

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Marcus Vinícius de Oliveira Ferreira

**Terapia com antirreabsortivos e exercícios físicos nas ratas osteoporóticas
ovariectomizadas**

Juiz de Fora
2025

Marcus Vinícius de Oliveira Ferreira

**Terapia com antirreabsortivos e exercícios físicos nas ratas osteoporóticas
ovariectomizadas**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Valdeci Manoel de Oliveira

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vinicius de Oliveira Ferreira, Marcus .

Terapia com antirreabsortivos e exercícios físicos nas ratas osteoporóticas ovariectomizadas / Marcus Vinicius de Oliveira Ferreira. -- 2025.

161 p. : il.

Orientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar

Coorientador: Valdeci Manoel de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2025.

1. Osteoporose. 2. Ovariectomia. 3. Risedronato. 4. Exercício Físico. I. Adriano Kopke de Aguiar , Jair , orient. II. Manoel de Oliveira, Valdeci , coorient. III. Título.

Marcus Vinicius de Oliveira Ferreira

Terapia com antirreabsortivos e exercícios físicos nas ratas osteoporóticas ovariectomizadas

Dissertação apresentada
Programa de Pós-
Graduação em Saúde
da Universidade Federal
de Juiz de Fora como
requisito parcial à
obtenção do título de
Mestre em Saúde. Área de
concentração: Pesquisa
em Experimentação
Animal.

Aprovada em 21 de março de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Valdeci Manoel de Oliveira - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Simone Moreira de Macêdo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Bruno Gonçalves Schroder e Souza

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 18/02/2025.



Documento assinado eletronicamente por **BRUNO GONCALVES SCHRODER E SOUZA, Usuário Externo**, em 21/03/2025, às 12:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Moreira de Macedo, Professor(a)**, em 24/03/2025, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Adriano Kopke de Aguiar, Professor(a)**, em 24/03/2025, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valdeci Manoel de Oliveira, Professor(a)**, em 24/03/2025, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2252166** e o código CRC **EB22119C**.

Dedico este trabalho a Deus, pela força e sabedoria concedidas ao longo desta jornada; à minha esposa Patrícia, pelo amor incondicional e apoio constante; aos meus amigos e familiares, pelo incentivo e companheirismo; e aos meus orientadores, **Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar** e **Prof. Dr. Valdeci Manoel de Oliveira**, por serem verdadeiros pilares nesta etapa tão sonhada e realizada da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **DEUS**, fonte de toda sabedoria e força, por guiar meus passos e iluminar meu caminho ao longo desta jornada. Sem a Sua presença em minha vida, este sonho do mestrado não teria sido possível.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar**, por sua incansável dedicação, acolhimento e entusiasmo. Sua orientação e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigado por se manter sempre presente, mesmo à distância, pela paciência em momentos desafiadores e por acreditar no meu potencial. Sua calma, confiança e esforço foram imprescindíveis para a concretização deste marco em minha trajetória.

Ao **Prof. Dr. Valdeci Manoel de Oliveira**, meu profundo reconhecimento por todo o suporte oferecido desde os meus primeiros passos acadêmicos, ainda antes da graduação. Sua generosidade, orientação e incentivo ao longo do caminho foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por sua colaboração, conselhos e dedicação, que tanto contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

À **Profª Dra. Vera Peters**, minha gratidão pela orientação, apoio e estímulo durante os momentos mais críticos da pesquisa. Sua experiência e dedicação foram essenciais para a tomada de decisões e para o progresso do estudo no Centro de Biologia da Reprodução (CBR).

À **Profª Dra. Valkíria**, minha mais sincera gratidão pela orientação e dedicação ao longo do meu mestrado. Sua expertise em Bioquímica, combinada com seu apoio constante e palavras encorajadoras, foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho e para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao veterinário **Ricardo Palhares Zschaber de Araújo**, agradeço a ajuda indispensável na fase prática da pesquisa e no manejo dos animais. Sua disponibilidade e atenção foram inestimáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do Centro de Biologia da Reprodução, especialmente **Ana Paula, Carol, Stephanie e Lorena**, meu agradecimento pelo cuidado e dedicação no tratamento dos animais.

À equipe de radiologia do HU, em especial ao **Dr. Rafael Gomide**, por sua valiosa colaboração e suporte no estudo. Ao **Prof. Dr. Rafael Alves Bonfim de Queiroz**, sou grato pela assistência na programação das imagens radiográficas, que foi crucial para o andamento da pesquisa.

À técnica do Laboratório de Histologia, **Lúcia**, obrigado pelo apoio no preparo das lâminas, e à **Profª Flávia**, pela orientação técnica e científica.

Aos funcionários do Núcleo de Estudos em Processos Patológicos, especialmente **Rogério e Bárbara**, pela colaboração sempre atenciosa. E aos alunos da UFJF, **Henrique, Kaiuran e Vitor**, pela disponibilidade, comprometimento e valiosa contribuição à pesquisa.

À minha esposa, **Patrícia**, expresso minha mais profunda gratidão pelo inestimável apoio e compreensão durante toda a jornada do mestrado. Sua paciência, incentivo e dedicação foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios e manter o foco nas etapas deste trabalho. Este feito não teria sido possível sem a sua presença constante e suporte incondicional, que forneceram o alicerce emocional necessário para a conclusão desta etapa acadêmica.

Finalmente, aos meus pais, **João e Vera**, pela confiança, amor e incentivo incondicional, que sempre me deram força para alcançar meus objetivos.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Muitos tratamentos já foram desenvolvidos objetivando retardar ou reverter a osteoporose: antirreabsortivos, anabólicos e atividades físicas. Existem discussões em relação aos métodos e seus efeitos sinérgicos. O objetivo desse trabalho é tentar avaliar como tratamentos isolados e sinérgicos se comportam nos ossos de ratas submetidas à ovariectomia. Para isso foram utilizadas 96 ratas Wistar, divididas em 12 grupos experimentais: OVX4- ovariectomizado e seguimento por 4 semanas; OVX8- ovariectomizado e seguimento por 8 semanas; OVX12- ovariectomizado e seguimento por 12 semanas; OVXR4- ovariectomizado e nas 4 semanas seguintes administrado risedronato; OVXR8- ovariectomizado e nas 8 semanas seguintes administrado risedronato; OVXR12- ovariectomizado e nas 12 semanas seguintes administrado risedronato; SHAME- submetidos à cirurgia simulada e exercícios por 12 semanas; SHAMR- submetidos à cirurgia simulada e por 12 semanas seguintes administrado risedronato; SHAMRE- submetidos à cirurgia simulada e por 12 semanas seguintes administrado risedronato e exercícios; OVXE- ovariectomizados e exercícios físicos na esteira durante 12 semanas; OVXRE- ovariectomizados e nas 12 semanas seguintes administrado risedronato e exercício físico na esteira; CONTROLE- referência- não submetidos à nenhum procedimento (somente deambulação livre na gaiola). Todos os grupos, após 12 semanas, foram eutanasiados, exceto os animais dos grupos OVX4 e OVXR4 e OVX8 e OVXR8 que foram eutanasiados com 4 e 8 semanas respectivamente. Durante o seguimento todos os animais foram submetidos a pesagem e radiografias de controle mensal para avaliação da densidade mineral óssea. Após o fim do experimento, foram coletados exames de sangue, as colunas e fêmures esquerdos foram dissecadas e submetidas a análise histológica. Os dados foram analisados por testes estatísticos com nível de significância 5%. Os resultados em relação ao peso demonstraram que os animais ovariectomizados apresentaram um aumento de peso maior que os dos grupos SHAM's, particularmente os grupos de tratamentos sinérgicos. Os exames laboratoriais demonstraram uma diminuição de cálcio e aumento do Ca e FA nos grupos OVX's. A densitometria radiográfica demonstrou a diminuição da densidade radiográfica na coluna dos animais ovariectomizados com aumento da densidade nos animais submetidos aos tratamentos. A histomorfometria demonstrou maiores índices da relação BV/TV nos animais submetidos a intervenção. Conclui-se que o exercício

físico e o medicamento apresentam efeitos sinérgicos nos ossos de ratas ovariectomizadas. O medicamento risedronato e o exercício não tem benefícios na prevenção primária.

Palavras-Chave: Osteoporose. Ratos Wistar. Ovariectomia. Risedronato. Exercício Físico.

ABSTRACT

Many treatments have been developed to delay or reverse osteoporosis: antiresorptive, anabolic and physical activities. There are discussions regarding the methods and its synergistic effects. The objective of this study is to evaluate how isolated and synergistic treatments behave in the bones of rats submitted to ovariectomy. For this, 96 Wistar rats were used, divided into 12 experimental groups: OVX4- ovariectomized and follow-up for 4 weeks; OVX8- ovariectomized and follow-up for 8 weeks; OVX12- ovariectomized and follow-up for 12 weeks; OVXR4- ovariectomized and in the following 4 weeks administered risedronate; OVXR8- ovariectomized and in the following 8 weeks administered risedronate; OVXR12- ovariectomized and in the following 12 weeks administered risedronate; SHAME- submitted to simulated surgery and exercises for 12 weeks; SHAMR- submitted to sham surgery and administered risedronate for the following 12 weeks; SHAMRE- submitted to sham surgery and administered risedronate and exercise for the following 12 weeks; OVXE- ovariectomized and exercised on the treadmill for 12 weeks; OVXRE- ovariectomized and administered risedronate and exercised on the treadmill for the following 12 weeks; CONTROL- reference- not submitted to any procedure (only free ambulation in the cage). All groups were euthanized after 12 weeks, except for the animals in groups OVX4 and OVXR4 and OVX8 and OVXR8, which were euthanized at 4 and 8 weeks, respectively. During follow-up, all animals were weighed and had monthly control radiographs taken to assess bone mineral density. After the end of the experiment, blood tests were collected, the left spines and femurs were dissected and submitted to histological analysis. The data were analyzed by statistical tests with a significant level of 5%. The results regarding weight demonstrated that the ovariectomized animals presented a greater weight gain than those in the SHAM groups, particularly in the synergistic treatment groups. Laboratory tests demonstrated a decrease in calcium and an increase in Ca and FA in the OVX groups. Radiographic densitometry demonstrated a decrease in radiographic density in the spine of the ovariectomized animals with an increase in density in the animals submitted to the treatments. Histomorphometry demonstrated higher rates of the BV/TV ratio in the animals submitted to the intervention. It is concluded that physical exercise and the drug have synergistic effects on the bones of ovariectomized rats. The drug risedronate and exercise have no benefits in primary prevention.

Keywords: Osteoporosis. Wistar, Rats. Ovariectomy. Risedronate. Exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho esquemático do metabolismo ósseo e fotografias de ossos normais e osteoporóticos	35
Figura 2 – Delineamento dos grupos	62
Figura 3 – Tricotomia na região entre o rebordo costal e a pelve	66
Figura 4 – Identificação na pele entre o ponto médio dos arcos costais e o ilíaco....	66
Figura 5 – Abertura da camada muscular	66
Figura 6 – Exposição do ovário	66
Figura 7 – Ligadura do ovário abaixo da fímbria	67
Figura 8 – Ovário individualizado	67
Figura 9 – Sutura da fímbria.....	67
Figura 10 – Sutura da pele	67
Figura 11 – Cuba de Maceração	69
Figura 12 – Becker com água e medicamento	69
Figura 13 – Esteira motorizada (Insight, Brasil).....	70
Figura 14 – Animais posicionados nas baias para o treinamento	71
Figura 15 – Aparelho de radiografia da marca Dabi Atlante Spectro 70X	72
Figura 16 – Desenho esquemático da escada de alumínio utilizada como referencial densitométrico	74
Figura 17 – Posicionamento na placa de radiografia e imagem com o referencial densitométrico	75
Figura 18 – Definição das áreas de interesse para medição óssea coluna (4 primeiras vértebras lombares) e fêmur direito (terço distal do fêmur proximal à articulação do joelho).	76
Figura 19 – Equação polinomial para conversão da imagem em mmAl.....	76
Figura 20 – Conversão das imagens nas quatro medidas de tempo em mmAl grupo OVX12 coluna e fêmur	77
Figura 21 – Dissecção com exposição da coluna e dos fêmures.....	78
Figura 22 – Presença dos ovários nos animais dos grupos SHAM e CONTROLE. ...	78
Figura 23 – Ausência dos ovários e atrofia dos cornos uterinos nos animais dos grupos OVX.....	79
Figura 24 – Ganho de peso comparativo dos grupos CONTROLE e OVX12 respectivamente.....	79

Figura 25 – Preparo das peças para histologia	81
Figura 26 – Microscópio para fotografia das peças histológicas.	82
Figura 27 – Imagens histológicas da coluna.	83
Figura 28 – Imagens histológicas do fêmur.....	83
Figura 29 – Análise inicial da imagem no software Fiji ImageJ	86
Figura 30 – Calibração da imagem	86
Figura 31 – Ajustes da imagem.....	87
Figura 32 – Cálculo plugin BoneJ BV, TV e BV/TV	88
Figura 33 – Cálculo espessura óssea trabecular (Tb. Th).....	89
Figura 34 – Cálculo espaço ósseo trabecular (Tb. Sp)	89
Figura 35 – Gráfico comparativo do Aumento Percentual de Peso em Modelos OVX vs. CONTROLE ao Longo do Tempo.....	93
Figura 36 – Gráfico demonstrando variação do Peso Corporal em 12 Semanas nos Grupos Controle e OVX expresso em média $\pm$ desvio padrão.	94
Figura 37 – Áreas de interesse marcadas nas radiografias para medição óssea coluna (a)- 4 primeiras vértebras lombares e fêmur direito (b)- terço distal do fêmur direito proximal à da articulação do joelho.	95
Figura 38 – Imagens das ratas de número 1 dos grupos OVX12 e CONTROLE pré- operatório e 12 semanas de seguimento.	96
Figura 39 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias da Coluna nos Grupos OVX vs Controle ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão.....	96
Figura 40 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias do Fêmur nos Grupos OVX vs Controle ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão.....	97
Figura 41 – Imagens de microscopia ampliação 10x mostrando comparativo imagens da coluna e fêmur dos grupos OVX12 e CONTROLE.....	98
Figura 42 – Gráfico da variação da razão entre Volume Ósseo e Total de tecido (BV/TV) na coluna dos grupos OVX12 e CONTROLE.	99
Figura 43 – Gráfico da variação da razão entre Volume Ósseo e Total de Tecido (BV/TV) no fêmur dos grupos OVX12 e CONTROLE.	100
Figura 44 – Gráfico demonstrando variação do Peso Corporal em 12 Semanas nos diferentes grupos expresso em média $\pm$ desvio padrão.	102

Figura 45 – Gráfico de linhas representando a média ajustada dos grupos para a variável peso dos ratos ao longo de 12 semanas, considerando o peso pré-teste como covariável = 197,18g.	103
Figura 46 – Radiografia evidenciando o primeiro animal de cada grupo experimental: CONTROLE, OVX12, OVXR12, OVXE, OVXRE, SHAME, SHAMR e SHAMRE	107
Figura 47 – Gráfico de linhas representando a média ajustada dos grupos para a variável Radiografia da Coluna dos ratos ao longo de 12 semanas, considerando a radiografia da coluna pré-teste como covariável = 2,537.	109
Figura 48 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias da Coluna nos diferentes grupos ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão.	110
Figura 49 – Gráfico de linhas representando a média ajustada dos grupos para a variável Radiografias do Fêmur dos ratos ao longo de 12 semanas, considerando as radiografias da coluna pré-teste como covariável = 1,958.	112
Figura 50 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias do Fêmur nos diferentes grupos ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão	113
Figura 51 – Imagem histológica do osso aumento 10X: osso com estrutura mantida (a) e osso com osteoporose instalada (b)- trabéculas mais finas, diminuição da quantidade de trabéculas visualizadas, aumento do espaço entre as trabéculas, conectividade reduzidas e degeneração gordurosa intensa.....	114
Figura 52 – Imagens de microscopia histológica em ampliação de 10x da coluna evidenciando o primeiro animal de cada grupo experimental: CONTROLE, OVX12, OVXR12, OVXE, OVXRE, SHAME, SHAMR e SHAMRE.	115
Figura 53 – Imagens de microscopia histológica em ampliação de 10x do fêmur evidenciando o primeiro animal de cada grupo experimental: CONTROLE, OVX12, OVXR12, OVXE, OVXRE, SHAME, SHAMR e SHAMRE.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo Risedronato de acordo com o peso dos animais.....	69
Tabela 2 – Treinamento exercícios	71
Tabela 3 – Escada de alumínio	73
Tabela 4 – Características Histológicas	84
Tabela 5 – Categorização da concordância do coeficiente de correlação intraclassa	84
Tabela 6 – Média do Peso de Ratos em gramas dos grupos CONTROLE e OVX12 ao longo de 12 semanas.....	92
Tabela 7 – Valores do cálcio, fósforo e fosfatase alcalina nos grupos CONTROLE vs OVX expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	95
Tabela 8 – Histologia Coluna Fiji ImageJ- Indicadores Histológicos da Coluna de ratos CONTROLE e OVX12 expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	99
Tabela 9 – Histologia do Fêmur Fiji ImageJ- Indicadores Histológicos do Fêmur de ratos CONTROLE e OVX12 expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	100
Tabela 10 – Média do Peso de ratos em gramas ao longo de 12 semanas comparando diferentes grupos experimentais expresso em média $\pm$ desvio-padrão	104
Tabela 11 – Valores do cálcio, fósforo e FA nos diferentes grupos expressos em média $\pm$ desvio-padrão.	105
Tabela 12 – Radiografias das colunas das ratas expressos em média $\pm$ desvio-padrão em milímetros de alumínio (mmAl) ao longo de 12 semanas de seguimento.	108
Tabela 13 – Radiografias dos fêmures das ratas expressos em média $\pm$ desvio-padrão em milímetros de alumínio (mmAl) ao longo de 12 semanas de seguimento.	111
Tabela 14 – Histologia Coluna Fiji ImageJ – Média $\pm$ Desvio-padrão de indicadores histológicos da coluna vertebral de ratos submetidos a diferentes tratamentos.....	117

Tabela 15 – Histologia Fêmur Fiji ImageJ Média $\pm$ Desvio-padrão de indicadores histológicos do fêmur de ratos submetidos a diferentes tratamentos. ...	121
Tabela 16 – Coeficiente de correlação intraclass (CCI) aleatório de duas vias e intervalo de confiança de 95% (IC95%) da concordância absoluta interobservador (n = 2) das classificações histológicas por região.	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetros
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AF	Atividade física
Al	Alumínio
ANCOVA	Análise de covariância
ANOVA	Análise de variância
BF	Bifosfonato
BFs	Bifosfonatos
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
BT	Estrutura trabecular óssea
BV	Volume ósseo total
BV/TV	Volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido
C	Controle
Ca	Cálcio
CBR	Centro da Biologia da Reprodução
CCI	Coeficiente de correlação intraclass
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Cm	Centímetros
CONTROLE	Grupo 12 – Controle (nenhuma intervenção)
DEXA	Absorciometria por dupla energia de raios X
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DMO	Densidade mineral óssea
DMV	Densidade mineral volumétrica
DR	Densitometria radiográfica
E	Exercícios físicos
EF	Exercícios físicos
ER α	Receptores de estrogênio alfa
ER β	Receptores de estrogênio beta
FA	Fosfatase alcalina
FDA	Food and Drug Administration
FPPS	Farnesil pirofosfato sintetase

GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
HE	Hematoxilina e eosina
HU-UFJF	Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora
IC	Intervalo de confiança
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IM	Via intramuscular
IV	Intravenosa
Kg	Quilograma
kV	Quilovoltagem
LHICB	Laboratório de histologia do Instituto de Ciências Biológicas
LIP-PPGCBio	LIP-ppgcbio - Laboratório Integrado de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
m	Metros
mA	Miliamperagem
mg	Miligramma
Min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MO	Microarquitetura óssea
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONM	Osteonecrose de mandíbula
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia
OVX12	Grupo 3 – Ovariectomia- 12 semanas
OVX4	Grupo 1 – Ovariectomia - 4 semanas
OVX8	Grupo 2 – Ovariectomia - 8 semanas
OVXE	Grupo 10- Ovariectomia + exercício
OVXR12	Grupo 6 - Ovariectomia + risedronato de sódio - 12 semanas
OVXR4	Grupo 4 - Ovariectomia + risedronato de sódio - 4 semanas
OVXR8	Grupo 5 - Ovariectomia + risedronato de sódio - 8 semanas
OVXRE	Grupo 11 - Ovariectomia + risedronato de sódio+ exercício

P	Fósforo sérico
p	Significância estatística
p.ex.	Por exemplo
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PIXImus	Densitometria portátil
PTH	Hormônio da Paratireóide
PVP-I	Polivinil-iodopovidona
R	Risedronato
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RDI	Região de Interesse
ROI	Regiões de interesse
RR	Risco relativo
RX	Radiografia
s	Segundo
Sc	Via subcutânea
SHAM	Cirurgia simulada
SHAME	Grupo 7 - Sham + exercício
SHAMR	Grupo 8 - Sham + risedronato de sódio
SHAMRE	Grupo 9 - Sham + risedronato de sódio + exercício
Tb. Sp	Espaçamento trabecular
Tb. Th	Espessura trabecular
TCQ	Tomografia computadorizada quantitativa
TE	Tamanho do efeito
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
TO	Tecido ósseo
TV	Volume total de tecido
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
vs	Versus
η^{2p}	Eta ao quadrado parcial

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
-	Intervalo
~	Aproximadamente
%	Porcentagem
>>	Prosseguir ou Selecionar a próxima ferramenta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 LACUNA DO CONHECIMENTO	31
1.2 CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO PARA OS AVANÇOS TERAPÊUTICOS.....	32
2 REVISÃO DA LITERATURA	34
2.1 FISIOPATOLOGIA DA OSTEOPOROSE.....	34
2.1.1 Ação das Citocinas Pró-Inflamatórias	36
2.1.2 Alteração na Relação OPG/RANKL.....	37
2.1.3 Impacto na Microarquitetura Óssea.....	37
2.1.4 A função do Estrogênio na Regulação Óssea	37
2.1.5 Efeitos no Osteoblasto	38
2.1.6 Efeitos no Osteoclasto.....	38
2.1.7 Efeitos no Osteócito.....	38
2.2 MODELO EXPERIMENTAL: RATAS OVARIECTOMIZADAS	38
2.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E PROCEDIMENTOS	39
2.3.1 Seleção dos Animais.....	39
2.3.2 Cirurgia: Ovariectomia.....	39
2.3.3 Grupo Controle.....	40
2.4 ALTERAÇÕES ÓSSEAS INDUZIDAS PELA OVARIECTOMIA.....	40
2.4.1 Perda da Massa Óssea.....	40
2.4.2 Alterações Microestruturais	40
2.4.3 Impacto na Qualidade Óssea	41
2.5 AVALIAÇÕES E APLICAÇÃO DO MODELO OVX	41
2.5.1 Densitometria Óssea.....	41
2.5.2 Densitometria Radiográfica.....	41
2.5.3 Histomorfometria.....	41
2.5.4 Marcadores Bioquímicos.....	41
2.5.5 Estudos das Terapias Farmacológicas	42
2.5.6 Intervenções Não Farmacológicas	42
2.5.7 Estudos Mecanísticos.....	42
2.6 MEDICAÇÕES ANTIRREABSORTIVAS.....	42
2.6.1 Bisfosfonatos: Mecanismo de Ação	42
2.6.2 Alendronato	43

2.6.2.1 Farmacocinética e Farmacodinâmica.....	43
2.6.2.2 Eficácia Clínica.....	44
2.6.2.3 Uso em Modelos Experimentais.....	44
2.6.2.4 Efeitos Colaterais	44
2.6.3 Risedronato	45
2.6.3.1 Farmacocinética e Farmacodinâmica.....	45
2.6.3.1.1 Afinidade pela Matriz Óssea.....	45
2.6.3.1.2 Mecanismo Molecular Principal.....	46
2.6.3.1.3 Indução de Apoptose.....	46
2.6.3.2 Efeitos Diretos e Indiretos no Processo de Remodelação Óssea	47
2.6.3.3 Eficácia Clínica.....	47
2.6.3.4 Uso em Modelos Experimentais.....	47
2.6.3.5 Efeitos Colaterais	48
2.6.3.6 Relevância Clínica e Experimental	48
2.7 EXERCÍCIOS FÍSICOS E SAÚDE ÓSSEA	49
2.7.1 Mecanismos Biomecânicos de Ação.....	50
2.7.1.1 Mecanotransdução	50
2.7.1.1.1 Detecção do Estímulo Mecânico	50
2.7.1.1.2 Ativação de Vias de Sinalização	51
2.7.1.2 Efeitos na Atividade Celular	51
2.7.1.2.1 Osteócitos	51
2.7.1.2.2 Osteoblastos	51
2.7.1.2.3 Células-Tronco Mesenquimais	52
2.7.1.3 Inibição da Reabsorção Óssea	52
2.7.1.4 Efeitos da Atividades Física na Qualidade Óssea	52
2.7.1.5. Benefícios Específicos dos Exercícios Biomecânicos	53
2.7.1.6 Tipos de Exercícios e seus Benefícios Biomecânicos.....	53
2.7.1.6.1 Exercícios de Impacto	53
2.7.1.6.2 Exercícios de Resistência	54
2.7.1.6.3 Exercícios Combinados.....	54
2.7.2 Evidências Científicas.....	55
2.7.2.1 Estudos em Humanos	55
2.7.2.2 Estudos em Modelos Animais	55
2.7.2.3 Considerações sobre Segurança	56

2.8 EFEITOS SINÉRGICOS DE TERAPIAS COMBINADAS	56
2.8.1 Mecanismos de Ação Sinérgica	56
2.8.2 Estudos em Humanos	57
2.8.3 Estudos em Ratas Ovariectomizadas	57
2.8.4 Mecanismos Moleculares Envolvidos	58
2.8.5 Aplicações Clínicas	58
3 OBJETIVOS	60
3.1 OBJETIVO GERAL	60
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
4 MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1 COMITÊ DE ÉTICA	61
4.2 DESENHO DO ESTUDO	61
4.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA	61
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	61
4.5 DIVISÃO DOS GRUPOS	62
4.6 PROCEDIMENTOS	63
4.6.1 Indução do modelo osteoporótico	63
4.6.2 Sala de cirurgia	63
4.6.3 Anestesia geral	63
4.6.4 Procedimentos pré-cirúrgicos	64
4.6.5 Ovariectomia	64
4.6.6 Cuidados pós-operatórios	68
4.6.7 Administração do Risedronato	68
4.6.8 Protocolo: Atividade Física	70
4.6.9 Densitometria Radiográfica	71
4.6.10 Acompanhamento da evolução ponderal	79
4.6.11 Acondicionamento dos Animais	80
4.7 REMOÇÃO DOS TECIDOS	80
4.8 PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	81
4.9 ANÁLISE HISTOLOGISTAS	84
4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA FIJI IMAGEJ	85
4.10.1 Protocolo Fiji ImageJ na histologia	85
4.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES ÓSSEOS	89
4.11.2 Amostra do sangue	89

4.12 TIPOS DE MEDIDAS DE RESULTADO.....	90
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
5 RESULTADOS.....	92
5.1 MODELO DE OSTEOPOROSE POR OVARECTOMIA (OVX)	92
5.1.1 Peso Corporal.....	92
5.1.2 Parâmetros de Marcadores Ósseos	94
5.1.3 Imagens Radiográficas	95
5.1.4 Parâmetros Histológicos	97
5.2 RESULTADOS COMPARATIVOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	100
5.2.1 Peso Corporal.....	101
5.2.2 Parâmetros dos Marcadores Ósseos	104
5.2.3 Imagens Radiográficas	106
5.2.4 Parâmetros Histológicos	113
5.2.4.1 Coluna.....	114
5.2.4.2 Fêmur.....	118
6 DISCUSSÃO	123
6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL.....	126
6.1.1 Escolha da idade apropriada do rato no momento da OVX	127
6.1.2 Seleção do método cirúrgico e verificação do sucesso da OVX	128
6.1.3 Seleção de locais ósseos	129
6.1.4 Tempo necessário para verificação da Osteoporose induzida por OVX.....	129
6.1.5 Marcadores de remodelação óssea.....	129
6.1.6 Densitometria Radiográfica.....	130
6.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS	131
6.2.1 Análise do Peso Corporal.....	131
6.2.2 Análise de Parâmetros de Marcadores Ósseos.....	135
6.2.3 Análise de Imagens Radiográficas	137
6.2.4 Análise de Parâmetros Histológicos	138
7 CONCLUSÃO	143
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	144
8.1 CENÁRIOS PROSPECTIVOS	144
8.2 SUGESTÕES PARA NOVOS ESTUDOS	145
9 REFERÊNCIAS.....	146

10 ANEXOS	159
10.1 ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.	159
11 APÊNDICES	160
11.1 APÊNDICE 1 - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA ATRAVÉS DA OBSERVAÇÃO DAS LÂMINAS PELOS HISTOPATOLOGISTAS	160

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença metabólica sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e degradação da microestrutura óssea, resultando em aumento da fragilidade do osso e acréscimo no risco de fraturas (Rajasekaran et al., 2017; Kanis et al., 2019). A diminuição da resistência óssea está relacionada a muitos fatores além da densidade mineral óssea (DMO), incluindo taxas de formação e reabsorção óssea (turnover), geometria (tamanho e formato do osso) e microarquitetura do tecido esquelético (Svedbom et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como limites diagnósticos para a osteoporose a diminuição da massa óssea utilizando medições de DMO em adultos jovens (T-score) servindo como grupo base para comparação (Cosman et al., 2014). A doença é mais comum em idosos, especialmente nas mulheres na pós-menopausa (Rachner; Khosla; Hofbauer, 2011), como consequência da redução nos níveis de estrogênio, um hormônio fundamental para o equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção, observando-se uma alteração significativa na dinâmica do metabolismo ósseo (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). A maioria das mulheres na pós-menopausa com osteoporose tem perda óssea relacionada à deficiência de estrogênio e/ou relacionado à idade (Cosman et al., 2014). O diagnóstico precoce e a quantificação da perda do tecido ósseo e do risco de fratura são importantes devido à disponibilidade de terapias que podem retardar ou até mesmo reverter a progressão da osteoporose (Cosman et al., 2014). Diversas complicações foram identificadas e ameaçam seriamente a vida e a saúde das pessoas, sendo a fratura osteoporótica a complicação mais grave decorrente da osteoporose (Leboff et al., 2022). Fraturas osteoporóticas podem ocorrer após trauma mínimo ou, em alguns casos, sem trauma (Cosman et al., 2014) .

