al., 1998).

Em humanos, a redução da massa óssea verificada na senilidade é atribuída entre outros fatores, à tendência ao sedentarismo, pois ocorre redução da carga mecânica sobre os ossos e do estímulo mecânico de osteoblastos, podendo ser observado o mesmo em reduções extremas do estresse mecânico, como ocorre durante imobilizações, lesões medulares e no vôo espacial (ausência da gravidade) (DEHORITY et al., 1999; BECK; SHOEMAKER, 2000).

Por outro lado, exercício crônico intenso em atletas do sexo feminino é freqüentemente acompanhado de distúrbios alimentares, amenorréia e osteoporose. Isto porque a combinação de baixa ingestão de calorias com exercício excessivo pode conduzir a um balanço negativo de energia, que desregula os hormônios circulantes o bastante para privar os ovários e o esqueleto da essencial influência dos estrógenos. Apesar dos efeitos benéficos do exercício sobre o osso,

se a redução de estrógenos for muito significativa pode acelerar a reabsorção e conseqüente perda óssea (RENCKEN; CHESNUT; DRINKWATER, 1996; TOMTEN et al., 1998; BECK; SHOEMAKER, 2000).

## **2.6 Metabolismo do cálcio**

As quantidades de minerais, tais como cálcio, fósforo e magnésio, absorvidas no intestino são determinadas pela disponibilidade dos mesmos na dieta e pela capacidade intestinal de absorvê-los, havendo regulação por ação hormonal, e devem suprir o requerimento de aumento de massa óssea, especialmente da mineralização óssea, durante a fase de crescimento e da remodelação óssea, na idade adulta. No processo normal de remodelação, a formação iguala-se à reabsorção óssea, então a excreção urinária desses minerais aproxima-se à quantidade absorvida no intestino e o balanço se torna neutro (HEILBERG, 2000).

Em quase todos os organismos, o cátion cálcio divalente tem papel importante na fisiologia celular e na regulação metabólica. Os níveis de cálcio extracelular são rigorosamente controlados dentro de uma estreita faixa fisiológica para proporcionar o adequado funcionamento de diversos tecidos: acoplamento excitação-contração no coração e em outros músculos, transmissão sináptica e outras funções do sistema nervoso, agregação plaquetária, coagulação, assim como secreção de hormônios e outros reguladores por exocitose. O nível de cálcio intracelular também é rigorosamente controlado, em níveis aproximadamente 10.000 vezes menores que o cálcio extracelular, a fim de que o cálcio sirva como um segundo mensageiro na regulação da divisão celular, contratilidade muscular, motilidade celular, tráfego na membrana e liberação da secreção celular (GOLDFIEN; MONROE, 2000).

O cálcio circula no fluido extracelular (FEC) em três frações distintas: cerca de 50% é a biologicamente importante fração ionizada, 40% é ligada à proteína e não filtrável pelos rins, e 10% é complexada a ânions tais como bicarbonato, citrato, sulfato, fosfato e lactato (BUSHINSKY; MONK, 1998). A redução do cálcio ionizado eleva a permeabilidade ao sódio, aumentando a excitabilidade de todos os tecidos excitáveis, enquanto que o aumento do cálcio ionizado tem ação oposta (HEILBERG, 2000).

A manutenção da concentração sérica normal no fluido extracelular (FEC) depende da regulação integrada do fluxo de cálcio em relação ao trato gastrointestinal, rins e ossos. A regulação precisa do soro é controlada pelo próprio cálcio, através de um receptor específico e de vários hormônios, sendo os mais importantes o PTH e a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (BUSHINSKY; MONK, 1998).

Mais de 98% do cálcio corporal total estão presentes no osso, dos quais cerca de 1% parece ser trocado livremente com o FEC através de mecanismos fisicoquímicos e mediados por células. A rigidez característica do esqueleto dos vertebrados é proveniente de uma forma de fosfato de cálcio que é normalmente conhecida como hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ ], a qual está embebida em fibrilas colágenas. No osso, o cálcio é importante para manter a integridade estrutural do esqueleto, servindo como um reservatório do íon cálcio para suprir as necessidades metabólicas do corpo em estados de deficiência deste mineral (NORDIN, 1997).

Em animais jovens, a deficiência de cálcio deve prejudicar o crescimento, atrasar a consolidação esquelética, e em certas circunstâncias, quando há deficiência de vitamina D, promover o raquitismo. Em animais adultos, a deficiência de cálcio causa mobilização de cálcio do osso e leva mais cedo ou mais tarde à osteoporose. Os efeitos da deficiência de cálcio e da ovariectomia são aditivos (NORDIN, 1997).

Em mulheres durante a menopausa, há um aumento da excreção renal de cálcio, havendo, geralmente, aumento na concentração plasmática deste íon, efeitos que estão relacionados à ação dos estrógenos sobre órgãos reguladores da homeostasia do cálcio, intestino, rins e ossos. Porém, ainda existem dúvidas sobre os efeitos do estrógeno sobre cada fração de cálcio isoladamente, contribuindo para alterações na concentração plasmática total (PRINCE, 1994).

Segundo Khosla et al. (1997) a deficiência estrogênica deve induzir a perda de cálcio por efeitos indiretos sobre a homeostasia do cálcio extraesquelético, que incluem redução da absorção intestinal e da conservação renal de cálcio após o início da deficiência estrogênica.

Diversos autores sugerem que a reabsorção óssea aumentada causada pela deficiência estrogênica desencadeia uma série de eventos envolvendo os hormônios calciotrópicos, que resulta em perdas renais de cálcio e diminuição da sua absorção. Por outro lado, com o envelhecimento ocorreria hiperparatireoidismo secundário, devido a menor síntese de vitamina D, levando a menor reabsorção de

cálcio intestinal, que resultaria em aumento da reabsorção óssea, havendo controvérsias sobre a contribuição do PTH na reabsorção óssea observada na maioria das mulheres osteoporóticas de todas as faixas etárias após a menopausa. Além disso, muitas vezes não é possível detectar esses fenômenos laboratorialmente (DOURADOR et al., 1997).

Alguns estudos apresentam relação entre o exercício físico e o aumento na deposição de cálcio nos ossos (HORCAJADA et al., 1997).

## **2.7 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo**

O uso de métodos laboratoriais que permitam a avaliação do metabolismo ósseo de maneira rápida e confiável tem sido objetivo há muito tempo almejado por pesquisadores que atuam nesta área. A quantificação de substâncias que poderiam representar os processos metabólicos em curso no tecido ósseo permite uma avaliação de alterações deste tecido em um período em que estas ainda não podem ser detectadas por técnicas radiológicas (SCIFERT-KLAUSS et al., 2002).

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são substâncias que retratam a formação ou a reabsorção ósseas. Estes são utilizados na prática clínica há décadas, em especial o estudo da fosfatase alcalina total sérica, a calciúria e a hidroxipolinúria. Avanços no isolamento e caracterização das células e dos componentes extracelulares da matriz óssea resultaram no desenvolvimento de métodos para medida de novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Os marcadores de formação óssea medem produtos decorrentes da ação dos osteoblastos, enquanto que os marcadores de reabsorção são produto da ação osteoclástica sobre a matriz óssea (VIEIRA, 1999).

As doenças ósseas alteram o padrão de produção de marcadores bioquímicos. Doenças que levam a osteopenia tendem a aumentar a relação entre os marcadores de formação e reabsorção óssea. Além disto, os marcadores de formação óssea atualmente em uso refletem a atividade osteoblástica em diferentes estágios de diferenciação deste tipo celular. Durante a formação do osso, a produção da matriz colágena precede a mineralização. A fase de produção de matriz colágena coincide com uma maior produção de fosfatase alcalina, enquanto que a mineralização coincide com uma maior produção de osteocalcina (BIKLE, 1997).

Entre os marcadores de formação óssea estão a fosfatase alcalina total, a fosfatase alcalina óssea, a osteocalcina e propeptídeos do colágeno tipo 1 (ROSEN; TENENHOUSE, 1998).

A fosfatase alcalina é uma ectoenzima que quando ancorada na superfície celular, está na forma de um tetrâmero, e quando liberado na circulação, por ação das fosfolipases C e D, o é na forma dimérica. As duas formas predominantes desta enzima na circulação são as isoenzimas óssea e hepática, em quantidades equivalentes, e a outra forma circulante é a intestinal, representando menos de 5% do total. No osso, é encontrada na membrana plasmática dos osteoblastos (BIKLE, 1997).

A osteocalcina é uma proteína não-colágena sintetizada e secretada pelos osteoblastos maduros. Sua função ainda está mal definida, apesar da sua estrutura indicar interação com cálcio e com cristais de hidroxiapatita. Estudos indicam que está relacionada com o processo de mineralização (WELSH et al., 1997).

O procolágeno tipo 1 apresenta alterações menos substanciais do que os outros marcadores de formação óssea, durante os diferentes níveis de remodelação óssea (BIKLE, 1997).

Entre os marcadores de reabsorção óssea estão o cálcio, a hidroxiprolina e interligadores do colágeno: hidroxiprolina, piridolinas, deoxipiridolina, N-telopeptídeo, C-telopeptídeo e fosfatase ácida tartarato-resistente (ROSEN; TENENHOUSE, 1998).

O uso dos marcadores bioquímicos se estende a qualquer condição que leve a uma alteração do metabolismo do tecido ósseo, com aumento ou diminuição da remodelação óssea. Estudos têm demonstrado sua utilidade no acompanhamento da eficácia, a curto prazo, de terapêuticas aplicadas a patologias ósseas, um exemplo é a investigação dos efeitos do exercício físico sobre estes marcadores e sua relação com alterações na densidade mineral óssea de mulheres no período pós-menopausa (WELSH et al., 1997).

## 2.8 Histomorfometria óssea

A histomorfometria óssea consiste na contagem e medida dos componentes celulares, intercelulares ou ambos do tecido ósseo (SZEJNFELD et al., 1987). É o único método que fornece informação sobre remodelação óssea *in vivo*. Através de técnicas estereológicas simples permite avaliar processos celulares de remodelação óssea quantitativamente, e interpretá-los em termos de renovação, perda óssea em cada ciclo de remodelação, e risco de perfurações trabeculares que levem à destruição da arquitetura óssea (HAUGE et al., 2001). É de grande importância no estudo de patologias ósseas, tais como a osteoporose, tendo em vista que a maioria delas relaciona-se com anormalidades quantitativas (SZEJNFELD et al., 1987).

Alterações da estrutura óssea têm sido avaliadas em diversos estudos através da histomorfometria (MOLINA; CABRERA; ESQUIVIAS, 1996). Bourrin et al. (1995) examinaram os efeitos do exercício em esteira sobre a rede trabecular óssea e as adaptações celulares em três áreas diferentes da tíbia de ratos Wistar machos, utilizando a análise histomorfométrica na detecção do volume ósseo e do número de trabéculas.

Yeh; Chen; Aloia (1996) avaliaram a interrelação entre a deficiência de hormônios hipofisários e ovarianos sobre a regulação do crescimento e formação óssea em ratas Sprague-Dawley. A análise histomorfométrica foi utilizada para verificar alterações na superfície periosteal, taxa de aposição mineral e formação óssea na tíbia e na quinta vértebra lombar dos animais.

A histomorfometria foi utilizada em um estudo no qual comparou-se características morfológicas e estruturais da região proximal do fêmur de humanos e de ratos, utilizando-se microrradiografias de amostras de fêmur humano obtidas de autópsias (mulheres pós-menopausa) e amostras do fêmur de ratas Sprague-Dowley ovariectomizadas (BAGI et al., 1997).