Estima-se que esta condição afete aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo o mundo (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Nos Estados Unidos a osteoporose afeta cerca de 9,9 milhões de pessoas e 43,1 milhões têm baixa DMO com maior probabilidade de fraturas (Rajasekaran et al., 2017). Acredita-se que maioria dos pacientes que sofrem fraturas por fragilidade nos Estados Unidos e na Europa, não recebeu terapia para osteoporose, apesar dos dados demonstrarem que a farmacoterapia reduz o risco de uma segunda fratura (Malacon et al., 2023).

O tratamento da fratura osteoporótica é baseado na inibição da reabsorção óssea, promovendo formação e regulação dos níveis de cálcio e de fósforo no sangue

para melhorar os sintomas como a dor (Cosman et al., 2014; Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Drogas comumente usadas são cálcio, bisfosfonatos, calcitonina, hormônio da paratireóide (PTH), anticorpos monoclonais e assim por diante (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Quando agentes antirreabsortivos falham em restaurar adequadamente a massa e a qualidade óssea, utiliza-se, nesses casos, medicações formadoras ósseas como injeções diárias de PTH ou anticorpos monoclonais como as injeções de denosumabe e romosozumabe que podem aumentar a massa óssea ao estimular a sua formação (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). No entanto, níveis de PTH cronicamente elevados podem causar reabsorção óssea excedendo a formação, resultando em efeitos catabólicos e levando à osteoporose (Wojda; Donahue 2018). Além disso, o uso dessas medicações também aumenta o risco de desenvolvimento de osteossarcomas (Wojda; Donahue 2018). Portanto, as opções de tratamento para promover a regeneração óssea e reverter a perda são atualmente limitadas. Ademais, os tratamentos farmacológicos disponíveis, embora eficazes, possuem limitações como baixa adesão, efeitos adversos e eficácia variável em diferentes populações (Cummings et al., 2009). Essas lacunas terapêuticas indicam a necessidade de explorar intervenções complementares para melhorar os resultados no manejo da osteoporose.

Exercícios físicos de baixo impacto com carga são recomendados para estimular a ação osteoblástica, contribuindo para prevenir a perda acentuada de massa óssea em estágios iniciais e, em casos em que a doença já está presente, reduzindo os efeitos da degradação do tecido ósseo (Nikander et al., 2010). Os exercícios são um dos principais métodos não-farmacológicos adjuvantes que aumentam e mantêm a DMO e a microarquitetura do tecido ósseo (TO), além de contribuir para evitar quedas e fraturas (Helge et al., 2010), promovendo o fortalecimento muscular e a melhora do equilíbrio (Nikander et al., 2010). Outra abordagem bastante consagrada é o tratamento cirúrgico da fratura osteoporótica associado ao tratamento medicamentoso, essa abordagem depende da gravidade da osteoporose, do local acometido e afeta de sobremaneira o prognóstico das fraturas (Cosman et al., 2014). Além disso, o tratamento perioperatório das fraturas osteoporóticas requer atenção para evitar a ocorrência de novas fraturas (Compston; Mcclung; Leslie, 2019).

Modelos animais com osteoporose são ferramentas adequadas para estudar novas formas de prevenção e modalidades de tratamento (Jee, 2001). A primeira

escolha, e a mais comumente empregada para tais estudos, é o modelo de rato ovariectomizado (Turner; Robling, 2003). A ovariectomia (OVX) resulta na diminuição do nível de estrogênio produzido pelos ovários, eventualmente levando a osteoporose (Mathavan et al., 2015). A OVX induz menopausa cirúrgica nos animais e essa consequente perda óssea pós-menopausa tem muitas características semelhantes com a doença que se desenvolve nos humanos (Fallahnezhad et al., 2018), incluindo uma rápida diminuição da massa de tecido trabecular e um aumento da reabsorção óssea. Essas amplas semelhanças fazem modelos animais ovariectomizados serem usados como modelos clinicamente relevantes de pós-menopausa em mulheres (Chen et al., 2016). O modelo de rato submetido a OVX foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos como um protótipo pré-clínico amplamente utilizado em estudos científicos (Johnston; Ward, 2015) e adequado para examinar o mecanismo da osteoporose (Xu et al., 2016a).

Como a osteoporose geralmente resulta na desarmonia entre a reabsorção e a regeneração óssea causada por deficiência de estrogênio ou envelhecimento, certos efeitos de agentes farmacológicos, como os que promovem a formação óssea (hormônio da paratireóide e anticorpos monoclonais) e os que inibem a reabsorção dos osteoclastos (bifosfonatos), são amplamente utilizados no tratamento dessa doença (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). No entanto, com a disseminação clínica do uso dessas drogas, efeitos colaterais adversos também foram observados, por exemplo (p. ex.) a osteonecrose da mandíbula relacionada a esses medicamentos (Wojda; Donahue 2018). Portanto, a busca por novos tratamentos para essa doença é uma estratégia de grande importância clínica.

Outra abordagem que também merece atenção é relacionada a exercícios físicos na melhoria da qualidade e quantidade óssea (Ireland; Rittweger, 2017). A prática de atividade física tem sido proposta como profilaxia e tratamento contra a osteoporose, devido a carga mecânica produzida no osso por meio do exercício físico, atuando como um fator essencial na regulação da atividade das células ósseas (Hart et al., 2017). Por outro lado, alguns estudos mostram apenas pequenos a moderados aumentos (de 1-8%) na massa óssea como resultado de ensaios de atividades físicas nas crianças (Ireland; Rittweger, 2017). Os efeitos em adultos são também menores, mesmo nos ensaios de longo prazo mais bem-sucedidos em adultos mais velhos, os aumentos de massa óssea são modestos (em torno de 1-3%) (Ireland; Rittweger, 2017). Isso é distinto do papel do exercício na redução da incidência de quedas,

quedas e osteoporose são fatores de risco independentes para fratura (Ireland; Rittweger, 2017). Os exercícios recomendados na literatura são aqueles capazes de estimular a unidade de remodelação do tecido ósseo, como caminhada, corrida, saltos, natação e exercícios resistidos (Hart et al., 2017). Pesquisas anteriores têm investigado o impacto do treinamento resistido na DMO e há resultados mostrando o aumento na mineralização deste tecido, bem como a atenuação na desmineralização óssea (Xu et al., 2016b).

A combinação de terapias farmacológicas e exercícios físicos tem emergido como uma estratégia promissora para o manejo da osteoporose (Xu et al., 2016b). Evidências sugerem que as intervenções combinadas podem ter efeitos sinérgicos, potencializando os benefícios individuais de cada abordagem (Wang et al., 2020). No entanto, a interação entre a biomecânica dos exercícios e os mecanismos moleculares das medicações antirreabsortivas ainda não está completamente elucidada, especialmente em modelos experimentais (Wang et al., 2020).

Este estudo é relevante porque busca elucidar se a combinação de medicações antirreabsortivas e exercícios físicos podem potencializar os benefícios para a saúde óssea, gerando dados que possam subsidiar o desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais eficientes. Além disso, os resultados podem ter implicações práticas no aprimoramento do bem-estar de pessoas com osteoporose ao integrar abordagens complementares no manejo da doença.

Neste contexto, a presente dissertação busca investigar por meio de análises da densidade óssea por imagem, dos marcadores bioquímicos de remodelação e da histomorfometria, colaborar com novas evidências sobre a eficácia dessas intervenções e sua aplicabilidade na prática clínica.

1.1 LACUNA DO CONHECIMENTO

Embora pesquisas anteriores tenham evidenciado os benefícios das medicações antirreabsortivas e dos exercícios físicos de forma isolada no tratamento, a interação entre essas intervenções ainda não está totalmente elucidada, especialmente em modelos experimentais. Muitos estudos utilizam animais com idade abaixo de 6 meses e, durante essa fase inicial de desenvolvimento, há um ganho ósseo importante e consequente perda acentuada ao se estabelecer um modelo ovariectomizado. Dessa forma, os estudos podem ter os resultados alterados pela

tenra idade resultando em perda óssea exuberante e, além disso, não simula o mecanismo natural de osteoporose no indivíduo adulto (Yousefzadeh et al., 2020). Dados sobre os mecanismos moleculares e biomecânicos que governam essa interação são limitados e há incertezas quanto ao potencial sinérgico das duas abordagens no tratamento da osteoporose.

Além de que, grande parte dos estudos realizados foram centrados em seres humanos ou utilizam avaliações de estudos experimentais com análises parciais sem uma abordagem integrada que inclua imagem óssea, análise histomorfométrica e avaliação de marcadores bioquímicos em um mesmo modelo animal. A ausência de dados robustos limita a formulação de protocolos terapêuticos combinados que podem ser mais eficazes na prevenção de fraturas e na melhoria da qualidade óssea.

1.2 CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO PARA OS AVANÇOS TERAPÊUTICOS

Este estudo busca preencher uma lacuna do conhecimento ao fornecer uma análise abrangente dos efeitos combinados das medicações antirreabsortivas e dos exercícios físicos em um modelo experimental de osteoporose. A partir de um protocolo detalhado que inclui diferentes abordagens terapêuticas, espera-se obter informações relevantes sobre:

- Eficácia das intervenções combinadas: Identificar se a combinação da medicação e dos exercícios oferece benefícios adicionais na recuperação da saúde óssea em comparação com as intervenções isoladas.
- Elucidação dos mecanismos subjacentes: Avançar no entendimento dos processos moleculares e biomecânicos que governam as interações sinérgicas entre agentes farmacológicos antirreabsortivos e a prática de exercícios físicos.
- Produção de evidências pré-clínicas: Gerar dados robustos em um modelo experimental amplamente validado, utilizando ratas ovariectomizadas, com potencial de tradução para aplicações terapêuticas em humanos.
- Aperfeiçoamento de protocolos terapêuticos: Contribuir para a prática clínica baseada em evidências científicas, desenvolvendo abordagens integrativas que maximizem os benefícios terapêuticos no tratamento da osteoporose.

A contribuição do estudo se dá ao fornecer uma base sólida para futuras investigações translacionais, além de apoiar o desenvolvimento de diretrizes que

combinem terapias farmacológicas e exercícios físicos visando proporcionar aumento da qualidade de vida nos pacientes com osteoporose.

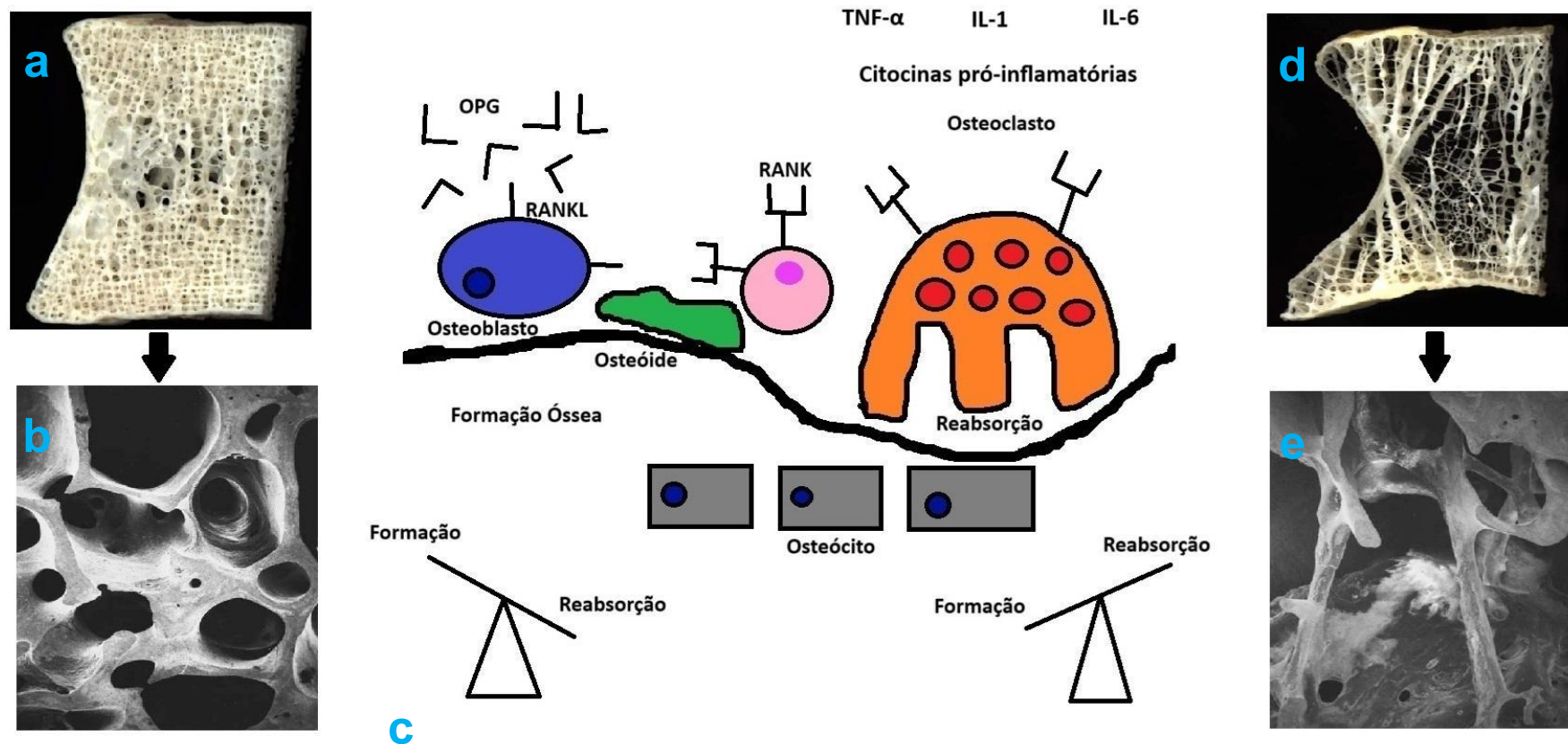
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FISIOPATOLOGIA DA OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma condição metabólica definida pela redução gradual da DMO e pela deterioração da microarquitetura óssea (MO), resultando em aumento da fragilidade do tecido ósseo e do risco de fraturas (Kanis et al., 2019). Essa condição afeta particularmente mulheres na pós-menopausa devido à redução abrupta nos níveis de estrogênio, um hormônio essencial para a manutenção da homeostase entre produção e reabsorção óssea (Compston; Mcclung; Leslie, 2019).

A renovação do tecido ósseo é uma atividade contínua e mutável em que o tecido ósseo antigo ou danificado é removido pelos osteoclastos e substituído por novo tecido formado pelos osteoblastos e osteócitos (Patel; Saxena 2025).

Figura 1 – Desenho esquemático do metabolismo ósseo e fotografias de ossos normais e osteoporóticos



Legenda: (a) - Imagem do osso trabecular de uma vértebra lombar normal*; (b) - Fotomicrografia de uma biópsia de osso trabecular normal#; (c) – Imagem esquemática da remodelação óssea regulada pelo papel dos Osteoblastos e dos Osteócitos (formadores de osso), dos Osteoclastos (reabsorvedores de osso) e das Citocinas inflamatórias; (d)- Imagem do osso trabecular de uma vértebra lombar osteoporótica*; (e)- Fotomicrografia de uma biópsia de osso trabecular osteoporótico#; RANK- receptor ativador do fator nuclear kappa-B; RANKL- ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B; OPG- Osteoprotegerina; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; IL-1- interleucina-1; IL-6- interleucina-6; * (Rajapakse et al., 2004); # (Manolagas; Jilka, 1995).

Esse equilíbrio é crítico para manter a resistência óssea e adaptar o esqueleto às demandas mecânicas do corpo (Johnson, 2008). Durante a menopausa, a deficiência de estrogênio resulta em um desequilíbrio entre a produção e reabsorção óssea, com superioridade da atividade osteoclástica, o que leva à perda óssea acelerada, principalmente no osso trabecular, que é metabolicamente mais ativo (Riggs; Khosla; Meltron, 2002).

A perda óssea pós-menopausa ocorre mais intensamente nos primeiros 5 a 10 anos após o início da mesma, período em que as mulheres podem perder até 20% da sua DMO (Manolagas, 2000). Isso se deve a uma série de alterações fisiológicas desencadeadas pela deficiência estrogênica, incluindo o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e a modulação negativa de fatores reguladores da atividade osteoclástica, como a osteoprotegerina (OPG) (Manolagas, 2000).

2.1.1 Ação das Citocinas Pró-Inflamatórias

O estrogênio tem propriedades anti-inflamatórias que suprimem a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Manolagas, 2000), interleucina-6 (IL-6) (Manolagas, 2000) e interleucina-1 (IL-1) (Boyle; Simonet; Lacey, 2003; Cai et al., 2024) que promovem um ambiente ósseo mais equilibrado (Manolagas, 2000). Essa ação é crucial para limitar a atividade osteoclástica e preservar a massa óssea (Manolagas, 2000; Compston, 2001; Boyle; Simonet; Lacey, 2003).

Essas citocinas promovem a diferenciação dos osteoclastos por meio da via do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), um dos principais reguladores da reabsorção óssea (Boyle; Simonet; Lacey, 2003; Cai et al., 2024). O aumento da atividade osteoclástica leva a uma remodelação óssea desequilibrada, na qual a taxa de reabsorção óssea supera a de formação, resultando na perda líquida de massa óssea (Boyle; Simonet; Lacey, 2003; Cai et al., 2024).

2.1.2 Alteração na Relação OPG/RANKL

A OPG é uma proteína secretada pelos osteoblastos que atua como um "receptor isca" (Correa 2019) para o RANKL, bloqueando sua interação com o receptor RANK nos osteoclastos e suas células precursoras (Boyle; Simonet; Lacey, 2003; Correa 2019; Cai et al., 2024). Durante a menopausa, a diminuição de estrogênio reduz a expressão de OPG e aumenta a de RANKL, favorecendo a ativação e a sobrevivência dos osteoclastos. Esse desajuste contribui para a reabsorção óssea acelerada observada na osteoporose pós-menopausa (Manolagas, 2000).

2.1.3 Impacto na Microarquitetura Óssea

O estrogênio contribui para a manutenção da microarquitetura óssea ao preservar a conectividade trabecular e reduzir a porosidade cortical (Riggs; Khosla; Meltron, 2002). A deficiência de estrogênio afeta tanto a qualidade quanto a densidade óssea (Riggs; Khosla; Meltron, 2002). Além disso, contribui para a redução da conectividade trabecular, aumento da porosidade do osso cortical e diminuição da espessura óssea, deixando o tecido mais sensível a fraturas, mesmo após traumas mínimos (Riggs; Khosla; Meltron, 2002). A deterioração da microarquitetura óssea é irreversível e contribui significativamente para a fragilidade do esqueleto nas mulheres pós-menopáusicas (Riggs; Khosla; Meltron, 2002).

2.1.4 A função do Estrogênio na Regulação Óssea

O estrogênio exerce uma função primordial na regulação do equilíbrio ósseo, exercendo efeitos reguladores em todas as células envolvidas no remodelamento ósseo, incluindo osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Riggs; Khosla; Meltron, 2002). Seus efeitos são mediados por receptores de estrogênio ($ER\alpha$ e $ER\beta$) expressos nessas células, que modulam a expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo (Manolagas, 2000; Compston, 2001).

2.1.5 Efeitos no Osteoblasto

O estrogênio promove o aumento da atividade dos osteoblastos, favorecendo a formação óssea e a síntese da matriz extracelular, particularmente colágeno tipo I, que é o principal componente orgânico do osso (Manolagas, 2000; Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Além disso, ele regula positivamente a expressão de fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são essenciais para a diferenciação dos osteoblastos (Compston; Mcclung; Leslie, 2019).

2.1.6 Efeitos no Osteoclasto

O estrogênio exerce efeitos inibitórios diretos e indiretos nos osteoclastos (Compston, 2001). Diretamente, ele reduz a expressão de genes envolvidos na diferenciação e atividade osteoclástica (Manolagas, 2000; Compston, 2001). Indiretamente, o estrogênio aumenta a relação OPG/RANKL, reduzindo a ativação dos osteoclastos e promovendo a apoptose, o que resulta em menor reabsorção óssea (Manolagas, 2000; Compston, 2001; Boyle; Simonet; Lacey, 2003).

2.1.7 Efeitos no Osteócito

Os osteócitos, que são os sensores mecânicos do osso, também são regulados pelo estrogênio (Manolagas, 2000; Compston, 2001). Esse hormônio preserva a viabilidade dos osteócitos e reduz a produção de esclerostina, uma proteína que inibe a atividade osteoblástica (Manolagas, 2000; Compston, 2001). Assim, o estrogênio favorece a formação óssea e reduz a reabsorção óssea mediada por osteócitos (Manolagas, 2000).

2.2 MODELO EXPERIMENTAL: RATAS OVARIETOMIZADAS

O modelo OVX é amplamente reconhecido por sua capacidade de reproduzir a perda óssea acelerada que ocorre em mulheres após a menopausa (Mathavan et al., 2015). A ovariectomia causa uma redução nos níveis de estrogênio, levando a um aumento na reabsorção óssea mediada por osteoclastos e a uma diminuição na

formação óssea, alterações que refletem a fisiopatologia da osteoporose pós-menopausa (Manolagas, 2000).

O modelo OVX, conforme descrito por Boyle, Simonet e Lacey (2003), apresenta diversas vantagens que o tornam amplamente utilizado em estudos sobre alterações ósseas (Boyle; Simonet; Lacey, 2003). Primeiramente, destaca-se pela alta reprodutibilidade, uma vez que a ovariectomia induz alterações ósseas de maneira consistente e previsível (Boyle; Simonet; Lacey, 2003). Além disso, seus efeitos são observados rapidamente com perda óssea detectável em questão de semanas, o que possibilita a realização de estudos de curta duração (Boyle; Simonet; Lacey, 2003). Outra vantagem significativa é a semelhança das alterações hormonais e ósseas induzidas pelo modelo com aquelas observadas em mulheres na pós-menopausa, tornando-o altamente relevante para estudos relacionados à menopausa humana (Boyle; Simonet; Lacey, 2003). Por fim, o modelo oferece excelente controle experimental, permitindo a comparação entre grupos tratados e não tratados sob condições rigorosamente controladas, o que amplia sua aplicabilidade em pesquisas científicas (Boyle; Simonet; Lacey, 2003).

2.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E PROCEDIMENTOS

2.3.1 Seleção dos Animais

Ratas Wistar ou Sprague-Dawley são comumente utilizadas devido ao seu tamanho, robustez e ciclo reprodutivo bem definido (Yousefzadeh et al., 2020). Animais adultos (geralmente de 3-6 meses de idade) são geralmente escolhidos, pois já possuem um esqueleto totalmente desenvolvido, facilitando a avaliação das alterações osteoporóticas (Turner; Robling, 2003).

2.3.2 Cirurgia de Ovariectomia

A ovariectomia é realizada sob anestesia geral para minimizar o desconforto animal (Karim et al., 2022). O procedimento envolve:

1. Incisão dorsal ou ventral: A escolha depende da preferência do pesquisador e do protocolo institucional (Yousefzadeh et al., 2020).

2. Ligadura dos ovários: Os ovários são removidos para interromper a produção de estrogênio (Yousefzadeh et al., 2020; Rowe et al., 2023).
3. Sutura e recuperação: Após a cirurgia, os animais recebem analgesia e são monitorados durante o período de recuperação (Yousefzadeh et al., 2020; Rowe et al., 2023).

2.3.3 Grupo Controle

Um grupo de ratas submetidas a cirurgia simulada (SHAM) é essencial para comparação (Wartolowska et al., 2014). Neste grupo, os ovários são expostos, mas não são removidos (submetidas ao mesmo estresse cirúrgico aplicado ao grupo OVX), garantindo que as alterações observadas nos grupos OVX sejam devido à deficiência estrogênica (Mathavan et al., 2015).

2.4 ALTERAÇÕES ÓSSEAS INDUZIDAS PELA OVARIECTOMIA

2.4.1 Perda da Massa Óssea

Após a ovariectomia, ocorre uma perda acelerada da massa óssea, especialmente no osso trabecular, devido ao aumento da atividade osteoclástica (Manolagas, 2000). Essa perda pode ser mensurada por absorciometria por dupla energia de raios X (DEXA), densitometria radiográfica (DR), histomorfometria e parâmetros laboratoriais (Riggs; Khosla; Meltron, 2002).

2.4.2 Alterações Microestruturais

O osso trabecular apresenta diminuição da conectividade, aumento da porosidade e redução da espessura trabecular (Boyle; Simonet; Lacey, 2003). Essas alterações são semelhantes às observadas em mulheres com osteoporose na pós-menopausa (Boyle; Simonet; Lacey, 2003).

2.4.3 Impacto na Qualidade Óssea

Além da perda de densidade, a ovariectomia afeta a qualidade óssea, incluindo alterações na mineralização, composição colágena e resistência mecânica (Manolagas, 2000). Essas mudanças contribuem para o aumento da fragilidade óssea (Manolagas, 2000).

2.5 AVALIAÇÕES E APLICAÇÃO DO MODELO OVX

2.5.1 Densitometria Óssea

A densitometria por absorciometria de raios-X de dupla energia (DEXA) é amplamente reconhecida como um método de referência para a avaliação da DMO nos ossos longos e na coluna vertebral das ratas (Turner; Robling, 2003).

2.5.2 Densitometria Radiográfica

A densitometria radiográfica (DR) é uma alternativa mais barata a DEXA nos ossos longos e na coluna vertebral das ratas em locais de poucos recursos (Louzada et al., 1998; Antonietto, 2010).

2.5.3 Histomorfometria

A análise histomorfométrica permite estudar a microarquitetura óssea, incluindo parâmetros como espessura trabecular, conectividade e número de trabéculas (Boyle; Simonet; Lacey, 2003).

2.5.4 Marcadores Bioquímicos

A avaliação de marcadores séricos, como a fosfatase alcalina óssea (indicativa de formação óssea) e os níveis de cálcio e fósforo (associados à reabsorção óssea), fornece informações detalhadas e relevantes sobre o processo de remodelação óssea (Hlaing; Compston, 2014).

2.5.5 Estudos de Terapias Farmacológicas

O modelo OVX é amplamente utilizado para testar a eficácia de medicações antirreabsortivas, como bisfosfonatos, e anabólicas, como teriparatida, denosumabe e romosozumabe (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Ele permite avaliar os efeitos dessas terapias na densidade, microarquitetura e resistência óssea (Black et al., 1996).

2.5.6 Intervenções Não Farmacológicas

O impacto de intervenções como exercícios físicos e dietas enriquecidas em cálcio e vitamina D também é avaliado no modelo OVX (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Essas abordagens complementares são fundamentais para o manejo integrado da osteoporose (Turner, 2001; Turner; Robling, 2003).

2.5.7 Estudos Mecanísticos

O modelo OVX possibilita a investigação dos mecanismos moleculares e celulares implicados na osteólise associado a deficiência de estrogênio, contribuindo para a compreensão da fisiopatologia da osteoporose (Manolagas, 2000).

2.6 MEDICAÇÕES ANTIRREABSORTIVAS

As medicações antirreabsortivas são amplamente utilizadas no manejo da osteoporose devido à sua capacidade de reduzir a atividade osteoclástica, favorecendo a manutenção da DMO e diminuindo a probabilidade de ocorrência de fratura. Entre essas medicações, destacam-se os bisfosfonatos (BFs), como o alendronato e o risedronato, que têm eficácia comprovada em estudos clínicos e experimentais (Cummings et al., 2009).

2.6.1 Bisfosfonatos: Mecanismo de Ação

Os bisfosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato inorgânico que se ligam à hidroxiapatita no osso, acumulando-se nas áreas de maior remodelação óssea

(Reszka; Rodan, 2003; Mendes, 2017). Os bifosfonatos podem ser ministrados via oral ou por via intravenosa (IV) (Mendes, 2017). Na formulação oral, eles são absorvidos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Mendes, 2017). BFs são excretados no rim por filtração glomerular, dessa forma, a função renal exerce um papel importante na prescrição desse fármaco (Mendes, 2017). Eles exercem seu efeito antirreabsortivo inibindo a atividade dos osteoclastos de forma indireta, por meio de dois mecanismos principais:

1. Interferência no metabolismo osteoclástico

O alendronato e o risedronato pertencem à classe dos bisfosfonatos nitrogenados, que inibem a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS) na via do mevalonato (Reszka; Rodan, 2003; Mendes, 2017). Isso resulta na inibição da prenilação de proteínas essenciais para a função e sobrevivência dos osteoclastos, levando à sua apoptose (Reszka; Rodan, 2003).

2. Redução da reabsorção óssea

Com a inibição dos osteoclastos, a taxa de reabsorção óssea diminui, permitindo que os osteoblastos depositem nova matriz óssea e aumentem a DMO (Reszka; Rodan, 2003; Arantes; Silva; Lazaretti-Castro, 2010).

2.6.2 Alendronato

2.6.2.1 Farmacocinética e Farmacodinâmica

O alendronato é um bisfosfonato nitrogenado que apresenta alta afinidade pela matriz óssea (Arantes; Silva; Lazaretti-Castro, 2010; Mendes, 2017). Após a administração oral, apenas uma pequena fração (cerca de 1%) é absorvida, sendo rapidamente distribuída para o osso ou excretada pelos rins (Arantes; Silva; Lazaretti-Castro, 2010; Mendes, 2017). Sua meia-vida no osso é prolongada, o que permite regimes de administração menos frequentes, como semanal ou até mensal (Arantes; Silva; Lazaretti-Castro, 2010).

2.6.2.2 Eficácia Clínica

Estudos clínicos, como os realizados por Black et al. (1996), demonstraram os efeitos benéficos do alendronato no tratamento da osteoporose. Entre os principais resultados, destaca-se o aumento significativo da DMO em regiões-chave, incluindo a coluna lombar, o fêmur proximal e o esqueleto total (Black et al., 1996). Além disso, o uso do alendronato foi associado a uma expressiva redução no risco de fraturas, com diminuição de até 50% nas fraturas vertebrais e 30% nas fraturas não vertebrais, após três anos de terapia contínua (Black et al., 1996). Esses dados reforçam a eficácia do alendronato como uma intervenção terapêutica para a melhoria da saúde óssea e a prevenção de complicações relacionadas à osteoporose (Black et al., 1996).

2.6.2.3 Uso em Modelos Experimentais

Pesquisas realizadas com ratas ovariectomizadas, conforme relatado por Romualdo et al. (2018), evidenciaram os efeitos positivos do alendronato na saúde óssea (Romualdo et al., 2018). Entre os resultados observados, destaca-se a preservação da microarquitetura óssea, um aspecto fundamental para a manutenção da integridade estrutural do esqueleto (Romualdo et al., 2018). Além disso, o alendronato mostrou ser eficaz na redução da reabsorção óssea, conforme indicado por marcadores bioquímicos específicos, corroborando seu papel como uma intervenção terapêutica relevante no manejo das alterações ósseas induzidas pela deficiência estrogênica (Romualdo et al., 2018).

2.6.2.4 Efeitos Colaterais

De acordo com Reszka e Rodan (2003), os principais efeitos adversos associados ao uso de medicamentos como o alendronato incluem distúrbios gastrointestinais, com destaque para a ocorrência de esofagite (Reszka; Rodan, 2003). Além disso, embora raros, foram reportados casos de osteonecrose da mandíbula e fraturas atípicas de fêmur, particularmente em pacientes submetidos a tratamentos prolongados (Reszka; Rodan, 2003). Esses eventos adversos ressaltam a importância de um monitoramento cuidadoso e individualizado durante o uso de

terapias de longa duração, visando minimizar os riscos associados ao tratamento (Reszka; Rodan, 2003).

2.6.3 Risedronato

2.6.3.1 Farmacocinética e Farmacodinâmica

O risedronato é um bisfosfonato (BF) de terceira geração amplamente empregado no manejo terapêutico de doenças ósseas de origem metabólica, como a osteoporose (Shimano, 2013; Cremers; Drake; Ebetino, 2019). Ele é caracterizado por alta potência antirreabsortiva, atuando por meio da ligação à hidroxiapatita óssea e inibição da reabsorção mediada por osteoclastos, preservando a função osteoblástica e a mineralização do tecido (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Sua formulação química, um derivado piridinil, permite uma afinidade elevada pelo tecido ósseo, contribuindo para sua eficácia clínica e reduzindo eventos adversos em relação a outros bisfosfonatos (Compston; Mcclung; Leslie, 2019). Comparado com BFs de primeira classe, tem uma potência 10 a 1000 vezes maior (Mendes, 2017).

Sua absorção oral é baixa (menor que 1%), mas o fármaco apresenta excelente distribuição e efeito prolongado no tecido ósseo (Arantes; Silva; Lazaretti-Castro, 2010; Mendes, 2017). Ele também inibe a FPPS, promovendo a apoptose dos osteoclastos e reduzindo a reabsorção (Crandall et al., 2014).

A absorção intestinal é pequena (<1 a 10%) e é inibida por cálcio ou outros íons bivalentes que capturam o bisfosfonato (Reszka; Rodan, 2003). Rapidamente são eliminados da circulação (meia-vida de 1 a 2 horas), e a ligação ao mineral ósseo é de 20 a 60%, o restante é eliminado pela urina (Reszka; Rodan, 2003). No tecido ósseo, os BFs se ligam aos cristais de hidroxiapatita, especialmente em locais com alta renovação óssea (Cremers; Drake; Ebetino, 2019). Eles se fixam fortemente nas frentes de calcificação nos osteóides e nos locais de reabsorção óssea, onde os minerais fosfato de cálcio estão expostos (Cremers; Drake; Ebetino, 2019).

2.6.3.1.1 Afinidade pela Matriz Óssea

O risedronato apresenta alta afinidade pela hidroxiapatita, o principal componente mineral do osso (Crandall et al., 2014). Essa característica confere ao

composto a capacidade de se concentrar de forma seletiva em regiões de remodelação óssea ativa, nas quais a atividade osteoclástica é predominante (Crandall et al., 2014). Na fase de reabsorção óssea, o risedronato é liberado da matriz e internalizado pelos osteoclastos, iniciando seus efeitos intracelulares (Crandall et al., 2014).

2.6.3.1.2 Mecanismo Molecular Principal

O risedronato atua inibindo a enzima FPPS na via do mevalonato, uma via metabólica crucial para a síntese de lipídios isoprenóides, como o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) e o farnesil pirofosfato (FPP) (Reszka; Rodan, 2003; Mendes, 2017). Esses compostos são essenciais para a prenilação de proteínas pequenas GTPases, como Rho, Rab e Rac, que regulam a função e a sobrevivência dos osteoclastos (Reszka; Rodan, 2003; Mendes, 2017; Cremers; Drake; Ebetino, 2019). Esse mecanismo compromete a capacidade dos osteoclastos de se aderir à matriz óssea e de realizar eficientemente o processo de reabsorção óssea (Reszka; Rodan, 2003; Mendes, 2017).

2.6.3.1.3 Indução de Apoptose

A inibição da enzima FPPS representa um mecanismo molecular crucial no comprometimento da funcionalidade dos osteoclastos (Reszka; Rodan, 2003). Tal inibição acarreta disfunções metabólicas que culminam na indução de apoptose celular, o que contribui significativamente para uma redução da capacidade de reabsorção óssea (Reszka; Rodan, 2003). O processo apoptótico observado é resultado direto da interrupção de vias de sinalização intracelulares mediadas por GTPases, que desempenham papel essencial na homeostase celular (Reszka; Rodan, 2003). Adicionalmente, o acúmulo de intermediários tóxicos do metabolismo isoprenóide intensifica a disfunção metabólica, comprometendo a viabilidade e a eficiência funcional dos osteoclastos (Reszka; Rodan, 2003).

2.6.3.2 Efeitos Diretos e Indiretos no Processo de Remodelação Óssea

O risedronato reduz a atividade osteoclástica de forma significativa, promovendo um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Reszka; Rodan, 2003). Isso preserva a microarquitetura óssea, contribuindo para a resistência mecânica do esqueleto (Reszka; Rodan, 2003). Outra função é realizada através dos efeitos indiretos nos osteoblastos, criando um ambiente favorável para a atividade osteoblástica, permitindo maior deposição de matriz óssea (Reszka; Rodan, 2003). Além disso estudos demonstram que o risedronato preserva a conectividade trabecular e reduz a porosidade cortical, melhorando a qualidade do osso além da densidade (Crandall et al., 2014).

2.6.3.3 Eficácia Clínica

Evidências científicas demonstram que seu uso está associado a um aumento significativo na DMO com incrementos de 5% a 7% na região da coluna lombar e de 2% a 3% no quadril após três anos de tratamento, conforme reportado por Harris et al. (1999). Além disso, estudos conduzidos por Reginster et al. (2000) evidenciam sua capacidade de reduzir o risco de fraturas, incluindo uma diminuição de até 41% em fraturas vertebrais e 30% em fraturas de quadril, mesmo em populações consideradas de alto risco (Reginster et al., 2000).

2.6.3.4 Uso em Modelos Experimentais

Estudos realizados em ratas ovariectomizadas têm demonstrado a eficácia do risedronato na proteção da qualidade óssea, conforme evidenciado por Romualdo et al. (2018). Os resultados indicam efeitos protetores significativos na manutenção da microarquitetura trabecular, um aspecto fundamental para a integridade estrutural do osso (Romualdo et al., 2018). Além disso, o medicamento foi associado à redução de marcadores bioquímicos de reabsorção óssea, reforçando sua ação benéfica no controle das alterações metabólicas ósseas induzidas pela deficiência estrogênica (Romualdo et al., 2018).

2.6.3.5 Efeitos Colaterais

Os efeitos adversos associados ao uso do risedronato apresentam características semelhantes aos observados com o alendronato, conforme descrito por Reszka e Rodan (2003). Entre os efeitos mais comuns, destacam-se sintomas gastrointestinais leves (Reszka; Rodan, 2003), sintomas semelhantes a resfriado comum e mialgia (Reid 2011), que geralmente são bem tolerados pelos pacientes (Reszka; Rodan, 2003). No entanto, também foram relatados, embora raramente, casos de osteonecrose da mandíbula (ONM) (Khan et al., 2015), o risco de aproximadamente 1 em 10.000 a 1 em 100.000 pacientes/ano, e a ocorrência de fraturas atípicas (1,74 fraturas por 10.000 pacientes/ano) (Black et al., 2020) principalmente em tratamentos prolongados.

2.6.3.6 Relevância Clínica e Experimental

Os bisfosfonatos, incluindo o alendronato e o risedronato, têm sido pilares no manejo da osteoporose, tanto em estudos clínicos quanto experimentais (Romualdo et al., 2018). Em modelos animais, esses fármacos não apenas ajudam a compreender os mecanismos envolvidos na reabsorção óssea, mas também são essenciais para avaliar a interação com outras intervenções, como exercícios físicos (Cummings et al., 2009).

A eficácia desses medicamentos na prevenção de fraturas os torna uma escolha terapêutica preferida em pacientes com osteoporose pós-menopausa e alto risco de fraturas (Fontalis; Eastell, 2020). No entanto, questões como adesão ao tratamento e efeitos adversos destacam a importância de integrar terapêuticas farmacológicas e não medicamentosas na condução do tratamento da osteoporose (Fontalis; Eastell, 2020).

O risedronato, um bisfosfonato nitrogenado, é amplamente estudado em modelos pré-clínicos devido à sua aplicabilidade na manutenção do tecido esquelético, melhora da microarquitetura óssea e prevenção das fraturas (Francisco et al., 2011). Esses estudos têm sido realizados principalmente em modelos animais, como ratas ovariectomizadas (OVX), para simular a osteoporose pós-menopausa, e em outros modelos de perda óssea induzida (Francisco et al., 2011).

2.7 EXERCÍCIOS FÍSICOS E SAÚDE ÓSSEA

Os exercícios físicos promovem a formação óssea por meio de mecanismos moleculares que envolvem a ativação de vias de sinalização e a regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo (Nikander et al., 2010). Durante o exercício, forças mecânicas geradas pela carga e impacto são convertidas em sinais bioquímicos pelas células ósseas, como osteócitos, osteoblastos e células-tronco mesenquimais, favorecendo a formação óssea e melhorando a densidade e a qualidade do osso (Turner; Robling, 2003).

Os ossos são estruturas dinâmicas que respondem aos estímulos mecânicos, adaptando-se às demandas funcionais impostas pelo ambiente (Bonewald; Johnson, 2008). Essa adaptação ocorre em conformidade com a Lei de Wolff, que estabelece que os ossos se remodelam de acordo com as tensões mecânicas aplicadas, otimizando sua estrutura para resistir às forças impostas (Bogni, 2013; Wang et al., 2022). Além disso, a ausência de carga mecânica, como em períodos de imobilização ou ausência de gravidade, resulta em perda significativa de massa óssea e enfraquecimento estrutural (Magrini et al., 2021). Os mecanismos pelos quais os exercícios físicos promovem a saúde óssea estão associados à mecanotransdução, um processo em que estímulos mecânicos são convertidos em sinais bioquímicos (Wang et al., 2022). Esses sinais regulam a atividade celular, estimulando a formação óssea por osteoblastos e inibindo a reabsorção óssea por osteoclastos (Wang et al., 2022). O fluxo de fluido intracanalicular e a deformação do tecido ósseo durante o exercício são detectados por osteócitos, que então modulam a secreção de moléculas sinalizadoras, como óxido nítrico (ONC) e prostaglandinas (PG), promovendo a remodelação óssea (Oftadeh et al., 2015). Além disso, o colágeno ósseo, por suas propriedades piezoelétricas, contribui para a geração de sinais elétricos que influenciam diretamente o comportamento celular e a organização da matriz (Heng et al., 2023). O tecido ósseo trabecular é amplamente reconhecido por sua maior sensibilidade às influências da atividade física em comparação ao tecido ósseo cortical (Turner; Robling, 2003). Enquanto o trabeculado apresenta uma resposta adaptativa mais dinâmica, o tecido cortical demonstra adaptações mais graduais ou relativamente mais lentas (Turner; Robling, 2003). Dessa forma, a prática regular de exercícios físicos é essencial não apenas para a saúde geral, mas também como um fator determinante na manutenção da integridade e funcionalidade do sistema

esquelético (Heng et al., 2023). Ademais, as forças mecânicas decorrentes das tensões musculares são determinantes para a manutenção da homeostase da massa óssea (Liu et al., 2022). Essas forças influenciam diretamente os processos de remodelação e adaptação estrutural do tecido, promovendo uma interação harmoniosa entre células ósseas e o microambiente mecânico (Liu et al., 2022; Heng et al., 2023). Assim, a atividade física desempenha um papel crucial na manutenção da saúde óssea, evidenciando a importância de sua prática regular para a prevenção de doenças osteometabólicas e para o fortalecimento estrutural do esqueleto (Heng et al., 2023).

2.7.1 Mecanismos Biomecânicos de Ação

2.7.1.1 Mecanotransdução

A mecanotransdução é o processo pelo qual as células ósseas, principalmente os osteócitos, detectam estímulos mecânicos e os convertem em respostas bioquímicas que promovem a formação óssea (Deriggi-Pisani et al., 2023). Durante o exercício, o aumento da tensão e da deformação óssea, ativa canais de íons, como os canais de cálcio, e vias de sinalização intracelular, como a via Wnt/ β -catenina, que estimula a atividade dos osteoblastos e osteócitos promovendo a formação óssea e inibindo a reabsorção (Bonewald; Johnson, 2008). Além disso, há fortes evidências de que a ausência de mecanotransdução leva à rápida perda óssea e à adipogênese da medula óssea (Deriggi-Pisani et al., 2023).

2.7.1.1.1 Detecção do Estímulo Mecânico

Os osteócitos, localizados na matriz óssea, detectam forças mecânicas por meio de extensões citoplasmáticas conectadas a canais iônicos mecanossensíveis, como os canais de cálcio (Bonewald; Johnson, 2008). O influxo de cálcio para os osteócitos ativa vias de sinalização intracelular, promovendo a liberação de moléculas sinalizadoras (Bonewald; Johnson, 2008).

2.7.1.1.2 Ativação de Vias de Sinalização

O estímulo mecânico desencadeia a ativação de diversas vias de sinalização intracelular, modulando a funcionalidade e a atividade das células que regulam a homeostase óssea (Johnson, 2008). A ativação do ligante Wnt em osteócitos e osteoblastos aumenta a estabilização da β -catenina, um fator essencial para a diferenciação osteoblástica e a formação óssea (Turner; Robling, 2003). A prática de exercício físico promove a redução na expressão do RANKL e aumenta a produção de OPG, inibindo a reabsorção óssea e favorecendo a sua formação (Tobeiha et al., 2020). Além de que, o exercício aumenta a produção de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), um fator que estimula a proliferação e diferenciação osteoblástica, além de promover a síntese de colágeno tipo I na matriz óssea (Tobeiha et al., 2020). E por fim, o estímulo mecânico estimula a produção de prostaglandina E2, promovendo a ativação de osteoblastos e a remodelação óssea (Turner; Robling, 2003).

2.7.1.2 Efeitos na Atividade Celular

2.7.1.2.1 Osteócitos

Os osteócitos são os principais sensores mecânicos no osso. Eles transmitem sinais para osteoblastos e células-tronco mesenquimais por meio de moléculas sinalizadoras como esclerostina e prostaglandinas (Tobeiha et al., 2020). O exercício físico inibe a expressão de esclerostina, uma proteína que bloqueia a via Wnt/ β -catenina. Essa inibição promove a ativação dos osteoblastos e aumenta a formação óssea (Tobeiha et al., 2020).

2.7.1.2.2 Osteoblastos

Os exercícios físicos estimulam diretamente a proliferação e a atividade dos osteoblastos (Tobeiha et al., 2020). Os osteoblastos respondem aos sinais gerados pelos osteócitos, aumentando a síntese de matriz óssea, maior deposição de colágeno e a mineralização, fortalecendo o tecido ósseo (Tobeiha et al., 2020). A presença de IGF-1 aumenta a proliferação e a atividade funcional dos osteoblastos,

resultando na deposição de colágeno tipo I e na formação de hidroxapatita (Tobeiha et al., 2020).

2.7.1.2.3 Células-Tronco Mesenquimais

O exercício estimula a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos, aumentando o potencial osteogênico no microambiente ósseo (Deriggi-Pisani et al., 2023).

2.7.1.3 Inibição da Reabsorção Óssea

A carga mecânica induzida pelos exercícios reduz a atividade osteoclástica, promove um equilíbrio positivo entre formação e reabsorção óssea (Deriggi-Pisani et al., 2023). Isso ocorre devido à redução da expressão de RANKL e ao aumento da produção de OPG, uma proteína que inibe a ativação dos osteoclastos (Bonewald; Johnson, 2008).

2.7.1.4 Efeitos da Atividades Física na Qualidade Óssea

Os exercícios físicos (EF) melhoram a microarquitetura óssea ao aumentar a conectividade trabecular, a espessura cortical e a densidade volumétrica do osso. Essas alterações são essenciais para a resistência óssea (Nikander et al., 2010). Estudos com ratos submetidos a exercícios de impacto mostraram maior conectividade trabecular e aumento na espessura trabecular em comparação aos controles sedentários (Turner; Robling, 2003). Demonstra-se também que os EF melhoram a qualidade do colágeno ósseo, promovendo uma melhor organização da matriz orgânica e aumentando a resistência óssea (Turner; Robling, 2003). Além disso, favorecerem o incremento na densidade mineral óssea, contribuem para uma distribuição mais homogênea dos minerais ao longo da matriz óssea, resultando em uma otimização das propriedades mecânicas e aumento da resistência estrutural do tecido ósseo (Turner; Robling, 2003).

2.7.1.5. Benefícios Específicos dos Exercícios Biomecânicos

Os EF que geram impacto, como corrida e salto, são particularmente eficazes para aumentar ou manter a DMO, especialmente em áreas sujeitas a altas cargas mecânicas, como o quadril e a coluna vertebral (Nikander et al., 2010). James e Carroll (2006) demonstraram que em mulheres na pós-menopausa, os exercícios de impacto moderado aumentaram a DMO da coluna lombar em até 2% após 12 meses (James; Carroll, 2006). Bolam, Uffelen e Taaffe (2013) apresentaram um estudo de 12 meses de seguimento em idosos, mostraram que os exercícios de resistência preservaram a DMO em comparação a um grupo controle, que apresentou perda óssea significativa (Bolam; Uffelen; Taaffe, 2013).

Ademais os EF melhoram a microarquitetura aumentando a conectividade trabecular e a espessura cortical, fatores essenciais para a resistência óssea (James; Carroll, 2006). Em adolescentes, exercícios de salto durante o crescimento mostraram melhorar a conectividade trabecular, promovendo um pico de massa óssea mais robusto (Mckay et al., 2005).

Além disso o estresse mecânico gerado pelo EF promove adaptações ósseas que aumentam a resistência ao impacto e às cargas (Turner; Robling, 2003). Testes biomecânicos demonstram que ossos submetidos a exercícios regulares são mais resistentes a fraturas (Turner; Robling, 2003). E não apenas os EF fortalecem o osso, mas também melhoram a força muscular, o equilíbrio e a coordenação, reduzindo o risco de quedas e fraturas, especialmente em idosos (Sherrington et al., 2017).