Para analisar os efeitos do treinamento físico sobre a massa óssea de ratos Wistar machos e as alterações após período de cessação do treino, a análise histomorfométrica foi útil na obtenção das áreas ósseas cortical, total e medular (KIUCHI; ARAI; KATSUTA et al., 1998).

Tamaki et al. (1998) avaliaram os efeitos do exercício em esteira associado ao uso de etidronato (bifosfonato) sobre a densidade mineral óssea do

fêmur e a área trabecular da região proximal da tíbia de ratas Wistar ovariectomizadas. Através de análise histomorfométrica obteve-se a medida da área trabecular óssea (%) e o número de osteoclastos por área óssea.

Iwamoto; Yeh; Aloia (1999) estudaram os efeitos do exercício em esteira sobre três áreas de osso esponjoso diferentes em ratas Sprague-Dawley em crescimento. Utilizando a análise histomorfométrica foi possível avaliar a taxa de aposição mineral, o volume de osso esponjoso nas regiões proximal e distal da metáfise tibial e da quinta vértebra lombar.

Em estudo realizado com ratos Wistar machos orquidectomizados submetidos à realização de exercício na postura ereta bípede, foram calculadas medidas histomorfométricas do volume ósseo trabecular, área óssea trabecular e cortical em vértebras lombares (YAO et al.,2000).

Hart et al. (2001) avaliaram os efeitos da natação sobre a massa óssea, densidade e propriedades mecânicas do fêmur de ratas Wistar ovariectomizadas. A análise histomorfométrica foi utilizada para avaliação da estrutura, formação e taxa de remodelação óssea.

Chen et al. (2001) utilizaram exercícios na postura bípede em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas em combinação com estrógenos para avaliar os seus efeitos sobre a tíbia. A análise histomorfométrica foi utilizada para avaliação de parâmetros estáticos e dinâmicos, tais como largura trabecular, área de osso esponjoso, percentual de área óssea trabecular e número de trabéculas. Através destes parâmetros foi possível avaliar a erosão óssea endocortical e a formação óssea periosteal após a ovariectomia.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência do treinamento físico em esteira sobre o tecido ósseo e as possíveis alterações hormonais e metabólicas em camundongos fêmeas submetidas a ovariectomia.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a massa corpórea dos animais no decorrer do experimento.
- Mensurar o comprimento dos fêmures direitos dos animais.
- Aferir a massa dos fêmures direitos dos animais.
- Determinar a concentração sérica do hormônio estradiol.
- Determinar a atividade metabólica, através da análise das concentrações séricas de cálcio e de fosfatase alcalina.
- Realizar análise histomorfométrica do tecido ósseo da área cortical proximal do fêmur para avaliar densidade, área e perímetro de osteócitos nos grupos em estudo.
- Analisar possíveis alterações na morfologia celular de osteócitos da área cortical proximal do fêmur nos grupos em estudo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 50 camundongos albinos, “swiss” (*Mus musculus*), fêmeas, com 90 dias de idade, pesando, inicialmente 25-35 g., gentilmente cedidos pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), e em seguida mantidos no biotério do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Os mesmos permaneceram em gaiolas apropriadas, cuja população não ultrapassou 5 animais por gaiola, sob ciclo claro / escuro (12 horas/12 horas), temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ . Receberam diariamente água e ração pró-biotério (Labina<sup>®</sup> - Purina) em quantidades suficientes para consumo *ad libitum*.

### 4.2 Método

#### 4.2.1 Grupos de estudo

Os animais foram inicialmente divididos aleatoriamente em cinco grupos:

- C : Controle (n = 10)
- OVS: Ovariectomizado Sedentário (n = 10)
- OVT: Ovariectomizado Treinado (n = 10)
- POS: Pseudo-operado Sedentário (n = 10)
- POT: Pseudo-operado Treinado (n = 10)

#### 4.2.2 Obtenção da massa corpórea dos animais

A massa corpórea dos animais foi verificada no início e no final de cada semana do experimento, utilizando-se balança analítica (Mettler, Suíça) – precisão: 0,1 g, capacidade máxima: 2610g.

### **4.2.3 Procedimento cirúrgico**

No início do experimento, os animais dos grupos OVT e OVS foram submetidos a cirurgia para retirada dos ovários. Sob anestesia com éter etílico, foi tricotomizada a região abdominal inferior, sendo feita assepsia no local com álcool iodado a 0,5%. Com os animais em decúbito dorsal realizou-se uma incisão de cerca de 2,0 cm de comprimento na pele (linha mediana) e tecido subcutâneo, a parede muscular foi divulsionada até ser atingida a cavidade abdominal. Os ovários foram pinçados e foi feita uma ligadura abaixo da tuba uterina e posteriormente o corte. O útero foi recolocado na cavidade abdominal, suturados o tecido muscular e em seguida a pele em planos separados.

Os animais dos grupos POS e POT foram submetidos a uma incisão de cerca de 2,0 cm na região abdominal inferior atingindo apenas pele e tecido subcutâneo e divulsionamento da parede muscular, que foram suturados em planos separados.

O grupo C (controle) não foi submetido a qualquer procedimento cirúrgico.

### **4.2.4 Treinamento físico**

Para a realização do protocolo de treinamento físico foi confeccionada, através da empresa TSI Informática, uma esteira medindo 35 X 15cm, com paredes montadas em material plástico (LEGO-DACTA®) e piso emborrachado, motor de 2,5 Ampers – 30 Watts, e controle de velocidade de 15 a 20 m/min., movida a eletricidade, como demonstrado na figura 2.

Os animais dos grupos OVT e POT foram exercitados a uma velocidade de 20m./min. (HORCAJADA et al.,1997; KIUCHI; ARAI; KATSUTA, 1998). Este protocolo de treinamento físico foi iniciado 30 dias após a cirurgia, com duração de 5 semanas, havendo aumento progressivo do tempo de treino:

1ª semana – 5 minutos ao dia (pela manhã);

2ª semana – 10 minutos ao dia, divididos em duas sessões diárias (manhã e tarde);

3ª semana – 14 minutos ao dia, divididos em duas sessões diárias (manhã e tarde);

4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas – 20 minutos ao dia, divididos em duas sessões diárias (manhã e tarde).

Os animais dos demais grupos (OVS, POS e controle) não foram treinados.



Figura 2 - Esteira elétrica confeccionada para a realização do treinamento físico dos animais. Medidas: 35 X 15cm, com paredes montadas em material plástico (LEGO-DACTA<sup>®</sup>) e piso emborrachado, motor de 2,5 Ampers – 30 Watts, e controle de velocidade de 15 a 20 m/min.

#### **4.2.5 Sacrifício dos animais e coleta de material**

Após o período de treinamento, os animais foram anestesiados com éter etílico, o sangue foi retirado por punção cardíaca, o soro coletado foi centrifugado a 3.000 rpm, pipetado e armazenado para a realização de dosagens bioquímicas.

Imediatamente após o sacrifício dos animais por inalação de éter etílico, com os mesmos posicionados em decúbito dorsal, foi realizada uma incisão da região abdominal inferior até o joelho direito, rebateu-se o peritônio, órgãos e músculos desta região, até ser atingida a articulação coxo-femoral, então foram desinseridos músculos e tendões da região anterior. Com os animais em decúbito lateral, foram removidos músculos e tendões posteriores, e o fêmur direito foi desarticulado proximal e distalmente.

#### 4.2.6 Verificação da massa e comprimento femoral

Após serem coletados, os fêmures foram dissecados para retirada de partes moles. Foram então, pesados em balança digital (precisão: 0,1 mg, capacidade máxima: 210g) (A & D Co., Japão) e em seguida, os comprimentos ósseos foram medidos com o uso de régua milimetrada.

Posteriormente à obtenção das medidas, os ossos foram seccionados transversalmente e armazenados em recipientes de vidro contendo solução fixadora de formol tamponado (10ml de formol a 37% e 27 mL de tampão fosfato 0,1M) em volume 50 vezes superior ao volume da amostra.

#### 4.2.7 Determinação da concentração sérica de estradiol

A técnica de radioimunoensaio foi utilizada para dosagem da concentração sérica do hormônio estradiol (kit DSL-4400, USA), a qual tem como princípio básico a competição entre antígenos radioativos (marcados com  $I^{125}$ ) e não-radioativos por um número determinado de sítios de ligação no anticorpo. A quantidade de estradiol marcado com  $I^{125}$  ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração do estradiol não-marcado presente nas amostras. A radiação foi verificada através do contador Gamma Count DPC Medlab. A figura 3 representa a curva-padrão obtida para a dosagem da concentração sérica de estradiol.

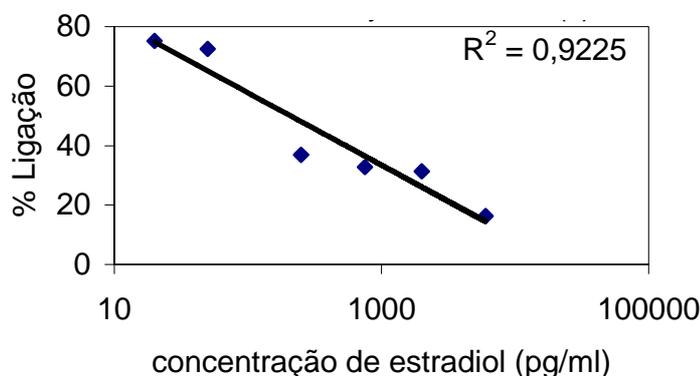


Figura 3- Curva-padrão obtida para dosagem da concentração sérica de estradiol (pg/ml) nos diversos grupos de estudo, através do kit de radioimunoensaio DSL-4400.

#### 4.2.8 Determinação da concentração sérica de cálcio

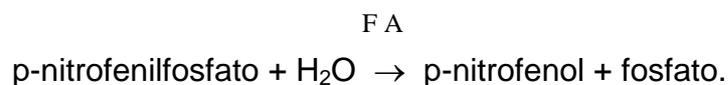
Para a determinação do cálcio, utilizou-se o método proposto pela Labtest-Diagnóstica (Brasil), no qual se utiliza um reagente aquoso estabilizado. A adição de um agente tensio-ativo exclui a interferência das proteínas na reação e a interferência do magnésio é eliminada pela adição de 8-hidroxiquinoleína, tornando assim, o método mais específico para a determinação do cálcio.

Os reagentes utilizados foram: tampão composto por 2-amino 2-metil 1-propanolol 0,5 mol/l, estabilizador e surfactante; reagente de cor (o-cresoftaleína complexona 92 nmol/l, 8-hidroxiquinoleína e estabilizador); padrão (cálcio 10 mg/dl). Os reagentes foram conservados em temperatura de 15-25° C.

O método colorimétrico foi usado para determinar o cálcio sérico. Medido em espectrofotômetro (Gehaka G3410, Brasil) a 570 nm da cor produzida pelo complexo formado entre ortocresoftaleína complexona e o cálcio, em pH alcalino.

#### 4.2.9 Determinação da concentração sérica de fosfatase alcalina total

A concentração sérica de fosfatase alcalina total foi determinada através de método proposto pela Labtest-Diagnóstica, Brasil (Bowers e Mc Comb modificado), que segue o princípio de que a fosfatase alcalina do soro, em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico, segundo a seguinte reação:



A quantidade de p-nitrofenol produzida, que tem elevada absorvância a 405 nm é diretamente proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina (F A) na amostra.