2.7.1.6 Tipos de Exercícios e Seus Benefícios Biomecânicos

2.7.1.6.1 *Exercícios de Impacto*

Atividades físicas de alta intensidade, como corrida, saltos e esportes que envolvem mudanças rápidas de direção, são conhecidas por gerar forças de reação ao solo que atuam como estímulos diretos sobre o tecido ósseo (Dalmolin, 2013). Esses estímulos mecânicos desencadeiam vias de ativação específicas que promovem adaptações positivas no sistema esquelético (Turner; Robling, 2003). Dentre essas vias, ressalta-se a amplificação na expressão do fator IGF-1 e a redução

da produção de esclerostina, uma proteína associada à inibição da formação óssea (Mckay et al., 2005).

No contexto da DMO, essas adaptações resultam em incrementos significativos em regiões submetidas a maiores cargas mecânicas, como o quadril e a coluna vertebral (Mckay et al., 2005). Além disso, a qualidade estrutural do osso também é beneficiada, fato evidenciado pela melhora na conectividade trabecular e no aumento da espessura cortical, aspectos cruciais para a resistência e funcionalidade do tecido ósseo (Nikander et al., 2010).

2.7.1.6.2 Exercícios de Resistência

O levantamento de peso e o uso de faixas elásticas exercem tensões localizadas sobre os ossos, atuando como estímulos mecânicos que promovem o processo de remodelação óssea (Nikander et al., 2010). Esses estímulos são particularmente importantes por desencadearem vias moleculares que favorecem a manutenção e o fortalecimento do tecido ósseo (Nikander et al., 2010).

Entre as principais vias de ativação envolvidas, observa-se o aumento da expressão de prostaglandina E2 (PGE2) e IGF-1, ambos fundamentais para a modulação do metabolismo ósseo (Nikander et al., 2010).

Essas intervenções contribuem para a preservação e aumento da densidade óssea, especialmente em populações vulneráveis, como mulheres em período pós-menopáusico, que apresentam maior risco de osteoporose (Howe et al., 2011). Adicionalmente, os efeitos sobre a qualidade óssea incluem o incremento da resistência biomecânica, um fator essencial para a funcionalidade e redução do risco de fraturas (Howe et al., 2011).

2.7.1.6.3 Exercícios Combinados

Protocolos de exercício que combinam estímulos de impacto e resistência, como o treinamento funcional, demonstram maximizar os benefícios para a saúde óssea, ao integrar diferentes formas de carga mecânica no sistema esquelético (Nikander et al., 2010).

Estudos indicam que programas de exercícios combinados promovem um aumento mais expressivo na DMO, associados à melhora da microarquitetura óssea

e ao incremento da resistência biomecânica, quando comparados às intervenções baseadas em exercícios isolados (James; Carroll, 2006). Além dos benefícios estruturais, esses protocolos também exercem efeitos significativos na funcionalidade global, contribuindo para a melhora do equilíbrio corporal e para a prevenção de quedas, fatores críticos para a redução do risco adicional de fraturas em populações idosas (James; Carroll, 2006).

2.7.2 Evidências Científicas

2.7.2.1 Estudos em Humanos

Diversos estudos destacam os benefícios dos exercícios físicos na saúde óssea ao longo das diferentes fases da vida (Nikander et al., 2010). McKay et al. (2005) demonstraram que exercícios de salto são eficazes em promover o aumento da conectividade trabecular e da densidade mineral óssea em adolescentes, contribuindo para a formação de uma estrutura óssea mais resistente (Mckay et al., 2005).

No contexto de mulheres pós-menopáusicas, Howe et al. (2011) relataram que exercícios de resistência são capazes de preservar tanto a densidade quanto a qualidade óssea, atuando como uma estratégia eficaz na prevenção de fraturas associadas à osteoporose (Howe et al., 2011). Adicionalmente, James e Carroll (2006) apontaram que exercícios físicos são fundamentais para prevenir a perda óssea decorrente da deficiência estrogênica, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteoporose nessa população (James; Carroll, 2006).

Por fim, Sherrington et al. (2017) destacaram que, além dos benefícios diretos na densidade e na qualidade óssea, os exercícios físicos contribuem para o fortalecimento muscular e a melhora do equilíbrio, desempenhando um papel significativo na prevenção de quedas, especialmente em idosos, reduzindo assim os riscos associados às fraturas (Sherrington et al., 2017).

2.7.2.2 Estudos em Modelos Animais

Turner e Robling (2003) demonstraram, em estudos com modelos experimentais em ratos, que o exercício físico é capaz de reduzir a expressão de

esclerostina, uma proteína inibidora da formação óssea, promovendo assim um aumento significativo na formação óssea trabecular (Turner; Robling, 2003). Além disso, os autores evidenciaram que o estímulo mecânico gerado pelo exercício físico aumenta a produção de prostaglandinas, moléculas bioativas que desempenham papel fundamental na ativação dos processos de formação óssea, corroborando a eficácia do exercício como uma estratégia para a manutenção e o fortalecimento da estrutura esquelética em modelos experimentais (Turner; Robling, 2003).

2.7.2.3 Considerações sobre Segurança

Embora os exercícios sejam benéficos, devem ser adaptados às condições de cada indivíduo para evitar lesões ou sobrecarga óssea. Indivíduos com osteoporose avançada devem evitar exercícios de alto impacto (Giangregorio et al., 2014).

2.8 EFEITOS SINÉRGICOS DE TERAPIAS COMBINADAS

O manejo da osteoporose frequentemente combina intervenções farmacológicas, como as medicações antirreabsortivas, e estratégias não farmacológicas, como os exercícios físicos (Giangregorio et al., 2014). Ambas as intervenções têm mecanismos complementares que podem levar a efeitos sinérgicos na preservação e no incremento da densidade mineral óssea (DMO) (Giangregorio et al., 2014). Estudos em humanos e modelos experimentais, como em ratas ovariectomizadas (OVX), sugerem que a interação entre esses tratamentos pode otimizar os resultados terapêuticos, melhorando a DMO e reduzindo o risco de fraturas (Bolam; Uffelen; Taaffe, 2013).

2.8.1 Mecanismos de Ação Sinérgica

A combinação de medicações antirreabsortivas e exercícios físicos tem se mostrado uma abordagem promissora na promoção da saúde óssea, ao integrar mecanismos farmacológicos e estímulos mecânicos (Giangregorio et al., 2014). Os bisfosfonatos, agentes antirreabsortivos amplamente utilizados, exercem uma ação inibitória direta sobre a reabsorção óssea, reduzindo a atividade osteoclástica e preservando a massa óssea (Giangregorio et al., 2014).

Paralelamente, os exercícios físicos atuam por meio da mecanotransdução, um processo no qual os estímulos mecânicos induzem a formação óssea ao ativar vias celulares que promovem o depósito de matriz óssea e a remodelação do tecido esquelético (Giangregorio et al., 2014).

Adicionalmente, essa combinação terapêutica também contribui para a melhoria da qualidade óssea, preservando a microarquitetura trabecular, aumentando a densidade óssea volumétrica e, conseqüentemente, otimizando a resistência biomecânica do osso. Esses efeitos complementares ressaltam o papel fundamental dessa abordagem integrada no manejo de condições como a osteoporose (Giangregorio et al., 2014).

2.8.2 Estudos em Humanos

Estudos em mulheres pós-menopáusicas mostram que a combinação de bisfosfonatos com exercícios físicos é mais eficaz do que cada intervenção isolada na preservação da DMO (Bolam; Uffelen; Taaffe, 2013). Bolam, Uffelen e Taaffe (2013) demonstraram que mulheres que combinaram alendronato com exercícios de resistência apresentaram aumento de 3% na DMO da coluna lombar após 12 meses, comparado a 1% no grupo que realizou apenas exercícios (Bolam; Uffelen; Taaffe, 2013). Carter e Hinton (2014) evidenciaram em um estudo randomizado controlado que a combinação de exercícios de impacto com risedronato reduziu a perda óssea no quadril em até 25% em comparação ao grupo controle (Carter; Hinton, 2014).

Em idosos, a combinação de terapias farmacológicas e exercícios melhora não apenas a DMO, mas também a força muscular e o equilíbrio, reduzindo o risco de quedas (Howe et al., 2011). Howe et al. (2011) relataram que idosos tratados com bisfosfonatos e submetidos a exercícios de resistência tiveram redução de 35% na incidência de fraturas em comparação aos que receberam apenas medicação (Howe et al., 2011).

2.8.3 Estudos em Ratas Ovariectomizadas

Modelos experimentais em ratas OVX mostram que a combinação de medicações antirreabsortivas e exercícios físicos preserva a DMO de forma mais eficaz do que cada intervenção isolada (Honda; Umemura; Nagasawa, 2001). Honda,

Umemura e Nagasawa (2001) mostraram que o treinamento de alto impacto e baixa repetição em ratos OVX teve efeitos benéficos na formação óssea e nas propriedades biomecânicas, sugerindo um aumento potencial na DMO (Honda; Umemura; Nagasawa, 2001). Ito et al. (2005) relataram que o tratamento com risedronato melhorou as alterações microestruturais deletérias causadas pela ovariectomia, o que poderiam estar associadas a aumentos na DMO (Ito et al. 2005).

Além do aumento da DMO, a combinação de intervenções melhora a microarquitetura óssea, reduzindo a fragilidade (Turner; Robling, 2003). Em ratas OVX, o tratamento combinado promoveu maior resistência mecânica do osso, aumentando a força de fratura em 20% em comparação às terapias isoladas (Turner; Robling, 2003).

2.8.4 Mecanismos Moleculares Envolvidos

Os bisfosfonatos reduzem a reabsorção óssea, enquanto os exercícios aumentam a formação óssea (Bonewald; Johnson, 2008). A interação entre essas ações resulta em maior equilíbrio no remodelamento ósseo (Bonewald; Johnson, 2008). Por outro lado, os EF reduzem a atividade e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , que estão associadas ao aumento da reabsorção óssea. Esse efeito pode potencializar a ação dos bisfosfonatos (Silva; Macedo 2011).

2.8.5 Aplicações Clínicas

A combinação de exercícios físicos e medicação antirreabsortiva reduz significativamente o risco de fraturas em populações vulneráveis, como mulheres na pós-menopausa e idosos (Bolam; Uffelen; Taaffe, 2013). Programas terapêuticos que integram farmacoterapia e exercícios devem ser incentivados, com ajustes baseados nas condições de cada paciente (Carter; Hinton, 2014).

Embora os efeitos sinérgicos entre o exercício físico e intervenções terapêuticas sejam amplamente documentados na literatura, algumas questões importantes ainda permanecem em aberto. Entre elas, destaca-se a ausência de padronização nos protocolos de exercícios, o que limita a comparabilidade entre estudos e dificulta a definição de diretrizes práticas para aplicação clínica (Daly et al., 2019).

Além disso, há uma necessidade crítica de investigações de longo prazo em populações humanas, a fim de avaliar os benefícios cumulativos dessas intervenções e seu impacto sustentável na saúde óssea ao longo do tempo (Carter; Hinton, 2014). Estudos dessa natureza são essenciais para compreender a eficácia duradoura dessas estratégias e orientar sua implementação em diferentes contextos populacionais (Bolam; Uffelen; Taaffe, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos isolados e combinados de medicações antirreabsortivas e atividades físicas na saúde óssea das ratas Wistar com osteoporose ovariectomizadas considerando variáveis como densidade mineral óssea (imagem), microarquitetura óssea (histologia) e marcadores bioquímicos de remodelação óssea (analitos urinários e sanguíneos).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o impacto das medicações antirreabsortivas na densidade mineral óssea e na microarquitetura óssea de ratas ovariectomizadas.
- Avaliar os efeitos dos exercícios físicos na densidade mineral óssea e nos marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea.
- Analisar a interação entre fármacos antirreabsortivos e a prática de exercícios físicos, com o objetivo de identificar e caracterizar potenciais efeitos sinérgicos sobre os parâmetros avaliados no estudo.
- Comparar os grupos experimentais para identificar qual intervenção (isolada ou combinada) proporciona os melhores resultados na recuperação da saúde óssea.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em conformidade com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta os procedimentos para uso científico em animais, através do protocolo número 024/2023 em 02/05/2023 (Anexo 1).

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, do tipo prospectivo, pareado, aleatório e duplo cego.

4.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram utilizadas 96 ratas adultas de sexo feminino (*Rattus norvegicus*, família Muridae, variedade Wistar), provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, primíparas pós-desmame, 24 semanas de idade, peso médio 180-220g. Foram utilizadas ratas após a primeira cria, garantindo o ciclo reprodutivo ovariano intacto. Para gerar ratos osteoporóticos: foram submetidas a OVX bilateral. Foram divididas em 12 grupos (8 ratas em cada grupo) combinando os procedimentos: ovariectomia (OVX), cirurgia simulada (SHAM), risedronato (R), exercícios físicos (E) e controle ou referência (CONTROLE).

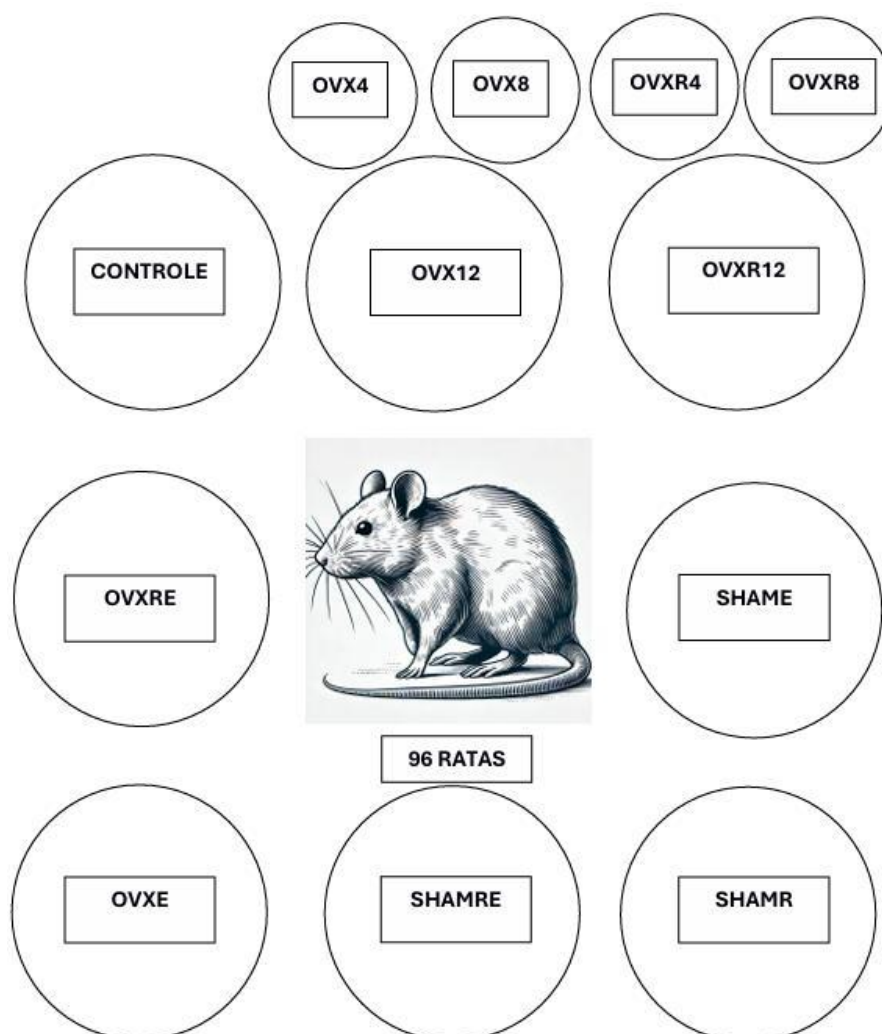
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais dos grupos OVX sofreram remoção cirúrgica dos ovários bilateral, os dos grupos SHAM sofreram o mesmo procedimento cirúrgico sem remoção dos ovários (operação simulada) e o grupo CONTROLE não foi submetido a nenhum tipo de intervenção (observação). Posteriormente foram submetidas às intervenções: observação, risedronato de sódio e/ou exercícios físicos.

4.5 DIVISÃO DOS GRUPOS

As ratas foram divididas em 12 grupos: ovariectomia (OVX), cirurgia simulada (SHAM), risedronato (R), exercícios físicos (E) e controle (CONTROLE) (Figura 2). O tempo de seguimento dos grupos OVX e OVXR foi colocado ao lado da identificação do grupo. Todos os outros grupos foram acompanhados por 12 semanas.

Figura 2 – Delineamento dos grupos



Legenda: Grupo 1 - Ovariectomia - 4 semanas (n = 8) - OVX4, Grupo 2 - Ovariectomia - 8 semanas (n = 8) - OVX8, Grupo 3 - Ovariectomia - 12 semanas (n = 8) - OVX12, Grupo 4 - Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 4 semanas (n = 8) - OVXR4, Grupo 5 - Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 8 semanas (n = 8) - OVXR8, Grupo 6 - Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas (n = 8) - OVXR12, Grupo 7 - Cirurgia Simulada + Exercício - 12 semanas (n = 8) - SHAME, Grupo 8 - Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas (n = 8) - SHAMR, Grupo 9 - Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas (n = 8) - SHAMRE, Grupo 10 - Ovariectomia + Exercício - 12 semanas (n = 8) - OVXE, Grupo 11 - Ovariectomia + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas (n = 8) - OVXRE, Grupo 12 - Controle (Referência) - 12 semanas (n = 8) - CONTROLE.

4.6 PROCEDIMENTOS

4.6.1 Indução do modelo osteoporótico

Para induzir um modelo osteoporótico, as ratas dos grupos OVX foram submetidas a ovariectomia bilateral de acordo com o método relatado no estudo como o descrito por Rowe et al. (2023).

Os animais do grupo SHAM foram submetidos a cirurgia simulada, sem ligadura das trompas e sem ressecção dos ovários, realizando os mesmos procedimentos da cirurgia e recolocando os ovários dentro da cavidade abdominal. Dessa forma foram submetidos ao mesmo estresse cirúrgico que o grupo OVX.

4.6.2 Sala de cirurgia

Os procedimentos operatórios experimentais foram realizados na Sala de Cirurgia do CBR da UFJF sob técnicas de assepsia e antisepsia, utilizando-se instrumental estéril e campos descartáveis. Para esterilização destes, utilizou-se o calor úmido (autoclave), sob a pressão de 15 libras e temperatura de 121°C por 30 minutos. Todas as operações deste estudo foram realizadas em condições estéreis.

4.6.3 Anestesia geral

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, cada rato foi pesado no dia anterior no intuito de minimizar o estresse no momento da cirurgia. Para a anestesia geral destes animais foi utilizado o protocolo de anestesia do ICBR: Cloridrato de Xilazina 2%®Syntec 8mg/kg, Cloridrato de Cetamina 10%®Syntec 40 mg/kg e Midazolam 5mg/mL®Syntec 5mg/kg aplicados conforme peso corpóreo por via intraperitoneal, com um tempo de ação de aproximadamente 5 minutos e um período aproximado de 30 minutos de anestesia.

Antes da cirurgia, ratos em jejum (6-12 horas) foram submetidos a anestesia conforme protocolo do ICBR, a área da pele foi preparada com tosquiadeiras elétricas (tricotomia com remoção dos pelos na área cirúrgica) e limpas (usando etanol 70%). As cirurgias foram realizadas em uma almofada aquecida (30-35°C) para prevenir a hipotermia.

Antes do início do procedimento e no decorrer de todo ele, a avaliação da eficácia da anestesia geral foi monitorada por meio da compressão das patas, com o objetivo de monitorar os reflexos periféricos, e em conjunto com o controle da frequência respiratória, realizado por observação visual. Durante a intervenção foi utilizada uma gaze estéril embebida em solução salina a 0,9% aplicada sobre os olhos dos animais como medida preventiva contra o ressecamento das córneas.

4.6.4 Procedimentos pré-cirúrgicos

Enquanto o rato estiver anestesiado, sob papel absorvente e após a tricotomia, realiza-se uma antissepsia com gaze estéril umedecida em Polivinil-iodopovidona (PVP-I) a 10%. Em seguida, foi colocado um campo cirúrgico estéril sob a mesa, e o rato foi colocado em decúbito ventral.

4.6.5 Ovariectomia

O procedimento cirúrgico empregado neste estudo foi conduzido de acordo com a metodologia descrita por Rowe et al. (2023). Inicialmente, foi realizada tricotomia na região dorsal, compreendida entre o rebordo costal inferior e a região superior da pelve (Figura 3). Em seguida, realizou-se a antissepsia da área com gaze embebida em solução de (PVP-I) a 10%. Após a preparação, procedeu-se a uma incisão transversal retilínea, com aproximadamente 1 cm de extensão, envolvendo pele e tecido celular subcutâneo, a cerca de 1 cm lateralmente à linha mediana, utilizando pinça e lâmina de bisturi número 15 (Figura 4). A divulsão da parede muscular foi realizada até alcançar a cavidade abdominal (Figura 5), identificando o ovário envolto em tecido adiposo. O corno uterino foi exposto para fora da cavidade abdominal (Figura 6), seguido pelo clampeamento da extremidade distal da tuba uterina com pinça hemostática. Procedeu-se então o clampeamento, com o uso de pinça hemostática delicada curva do tipo Kelly, dos vasos ovarianos e da extremidade distal da tuba uterina (Figura 7), realiza-se sutura com fio de Nylon 3.0 abaixo do clampeamento. Realiza-se a ressecção do ovário entre a ligadura e a área de sutura, prevenindo hemorragias locais. O ovário, juntamente com os tecidos adjacentes, foi removido (Figura 8), e as trompas foram reposicionadas dentro da cavidade abdominal. Observa-se a sutura da fimbria ovariana e controle do sangramento

(Figura 9). Procede-se a sutura da parede muscular com fios absorvíveis e o fechamento da pele com fio de Nylon 3.0 (Figura 10). O procedimento foi repetido no lado contralateral para a remoção dos dois ovários. Após a cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de antibiótico (40.000 U/kg de Penicilina G Procaína), conforme protocolo descrito por Shimano (2013).

Figura 3 – Tricotomia na região entre o rebordo costal e a pelve

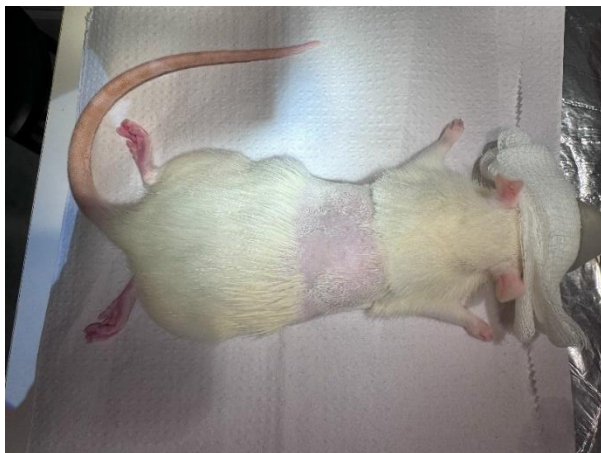


Figura 4 – Identificação na pele entre o ponto médio dos arcos costais e o íliaco



Figura 5 – Abertura da camada muscular

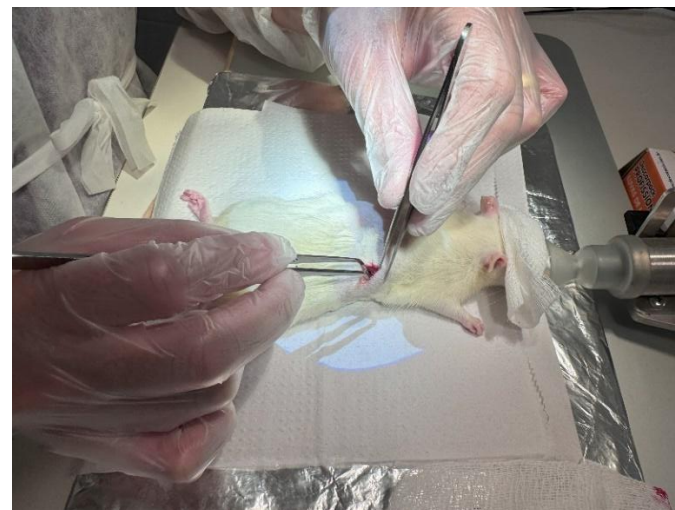


Figura 6 – Exposição do ovário

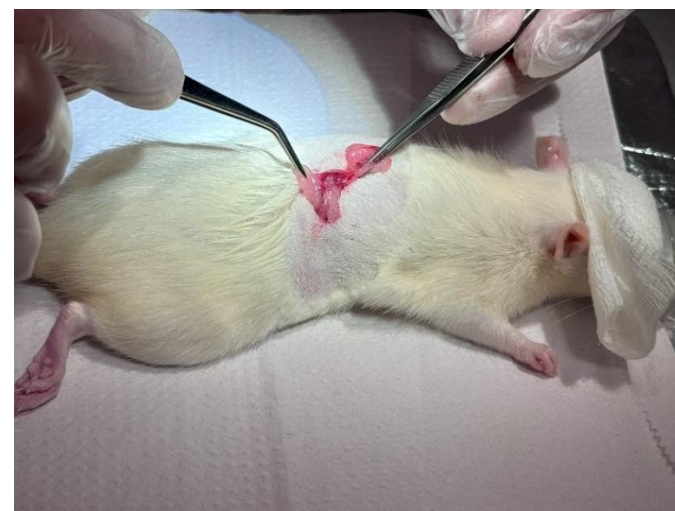


Figura 7 – Ligadura do ovário abaixo da fímbria



Figura 8 – Ovário individualizado



Figura 9 – Sutura da fímbria

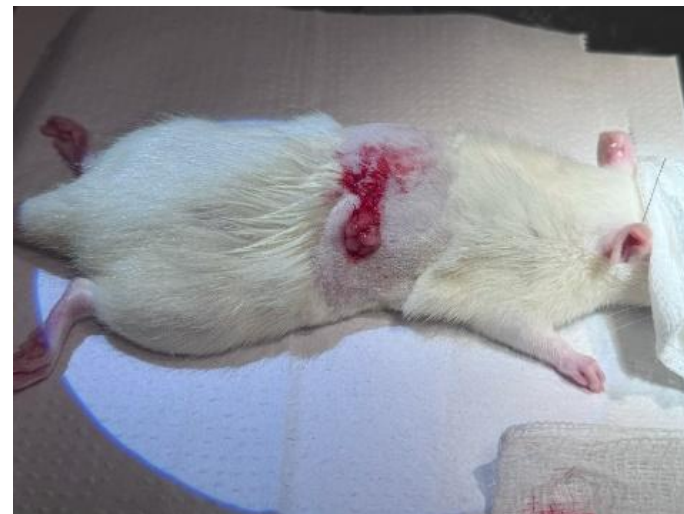
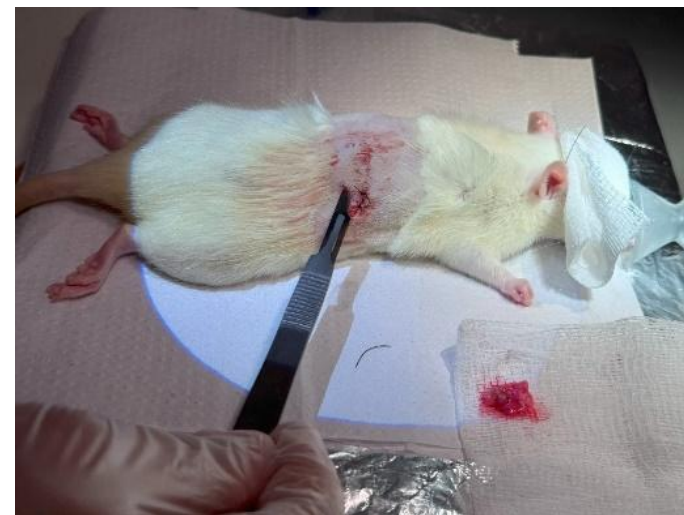


Figura 10 – Sutura da pele



O procedimento cirúrgico SHAM foi conduzido empregando os mesmos passos técnicos utilizados na ovariectomia, com a exceção de que não foi realizada a ligadura abaixo da fimbria nem a remoção dos ovários. Neste caso, os ovários foram apenas expostos e reposicionados na cavidade original, permanecendo intactos ao final do procedimento.

4.6.6 Cuidados pós-operatórios

Foram seguidos os mesmos cuidados pós-operatórios preconizados por Rowe et al. (2023): administrado medicamento para dor, meloxicam 0,2 mg/Kg, via de administração subcutânea, 1 x ao dia, por 72 horas após a operação. Após a cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de antibiótico (40.000 U/kg de Penicilina G Procaína), conforme protocolo descrito por Shimano (2013). Ao término da conclusão da cirurgia, os animais foram transferidos em uma gaiola individual, limpa, forrada com papel toalha seco em estante de temperatura controlada. Os animais não foram colocados juntos numa gaiola até que se recuperassem do procedimento por 72 horas. Foi permitido que o animal pudesse andar livremente na gaiola antes de colocá-los de volta em uma gaiola limpa com os outros animais, mantendo 4 animais por gaiola. Os animais foram monitorados em busca de sinais de infecção, dor ou complicações cirúrgicas a cada 12 horas até as primeiras 72 horas do tempo de cicatrização. Os pontos não foram retirados e não houve complicações pós-operatórias.

4.6.7 Administração do Risedronato

O grupo risedronato recebeu uma dose do medicamento diluído em solução salina na dose de 30 miligramas (mg)/quilograma (Kg)/ mês por 3 meses, com a primeira dose três dias após a OVX. Foram administradas quatro doses no total, sendo uma dose por mês (30 mg/kg/mês de risedronato de sódio) conforme Tabela 1. Os animais do grupo OVXR4 receberam duas doses e do grupo OVXR8 receberam três doses. O medicamento risedronato de sódio 150mg – (Eurofarma Laboratórios S/A, São Paulo, Brasil) foi administrado nos grupos OVR4, OVXR8, OVXR12, SHAMR, SHAMRE, OVXRE. A massa inicial do comprimido foi pesada em balança de precisão (Marte AM- 220) (273 mg). Triturado em cuba de maceração de cerâmica (Figura 11),

150 mg do comprimido macerado, pesado em um Becker de 100 mililitros (mL) e nesta foi adicionado 25 mL de água destilada, com auxílio de uma barra magnética, em um agitador até que o risedronato fosse totalmente solubilizado, obtendo uma solução com 6 mg/mL de risedronato sódico (Figura 12).

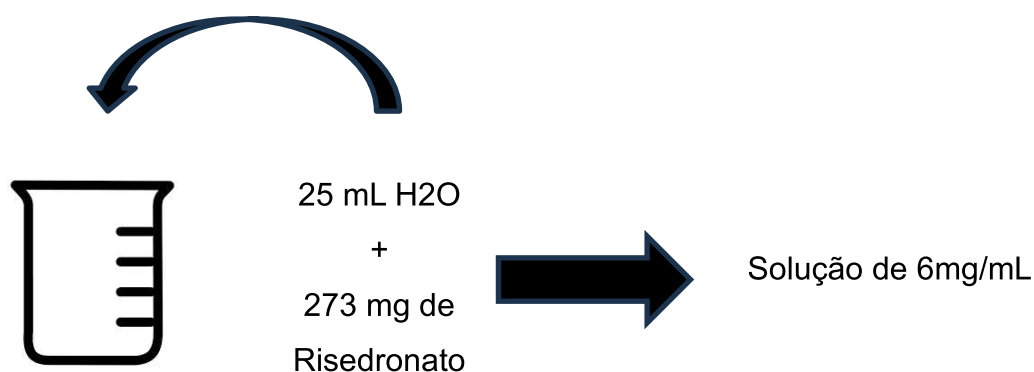
Tabela 1 – Protocolo Risedronato de acordo com o peso dos animais

Peso (gramas)	Risedronato de Sódio (6mg/mL)
200	1,0 mL
250	1,5 mL
300	2,0 mL

Figura 11 – Cuba de Maceração



Figura 12 – Becker com água e medicamento



A administração do medicamento foi realizada por gavagem. Na manhã do dia da administração, a comida foi retirada, para que os animais recebessem o medicamento em jejum de 6 horas. Semanalmente, os animais foram pesados em balança eletrônica para controle do peso corporal e mensalmente os ratos foram

realocados nas caixas, onde os animais com pesos mais aproximados foram colocados juntos, com isso a dose do risedronato foi ajustada conforme o peso mensalmente. Os grupos onde o risedronato não foi administrado, foram submetidos aos mesmos protocolos dos grupos risedronato, retirada de comida, pesagens mensais e realocação dos animais pelo peso. A primeira administração do medicamento foi realizada 72 horas após a cirurgia.

4.6.8 Protocolo Atividade Física

Os animais do grupo CONTROLE e dos grupos que não tinham atividade física permaneceram em caixas de polipropileno, próprias para ratos, sem atividade física programada, apenas com deambulação livre. Os grupos que foram submetidos ao treinamento foram os seguintes: SHAME, SHAMRE, OVXE, OVXRE. O treinamento físico de corrida de intensidade baixa a moderada, foi realizado em uma esteira motorizada (Insight, Brasil) (Figura 13), composta por 6 baias individuais, com altura de 15 cm, largura interna de 10 cm e comprimento de 50 cm, sem o auxílio de estímulos nocivos (como choques de baixa voltagem, por exemplo).

Figura 13 – Esteira motorizada (Insight, Brasil)



Para o treinamento físico foi utilizado o protocolo proposto por Shimano 2013 com pequenas alterações (Shimano, 2013). O período de treinamento foi iniciado uma semana após a ovariectomia. Os animais correram 10 minutos por dia (Figura 14), aos quais foram acrescidos 5 minutos a cada dia, até 60 minutos de treinamento diário na velocidade de 10 metros (m)/min (Tabela 2).

Figura 14 – Animais posicionados nas baias para o treinamento

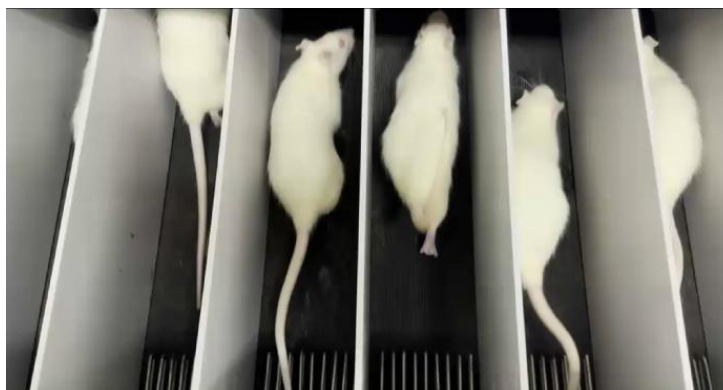


Tabela 2 – Treinamento exercícios

Semanas de Treinamento	Velocidade m/min	Duração das sessões (minutos)				
1	10	10	15	20	25	30
2	10	35	40	45	50	55
3	15	60	60	60	60	60
4	15	60	60	60	60	60
5	15	60	60	60	60	60
6	15	60	60	60	60	60
7	15	60	60	60	60	60
8	15	60	60	60	60	60
9	15	60	60	60	60	60
10	15	60	60	60	60	60
11	15	60	60	60	60	60
12	15	60	60	60	60	60

Este aumento progressivo no tempo de treinamento permitiu a adaptação do animal ao exercício. A velocidade da esteira a partir da terceira semana foi de 15 m/min, na posição horizontal sem inclinação, caracterizando exercício de baixa intensidade. O grupo exercícios foi submetido a este protocolo durante 90 dias. A cada semana os ratos foram treinados por 5 dias consecutivos e tiveram dois dias de repouso.

4.6.9 Densitometria Radiográfica

A densitometria radiográfica (DR) foi empregada como método para quantificar a densidade óssea (DO), demonstrando-se uma ferramenta eficaz no diagnóstico e no direcionamento terapêutico de doenças osteometabólicas. Foi utilizado o aparelho de radiografia da marca Dabi Atlante Spectro 70X (Figura 15).

Figura 15 – Aparelho de radiografia da marca Dabi Atlante Spectro 70X



Para a aquisição das imagens as ratas foram anestesiadas conforme protocolo do CBR: Cloridrato de Xilazina 2%®Syntec 8mg/kg, Cloridrato de Cetamina 10%®Syntec 40 mg/kg e Midazolam 5mg/mL®Syntec 5mg/kg aplicados conforme peso corpóreo por via intraperitoneal, com um tempo de ação de aproximadamente 5 minutos e um período aproximado de 30 minutos de anestesia. Os animais foram posicionados em decúbito ventral no chassi radiográfico 24 x 30 cm, num suporte de chão de 30 centímetros de altura. O feixe do aparelho de radiografias foi direcionado perpendicular à coluna toracolombar dos animais com os membros afastados do corpo, cabeça, tronco e cauda alinhados no chassi. O artefato referencial densitométrico foi posicionado na lateral direita do animal a uma distância entre 2 cm até 3 cm do bordo lateral costal direito. Os parâmetros radiográficos adotados foram os seguintes: o animal foi posicionado a uma distância de 1 metro do emissor de radiação ou cabeçote (distância foco-filme) com ajuste de tensão de pico 75 quilovoltagem (kV)- voltagem aplicada ao tubo de raios X-, 7.0 miliamperagem (mA) - corrente utilizada para acionar o tubo de raios-X- e 1.0 segundo (s) - tempo de irradiação do paciente- com foco localizado no centro do animal na região toracolombar. Após o ajuste, foi realizado o disparo da tomada radiográfica. Os filmes contendo as imagens foram levados ao laboratório de radiologia do Hospital

Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF) para pós-processamento do sistema digital de imagem com a leitura do aparelho Agfa CR30-Xm ano 2015/2016, gerando um arquivo de imagens formato Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM) e salvo no sistema de gestão de arquivos Arya do HU-UFJF. As imagens foram baixadas em arquivo tipo DICOM e eram armazenadas para posterior análise. Todo o processo era realizado com aquisição de 1 imagem por animal, totalizando 8 imagens por grupo. Todos os animais foram submetidos a 4 imagens, correspondendo a imagem pré-operatória, 30 dias após a cirurgia, 60 dias após a cirurgia e 90 dias após a cirurgia, após a última radiografia os animais eram submetidos a eutanásia 2 dias após o último exame. Os animais dos grupos OVX4 e OVXR4 foram submetidos a duas imagens e os grupos OVX8 e OVXR8 foram submetidos a três exames de imagens respectivamente. O uso de avental de chumbo e protetor de tireóide foi adotado como método de proteção individual do pesquisador, assegurando eficácia na contenção da penetração dos raios-X emitidos pelo equipamento. Tal abordagem garante a minimização da exposição à radiação ionizante, promovendo segurança do pesquisador durante a execução dos procedimentos.

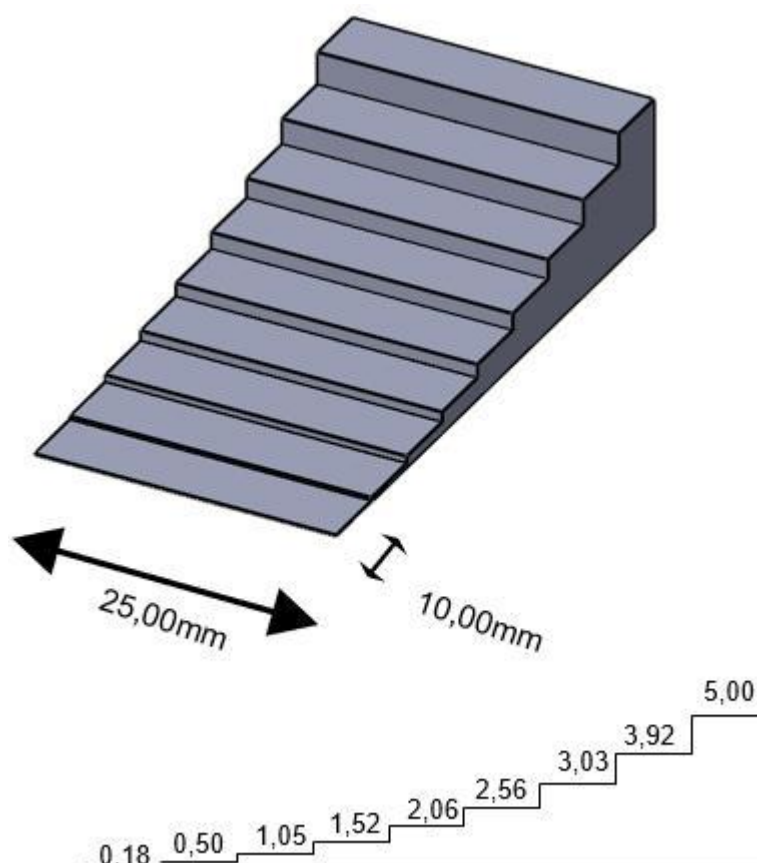
Como padrão densitométrico nas imagens radiográficas, foi utilizada uma escada de alumínio [liga 6063, conforme especificação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)] com nove degraus, 10 milímetros (mm) de espessura para o primeiro degrau, variando de 10 mm até o nono degrau, cada um com 10x25 mm de área, a altura dos degraus varia conforme a Tabela 3 [utilizamos os mesmo parâmetros utilizados por Oliveira (2014)].

Tabela 3 – Escada de alumínio

Degrau	Espessura (mm)*
1	0,18
2	0,50
3	1,05
4	1,52
5	2,06
6	2,56
7	3,03
8	3,92
9	5,00

O artefato densitométrico em forma de escada foi confeccionado com o auxílio de uma fresadora, sendo as dimensões dos degraus determinadas com precisão utilizando-se um paquímetro, conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 16 – Desenho esquemático da escada de alumínio utilizada como referencial densitométrico



A escada foi posicionada próxima às vértebras, alinhada com o feixe principal de raios X, à direita da coluna toracolombar dos animais (Figura 17). O software computacional “Fiji ImageJ” - versão 1.54m (domínio público-<https://imagej.net/software/fiji/downloads>) (Schindelin et al., 2012), foi utilizado para análise densitométrica, após delimitada a região de interesse para medição óssea coluna (4 primeiras vértebras lombares) e fêmur direito (terço distal acima da articulação do joelho) (Figura 18) utilizando a ferramenta de definição de área do software de análise, com o objetivo de determinar os níveis médios de densidade em tons de cinza (até 256 níveis) tanto das vértebras e fêmures quanto dos degraus da

escada de alumínio (Al) para calibração da leitura. Os valores obtidos para as vértebras foram convertidos para valores equivalentes à espessura de alumínio (Al) em milímetros (mm) com base em uma equação polinomial previamente definida (Figura 19), seguindo as seguintes etapas metodológicas descritas por Louzada et al. (2009) (Antonietto, 2010): Inicialmente, foi determinado o valor da DR da Região de Interesse (RDI). Utilizando o valor de DR obtido na etapa 1 como referência, foram estabelecidos 9 degraus na escada de alumínio, os quais serviram como padrão densitométrico. Esses valores de DR abrangiam o intervalo correspondente ao da RDI. Com base nos valores de espessura e DR dos 9 degraus definidos na etapa 2, foi elaborado um gráfico utilizando a ferramenta do Excel® Microsoft. A partir das ferramentas analíticas do Excel, identificou-se a curva que melhor se ajustava aos pontos do gráfico, resultando em um gráfico de polinômio de 3º grau (Figura 19). O programa gerou uma equação de ajuste correspondente. Por meio da equação de ajuste obtida na etapa 4, o valor de X foi substituído pela DR da RDI (etapa 1), permitindo a determinação da espessura equivalente em milímetros de alumínio (mmAl) para o objeto de estudo. Assim, a densidade óssea foi expressa em unidades equivalentes a milímetros de alumínio (mmAl), conforme demonstrado na Figura 20 e na Tabela 3.

Figura 17 – Posicionamento na placa de radiografia e imagem com o referencial densitométrico

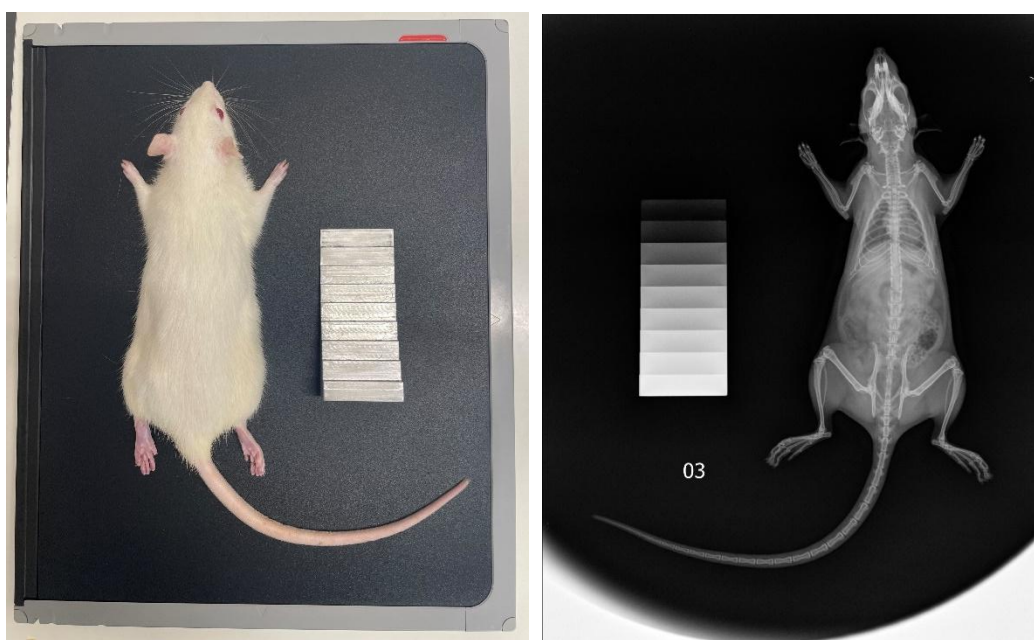


Figura 18 – Definição das áreas de interesse para medição óssea coluna (4 primeiras vértebras lombares) e fêmur direito (terço distal do fêmur proximal à articulação do joelho).

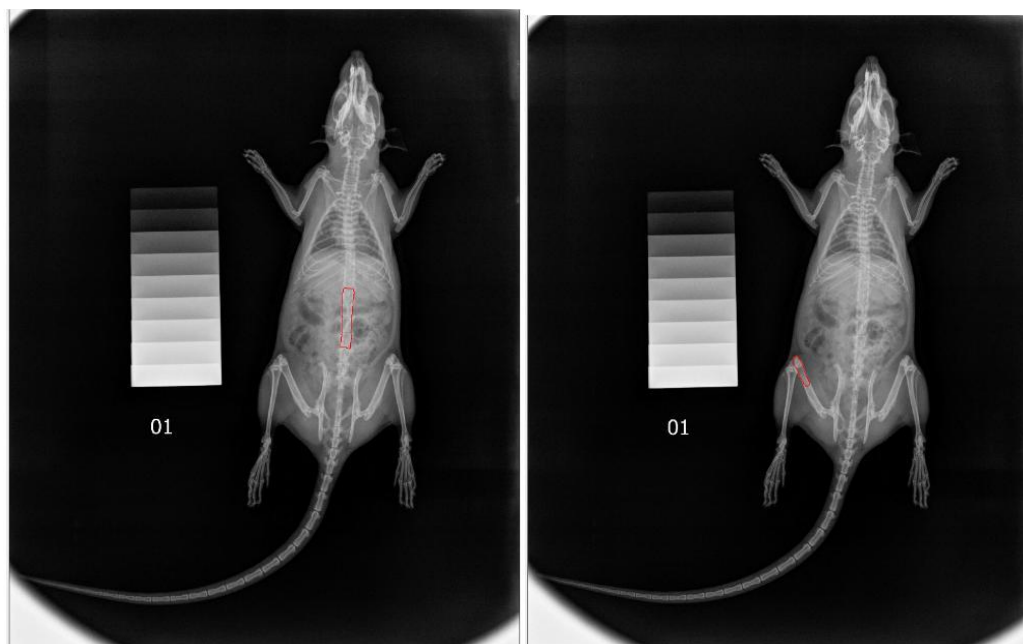


Figura 19 – Equação polinomial para conversão da imagem em mmAI

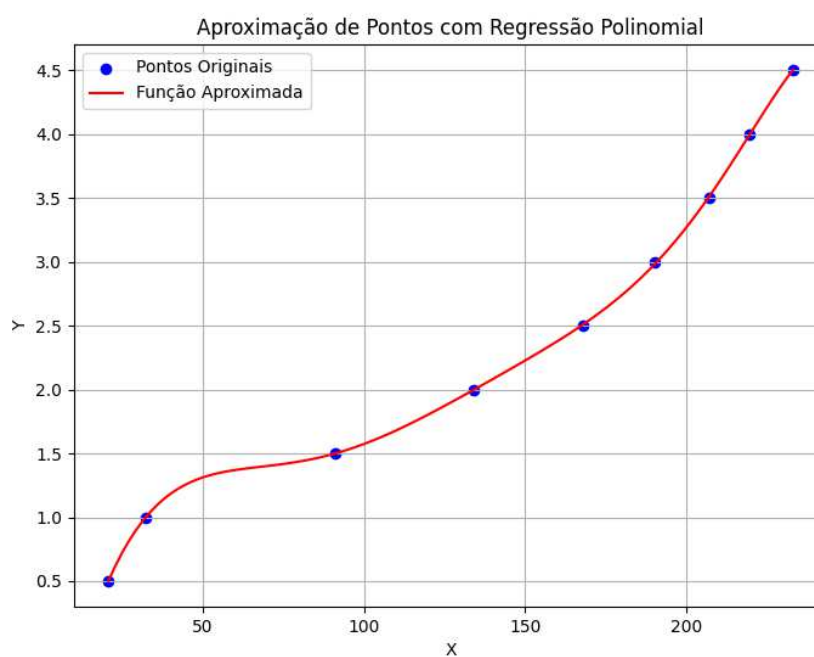


Figura 20 – Conversão das imagens nas quatro medidas de tempo em mmAl grupo OVX12 coluna e fêmur

Densidade Mineral Radiográfica: Coluna L1-L4 e fêmur direito				
1. Média Coluna mm Al				
Rato	OVX12_1	OVX12_2	OVX12_3	OVX12_4
1	2.6286782	2.7698965	2.56393	2.65747632
2	2.67246	2.7221397	2.64548	2.72449499
3	2.7751172	2.7758015	2.55851	2.80486892
4	2.6564694	2.7018352	2.57333	2.72603295
5	2.8441254	2.8712166	2.54362	2.93269685
6	2.7057780	2.7593795	2.63905	2.73858868
7	2.6479195	2.6480570	2.42211	2.65406463
8	1.8441168	1.8564815	2.56825	1.79041239
2. Média fêmur direito mm Al				
Rato	OVX12_1	OVX12_2	OVX12_3	OVX12_4
1	1.9802298	1.9780630	1.97347	2.02054708
2	1.9795965	1.9793151	2.00192	2.01172164
3	2.0337450	2.091067	1.92696	2.09778886
4	1.9954093	2.0190304	2.0256	2.02454611
5	2.0311742	1.9944073	2.06576	2.21505384
6	2.1041584	2.0920698	2.02382	2.08909038
7	1.9269767	1.900244	1.79307	2.01095729
8	1.8441168	1.8564815	1.80327	1.79041239

Os ratos foram sacrificados 90 dias após a cirurgia. Para tal, foram administradas uma sobredose de medicações utilizadas na anestesia na seguinte dosagem: Cloridrato de Xilazina 2%®Syntec 10 mg/kg e Cloridrato de Cetamina 10%®Syntec 90 mg/kg aplicados conforme peso corpóreo por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada exsanguinação por punção intracardíaca para eutanásia, nesse momento 5 mL do sangue foi encaminhado para exames laboratoriais. Após a eutanásia, foi realizada uma tricotomia na região lombar e nos fêmures dos ratos, seguida da limpeza da pele com álcool etílico a 70%. Posteriormente, procedeu-se com uma incisão mediana, dissecação por planos e exposição da coluna e dos fêmures direito e esquerdo (Figura 21). A ressecção do osso foi realizada com lâminas de bisturi números 11 e 23. As colunas e os fêmures esquerdos foram dissecados e mantidos em solução de formol tamponado 10% para subseqüentes análises. Os fêmures direitos foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a – 80 graus Célsius para investigações posteriores. Foi realizada checagem da presença dos ovários (grupos SHAM e CONTROLE) (Figura 22), o que significa que o estímulo

estrogênico foi mantido. E ausência dos ovários (grupos OVX) (Figura 23) com consequente atrofia dos cornos uterinos o que significa supressão do influxo estrogênico, garantindo a ausência deste estímulo hormonal nos animais ovariectomizados.

Figura 21 – Dissecção com exposição da coluna e dos fêmures.



Figura 22 – Presença dos ovários nos animais dos grupos SHAM e CONTROLE.