#### **4.2.10 Processamento histológico das amostras ósseas**

As amostras de osso permaneceram por 72 horas na solução de formol tamponado para fixação, em seguida foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de fixador e transferidas para solução descalcificadora (ácido nítrico a 5%), em volume 100 vezes maior que o da peça, permanecendo por 48 horas, quando obtinha-se, então, a descalcificação completa. As amostras foram novamente lavadas em água corrente e processadas segundo técnica de rotina histológica, com desidratação em soluções crescentes de álcool, diafanização utilizando-se xilol (Merck, Brasil) e inclusão em parafina. Vinte e quatro horas após a inclusão do material, foram realizados cortes longitudinais de 4 $\mu$ m de espessura utilizando-se o micrótomo (Leica RM 2125 RT), sendo obtidas de cada amostra 5 lâminas contendo cada uma delas 3 cortes, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan<sup>®</sup> – Merck). Depois de montadas, as lâminas foram visualizadas ao microscópio óptico (Olympus BH-2) para seleção daquelas que seriam utilizadas para análise histomorfométrica.

#### **4.2.11 Análise histomorfométrica do tecido ósseo**

O material obtido através do processamento histológico foi analisado em microscópio óptico (Olympus BH-2) com ocular de 10X e objetiva de 40X. Foram escolhidos aleatoriamente 5 campos microscópicos por lâmina e através de *software* (TCI pro for Windows 95), as imagens foram captadas para o microcomputador e analisadas por meio do *software* Optimas 6.1, através do qual foram determinados a densidade de osteócitos por campo, a área e o perímetro destas células, localizadas na área cortical proximal do fêmur.

#### **4.2.12 Tratamento Estatístico**

A análise estatística para cada variável estudada foi realizada comparativamente entre os grupos de estudo através da Análise de Variância, utilizando-se o Teste de Tukey, e a variável massa corpórea foi também analisada

dentro de cada grupo no decorrer de todo o período experimental através do teste “t” student, considerando em todas as análises um nível de significância ( $p < 0,05$ ). As variáveis foram apresentadas em termos de média  $\pm$  desvio padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Massa corpórea

Inicialmente, a massa corpórea média apresentada em cada grupo era: controle,  $32,56 \pm 1,79\text{g}$ ; POS,  $33,2 \pm 1,84\text{g}$ ; POT,  $29,87 \pm 2,27\text{g}$ ; OVS,  $31,97 \pm 2,92\text{g}$  e grupo OVT,  $25,94 \pm 3,6\text{g}$  (Figura 4).

Após 30 dias do início do experimento, pôde-se verificar, como ilustra a figura 4, que no grupo controle não houve alteração significativa de massa corpórea ( $p > 0,05$ ), observou-se que no grupo POS também não houve alteração significativa ( $p > 0,05$ ), enquanto no grupo POT, houve aumento de 6,86% ( $31,92 \pm 3,08\text{g}$ ,  $p < 0,05$ ), e nos grupos submetidos a ovariectomia, este aumento foi ainda maior, sendo no grupo OVS de 9,82% ( $35,11 \pm 2,45\text{g}$ ,  $p < 0,05$ ), e no grupo OVT de 16% ( $30,09 \pm 3,88\text{g}$ ,  $p < 0,05$ ).

Nas cinco semanas subseqüentes, verificou-se que nos grupos não-treinados (controle, POS e OVS) houve um aumento linear de massa corpórea, enquanto que nos grupos treinados (POT e OVT) houve um ganho de massa inicial, seguido de estabilização e tendência a redução, sobretudo a partir da 4ª semana de treinamento físico, no grupo OVT foram observadas maiores oscilações da massa corpórea (Figura 4).

Durante todo o período experimental, como demonstra a figura 4, verificou-se que no grupo controle o ganho de massa corpórea foi de 12,53% ( $p < 0,05$ ), no grupo POS, foi de 15,39% ( $p < 0,05$ ), no grupo POT, 12,18% ( $p < 0,05$ ), o grupo OVS apresentou o maior ganho de massa corpórea, 23,27% ( $p < 0,05$ ), enquanto que o grupo OVT não apresentou diferença estatisticamente significativa entre a massa corpórea média apresentada no início e no final do experimento ( $p > 0,05$ ), tendo em vista que o ganho de massa corpórea observado trinta dias após a retirada dos ovários neste grupo, não se manteve durante o período de treinamento físico.

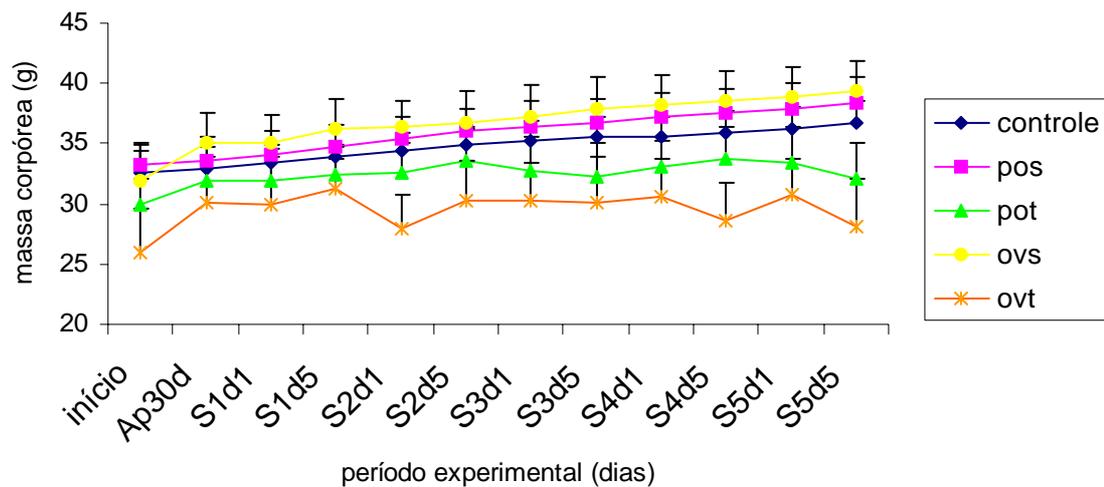


Figura 4 - Valores médios da massa corpórea (mg) dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS); ovariectomizados treinados (OVT), verificados no início do experimento (início), após os trinta dias iniciais (Ap30d), e no primeiro e quinto dia de cada semana subsequente: S1d1(dia 1 da 1ª semana), S1d5 (dia 5 da 1ª semana), e assim sucessivamente até o dia 5 da 5ª semana (S5d5).

## 5.2 Concentração sérica de estradiol

A concentração sérica média de estradiol apresentou-se menor no grupo OVT ( $16,96 \pm 0,85$  pg/mL) em relação ao grupo controle ( $19,12 \pm 0,92$  pg/mL), sendo esta redução de 11,35% ( $p < 0,05$ ). Os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), como ilustra a figura 5.

A concentração apresentada pelo grupo OVT ( $16,96 \pm 0,85$  pg/mL) também foi inferior à concentração média do grupo OVS ( $18,79 \pm 0,71$  pg/mL), havendo uma redução de 9,79% nos animais treinados (OVT) ( $p < 0,05$ ) (figura 5).

Entre os grupos pseudo-operados, POS ( $18,56 \pm 0,91$  pg/mL) e POT ( $17,72 \pm 1,74$  pg/mL) não se observou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (figura 5).

Quando se compara os grupos ovariectomizados, OVS ( $18,79 \pm 0,71$  pg/mL) e OVT ( $16,96 \pm 0,85$  pg/mL) com os pseudo-operados, POS ( $18,56 \pm 0,91$  pg/mL) e POT ( $17,72 \pm 1,74$  pg/mL) também não há diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), como apresentado na figura 5.

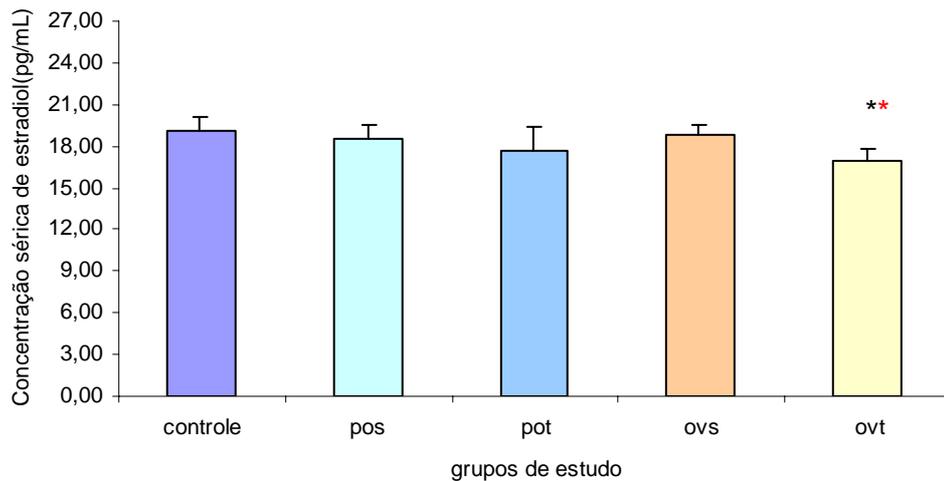


Figura 5 – Valores médios da concentração sérica de estradiol (pg/mL) dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS); ovariectomizados treinados (OVT). (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo OVS ( $p < 0,05$  para o Teste de Tukey).

### 5.3 Concentração sérica de cálcio

A figura 6 demonstra que a concentração sérica de cálcio esteve, em média, mais alta nos animais do grupo controle ( $8,75 \pm 1,35$  mg/dL), quando comparado aos demais grupos, havendo diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao grupo OVT ( $5,6 \pm 1,06$  mg/dL), 36% inferior ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

A concentração sérica média de cálcio no grupo OVT ( $5,6 \pm 1,06$  mg/dL) também foi inferior aos demais grupos. Em relação ao grupo OVS ( $7,4 \pm 0,52$  mg/dL), houve redução de 24,32% ( $p < 0,05$ ), e em relação aos grupos pseudo-operados, POS ( $8,20 \pm 1,08$  mg/dL) e POT ( $8,00 \pm 0,94$  mg/dL) esta redução esteve em torno de 30% ( $p < 0,05$ ) (figura 6).

Entre os grupos pseudo-operados, POS ( $8,20 \pm 1,08$  mg/dL) e POT ( $8,00 \pm 0,94$  mg/dL) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (figura 6).

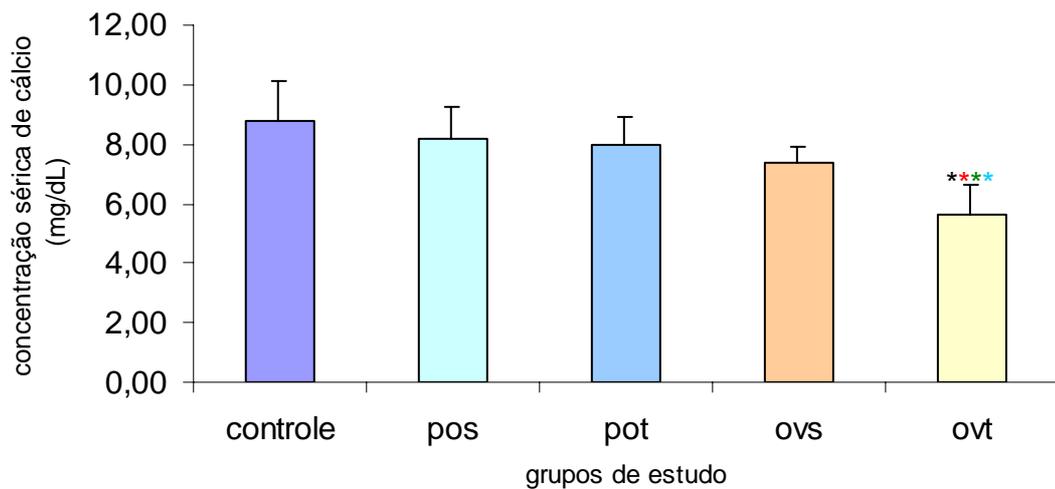


Figura 6 - Valores médios da concentração sérica de cálcio (mg/dL) dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS); ovariectomizados treinados (OVT). (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo OVS, (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo POT, (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo POS ( $p < 0,05$  para o Teste de Tukey).

#### 5.4 Concentração sérica de fosfatase alcalina total

A figura 7 apresenta os níveis médios de concentração sérica de fosfatase alcalina total em cada grupo estudado, podendo-se verificar que esta concentração esteve mais alta nos grupos treinados, OVT ( $43,19 \pm 9,88$ U/L) e POT ( $35,93 \pm 10,38$ U/L), em relação aos demais grupos.

Quando se compara o grupo OVT ( $43,19 \pm 9,88$ U/L) com o grupo controle ( $22,11 \pm 10,75$ U/L), verifica-se um aumento de 48,81% ( $p < 0,05$ ) (figura 7).

No grupo POT ( $35,93 \pm 10,38$ U/L) em relação ao controle ( $22,11 \pm 10,75$ U/L), o aumento foi de 38,46%, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (figura 7).

Os grupo OVS ( $20,50 \pm 6,45$ U/L), e POS ( $19,35 \pm 3,01$ U/L), não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) (figura7).

Entre os grupos ovariectomizados (treinado e não-treinado), verifica-se que esta concentração no grupo OVT ( $43,19 \pm 9,88$ U/L) foi 52,53% superior à do grupo OVS ( $20,50 \pm 6,45$ U/L) ( $p < 0,05$ ) (figura 7).

Entre os grupos submetidos à cirurgia simulada (treinado e não-treinado), observa-se que no grupo POT ( $35,93 \pm 10,38$ U/L) essa concentração esteve 46,14% mais elevada do que no grupo POS ( $19,35 \pm 3,01$ U/L) ( $p < 0,05$ ) (figura 7).

Entre os grupos POS e OVT, esta concentração esteve 55,2% superior no grupo OVT ( $p < 0,05$ ) e entre os grupos POT e OVS, esteve 42,94% mais alta no grupo POT ( $p < 0,05$ ) (figura 7).

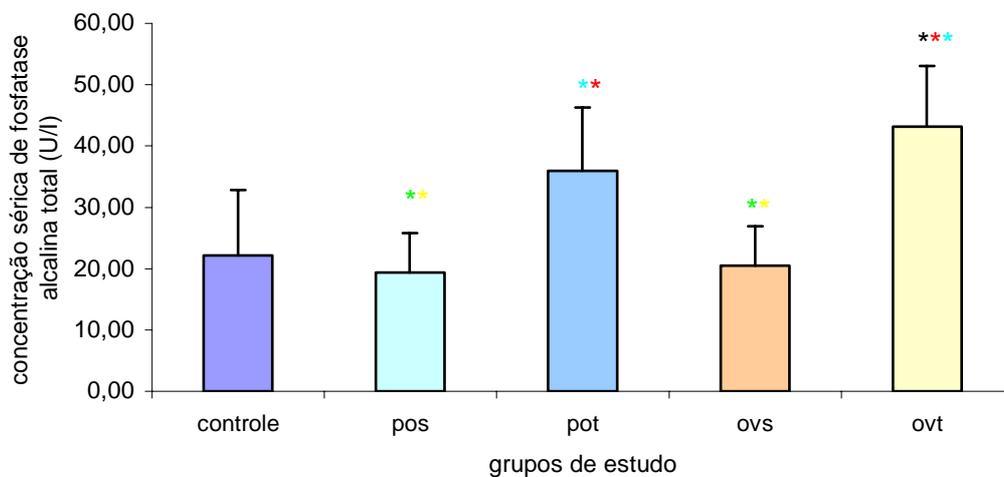


Figura 7 - Valores médios da concentração sérica de fosfatase alcalina total (U/L) dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS); ovariectomizados treinados (OVT). (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo OVS, (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo POT, (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo POS, (\*) Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo OVT ( $p < 0,05$  para o Teste de Tukey).

## 5.5 Comprimento femoral

Na figura 8 tem-se a representação gráfica dos comprimentos médios dos fêmures direitos em cada grupo estudado, podendo-se verificar que não houve diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos ( $p > 0,05$ ). No grupo controle este comprimento foi de  $1,85 \pm 0,05$  cm; no grupo POS,  $1,82 \pm 0,06$  cm; no grupo POT,  $1,85 \pm 0,05$  cm; no grupo OVS,  $1,82 \pm 0,04$  cm; e no OVT,  $1,78 \pm 0,06$  cm.

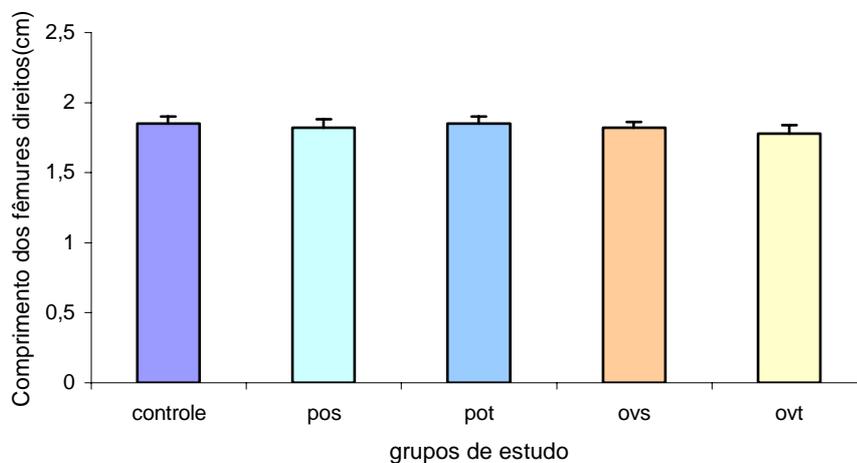


Figura 8 – Valores médios do comprimento (cm) dos fêmures direitos dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS) e ovariectomizados treinados (OVT).

## 5.6 Massa femoral

Ao analisar a massa dos fêmures, pode-se verificar, na figura 9 que nos animais do grupo POT ( $70,32 \pm 2,03\text{mg}$ ) houve aumento de 8,15% em relação ao grupo controle ( $64,59 \pm 3,6\text{mg}$ ) ( $p < 0,05$ ), semelhante ao grupo OVT ( $70,28 \pm 3,81\text{mg}$ ), no qual o aumento foi de 8,81% ( $p < 0,05$ ), enquanto que o grupo POS ( $68,63 \pm 3,3\text{mg}$ ) apresentou aumento de 5,89% em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e o grupo OVS ( $67,4 \pm 2,0$ ) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p > 0,05$ ).

Entre os grupos ovariectomizados (treinado e não-treinado), não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), bem como entre os grupos submetidos à cirurgia simulada (treinado e não-treinado) ( $p > 0,05$ ) (figura 9).

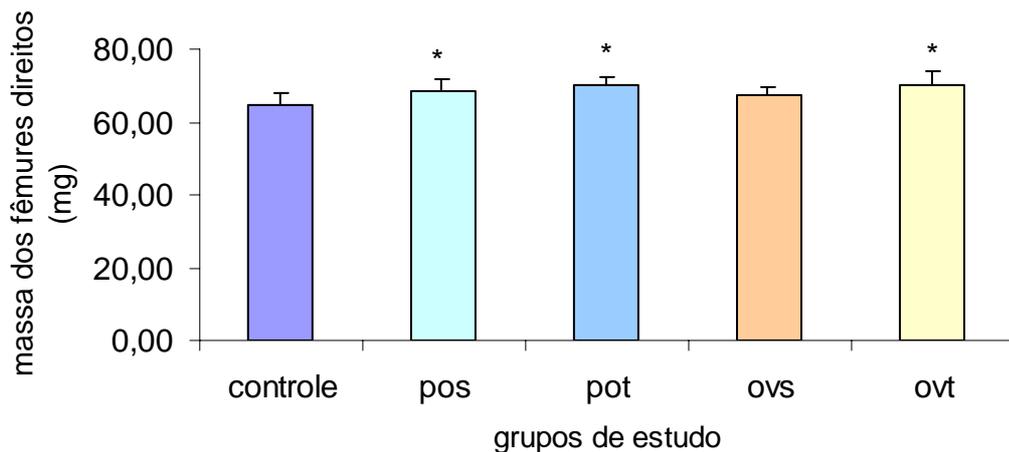


Figura 9 - Valores médios da massa (mg) dos fêmures direitos dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS) e ovariectomizados treinados (OVT). (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  para o Teste de Tukey).

## 5.7 Medidas morfométricas

### 5.7.1 Densidade de osteócitos

Como pode ser verificado na figura 10, a densidade média de osteócitos esteve mais alta no grupo OVS ( $18,10 \pm 1,78$ ), apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $12,87 \pm 1,9$ ) ( $p < 0,05$ ), nos demais grupos não se observou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (no grupo POS esta densidade foi de  $13,49 \pm 1,82$ , no grupo POT de  $15,5 \pm 3,23$  e no grupo OVT,  $17,08 \pm 2,90$ ).

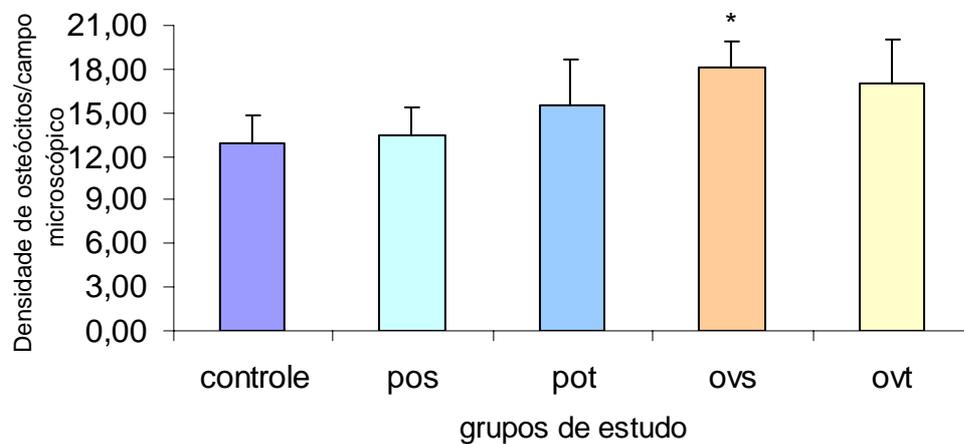


Figura 10- Densidade média de osteócitos por campo microscópico visualizado dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS) e ovariectomizados treinados (OVT). (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  para o Teste de Tukey).

### 5.7.2 Área dos osteócitos

A área média dos osteócitos no grupo controle foi de  $13,84 \pm 2,36 \mu\text{m}^2$ , estando similar nos grupos POT ( $14,78 \pm 1,76 \mu\text{m}^2$ ) e OVT ( $14,76 \pm 2,36 \mu\text{m}^2$ ). Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos POS ( $15,77 \pm 1,84 \mu\text{m}^2$ ) e OVS ( $12,98 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ ) ( $p < 0,05$ ), como apresentado na figura 11.