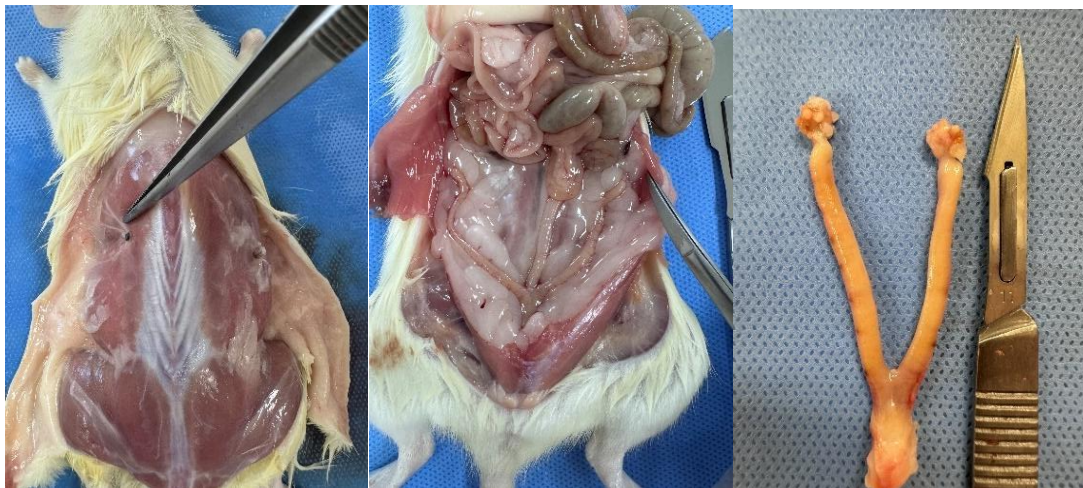


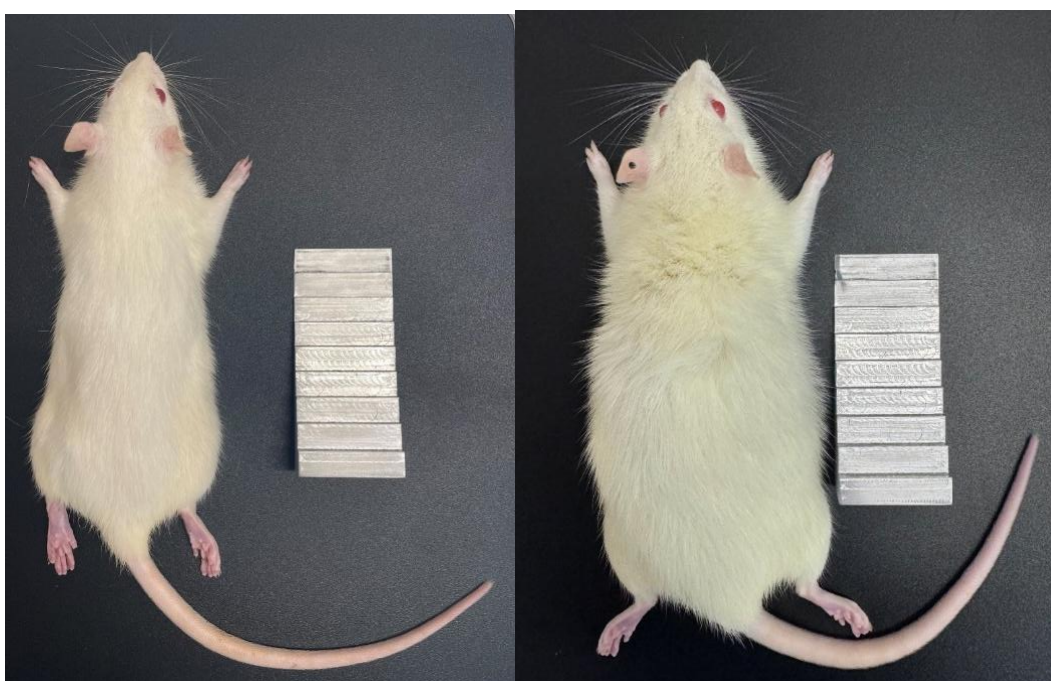
Figura 23 – Ausência dos ovários e atrofia dos cornos uterinos nos animais dos grupos OVX



4.6.10 Acompanhamento da evolução ponderal

Os ratos foram pesados mensalmente, numa planilha padronizada, antes da OVX e nos três meses subsequentes. O peso dos animais foi aferido em balança digital pertencente ao CBR da UFJF. Abaixo segue uma imagem do comparativo animais durante três meses de seguimento CONTROLE e OVX12 (Figura 24).

Figura 24 – Ganho de peso comparativo dos grupos CONTROLE e OVX12 respectivamente.



4.6.11 Acondicionamento dos Animais

Os animais foram mantidos inicialmente no CBR da UFJF até os 180 dias de vida, a uma temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, num ciclo claro-escuro 12/12h, primíparas. Após a primeira cria e o desmane os animais foram transferidos para o experimento, o qual manteve o sistema de iluminação e aquecimento, e onde foram mantidos em gaiolas de polipropileno, contendo maravalha autoclavada de madeira macia, mantido controle de temperatura, ração comum e água ad libitum. Como os ratos geralmente têm um comportamento comunitário, eles foram alojados em quatro animais por gaiola.

Todas as gaiolas foram acondicionadas em uma sala exclusiva para esta pesquisa e, durante um período de 15 dias, os animais foram mantidos numa sala de quarentena, onde foram avaliados, pelo veterinário responsável, o seu estado geral de saúde. Durante o período de quarentena, os animais foram vermifugados com Albendazol. A limpeza das gaiolas e dos bebedouros foi efetuada duas vezes por semana, segundo o protocolo de limpeza e desinfecção do CBR. A alimentação dos animais se deu através de ração comercial sólida (Nuvilab® CR 1 irradiada- Quimitia) e água ad libitum.

4.7 REMOÇÃO DOS TECIDOS

Após um período de 48 horas do fim do experimento, os animais foram submetidos a eutanásia. As colunas e os fêmures esquerdos foram dissecadas e mantidas em solução de formol tamponado 10% para as subseqüentes análises (Figura 25): Preparo das peças para histologia.

Figura 25 – Preparo das peças para histologia



4.8 PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

As peças foram fixadas em formol tamponado a 10% em temperatura ambiente e, posteriormente, descalcificadas em solução de ácido nítrico a 0,5% por 5 dias. Após a descalcificação, as peças foram lavadas com água destilada corrente durante 2 minutos e mediante uma navalha. A coluna foi seccionada transversal e o fêmur foi seccionado na região distal 1,5 cm proximal aos côndilos femorais.

Cada amostra, contendo um segmento de cada vértebra e do 1,5 cm distal fêmur esquerdo foram colocadas num tubo cônico contendo álcool a 70% e encaminhadas para seu processamento histológico, no qual foram desidratadas em soluções de álcool etílico a 80%, 90% e 100%, diafanizadas em banhos de xilol e incluídas em parafina de forma padronizada, o que permitiu o posicionamento no micrótomo e o corte da amostra no sentido coronal. Posteriormente, os espécimes foram seccionados em cortes seriados de 5 μ m de espessura em micrótomo Leica RM 2165 (Alemanha), e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Posteriormente, foram corados com hematoxilina e eosina (HE) segundo a metodologia de Junqueira e Carneiro (2013). Todas as lâminas foram analisadas em um microscópio de fluorescência (Olympus BX53, Tóquio, Japão) e as imagens coletadas foram analisadas com o software de imagem CellR&CellRImaging Life Science Microscopy (v1.16, Olympus) sem a utilização de nenhum tipo de filtro (Figura 26): Microscópio para fotografia das peças histológicas. As imagens foram obtidas com ampliação de 4X, 10X, 20X com imagens da coluna (Figura 27): Imagens histológicas da coluna – e do fêmur (Figura 28): Imagens

histológicas do fêmur esquerdo. Todas as etapas para o procedimento histológico foram realizadas no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biológicas (LHICB) e as imagens foram realizadas no Laboratório Integrado de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (LIP-PPGCBio). As imagens da coluna e fêmur esquerdo em campo de 10X foram escolhidas para análise do software Fiji ImageJ (version 1.51r; NIH, Maryland, USA).

Figura 26 – Microscópio para fotografia das peças histológicas.



Figura 27 – Imagens histológicas da coluna.

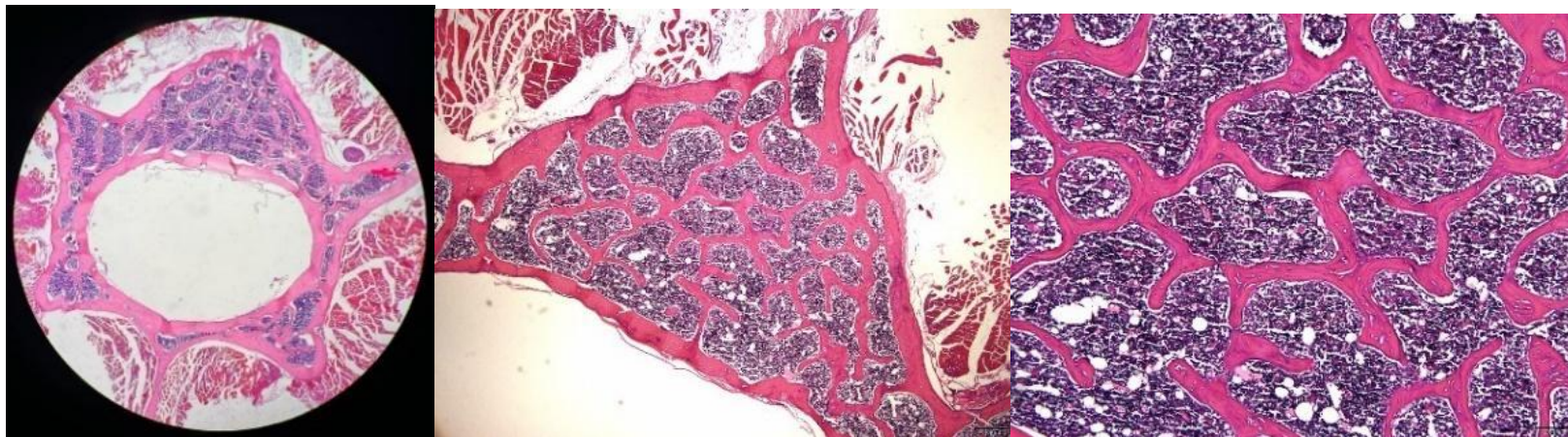
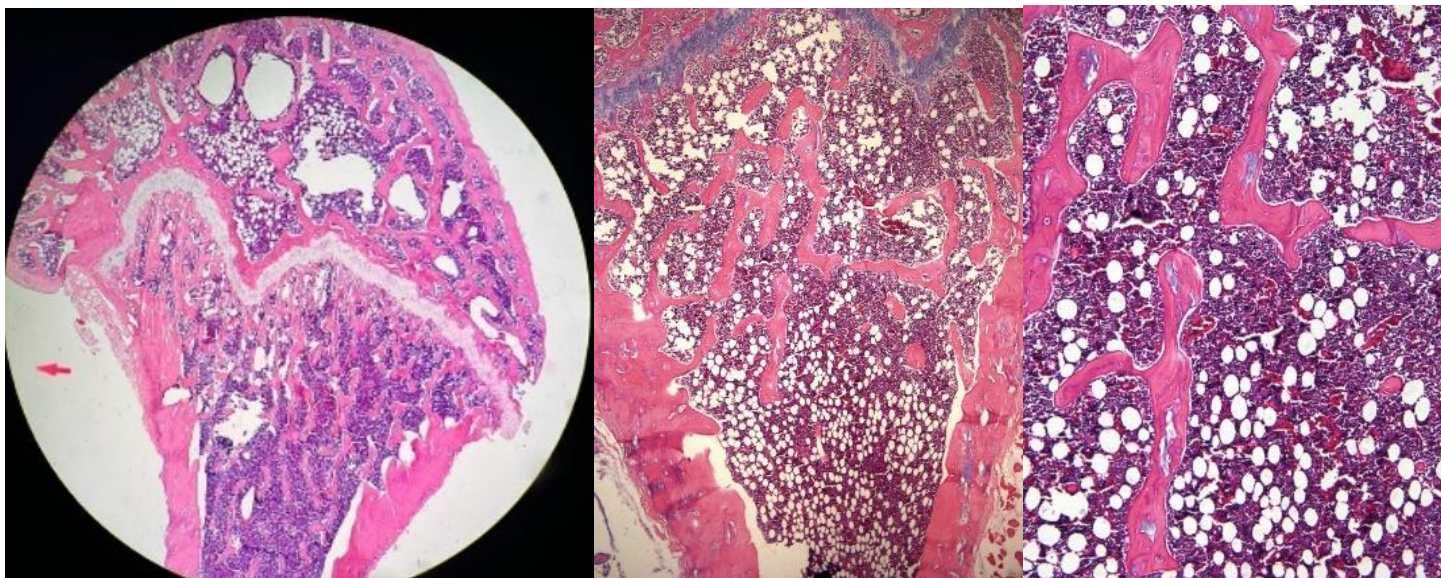


Figura 28 – Imagens histológicas do fêmur.



Um examinador treinado que estava cego para os diferentes tratamentos conduziu a análise histomorfométrica. Quatro seções equidistantes de cada espécime foram selecionadas de cada lâmina fotografadas pelo software CellR&CellRImaging Life Science Microscopy. Imagens na área de 3,5 x 2,5 mm contendo a região média do corpo vertebral e a região metaepifisária do fêmur distal esquerdo foram obtidas com ampliação de 35%.

4.9 ANÁLISE HISTOLOGISTAS

A análise foi realizada por 2 histopatologistas com experiência na área. Os avaliadores tiveram conhecimento limitado sobre a metodologia deste experimento e não sabiam qual eram os grupos que estavam avaliando. As amostras foram entregues para a avaliação em caixas identificadas com colorações em HE. A avaliação foi realizada de forma que os mesmos cortes foram analisados pelos avaliadores, sendo um avaliador por vez. Adicionalmente foi entregue para cada um deles uma pasta contendo a descrição das características histológicas e uma ficha padronizada para preenchimento. Foram utilizados os parâmetros da Tabela 4 para a avaliação. Estas duas características histopatológicas foram avaliadas e classificadas conforme a categorização da concordância do coeficiente de correlação intraclasse expresso na Tabela 5.

Tabela 4 – Características Histológicas

Características Histológicas	Score
Estrutura do osso trabecular e Quantidade do osso trabecular	0- Normal 90-100%
	1- Parcialmente reduzido 60-90%
	2- Marcadamente reduzido 30-60%
	3- Ausente 0-30%

Tabela 5 – Categorização da concordância do coeficiente de correlação intraclasse

Coeficiente de correlação intraclasse	Força da Concordância
<0,50	Pobre
0,50-075	Moderada
0,75-0,90	Boa
0,90-1,00	Excelente

4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA FIJI IMAGEJ

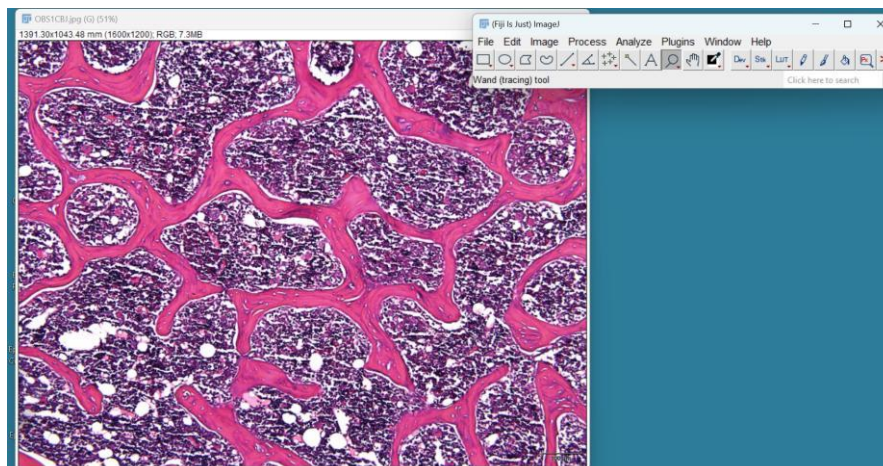
Foi realizada a análise histológica quantitativa do tecido ósseo trabecular na região da coluna lombar e do fêmur distal esquerdo, sendo que para cada animal foram feitos 10 cortes histológicos por bloco de modo a captar na lâmina histológica a estrutura do osso por completo. Após as colorações por HE, digitalizou-se 2 imagens por animal, sendo 8 animais por grupo, tendo, portanto, um total de 64 imagens por grupo. Após coloração, a análise quantitativa das áreas do volume ósseo total (BV), volume total de tecido (TV), volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido (BV/TV) (%), espessura trabecular (Tb. Th) e espaçamento trabecular (Tb. Sp) através do software “Fiji ImageJ” (version 1.51r; NIH, Maryland, USA) que capta as imagens reconhecendo a coloração do osso cortical, do osso esponjoso e da degeneração adiposa. Quantifica-se também a área em micrômetros (μm) após calibração da análise. Os valores médios foram calculados e comparados estatisticamente.

4.10.1 Protocolo Fiji ImageJ na histologia

O protocolo utilizado requer um sistema operacional de 32/64 bits (Li et al., 2023). Os scripts dependem de java e Fiji ImageJ (Malhan et al., 2018; Li et al., 2023). Portanto, qualquer sistema operacional (Windows/Mac/Linux) com versão atualizada do java pode ser usado para executar histomorfometria. O Fiji ImageJ (versão 1.54m) foi usado como plataforma para executar o programa e como base para obtenção dos tons da imagem (azul, vermelho e verde), obtenção das imagens binárias e cálculo dos parâmetros ósseos como espessura óssea trabecular (Tb. Th) e espaço ósseo trabecular (Tb. Sp). Enquanto, BoneJ foi usado como base para criar um segundo script otimizado para obter parâmetros como áreas do volume ósseo total (BV), do volume total de tecido (TV) e do volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido (BV/TV) (%) (Doubé et al., 2010). Passo a passo para o cálculo dos parâmetros:

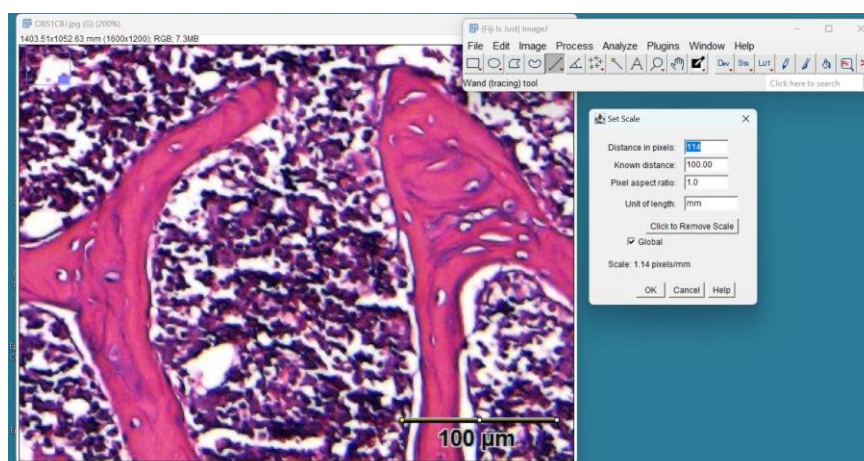
1. Abrir a imagem HE no software computacional “Fiji ImageJ” - versão 1.54m (domínio público – <https://imagej.net/software/fiji/downloads>) (Schindelin et al., 2012). Selecione a ferramenta “Wand” na barra de ferramentas. Clique no osso trabecular (Figura 29): Análise inicial.

Figura 29 – Análise inicial da imagem no software Fiji ImageJ



2. Abrir comandos de configuração: “Analyze” >> “Set Scale” e depois inserir a ampliação conhecida (“Known Distance”).
3. Utilização da ferramenta de linha reta para esboçar uma unidade de comprimento em micrômetros e clique em “Analyze” >> “Set Scale”. Defina a “Known distance” (mostrado na lâmina) - no canto inferior direito - e a “Pixel aspect ratio” para 1 e clique em “OK”. O ImageJ pode converter o comprimento do pixel para o comprimento da unidade no micrômetro. Observação: utilizada a objetiva de 10X com distância conhecida de 100 micrômetros (Figura 30): Calibração da imagem.

Figura 30 – Calibração da imagem

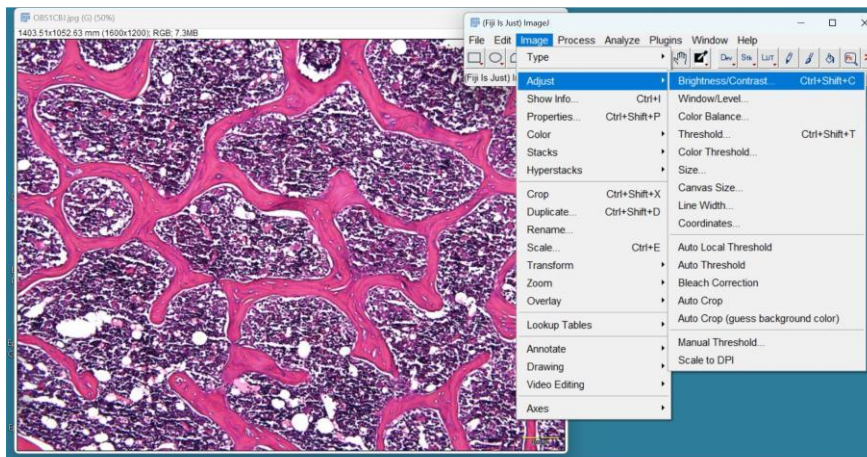


4. Ajustes da imagem (Figura 31):
 “Image” >> “Adjust” >> “Brithness” e “Contrast” (“Auto>>Apply”).
 “Image” >> “Adjust” >> “Window” e “Level” (“Auto>>Apply”).

“Process” >> “Smooth.”

“Process” >> “Enhance contrast.”

Figura 31 – Ajustes da imagem



5. Calibração dos parâmetros:

Vá para “Analyze” >> “Set Measurements”. Marcar “Area,” “Mean Gray Value,” “Standard Deviation,” e “Min & Max gray value.” Deixe todas as outras caixas desmarcadas e clique em “OK”.

6. Medição dos parâmetros:

Vá para “Analyze” >> “Measure”. Uma janela aparecerá com essas métricas para o ROI na sua caixa de seleção;

Vá para “Analyze” >> “Color Histogram”. Isso lhe dará os valores de cor vermelha, verde e azul em um formato de histograma e uma TABELA em uma janela “Results”; Na janela Resultados, vá para “Edit” >> “Copy”. Em seguida, em uma planilha do Excel na qual você está salvando os dados, cole-os lá com os rótulos apropriados.

7. Binarização da imagem:

Execute “Process” >> “Filters” >> “Gaussian Blur (2D)” com um sigma de 2.0;

Execute “Image” >> “Adjust” >> “Color Threshold”, selecione “Dark background” e “Stack histogram”, clique em “Auto” e depois em “Apply”;

Na janela “Convert Stack to Binary”, desmarque todas as caixas de seleção e selecione “Method: Default”, “Background: Dark”, clique em “OK”;

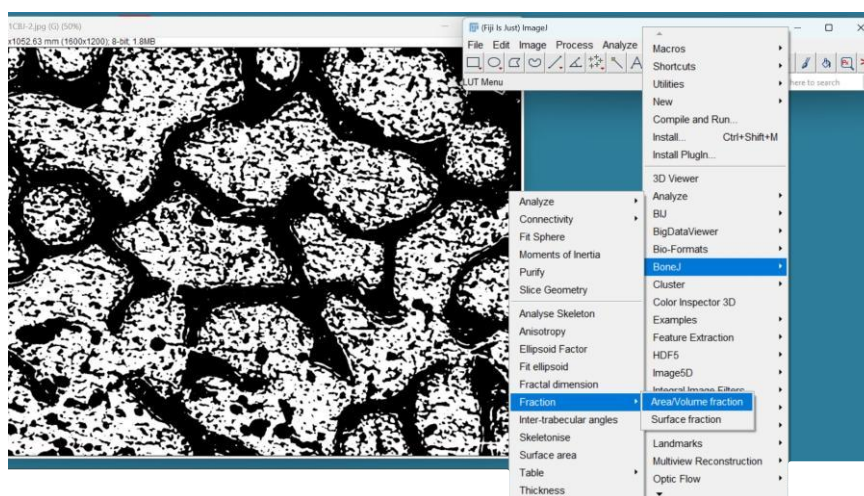
“Execute Process” >> “Binary” >> “Make Binary” para converter a imagem colorida em uma imagem binária.

8. Execução do BoneJ:

Executar “Plugins” >> “BoneJ” >> “Fraction” >> “Area/Volume Fraction” para calcular BV, TV e BV/TV;

Use o plugin “BoneJ” (Domander; Felder; Doube, 2021) no software para analisar parâmetros estruturais: Execute “Area/Volume Fraction” para calcular o volume ósseo para o volume total de tecido (BV/TV [%]). NOTA: Este método é aplicável para trabéculas ósseas e medula óssea, preenchendo todo o ROI nas imagens HE (Figura 32): Cálculo “plugin BoneJ” BV, TV e BV/TV.

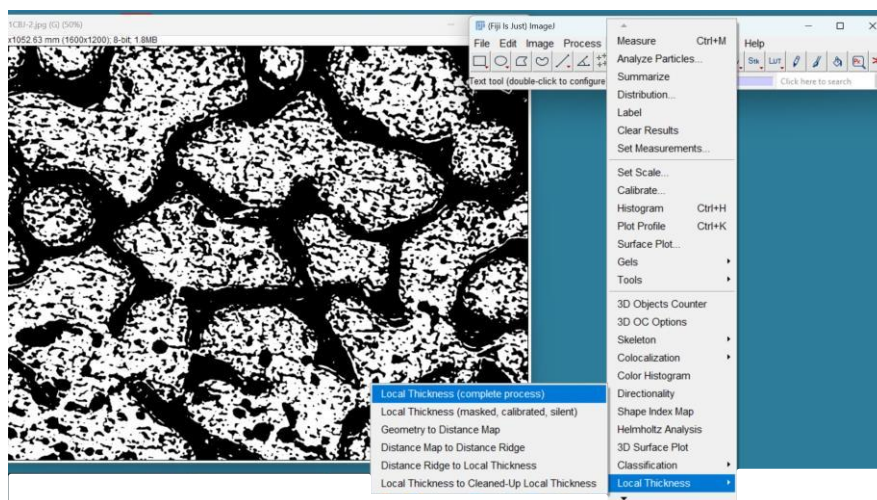
Figura 32 – Cálculo plugin BoneJ BV, TV e BV/TV



9. Calcular a espessura óssea trabecular (Tb. Th):

Utilizar Imagem em 8 bits. Utilizar as medições 2D de espessura com a versão interna do “Local Thickness” (use o campo de pesquisa na barra de tarefas ou pressione a tecla [L] e pesquise), que deve ser executada em suas imagens 2D ajustando círculos em vez de esferas. Os resultados são os valores em micrômetros da imagem rotulados pela calibração. Obter as estatísticas da imagem com os comandos de medição ou histograma (Schindelin, 2012) (Figura 33): Cálculo espessura óssea trabecular (Tb. Th).