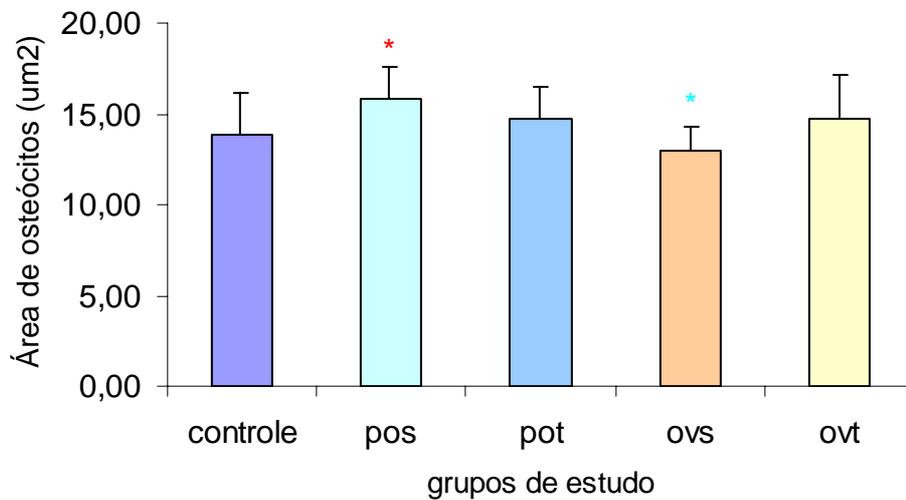


Figura 11 – Valores médios da Área dos osteócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS) e ovariectomizados treinados (OVT). (\*) : Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo OVS, (\*): Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo POS ( $p < 0,05$  para o Teste de Tukey).

### 5.7.3 Perímetro dos osteócitos

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao perímetro dos osteócitos ( $p > 0,05$ ). O grupo controle apresentou em média perímetro de osteócitos de  $21,26 \pm 2,40\mu\text{m}$ ; o grupo POS,  $23,40 \pm 1,02\mu\text{m}$ ; o grupo OVS,  $21,82 \pm 1,90\mu\text{m}$ ; e o grupo OVT,  $23,61 \pm 2,82\mu\text{m}$ . (Figura 12)

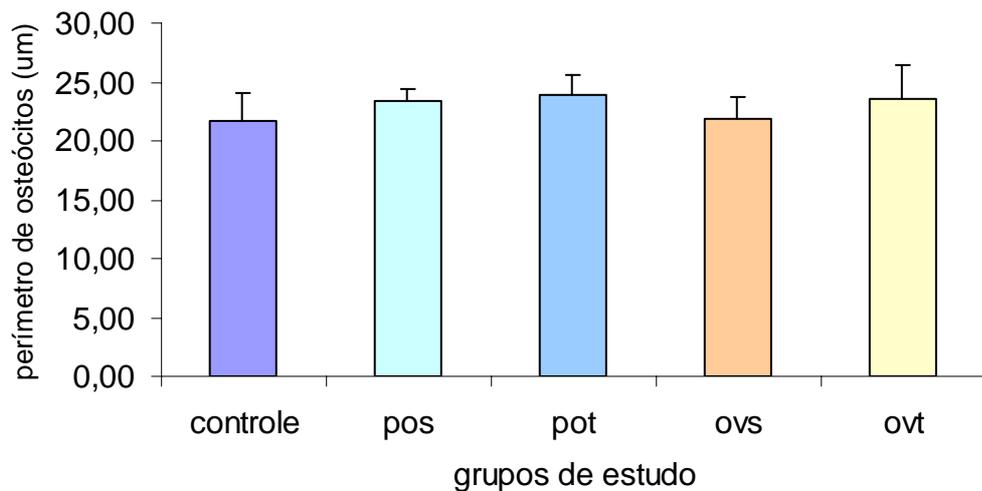


Figura 12 – Valores médios do Perímetro dos osteócitos ( $\mu\text{m}$ ) dos animais controle; pseudo-operados sedentários (POS); pseudo-operados treinados (POT); ovariectomizados sedentários (OVS) e ovariectomizados treinados (OVT).

### 5.8 Morfologia do tecido ósseo:

Morfologicamente, verificou-se que no grupo controle, o tecido ósseo apresentou-se com lacunas osteocitárias de morfologia ovalada e contorno regular, com osteócitos dispostos centralmente e presença de linhas cementantes bem visíveis na matriz óssea (Figura 13). O grupo POS apresentou padrão morfológico semelhante ao grupo controle, porém, com linhas cementantes pouco evidentes (Figura 14). Já no grupo POT, observou-se lacunas com morfologia e contorno semelhantes ao controle, além da presença de linhas cementantes, no entanto, os osteócitos apresentaram-se dispostos excentricamente (Figura 15). No grupo OVS as lacunas osteocitárias apresentaram morfologia alongada e contorno irregular, com osteócitos dispostos excentricamente e ausência de linhas cementantes visíveis na matriz óssea (Figura 16). Diferentemente do grupo OVS, o grupo OVT apresentou lacunas osteocitárias de contorno regular e presença de linhas cementantes na matriz óssea, em relação à morfologia lacunar e disposição dos osteócitos esteve similar ao grupo OVS (Figura 17).



Figura 13 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo controle, mostrando: Lacunas osteocitárias de morfologia ovalada e contorno regular, com osteócitos dispostos centralmente e presença de linhas cementantes bem visíveis na matriz óssea. I: lacuna osteocitária; o: osteócito; lc: linha cementante. Hematoxilina e Eosina. 400x.

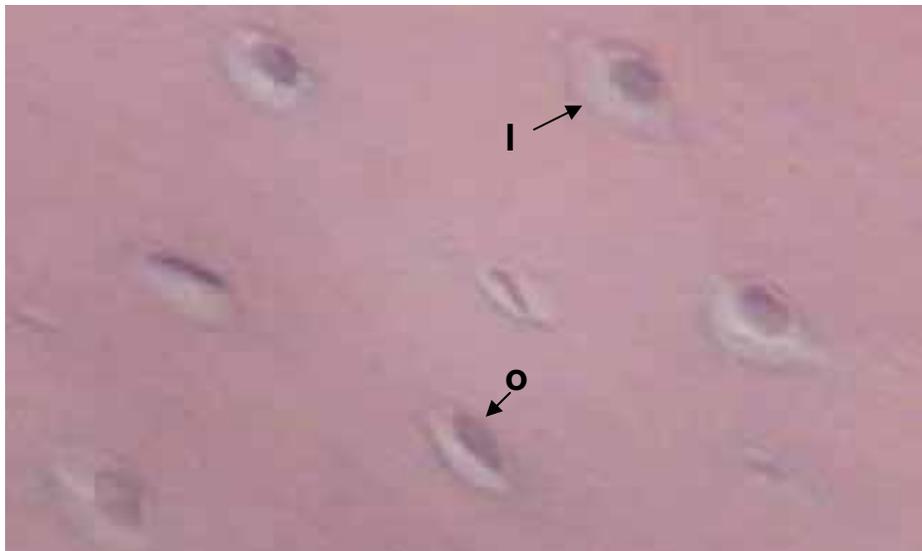


Figura 14 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo POS, mostrando: Lacunas osteocitárias de morfologia ovalada e contorno regular, com osteócitos dispostos centralmente, linhas cementantes pouco visíveis na matriz óssea. I: lacuna osteocitária; o: osteócito. Hematoxilina e Eosina. 400x.

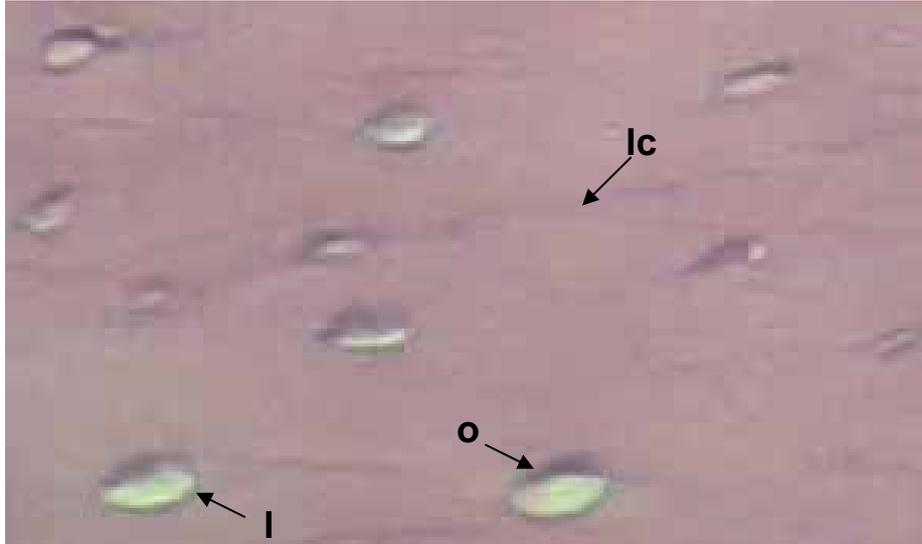


Figura 15 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo POT, podendo-se observar: Lacunas osteocitárias de morfologia ovalada e contorno regular, com osteócitos dispostos excentricamente, presença de linhas cementantes bem visíveis na matriz óssea. l: lacuna osteocitária; o: osteócito; lc: linha cementante. Hematoxilina e Eosina. 400x.



Figura 16 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo OVS, podendo-se observar: Lacunas osteocitárias de morfologia alongada e contorno irregular, com osteócitos dispostos excentricamente, ausência de linhas cementantes visíveis na matriz óssea. l: lacuna osteocitária; o: osteócito. Hematoxilina e Eosina. 400x.

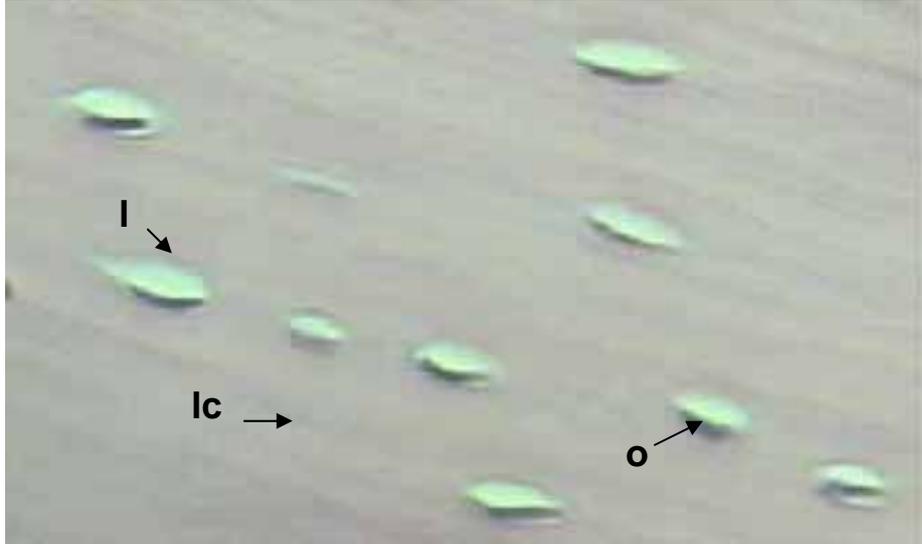


Figura 17 – Fotomicrografia do tecido ósseo da região cortical proximal do fêmur direito de animal do grupo OVT, podendo-se observar: Lacunas osteocitárias de morfologia alongada e contorno regular, com osteócitos dispostos excêntrica, presença de linhas cementantes visíveis na matriz óssea. l: lacuna osteocitária; o: osteócito; lc: linha cementante. Hematoxilina e Eosina. 400x.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo pôde-se verificar que nos animais submetidos à ovariectomia houve substancial ganho de massa corpórea trinta dias após a cirurgia, período necessário, segundo a literatura para a ocorrência de déficit hormonal e conseqüente alteração no metabolismo ósseo no modelo experimental utilizado (PAZ; JORGETTI ; YOSHINARI, 1997). O aumento na massa corpórea após a menopausa ou ovariectomia, tanto em mulheres quanto em animais, tem sido verificado por diversos autores (BORTOLI et al.,1996; CHEN et al., 2001) estando relacionado a alterações metabólicas decorrentes da redução na síntese e liberação dos hormônios ovarianos.

Porém, o acompanhamento periódico da massa corpórea dos animais neste estudo demonstrou que a prática do exercício físico influenciou significativamente o ganho de massa corpórea, tendo em vista que tanto nos animais ovariectomizados como naqueles submetidos à cirurgia simulada, quando exercitados durante cinco semanas, o aumento de massa corpórea não se manteve, havendo inclusive tendência a redução nesta massa a partir da quarta semana de treinamento. Já nos grupos que permaneceram sedentários, verificou-se ganho de massa corpórea no decorrer de todo o experimento, sendo mais evidente, sobretudo naqueles submetidos à ovariectomia. Corroborando com estes achados, Chen et al. (2001) verificaram em estudo utilizando ratas Sprague-Dawley, um aumento da massa corpórea após 30 dias de ovariectomia, no entanto, entre os animais treinados, ovariectomizados e não-ovariectomizados não houve diferença estatisticamente significativa na massa corpórea. Por outro lado, Iwamoto; Yeh; Aloia (1999) em estudo desenvolvido com ratas Sprague-Dawley em crescimento, apresentando ovários intactos, exercitadas por oito e doze semanas, não verificaram alteração significativa na massa corpórea em relação aos animais controle. Segundo Huang et al. (2002) o exercício físico em animais aumentaria o consumo energético e causaria um leve aumento na taxa de repouso metabólico pós-exercício, podendo estar relacionado a uma redução na massa corpórea.

A determinação da concentração sérica do hormônio estradiol neste estudo conduz a reflexões importantes acerca das alterações metabólicas decorrentes da falência ovariana, bem como de fatores que podem influenciar tais alterações, que são observadas sobretudo no período pós-menopausa, o qual tem

sido bastante estudado. Porém, ainda há muito a ser esclarecido para que se reconheça a real importância das diversas modalidades terapêuticas que têm sido empregadas. Nossos resultados revelaram pequena redução na concentração sérica de estradiol dos animais ovariectomizados treinados em relação aos animais controle, porém, nos animais ovariectomizados que permaneceram sedentários os níveis séricos de estradiol estiveram compatíveis com aqueles apresentados por animais dos grupos controle e pseudo-operado.

Tais resultados sugerem que decorrido o período após a supressão ovariana, a concentração sérica de estradiol apresentada pelos animais não-treinados pode ter sido resultado da produção e conversão de precursores estrogênicos em áreas extragonadais, como o tecido adiposo, no entanto, nos animais ovariectomizados treinados esta produção foi menos substancial, tendo em vista que neste grupo houve menos ganho de massa corpórea e, conseqüentemente um menor acúmulo de massa adiposa. Uma outra hipótese que pode justificar uma redução estrogênica nestes animais é a interferência do exercício físico sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, alterando a produção e liberação de precursores estrogênicos pela glândula adrenal.

Concordando com os resultados desta dissertação, Goetz (1999) não encontrou alterações significativas nos níveis de estradiol entre animais ovariectomizados sedentários e pseudo-operados, relacionando este fato à conversão periférica de andrógenos em estrógenos através de processos enzimáticos no tecido adiposo nos animais ovariectomizados.

De acordo com Vihko; Isomaa ; Gohsh (2001) a ausência dos ovários levaria a uma redução dos hormônios estrogênicos, no entanto, no decorrer do período após a ovariectomia pode haver produção destes hormônios pela glândula adrenal, e a estrona e os andrógenos circulantes com origem nesta glândula também podem ser convertidos em estradiol em tecidos periféricos, o que pode fazer com que a concentração hormonal dos animais ovariectomizados se apresente semelhante a dos animais mantidos com os ovários intactos.

Russell et al. (1993) apud Latour (2001) em estudos estendidos por períodos prolongados após a ovariectomia, verificaram que podem ser encontrados níveis mais substanciais de estradiol plasmático e sugerem que outros órgãos, tais como as glândulas adrenais podem aumentar a secreção de estradiol, minimizando as diferenças na concentração hormonal entre animais ovariectomizados e controle.

De acordo com diversos pesquisadores, o exercício físico pode interferir com o eixo hipotálamo-hipofisário, levando a uma redução dos níveis de estradiol, como foi verificado em nosso estudo apenas no grupo ovariectomizado treinado. No entanto, esta alteração só interfere com o metabolismo ósseo quando a redução estrogênica for muito significativa (RENCKEN; CHESNUT; DRINKWATER, 1996; TOMTEN et al.,1998; BECK; SHOEMAKER, 2000).

Os andrógenos circulantes têm importante papel na fisiologia e fisiopatologia em mulheres, sendo a conversão periférica de andrógenos circulantes em estrógenos de grande importância após a menopausa, quando os ovários cessam a síntese de estrógenos, e o estradiol não tem mais um papel principal como hormônio circulante (LEA; FLANAGAN, 1998; SIMPSON, 2002). A biossíntese local de estrógenos em áreas extragonadais possui diversas características fundamentais que diferem daquele produzido pelos ovários. O estrógeno sintetizado nestes compartimentos extragonadais atua sobretudo localmente, exercendo importante papel fisiológico, porém, ainda pouco reconhecido. No osso, a aromatase é expressa primariamente nos osteoblastos e condrócitos, e sua atividade em culturas de osteoblastos é comparável à que ocorre nas células estromais adiposas, assim, parece que também no osso, a expressão local de aromatase é a principal fonte de estrógenos responsável pela manutenção da mineralização, embora isto seja difícil de ser comprovado experimentalmente (SIMPSON, 2002).

Com relação à concentração sérica de cálcio, os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o treinamento físico esteve relacionado com a redução da concentração sérica de cálcio em camundongos submetidos a ovariectomia, e não exerceu influência sobre os animais que tiveram os ovários preservados. Como os animais ovariectomizados treinados apresentaram ainda aumento da massa femoral, pode-se inferir que esta redução na concentração sérica de cálcio esteja relacionada a uma maior deposição de cálcio no osso, que não foi quantificada neste estudo.

Em trabalho realizado por Horcajada et al. (1997) com ratos Wistar machos orquidectomizados submetidos a treinamento em esteira não foi encontrada alteração significativa nos níveis plasmáticos de cálcio. Já o conteúdo de cálcio no fêmur esteve mais alto nos animais treinados.

Na literatura, a maioria dos trabalhos que avaliam os efeitos do exercício físico sobre o tecido ósseo utiliza a análise do conteúdo de cálcio diretamente no

osso. Huang et al. (2002) analisaram o conteúdo de cálcio no fêmur de ratos Wistar machos submetidos a treinamento em esteira por 10 semanas, não tendo encontrado diferença significativa entre animais treinados e controle.

Bortoli et al. (1996) verificaram redução no conteúdo de cálcio no fêmur de ratas Wistar submetidas a ovariectomia (sedentárias) a partir de trinta dias de pós-operatório.

Neste estudo, os animais ovariectomizados sedentários não apresentaram alterações nos níveis de cálcio sérico. Corroborando com estes achados, Dick et al. (1996) utilizando em seus experimentos ratas Sprague Dawley submetidas a ovariectomia, recebendo uma dieta contendo 0,1% de cálcio para representar a ingesta de cálcio consumida por mulheres na pós-menopausa, verificaram que os animais ovariectomizados apresentaram perda óssea, mas não houve diferença significativa no cálcio plasmático total, em relação a animais submetidos à cirurgia simulada.

Dourador et al. (1997) também não encontraram alteração significativa no cálcio sérico total em estudo realizado com mulheres no período pós-menopausa apresentando densidade óssea normal, osteopenia ou osteoporose.

Segundo Prince (1994) os hormônios estrogênicos apresentam efeitos diretos sobre o osso e também sobre os rins e intestino, órgãos que apresentam papéis importantes no transporte do cálcio, havendo geralmente aumento do cálcio plasmático total quando há deficiência estrogênica, como na menopausa ou após ovariectomia, e queda desta concentração com a realização de reposição estrogênica. No entanto, ainda existem dúvidas sobre a influência do estrógeno sobre as diversas frações de cálcio contribuindo para a concentração do cálcio plasmático total.

No presente estudo, os animais submetidos ao treinamento físico apresentaram maior concentração sérica de fosfatase alcalina total, situação que é compatível com uma maior atividade metabólica, e com relação ao tecido ósseo, a um aumento da atividade osteoblástica, tendo em vista que os marcadores de formação óssea medem produtos decorrentes da ação dos osteoblastos, sendo a fosfatase alcalina produzida predominantemente durante a fase de formação de matriz colágena (BIKLE, 1997; VIEIRA, 1999).

Srivastava et al. (2000) enfatizam o uso de camundongos como modelo animal para o estudo de mecanismos de remodelação esquelética em humanos,

apresentando o uso da fosfatase alcalina como um meio apropriado para a avaliação da formação óssea nestes animais, enquanto que o uso de marcadores de reabsorção óssea é mais limitado.

Segundo Tamaki et al. (1998) alterações endócrinas induzidas pelo exercício têm importante papel sobre o metabolismo ósseo, estando relacionado a um aumento da formação óssea, que resulta em maior recrutamento osteoblástico e na atividade de osteoblastos individuais, que pode ser indicada por elevação nos níveis de fosfatase alcalina.

Ushida; Uemura; Tateishi (2001) destacam a importância da carga mecânica na regulação do ciclo de remodelação óssea e na manutenção da massa e densidade óssea, tendo verificado em seus estudos que o estresse mecânico sobre células da medula óssea de ratos promove um aumento da atividade da fosfatase alcalina em células da linhagem osteoblástica, além de induzir a proliferação celular.

O estradiol também participa da regulação da atividade da fosfatase alcalina, estando, segundo Holzer; Einhorn; Majeska (2002), relacionado à modulação da expressão desta enzima em células estromais da medula óssea de humanos, representando importante papel na diferenciação osteoblástica.

De acordo com os resultados aqui apresentados, os animais treinados, tanto ovariectomizados quanto pseudo-operados, mostraram discreto aumento da massa femoral em relação aos animais controle, o que sugere possível aumento da deposição mineral no osso, sobretudo nos animais ovariectomizados treinados, que apresentaram redução sérica de cálcio. Por outro lado, não houve alterações no tamanho do fêmur, provavelmente devido ao estado de maturação esquelética dos animais. Diversos estudos têm demonstrado aumento de massa óssea subsequente ao exercício, no entanto, com relação ao comprimento ósseo os dados apresentados na literatura são bastante variados.

Outros autores, tais como Iwamoto; Yeh; Aloia (1999) verificaram aumento da massa femoral após treinamento físico em ratas Sprague-Dawley apresentando ovários preservados, assim como Kiuchi; Arai; Katsuta (1998) também encontraram aumento na massa femoral de ratos machos treinados. Já Huang et al. (2002) não verificaram alterações significativas após o exercício, também em ratos machos.

Em estudo desenvolvido por Kiuchi; Arai; Katsuta (1998), o exercício induziu ganho de comprimento do fêmur, tibia e úmero de ratos machos com 4 semanas de idade. IWAMOTO; YEH; ALOIA (1999) também verificaram aumento do comprimento femoral em ratas Sprague-Dawley com 4 semanas de idade exercitadas em esteira por 12 semanas, segundo este autor, a idade e o gênero dos animais, bem como as características do exercício aplicado interferem no crescimento ósseo. Já Horcajada et al. (1997) não encontraram diferenças no comprimento femoral de ratos Wistar machos castrados, treinados em esteira por 15 semanas.

Frost (1987) apud Iwamoto; Yeh; Aloia (1999) propôs a teoria mecanoestática para explicar a adaptação esquelética ao estresse mecânico, segundo a qual o aumento do estímulo mecânico leva ao aumento na modelação e diminui a remodelação óssea. Em ossos jovens, tanto a modelação quanto a remodelação estão ativas, enquanto que em ossos adultos, a modelação está diminuída e a remodelação é predominante. Conseqüentemente, a resposta do osso ao exercício deve ser dependente de alterações da remodelação óssea, tanto em ratos adultos quanto em ratos jovens.