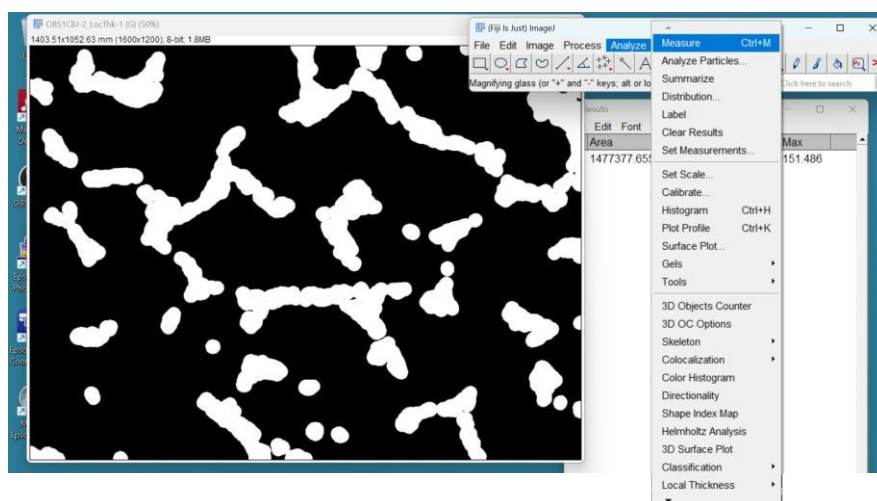
Figura 33 – Cálculo espessura óssea trabecular (Tb. Th)



10. Calcular o espaço ósseo trabecular (Tb. Sp):

Duplicar uma imagem, inverter para binário e calcular a “Local Thickness” novamente conforme descrito no item 9 (Schindelin, 2012) (Figura 34): Cálculo espaço ósseo trabecular (Tb. Sp).

Figura 34 – Cálculo espaço ósseo trabecular (Tb. Sp)



4.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES ÓSSEOS

4.11.1 Amostra do sangue

Com a obtenção do sangue do animal no momento da eutanásia foi realizada a dosagem de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina através do Equipamento cobas c111-Roche® com uso de kits para análise dos analitos mencionados.

4.12 TIPOS DE MEDIDAS DE RESULTADO

A avaliação radiográfica, tecidual e laboratorial em todos os grupos.

Avaliação dos animais ocorrerá após a OVX nos meses 1, 2 e 3 após as intervenções.

Desfechos: foram avaliadas as radiografias pela técnica Densitometria Radiográfica da Coluna e Fêmur Direito dos ratos durante os meses 1, 2 e 3 após OVX. Foram avaliados parâmetros laboratoriais (Ca, P e FA) e parâmetros histomorfométricos avaliação dos histologistas e Fiji ImageJ (BV, TV e BV/TV %, Tb. Th e Tb. Sp) nas amostras da coluna e do fêmur esquerdo de todos os animais durante o seguimento.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Komolgorov-Smirnov. O teste de Levene foi utilizado para investigar a homogeneidade das variâncias. Para testar a diferença entre os grupos em relação ao cálcio, fósforo e FA, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de um caminho, seguida do teste post-hoc de Bonferroni. A análise de covariância (ANCOVA) mista de duas vias foi usada para comparar o efeito de diferentes formulações sobre o peso e a densidade óssea da coluna e do fêmur dos ratos (entre fatores – 8 grupos, e dentro dos fatores – 3 pontos no tempo), utilizando o valor pré-teste como covariável. A esfericidade dos dados foi avaliada pelo teste de Mauchly, e os graus de liberdade foram ajustados usando a correção de Greenhouse-Geisser. Os efeitos principais e/ou interações significativas foram analisados por comparações múltiplas, com post hoc de Bonferroni. O tamanho do efeito foi calculado por eta ao quadrado parcial (η^2_p), com a magnitude considerada como: pequena - $\eta^2 = 0,01$; moderada - $\eta^2 = 0,05$; e grande - $\eta^2 = 0,25$. O tamanho do efeito (TE) nas comparações pareadas de médias foi calculado pelo d de Cohen, adotando a seguinte classificação: pequeno $< 0,50$; moderado $0,50-0,79$; grande $\geq 0,80$ (Cohen, 1992). O coeficiente de

correlação intraclass (CCI) foi usado para a análise da reprodutibilidade interobservadores, sendo adotada a seguinte classificação: ruim $< 0,50$, moderado $0,50$ a $0,75$, bom $0,75$ a $0,90$ e excelente $>0,90$ (Koo; Li, 2016). A análise estatística foi realizada através do software SPSS version 21.0 (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL, USA). O valor de $p < 0,05$ foi adotado para significância estatística (Cohen, 1992).

5 RESULTADOS

5.1 MODELO DE OSTEOPOROSE POR OVARECTOMIA (OVX)

O modelo experimental de osteoporose em ratas ovariectomizadas tem sido amplamente utilizado na pesquisa biomédica devido à sua capacidade de replicar os aspectos fisiopatológicos da osteoporose pós-menopáusia em humanos (Dai et al., 2014), bem como, na avaliação de potenciais tratamentos. Esse modelo se baseia na remoção cirúrgica dos ovários, o que simula a deficiência de estrogênio que ocorre em mulheres na pós-menopausa, principal causa da osteoporose nessa população (Luengo-Mateos et al., 2024).

Este estudo investigou as alterações ósseas, bioquímicas e estruturais em ratas submetidas à ovariectomia, contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos na perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio. Este trabalho utilizou 96 ratas primíparas em diferentes grupos experimentais. Desse total, somente dois animais foram perdidos após os procedimentos de radiografia mensal. Os animais SHAMRE 4 e SHAME 5 foram encontrados mortos nas gaiolas no dia seguinte às segundas radiografias.

5.1.1 Peso Corporal

Para a caracterização do modelo de Osteoporose, foram utilizadas 16 ratas primíparas, com idade variando entre 6 e 9 meses, as quais foram divididas em dois grupos, CONTROLE e OVX12.

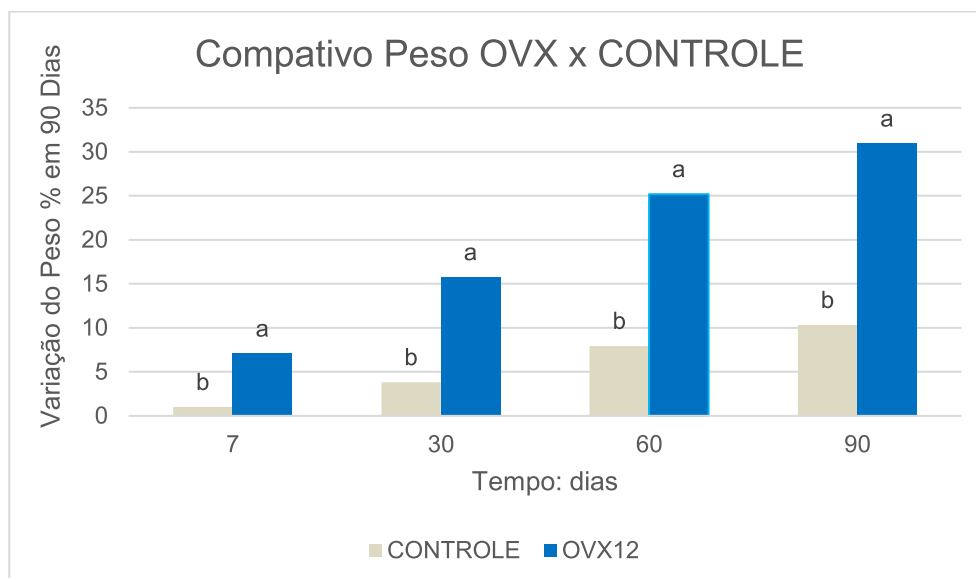
Os pesos dos animais são apresentados na Tabela 6 e Figura 35.

Tabela 6 – Média do Peso de Ratos em gramas dos grupos CONTROLE e OVX12 ao longo de 12 semanas.

GRUPOS	PRÉ-OP	4 SEMANAS	8 SEMANAS	12 SEMANAS
CONTROLE	182,44 ± 11,50	186,25 ± 12,33	190,38 ± 9,83	192,75 ± 12,80
Δ Peso	-	3,81	4,13	2,37
OVX12	211,31 ± 8,69	227,06 ± 11,00	236,5 ± 14,56	242 ± 15,89
Δ Peso	-	15,75	9,44	5,50

Dados expressos em média ± desvio padrão; Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, PRE-OP- pré-operatório.

Figura 35 – Gráfico comparativo do Aumento Percentual de Peso em Modelos OVX vs. CONTROLE ao Longo do Tempo.

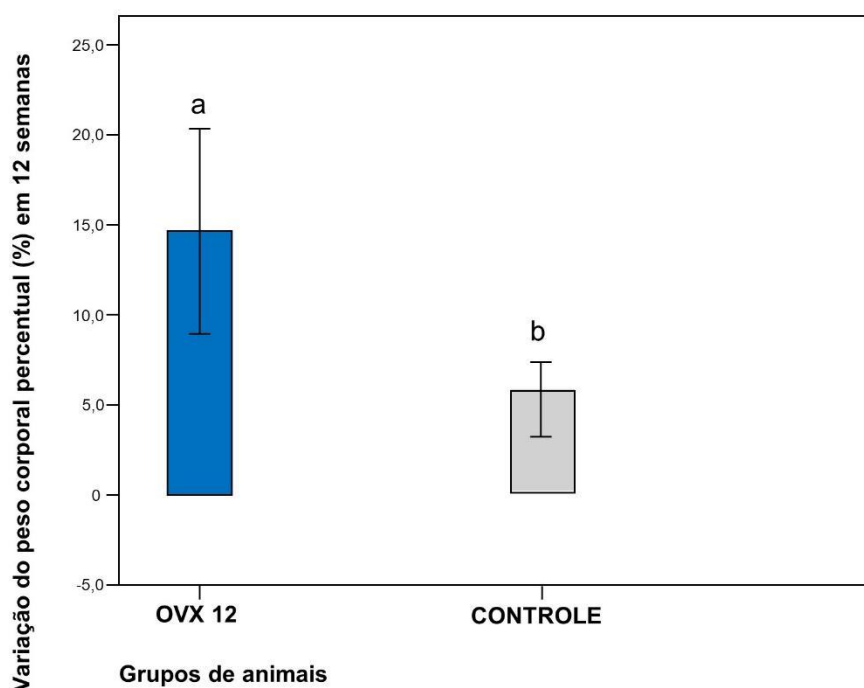


Letras diferentes (a,b) indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas.

Nossos dados, relacionados ao peso dos animais, demonstraram que os animais do grupo CONTROLE ganharam pouco peso ao longo do seguimento clínico das 12 semanas (Tabela 6). Por outro lado, os animais do grupo OVX12 apresentaram ganhos de pesos mais exuberantes. Observa-se um maior ganho de corpóreo decrescente ao longo do período analisado, ou seja, durante o primeiro mês, um ganho maior de peso, menor no segundo mês e uma pequena alteração no terceiro mês (Tabela 6).

Após o controle do peso dos animais para uniformização da análise das variáveis, observa-se uma variação positiva do peso corporal de 14,8% no grupo OVX12 conforme evidenciado na Figura 36.

Figura 36 – Gráfico demonstrando variação do Peso Corporal em 12 Semanas nos Grupos Controle e OVX expresso em média $\pm$ desvio padrão.



Letras diferentes (a, b) indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas.

5.1.2 Parâmetros de Marcadores Ósseos

Após a eutanásia dos animais, o sangue coletado foi submetido à análise de cálcio (Ca), fósforo (P) e fosfatase alcalina (FA). Os dados dos grupos OVX e CONTROLE são apresentados na Tabela 7. Podemos observar que o grupo CONTROLE apresentou maiores valores de Ca (11,37 mg/dl), P (5,99 mg/dl) e menores valores de FA (93,6 U/L). Enquanto os animais do grupo OVX apresentaram diminuição dos níveis de Ca (10,24 mg/dl) e P (3,85 mg/dl) e aumento dos valores de FA (140,61 U/L) fato que corrobora o incremento no metabolismo ósseo iniciado após a ovariectomia com mobilização de cálcio sérico e incremento da FA pelo aumento da atividade óssea (Saleh et al., 2020).

Tabela 7 – Valores do cálcio, fósforo e fosfatase alcalina nos grupos CONTROLE vs OVX expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

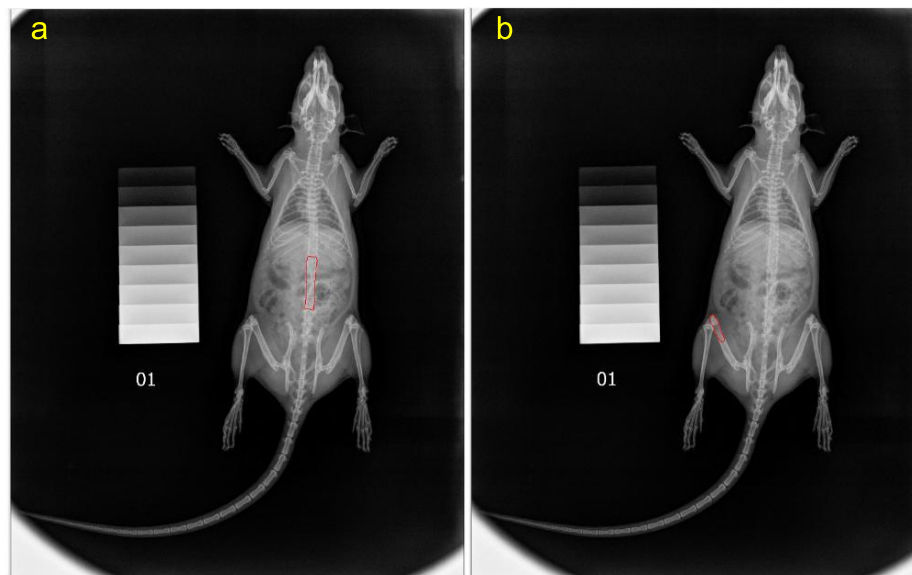
GRUPOS	CÁLCIO (mg/dl)	FÓSFORO (mg/dl)	FA (U/L)
CONTROLE	11,37 $\pm$ 2,01 ^b	5,99 $\pm$ 4,65	93,60 $\pm$ 14,96 ^b
OVX12	10,24 $\pm$ 0,24 ^a	3,85 $\pm$ 0,52	140,61 $\pm$ 28,58 ^a

*diferença estatística em relação ao grupo de referência, $p = 0,007$; letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, FA- Fosfatase alcalina.

5.1.3 Imagens Radiográficas

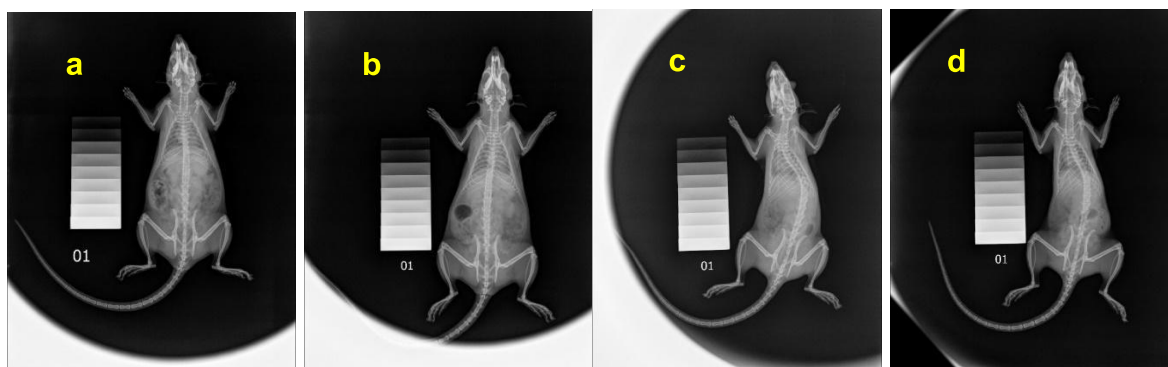
A análise dos exames de imagem levou em consideração um segmento da coluna contendo as 4 primeiras vértebras lombares e o terço distal do fêmur direito proximal à articulação do joelho conforme a Figura 37.

Figura 37 – Áreas de interesse marcadas nas radiografias para medição óssea coluna (a)- 4 primeiras vértebras lombares e fêmur direito (b)- terço distal do fêmur direito proximal à articulação do joelho.



A Figura 38 demonstra as imagens radiográficas de um representante de cada grupo CONTROLE e OVX12 no período pré-cirúrgico e 12 semanas de seguimento. Observa-se na Figura 38 que as alterações nos exames de imagem das ratas são pouco perceptíveis nas radiografias comparativas.

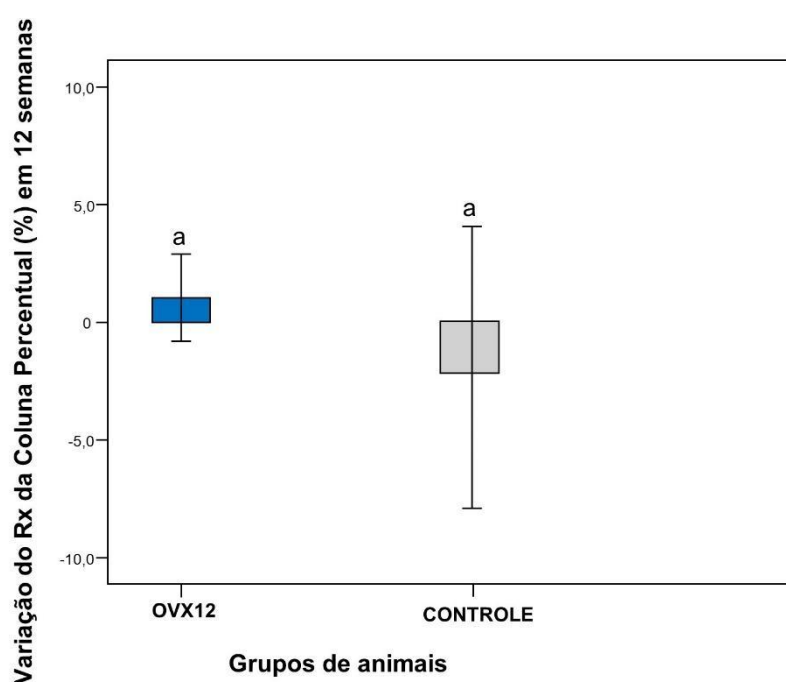
Figura 38 – Imagens das ratas de número 1 dos grupos OVX12 e CONTROLE pré-operatório e 12 semanas de seguimento.



Legenda: a- CONTROLE pre-op, b- CONTROLE pos-op, c- OVX12 pre-op, d- OVX12 pos-op. CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas. CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, PRE-OP- pré-operatório, POS-OP- pós-operatório

As análises dos exames de imagem de coluna dos animais do grupo OVX apresentaram alterações muito sutis na sua variação, somente 1,5% dessa medida ao longo das 12 semanas (Figura 39). Por outro lado, o grupo CONTROLE apresentou variação negativa nos exames de imagem com perda óssea, variação -2,5%.

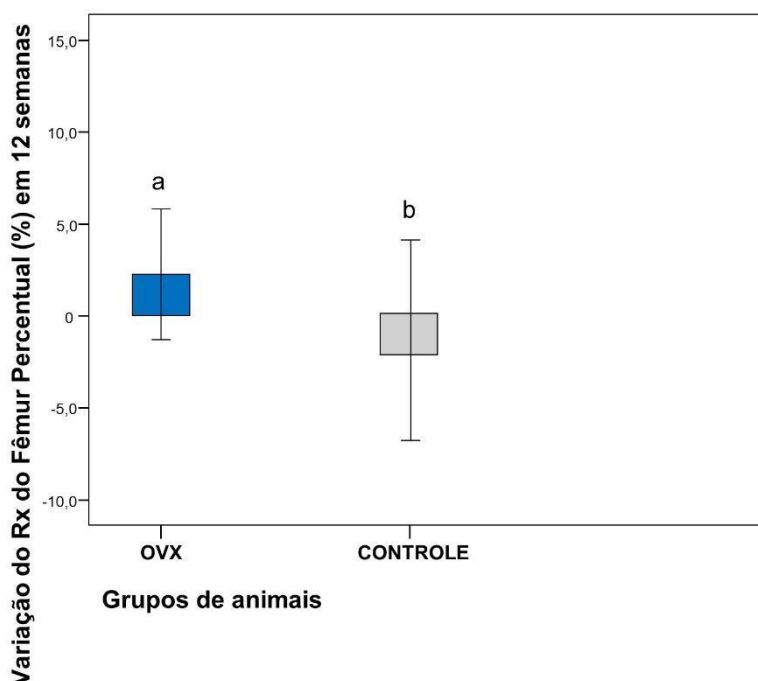
Figura 39 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias da Coluna nos Grupos OVX vs Controle ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão



Letras iguais (a) diferenças não significativas entre os grupos, $p > 0,05$. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas.

De maneira semelhante ao que aconteceu na coluna, os exames de imagem do fêmur do grupo OVX apresentou uma variação de 3,0% enquanto o grupo CONTROLE variou apresentou variação negativa de - 2,5%, porém nesse caso houve diferença estatística (Figura 40).

Figura 40 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias do Fêmur nos Grupos OVX vs Controle ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão

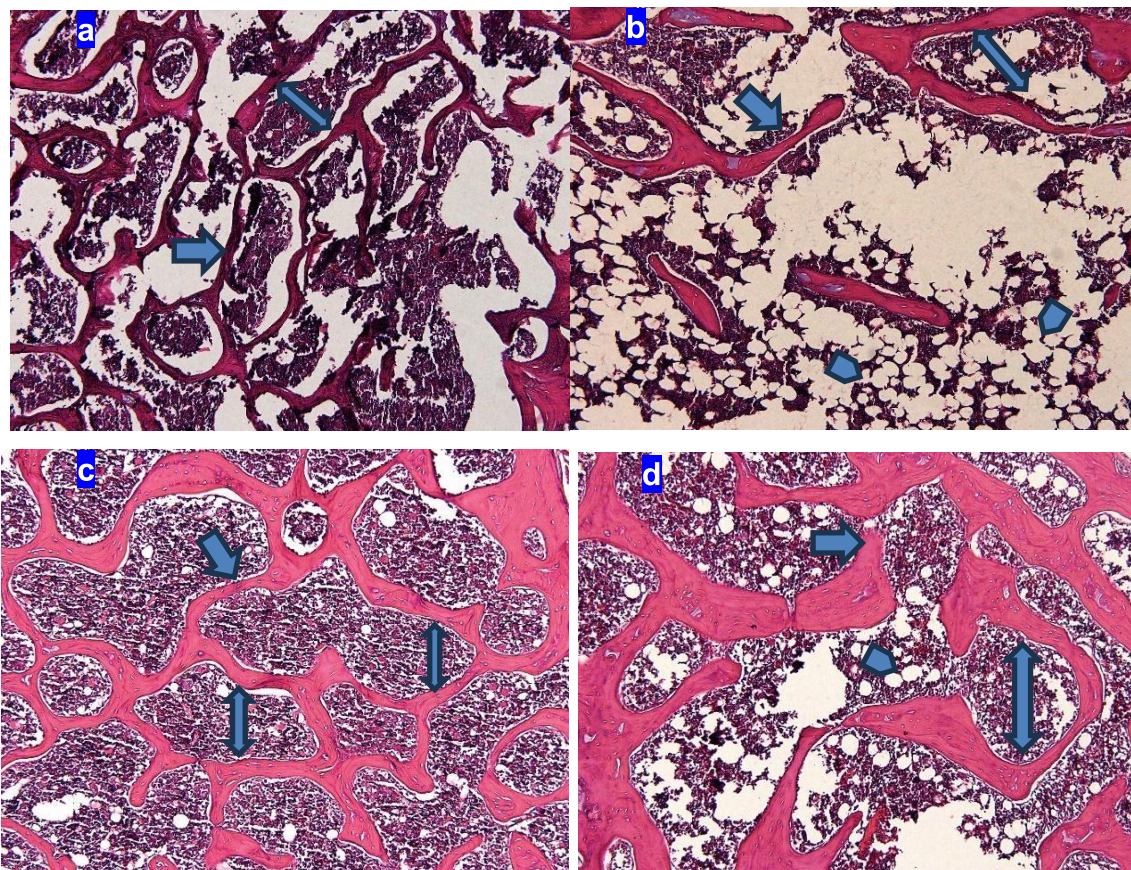


Letras diferentes (a, b) indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas.

5.1.4 Parâmetros Histológicos

A Figura 41 apresenta imagens histológicas representativas da coluna e do fêmur direito, à esquerda e à direita respectivamente o animal identificado número 1 dos grupos OVX12 (a e b) e CONTROLE (c e d). Observa-se nas imagens microscópicas da Figura 41 as trabéculas finas no grupo OVX (setas) e a degeneração adiposa mais intensa (cabeça de seta). Na figura inferior observam-se lâminas do grupo CONTROLE com estrutura trabecular e espaçamento mantidos.

Figura 41 – Imagens de microscopia ampliação 10x mostrando comparativo imagens da coluna à esquerda e do fêmur à direita dos grupos OVX12 (a e b) e CONTROLE (c e d).



Legenda: setas demonstrando a espessura cortical, setas duplas demonstrando espessamento cortical e cabeça de seta demonstrando degeneração gordurosa. Legenda: a- OVX12-Coluna, b- OVX12- Fêmur, c- CONTROLE- Coluna, d- CONTROLE- Fêmur, CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas.