Neste estudo, não se verificou influência do treinamento físico sobre a morfometria dos osteócitos, porém, a ovariectomia associada ao sedentarismo esteve relacionada à redução na área dos osteócitos, e possivelmente devido a esta redução, houve maior densidade de células por campo microscópico. Segundo Power et al. (2002) a densidade de osteócitos sofre influências de alterações na diferenciação final de células da linhagem osteoblástica, podendo estar elevada na osteoporose, ou quando a mineralização da matriz óssea está prejudicada. Mullender et al. (1996) acreditam que os osteócitos regulam o recrutamento de BMU's em resposta estímulo mecânico, modulando a diferenciação de osteoblastos em osteócitos e aumentando a produção de fatores locais. Eles verificaram em seus estudos maior densidade de osteócitos e maior densidade e menor área de lacunas osteocitárias em pacientes osteoporóticos, sugerindo que na osteoporose os osteócitos promovem menor volume ósseo e ocorre redução na vida média dos osteoblastos. De acordo com Marotti (2000), o tamanho dos osteócitos é proporcional ao tamanho dos osteoblastos dos quais eles se diferenciaram.

Em relação ao padrão morfológico do tecido ósseo observado neste estudo, os animais ovariectomizados apresentaram um achatamento dos osteócitos,

em relação aos animais que tiveram seus ovários preservados, entretanto, aqueles que foram submetidos ao treinamento apresentaram características mais semelhantes aos animais controle, como o contorno regular dos osteócitos e a presença de linhas cementantes na matriz óssea, sugestivas da atividade de formação óssea, o que leva a crer que o exercício em parte preveniu as alterações do tecido ósseo decorrentes da ovariectomia e possibilitou um aumento de formação óssea, que também coincide com a redução da concentração sérica de cálcio, a elevação da concentração sérica de fosfatase alcalina total e o discreto aumento da massa femoral. Todavia, as alterações morfológicas encontradas poderiam ser melhor evidenciadas através da utilização de técnicas estereológicas mais complexas, tais como a histomorfometria dinâmica.

## 7 CONCLUSÕES

- O exercício físico em camundongos ovariectomizadas esteve relacionado à redução na massa corpórea;
- Não houve influência do exercício físico sobre o tamanho femoral;
- O exercício promoveu aumento na massa femoral dos animais treinados, submetidos ou não à ovariectomia;
- O treinamento físico provocou alterações hormonais que resultaram na redução da concentração sérica de estradiol nos animais ovariectomizados;
- A concentração sérica de cálcio foi reduzida diante da prática de exercício físico nos animais ovariectomizados;
- O exercício induziu a um aumento da atividade metabólica e provavelmente da atividade osteoblástica, em virtude do aumento na fosfatase alcalina total sérica;
- A densidade, a área e o perímetro dos osteócitos da região cortical proximal do fêmur não foram alterados na presença do exercício;
- O exercício físico alterou o padrão morfológico da região cortical proximal do fêmur de animais ovariectomizados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.C. What's the new in preventing and treating osteoporosis? **Postgraduate Medicine**, v.104, n.4, p. 89-97, oct.1998.

AHLEN, J.; ANDERSSON, S.; MUKOHYAMA, H.; ROTH, C.; BACKMAN, A.; CONAWAY, H. H.; LERNER, U. H. Characterization of the bone-resorptive effect of interleukin-11 in cultured mouse calvarial bones. **Bone**, v. 31, n. 1, p. 242-251, july 2002.

AKHTER, M. P.; CULLEN, D. M.; GONG, G.; RECKER, R. R. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice. **Bone**, v. 29, n.2, p. 121-125, Aug. 2001.

BAGI, C. M.; WILKIE, D.; GEORGELOS, K.; WILLIAMS, D.; BERTOLINI, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone**, v.20, n.3, p.261-267, sep. 1997.

BARLET, J. P.; GAUMET-MEUNIER, N.; HORCAJADA-MOLTENI, M. N. Exercise Physique, carence estrogénique, monoxyde d'azote et remodelage osseux. **Science and Sports**, v. 14, n. 292-300, 1999.

BECK, B. R.; SHOEMAKER, R. M. Osteoporosis: understanding key risk factors and therapeutic options. **The Physician and Sportsmedicine**, v.28, n.2, Feb. 2000.

BIKLE, D. D. Biochemical markers in the assesment of bone disease. **American Journal of Medicine**, v.103, p. 427-435, 1997.

BONEWALD, L. F. Osteocytes: A proposed multifunctional bone cell. **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v.2,n.3, p.239-241, 2002.

BORTOLI, M. A.; ASCAR, J. M.; ARCE, P.; VILLEGAS, L. Variaciones en el contenido de calcio, fosfato, magnesio y sodio en huesos de ratas ovariectomizadas. **Archives Latinoamericano de Nutricion**, v.46, n.1, 1996.

BOURRIN, S.; PALLE, S.; PUIPIER, R.; VICO, L.; ALEXANDRE, C. Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 10, n.11, p. 1745-1752, Nov. 1995.

BUSHINSKY, D. A.; MONK, R. D. Calcium. **The Lancet**, v. 352, n.25,p.306-311, july 1998.

CHEN, J. L.; YAO, W.; FROST, H. M.; LI, C. Y.; SETTEMBERG, R. B.; JEE, W. S. S. Bipedal stance exercise enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effects on bone formation in sham and ovariectomized rats. **Bone**, v.29, n.2, p. 126-133, Aug.2001.

CHENG, S.; SIPILÄ, S.; TAAFFW, D. R.; PUOLAKKA, J.; SUOMINEN, H. Change in bone mass distribution induced by hormone replacement therapy and high-impact

physical exercise in post – menopausal women. **Bone**, v.31, n.1, p. 126-135, July 2002.

CULLINANE, D. M. The role of osteocyte in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception. **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v.2,n.3, p.242-244, 2002.

DALÉN, N.; OLSSON, K. E. Bone mineral content and physical activity. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 45, p. 170-174, 1974.

DEHORITY, W.; HALLORAN, B. P.; BIKLE, D. D.; CURREN, T.; KOSTENCIK, P. J.; WRONSKI, T. J.; SHEN, Y.; RABKIN, B.; BOURAOUI, A.; MOREY-HOLTON, E. Bone and hormonal changes induced by skeletal unloading in the mature male rat. **American Journal of Physiology**, n. 276 (Endocrinology metabolism, 39), p. E62-E69, 1999.

DICK, I. M.; St. JOHN, A.; HEAL, S.; PRINCE, R. L. The effect of estrogen deficiency on bone mineral density, renal calcium and phosphorus handling and calcitropic hormones in the rat. **Calcified Tissue International**, v.59, p.174-178, 1996.

DOURADOR, E. B; FALCO, V. de; CHAHADE, W. H.; COSSERMELLI, W.; YOSHINARI, N. H. Parâmetros bioquímicos e hormonais na osteoporose pós-menopausa. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 52, n.2, p. 60-62, 1997.

ERDMANN, J.; STORCH, S.; PFEILSCHIFTER, J.; OCHLICH, P.; ZIEGLER, R.; BAUSS, F. Effects of estrogen on the concentration of insulin-like growth factor-i in rat bone matrix. **Bone**, v.22, n.5, p. 503-507, May 1998.

ERICKSON, S. M.; SEVIER, T. L. Osteoporosis in Active Women: Prevention, diagnosis, and treatment. **The Physician and Sportsmedicine**, v. 25, n. 11, nov.1997.

FORWOOD, M. R.; BURR, D. B. Physical activity and bone mass: exercises in futility? **Bone Mineral**, v. 21, p. 89-112, 1993.

FROST, H. M. Bone “mass” and “mechanostat”: a proposal. **Anat. Rec.**, v.219, p. 1-9, 1987. In: IWAMOTO, J.; YEH, J. K.; ALOIA, F. Differential Effect of Treadmill Exercise on Three Cancellous Bone Sites in the Young Growing Rat. **Bone**, v. 24, n.3, p.163-169, mar.1999.

GENNARI, L.; BECCHERINI, L.; FALCHETTI, A.; MASI, L.; MASSARI, F.; BRANDI, M. L. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.1689, p.1-24, 2002.

GODDARD, D.; KLEEREKOPER, M. The epidemiology of osteoporosis. **Postgraduate Medicine**, v. 104, n. 4, p. 54-72, Oct. 1998.

- GOETZ, L. H. Effect of estradiol and exercise on lymphocyte proliferation responses in female mice. **Physiology and Behavior**, v. 68, p. 169-174, 1999.
- GOLDFIEN, A.; MONROE, E. Ovários. In: GREENSPAN, F. S.; STREWLER, G. J. **Endocrinologia: Básica & Clínica**, ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000. cap.13.
- HART, K. J.; SHAW, J. M.; VAJDA, E.; HEGSTED, M.; MILLER, S. C. Swim – trained rats have greater bone mass, density, strenght, and dynamics. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1663-1668, 2001.
- HEILBERG, I. P. Homeostasia Mineral. In: SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose: Diagnóstico e tratamento**, ed. Sarvier, São Paulo, 2000. cap. 3.
- HOLZER, G.; EINHORN, T. A.; MAJESKA, R. J. Estrogen regulation of growth and alkaline phosphatase expression by cultured human bone marrow stromal cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.20, p.281-288, 2002.
- HORCAJADA, M. N.; COXAM V.; DAVICCO, M. J.; GAUMET, N.; PASTOUREAU, P.; LETERRIER, C.; CULIOLI, J.; BARLET, J. P. Influence of treadmill running on femoral bone in young orchidectomized rats. **Journal of Applied Physiology**. v.83, n. 1, p. 129-133, july 1997.
- HUANG, T. H.; YANG, R. S.; HSIEH, S. S.; LIU, S. H. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young wistar rats. **Bone**, v.30, n.1, p. 293-299, jan. 2002.
- HUBER, J. C.; SCHNEEBERGER, C.; TEMPFER, C. B. Genetic modelling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders. **Maturitas – The European Menopause Journal**, v.42,p. 1-12, 2002.
- ILVESARO, J. Attachment, polarity and communication characteristics of bone cells.2001. Academic Dissertation – university of oulu, Finland.
- INMAN, C. L.; WARREN, G. L. HOGAN, H. A.; BLOOMFIELDS. A. Mechanical loading attenuates bone loss due to immobilization and calcium deficiency. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n.2, p. 189-195, 1999.
- IWAMOTO, J.; YEH, J. K.; ALOIA, F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. **Bone**, v. 24, n.3, p.163-169, mar.1999.
- JEE, W. S. S. Anabolic agents and osteoporosis: Quo vadis? **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v. 1, n. 2, p. 107-111, 2000.
- JEE, W. S. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v. 1, n. 3, p. 193-207, 2001.

JILKA, R. L. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. **Bone**, v. 23, n.2, p.75-81, ago.1998.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; RENSTRÖM, P.; JÄRVINEN, M.; KVIST, M.; LEHTO, M.; OJA, P.; VUORI, I. The effect of training, immobilization and remobilization on musculoskeletal tissue. 1. Training and immobilization. **Scandinavian Journal Medicine and Science Sports**, v. 2, p. 100-118, 1992.

KATZ, W. A.; SHERMAN, C. Osteoporosis. **The Physician and Sportsmedicine**, v.26, n.2, feb. 1998.

KAWATA, T.; FUJITA, T.; TOKIMASA, C.; KAWASOKO, S.; KAKU, M.; SUGIYAMA, H.; NIIDA, S.; TANNE, K. Suspension "hypokinesia/hypodinamia" may decrease bone mass by stimulating osteoclast production in ovariectomized mice. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.44, n.5, p.581-590, 1998.

KHOSLA, S.; ATKINSON, E. J.; MELTON III, L. J.; RIGGS, B. L. Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. **Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v.82, p. 1522-1527, 1997.

KIUCHI, A.; ARAI, Y.; KATSUTA, S. Detraining effects on bone mass in young male rats. **International Journal Sports Medicine**, v. 19, p. 245-249, 1998.

KLEEREKOPER, M. Detecting osteoporosis. **Postgraduate Medicine**, v.103, n.4, p.45-68, apr.1998.

KUNDU, B.; KHARE, S. K.; SINGH, G. Role of polypeptides in the treatment and diagnosis of osteoporosis. **Peptides**, v. 20, p. 523-537, 1999.

LATOUR, M. G. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p.235-241, 2001.

LEA, C. K.; FLANAGAN, A. M. Physiological plasma levels of androgens reduce bone loss in the ovariectomized rat. **American Journal of Physiology**, v. 274 (Endocrinology Metabolism, 37), p. E328-E335, 1998.

LERNER, U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biology**, v.19, p. 107-120, 2000.

LIMA, J. G. L. ; NÓBREGA, L. H. C.; NÓBREGA, M. L. C. **Aulas em Endocrinologia**, ed. Atheneu, São Paulo, 2001.

LOVERIDGE, N.; FLETCHER, S.; POWER, J.; CABALLERO-ALÍAS, A. M.; DASGUPTA, V.; RUSHTON, N.; PARKER, M.; REEVE, J.; PITSILLIDES, A. A. Patterns of osteocytic endothelial nitric oxide synthase expression in the femoral neck cortex: Differences between cases of intracapsular hip fracture and controls. **Bone**, v.30, n.6, p. 866-871, june, 2002.

MACEDO, J. M. S. de; ARAÚJO, L. M. B. Como diagnosticar e tratar osteoporose: um problema de saúde pública. **Revista Brasileira de Medicina - Ginecologia e Obstetrícia**, v.8, n.3, jun. 1997.

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

MAROTTI, G. The osteocyte as a wiring transmission system. **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v.1,n.2, p.133-136, 2000.

MEIRELLES, E. S. Osteoporose. **Revista Brasileira de Medicina**, v.52, p.169-184, dez. 1995.

MILLER, S. C.; BOWMAN, B. M.; JEE, W. S. S. Available animal models of osteopenia- small and large. **Bone**, v. 17, n.4, 117S-123S, oct. 1995.

MOLINA, M. A. ; CABRERA, A.; ESQUIVIAS, J. J. Histomorfometría de masa ósea y celularidad mediante análisis de imagen; caracterización de los patrones de infiltración en LLC. **Sangre**, v. 41, n.5, p. 357-362, 1996.

MULLENDER, M. G.; VAN DER MEER, D. D.; HUISKES, R.; LIPS, P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. **Bone**, v. 18, n. 2, p.109-113, feb. 1996.

NICOLELLA, D. P.; LANKFORD, J. Microstructural strain near osteocyte lacuna in cortical bone *in vitro*. **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v.2, n.3, p.261-263, 2002.

NOMURA, S.; TAKANO-YAMAMOTO, T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biology**, v.19, p. 91-96, 2000.

NORDIN, B. E. C. Calcium and Osteoporosis. **Nutrition**, v.13, ns. 7-8, p. 664-686, 1997.

ONGPHIPHADHANAKUL, B.; THAMPRAJAMCHIT, S.; CHANPRASERTYOTHIN, S.; CHAILURKIT, L.; RAJATANAVIN, R. Effect of estrogen replacement on insulin sensitivity, serum lipid and bone resorption marker in hypogonadal males. **Maturitas – The European Menopause Journal** , v.42, p. 85-89, 2002.

PALUMBO, C.; FERRETTI, M.; ARDIZZONI, A.; ZAFFE, D.; MAROTTI, G. Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling. **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v.1,n.4, p.327-332, 2001.

PAPAIOANNOU, S.; TUMBER, A. M.; MEIKLE, M. C.; Mc DONALD, F. G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1449, p. 284-292, 1999.

PARFITT, A. M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. **Bone**, v.30, n.1, p.5-7, jan. 2002.

PAZ, L. H. B. C. da; JORGETTI, V.; YOSHINARI, N. H. Modelos animais de osteoporose. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v.52, p.86-89, 1997.

PENG, Z.Q.; VAANANEN, H. K.; TUUKKANEN, J. Ovariectomy-induced bone loss can be affected by different intensities of treadmill running exercise in rats. **Calcif Tissue International**, v.60, p. 441-8, 1997. In: KIUCHI, A.; ARAI, Y.; KATSUTA, S. Detraining effects on bone mass in young male rats. **International Journal of Sports Medicine**, v. 19, p. 245-249, 1998.

POWER, J.; LOVERIDGE, N.; RUSHTON, N.; PARKER, M.; REEVE, J. Osteocyte density in aging subjects is enhanced in bone adjacent to remodeling haversian systems. **Bone**, v. 30, n.6, p.859-865, June 2002.

PRINCE, R. L. Counterpoint: estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. **Endocrine Reviews**. v.15, n.3, p.301-309, June 1994.

QIU, S.; RAO, D. S.; PALNITKAR, S.; PARFITT, A. M. Age and distance from the surface but not menopause reduce osteocyte density in human cancellous bone. **Bone**, v. 31, n.2, 2002.

RAISZ, L. G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n.8-B, p. 1353-1358, 1999.

RENCKEN, M. L.; CHESNUT, C. H.; DRINKWATER, B. L. Bone Density at multiple skeletal sites in amenorrheic athletes. **JAMA**, v. 276, n. 3, July 1996.

ROSEN, C. J.; TENENHOUSE, A.. Biochemical markers of bone turnover. **Postgraduate Medicine**, v.104, n.4, p. 101-114, Oct. 1998.

ROZEN, N.; ISH-SHALON, S.; RACHMIEL, A.; STEIN, H.; LEWINSON, D. Interleukin-6 modulates trabecular and endochondral bone turnover in the nude mouse by stimulating osteoclast differentiation. **Bone**, v.26, n.5, p.469-474, May 2000.

RUGGIERO, R. J.; LIKIS, F. E. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. **Journal of Midwifery e Women`s Health**, v.47,n.3, p. 130-138, May/June 2002.

RUSSELL J. C.; AMY, R. M.; GRAHAM, S.; WENZEL, L. M.; DOLPHIN, P. J. Effects of castration on hyperlipidemic, insulin resistant JCR:LA-Corpulent Rats. **Atherosclerosis**, v.100, p. 113-122, 1993. In: LATOUR, M. G. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p.235-241, 2001.

SCIFERT-KLAUSS, V.; MUELLER, J. E.; LUPPA, P.; PROBST, R.; WILKER, J.; HÖB, C.; TREUMANN, T.; KASTNER, C.; ULM, K. Bone metabolism during the perimenopausal transition: a prospective study. **Maturitas – The European Menopause Journal**, v. 41, p. 23-33, 2002.

SIMPSON, E. R. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. **Fertility and Sterility**, v. 77, n.4, supl. 4, p. S6-S10, apr. 2002.

SINGH, S.; SHAUL, P. W.; GUPTA, P. D. Conventional estrogen receptors are found in the plasma membrane of vaginal epithelial cells of the rat. **Steroids**, v.67, p. 757-764, 2002.

SRIVASTAVA, A. K.; BHATTACHARYYA, S.; CASTILLO, G.; MIYAKOSHI, N.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Development and evaluation of c-telopeptide enzyme-linked immunoassay for measurement of bone resorption in mouse serum. **Bone**, v.27, n.4, p. 529-533, Oct. 2000.

STERCK, J. G. H.; KLEIN-NULEND, J.; LIPS, P.; BURGER, E. H. Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress in vitro, **American Journal Physiology**, v. 274 (Endocrinologia e Metabolismo, 37), p. E1113- E1120, 1998.

SZEJNFELD, V. L.; CARVALHO, A. B. ; SATO, E. I.; ATRA, E. Histomorfometria óssea e osteoporose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.27, n.3, mai./jun. 1987.

SZEJNFELD, V. L. **Osteoporose: Diagnóstico e tratamento**, ed. Sarvier, São Paulo, 2000.

TAMAKI, H.; AKAMINE, T.; GOSHI, N.; KURATA, H.; SAKOU, T. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. **Bone**, v.23, n.2, p. 147-153, Aug. 1998.

TOBIAS, J. H.; COMPSTON, J. E. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? **Bone**, v. 24, n.2, p. 122-124, Feb. 1999.

TOMTEN, S. E.; FALCH, J. A.; BIRKELAND, K. I.; HEMMERSBACH, P.; HOSTMARK, A. T. Bone mineral density and menstrual irregularities. A comparative study on cortical and trabecular bone structures in runners with alleged normal eating behavior. **International Journal Sports Medicine**, v.19, p.92-97, 1998.

USHIDA, T.; UEMURA, T.; TATEISHI, T. Changes in cell proliferation, alkaline phosphatase activity and camp production by mechanical strain in osteoblast-like cells differentiated from rat bone marrow. **Material Science and Engineering C**, v.17, p. 51-53, 2001.

UMEMURA, Y.; ISHITO, T.; TSUJIMOTO, H.; MIURA, H.; MOKUSH, N.; SUZUKI, H. Effects of jump training on bone hypertrophy in young and old rats. **International Journal Sportsmedicine**, v. 16, p. 364-367, 1995. In: HORCAJADA, M. N.; COXAM V.; DAVICCO, M. J.; GAUMET, N.; PASTOUREAU, P.; LETERRIER, C.; CULIOLI, J.; BARLET, J. P. Influence of treadmill running on femoral bone in young orchidectomized rats. **Journal of Applied Physiology**, v.83, n. 1, p. 129-133, July 1997.

VASHISHTH, D.; GIBSON, G.; FYHRIE, D. P. Do Osteocytes play a Role in the Regulation of Bone Matrix? 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Feb. 25-28, 2001, San Francisco, California.

VIEIRA, J. G. H. Marcadores bioquímicos na prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.43, n.6, p. 416-422, 1999.

VIHKO, P.; ISOMAA, V.; GHOSH, D. Structure and function of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.171, p. 71-76, 2001.

WEINSTEIN, R. S.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis and osteoporosis. **The American journal of Medicine**, v. 108, p. 153-163, Feb. 2000.

WELSH, L.; RUTHERFORD, O. M.; JAMES, I.; CROWLEY, C.; COMER, M.; WOLMAN, R. The acute effects of exercise on bone turnover. **International Journal of Sports Medicine**, v.18, p. 247-251, 1997.

WINDAHL, S. H.; ANDERSSON, G. ran; GUSTAFSSON, J. ke. Elucidation of estrogen receptor function in bone with the use of mouse models. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n.5, p. 195-200, jul.2002.

YAO, W. ; JEE, W. S. S.; CHEN, J.; TAM, C. S.; SETTERBERG, R. B. FROST, H. M. Erect bipedal stance exercise partially prevents orquidectomy-induced bone loss in the lumbar vertebrae of rats. **Bone** , v.27, n.5, p. 667-675, Nov. 2000.

YEH, J. K.; CHEN, M.; ALOIA, F. J. Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.273, Issue 4, E734-E742, Oct. 1997.

ZAMAN, G.; CHENG, M. Z.; JESSOP, H. L.; WHITE, R.; LANYON, L. E. Mechanical strain activates estrogen response elements in bone cells. **Bone** , v.27, n.2, p. 233-239, aug. 2000.

ZERBINI, C. A. F. Osteoporose – Uma revisão. **Revista Brasileira de Clínica Terapêutica**, v.24, n.1, p. 22-27, jan. 1998.