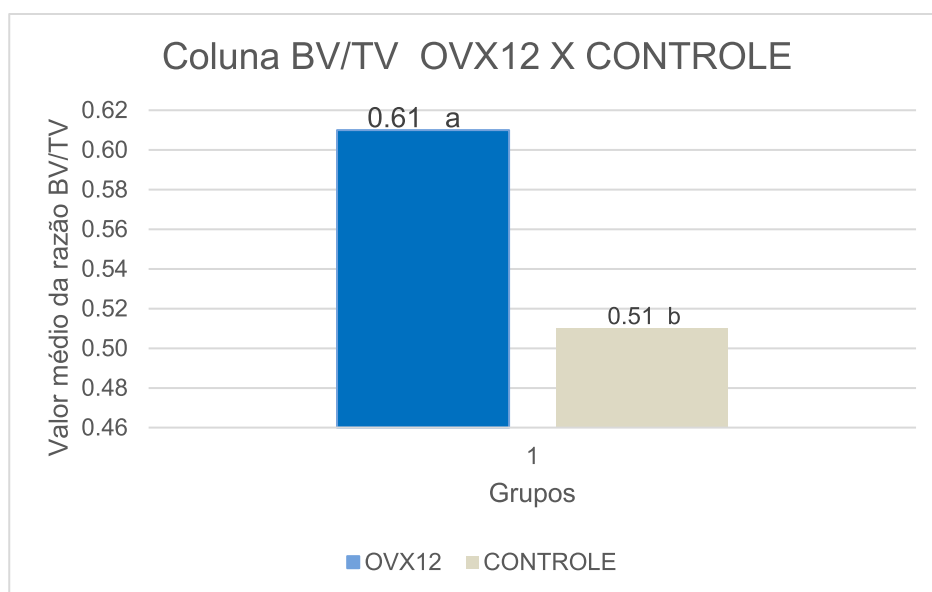
A análise óssea pelo Fiji ImageJ avaliando as imagens histológicas da coluna evidenciou que o BV no grupo CONTROLE apresentou uma média de $761.673,6 \mu\text{m}^2$. Esse valor foi abaixo daquele valor encontrado no grupo de animais OVX. A análise óssea pelo Fiji ImageJ avaliando as imagens histológicas da coluna do grupo OVX12 apresentou uma média de BV de $848.678,9 \mu\text{m}^2$ (Tabela 8). A razão BV/TV 58% no grupo OVX12 e 52% no grupo CONTROLE (Figura 42). Isso demonstra que os animais do grupo CONTROLE apresentam uma relação tecido ósseo e total de tecido abaixo de média dos animais ovariectomizados.

Tabela 8 – Histologia Coluna Fiji ImageJ- Indicadores Histológicos da Coluna de ratos CONTROLE e OVX12 expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

Grupos	BV μm^2	TV μm^2	BV/TV %	Tb. Th μm	Tb. Sp μm
CONTROLE	761673,6 $\pm$ 65767,7 ^b	1465665,6 $\pm$ 14844,7 ^b	0,52 $\pm$ 0,04 ^b	17,03 $\pm$ 11,54	160,70 $\pm$ 61,17
OVX12	848678,9 $\pm$ 124850,8 ^a	1468807,0 $\pm$ 9162,4 ^a	0,58 $\pm$ 0,97 ^a	10,00 $\pm$ 5,91	144,26 $\pm$ 98,84

Nas colunas, letras diferentes a,b indicam diferenças estatísticas entre grupos, $p < 0,05$ pelo teste post-hoc de Bonferroni; Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, BV- volume ósseo total, TV- volume total de tecido, BV/TV do volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido, Tb. Th- espessura óssea trabecular, Tb. Sp- espaço ósseo trabecular, μm - micrômetros.

Figura 42 – Gráfico da variação da razão entre Volume Ósseo e Total de tecido (BV/TV) na coluna dos grupos OVX12 e CONTROLE.



Letras diferentes a,b indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, BV- volume ósseo total, TV- volume total de tecido, BV/TV do volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido.

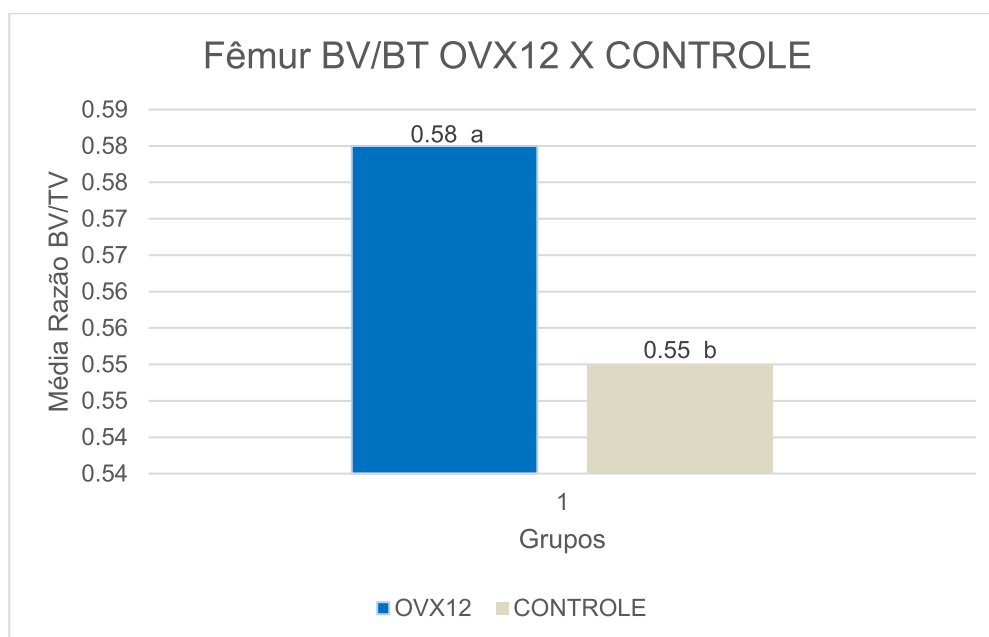
Por outro lado, a avaliação histológica do fêmur do grupo OVX comparado com o CONTROLE demonstrou uma média de BV de 851.318,4 μm^2 versus 810.806,4 μm^2 (Tabela 9). A variação da razão BV/TV 58% versus 55% (Figura 43). De forma semelhante ao que ocorre na coluna, os valores encontrados no fêmur dos animais do grupo CONTROLE são menores quando comparados aos que os encontrados no grupo OVX.

Tabela 9 – Histologia do Fêmur Fiji ImageJ- Indicadores Histológicos do Fêmur de ratos CONTROLE e OVX12 expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

Grupos	BV μm^2	TV μm^2	BV/TV %	Tb. Th μm	Tb. Sp μm
CONTROLE	810806,4 $\pm$ 113411,7 ^b	1468763,3 $\pm$ 0000,0 ^b	0,55 $\pm$ 0,08 ^b	11,20 $\pm$ 2,79	147,47 $\pm$ 58,04
OVX12	851318,4 $\pm$ 117685,0 ^a	1468763,3 $\pm$ 0000,0 ^a	0,58 $\pm$ 0,08 ^a	11,02 $\pm$ 3,88	135,89 $\pm$ 25,02

*diferença estatística em relação ao grupo de referência, $p = 0,007$; letras diferentes a,b indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, BV- volume ósseo total, TV- volume total de tecido, BV/TV do volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido, Tb. Th- espessura óssea trabecular, Tb. Sp- espaço ósseo trabecular, μm - micrômetros.

Figura 43 – Gráfico da variação da razão entre Volume Ósseo e Total de Tecido (BV/TV) no fêmur dos grupos OVX12 e CONTROLE.



Letras diferentes a,b indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, BV- volume ósseo total, TV- volume total de tecido, BV/TV do volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido.

5.2 RESULTADOS COMPARATIVO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

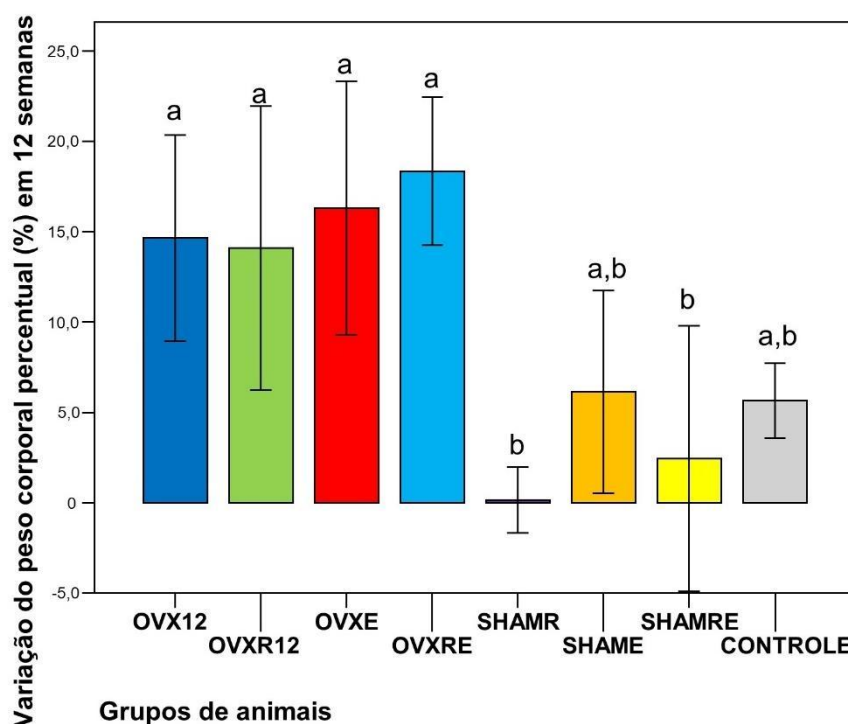
Foram avaliadas as radiografias pela técnica Densitometria Radiográfica da Coluna e do Fêmur Direito dos ratos durante os meses 1, 2 e 3 após ovariectomia (OVX). Foram apreciados parâmetros laboratoriais como a dosagens de cálcio (Ca), fósforo (P) e fosfatase alcalina (FA) e parâmetros histomorfométricos pelo software

Fiji ImageJ como volume ósseo total (BV), volume total de tecido (TV), volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido (BV/TV), espessura óssea trabecular (Tb. Th), espaço ósseo trabecular (Tb. Sp) nas amostras da coluna e do fêmur direito após a eutanásia e adicionalmente as lâminas histológicas foram submetidas avaliação de dois histologistas com experiência em tecido ósseo para o cálculo do coeficiente de correlação intraclasse (CCI).

5.2.1 Peso Corporal

Os resultados obtidos evidenciaram diferenças significativas no comportamento do peso corporal dos grupos experimentais ao longo das 12 semanas de acompanhamento. Os grupos ovariectomizados (OVX12, OVXE, OVXR, OVXRE) apresentaram os maiores ganhos percentuais de peso (entre 14,1% e 18,2%) ao longo do período (Figura 44). Esse resultado é esperado devido à relação conhecida entre a ovariectomia e alterações metabólicas, como o aumento do peso corporal causado pela ausência de hormônios ovarianos, que afetam a regulação energética e a deposição de gordura (Liu et al., 2024).

Figura 44 – Gráfico demonstrando variação do Peso Corporal em 12 Semanas nos diferentes grupos expresso em média $\pm$ desvio padrão.



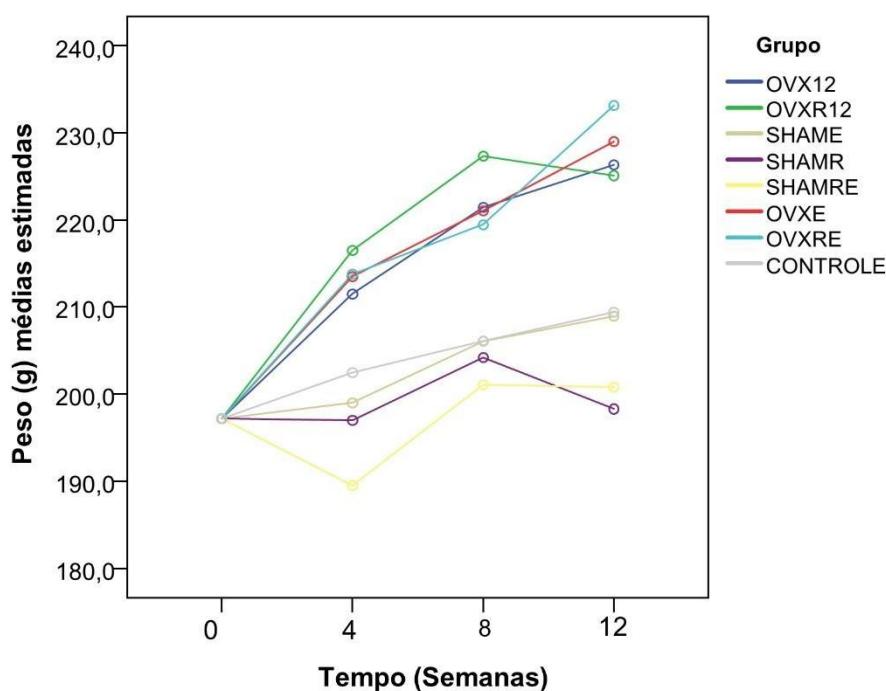
Letras diferentes (a, b) indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas.

O maior ganho foi observado no grupo OVXRE (18,2%), que combinou exercícios e medicação. Este resultado sugere um possível efeito sinérgico dessas intervenções na modulação do peso corporal, particularmente na preservação de massa magra e na redução relativa do ganho de massa adiposa (Medina-Contreras et al., 2020). Os grupos SHAM e CONTROLE apresentaram ganhos de peso modestos e semelhantes (1,8% a 6,2%), com destaque para os grupos SHAMRE (1,8%) e SHAMR (0,6%), que praticamente mantiveram o peso ao longo do experimento (Figura 44).

A análise ANCOVA indicou ausência de relação estatisticamente significativa entre os pesos inicial e final ($F_{2,106} = 0,300$; $p = 0,74$; $\eta^2 = 0,01$), reforçando que as variações observadas no peso não foram influenciadas pelas condições basais, mas sim pelas intervenções realizadas. O efeito de interação significativo entre os grupos e o tempo ($F_{14,106} = 4,666$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,38$) evidencia que os tratamentos

aplicados impactaram distintamente o padrão de variação de peso ao longo do tempo, independentemente do peso inicial. Esses resultados são representados de forma clara na Figura 45, bem como na Tabela 10.

Figura 45 – Gráfico de linhas representando a média ajustada dos grupos para a variável peso dos ratos ao longo de 12 semanas, considerando o peso pré-teste como covariável = 197,18g.



Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas.

Tabela 10 – Média do Peso de ratos em gramas ao longo de 12 semanas comparando diferentes grupos experimentais expresso em média $\pm$ desvio-padrão

GRUPOS	PRE-OP	4 sem	8 sem	12 sem
CONTROLE		202,48 $\pm$ 9,79	206,11 $\pm$ 12,15	209,43 $\pm$ 12,76
OVX		211,1 $\pm$ 9,70	221,42 $\pm$ 12,04	226,28 $\pm$ 12,64
OVXR		216,50 $\pm$ 8,72	227,31 $\pm$ 10,82	225,07 $\pm$ 11,36
OVXE	197,18	213,50 $\pm$ 9,40	221,04 $\pm$ 11,66	228,98 $\pm$ 12,24
OVXRE		213,74 $\pm$ 8,65	219,45 $\pm$ 10,73	233,09 $\pm$ 11,27
SHAMR		196,98 $\pm$ 8,89	204,19 $\pm$ 11,02	198,30 $\pm$ 11,58
SHAME		199,03 $\pm$ 9,51	206,06 $\pm$ 11,80	208,95 $\pm$ 12,39
SHAMRE		189,52 $\pm$ 9,92	201,05 $\pm$ 12,31	200,81 $\pm$ 12,93

Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio + Exercício - 12 semanas, PRE-OP- pré-operatório.

A Figura 45 e a Tabela 10 mostram que os grupos OVX's apresentaram aumentos consistentes de peso ao longo do tempo, enquanto os grupos SHAM's e CONTROLE apresentaram variações menos acentuadas, sugerindo uma menor resposta às condições metabólicas alteradas pela ovariectomia.

5.2.2 Parâmetros de Marcadores Ósseos

Os parâmetros laboratoriais analisados são apresentados na Tabela 11. Os animais do grupo ovariectomia apresentam diminuição dos níveis de Ca (10,24 mg/dl) e P (3,85 mg/dl), porém aumentaram os valores de FA (140,61 U/L) fato que corrobora o aumento metabolismo ósseo iniciado após a ovariectomia (Saleh et al., 2020). A ANOVA de um caminho mostrou diferenças estatísticas entre os grupos em relação aos valores de Ca ($F_{7,54} = 2,474$; $p = 0,03$) e FA ($F_{7,54} = 11,245$; $p < 0,001$). Quanto à FA, o grupo OVX e suas combinações apresentaram maiores valores em relação aos grupos SHAM e CONTROLE (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores do cálcio, fósforo e FA nos diferentes grupos expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

GRUPOS	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	FA (U/L)
CONTROLE	11,37 $\pm$ 2,01	5,99 $\pm$ 4,65	93,60 $\pm$ 14,96 ^b
OVX12	10,24 $\pm$ 0,24	3,85 $\pm$ 0,52	140,61 $\pm$ 28,58 ^a
OVXR12	10,30 $\pm$ 0,83	2,81 $\pm$ 1,56	148,69 $\pm$ 37,36 ^a
OVXE	10,25 $\pm$ 0,44	3,89 $\pm$ 0,94	118,52 $\pm$ 25,07 ^a
OVXRE	10,37 $\pm$ 0,46	3,99 $\pm$ 0,86	141,84 $\pm$ 20,97 ^a
SHAME	9,40 $\pm$ 1,21*	4,07 $\pm$ 0,93	81,83 $\pm$ 16,02 ^b
SHAMR	9,87 $\pm$ 0,84	4,64 $\pm$ 0,63	73,04 $\pm$ 22,42 ^b
SHAMRE	10,21 $\pm$ 0,46	4,44 $\pm$ 1,20	107,76 $\pm$ 17,85 ^b

*diferença estatística em relação ao grupo de referência, $p = 0,007$; letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, Ca- cálcio, P- fósforo, FA- Fosfatase alcalina.

O grupo CONTROLE apresentou os níveis mais elevados de cálcio (11,37 $\pm$ 2,01 mg/dl), indicando homeostase óssea preservada (Li et al., 2014). Nos grupos ovariectomizados (OVX e combinações), os níveis variaram de 10,24 $\pm$ 0,24 mg/dl a 10,37 $\pm$ 0,46 mg/dl, mostram uma leve redução em relação ao CONTROLE, mas com preservação relativa. Isso é esperado devido à mobilização óssea pós-ovariectomia (Saleh et al., 2020). A ANOVA revelou diferenças estatisticamente significativas entre grupos na avaliação dos níveis de Ca ($F_{7,54} = 2,474$; $p = 0,03$), sugerindo impacto dessas intervenções. A manutenção dos níveis de cálcio nos grupos ovariectomizados, apesar do aumento do turnover ósseo (indicado por FA elevada), pode indicar o papel de mecanismos compensatórios para a regulação do cálcio sérico, como absorção intestinal e mobilização óssea (Ali et al., 2023).

Em relação ao P, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($F_{7,54} = 1,755$; $p = 0,12$) (Tabela 11). O grupo CONTROLE apresentou os maiores níveis de fósforo (5,99 $\pm$ 4,65 mg/dl), enquanto os grupos OVX12 e suas combinações apresentaram níveis reduzidos, especialmente o grupo OVXR12 (2,81 $\pm$ 1,56 mg/dl).

A análise da FA demonstrou que os grupos OVX apresentaram os maiores níveis, com destaque para OVXR12 (148,69 $\pm$ 37,36 U/L) e OVXRE (141,84 $\pm$ 20,97 U/L), enquanto os grupos SHAM e CONTROLE apresentaram valores mais baixos (73,04 $\pm$ 22,42 U/L no SHAMR e 93,60 $\pm$ 14,96 U/L no CONTROLE). Diferenças estatísticas significativas foram encontradas entre os grupos para FA ($F_{7,54} = 11,245$;

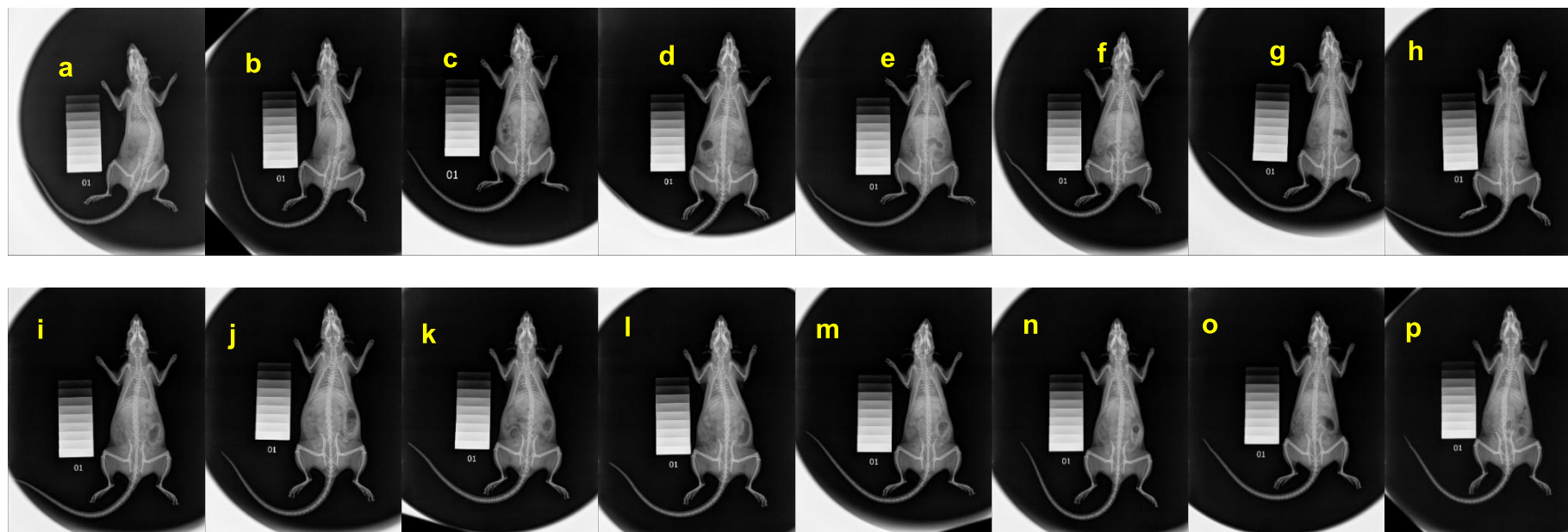
$p < 0,001$). O aumento da FA é consistente com a intensificação do turnover ósseo nos grupos ovariectomizados, refletindo maior atividade osteoblástica e remodelação óssea (Zhang et al., 2020).

5.2.3 Imagens Radiográficas

Neste estudo utilizamos a técnica de Densitometria Radiográfica (DR) (Antonietto, 2010) para avaliar as alterações ósseas em ratas ovariectomizadas submetidas a tratamentos com bifosfonatos e exercícios, permitindo a análise quantitativa e qualitativa da DMO e da microarquitetura óssea. Embora não possua a resolução tridimensional da microtomografia computadorizada, a DR é amplamente utilizada devido ao seu custo-benefício e à capacidade de monitorar alterações na DMO ao longo do tempo (Antonietto, 2010).

Abaixo seguem imagens dos animais de um exemplo do primeiro animal de cada grupo. Radiografias evidenciando a coluna e o fêmur dos animais: pré-operatório e 12 semanas de seguimento ao final do tratamento (Figura 46).

Figura 46 – Radiografia evidenciando o primeiro animal de cada grupo experimental: CONTROLE, OVX12, OVXR12, OVXE, OVXRE, SHAME, SHAMR e SHAMRE.



Legenda: a- CONTROLE pre-op, b- CONTROLE pos-op, c- OVX12 pre-op, d- OVX12 pos-op, e- OVXR12 pre-op, f- OVXR12 pos-op, g- OVXE pre-op, h- OVXE pos-op, i- OVXRE pre-op, j- OVXRE pos-op, k- SHAME pre-op, l- SHAME pos-op, m- SHAMR pre-op, n- SHAMR pos-op, o- SHAMRE pre-op, p- SHAMRE pos-op. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, PRE-OP- pré-operatório, POS-OP- pós-operatório.

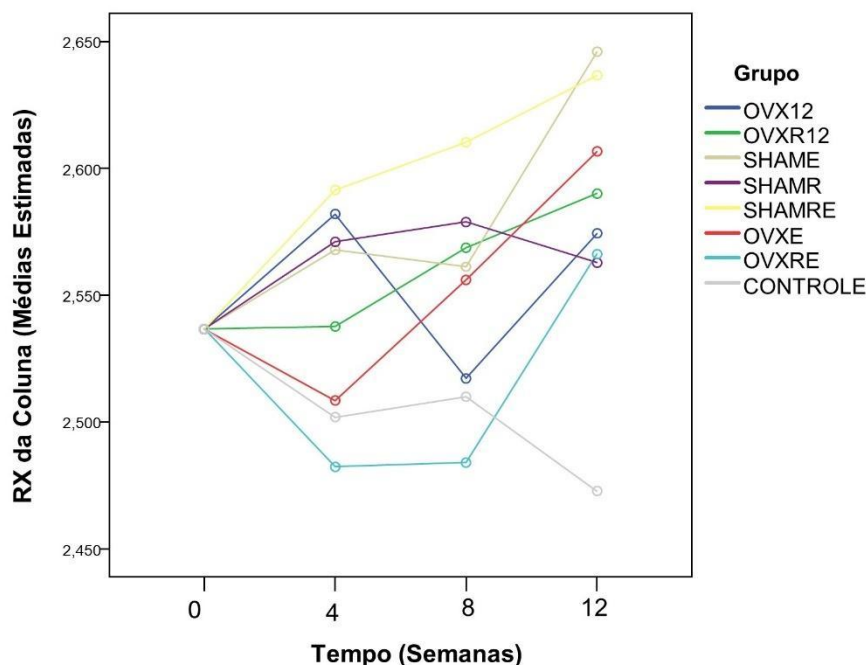
Em relação a análise das radiografias da coluna dos ratos, a ANCOVA mostrou que havia relacionamento entre os escores da radiografia (RX) da coluna do pré-teste e do pós-teste ($F_{2,106} = 4,120$; $p = 0,03$; $\eta^2 = 0,07$). As médias e o desvio-padrão ajustados estão apresentados na Tabela 12. Houve um efeito medida significativo, mostrando diferenças estatísticas nos RX da coluna dos ratos após 4, 8 e 12 semanas, depois que os escores do pré-teste foram controlados ($F_{2,106} = 3,950$; $p = 0,03$; $\eta^2 = 0,07$) (Figura 47). A análise de contraste mostrou maior valor no Raios-X da coluna após 12 semanas comparado ao valor pré-teste ($2,582 \pm 0,105$ vs. $2,537$, respectivamente; $p = 0,007$; $d = 0,43$), independente dos grupos.

Tabela 12 – Radiografias das colunas das ratas expressos em média $\pm$ desvio-padrão em milímetros de alumínio (mmAl) ao longo de 12 semanas de seguimento.

GRUPOS	PRÉ-OP	4 SEMANAS	8 SEMANAS	12 SEMANAS
CONTROLE		$2,502 \pm 0,100$	$2,510 \pm 0,131$	$2,473 \pm 0,103$
OVX12		$2,582 \pm 0,100$	$2,517 \pm 0,131$	$2,574 \pm 0,104$
OVXR12		$2,538 \pm 0,100$	$2,569 \pm 0,131$	$2,590 \pm 0,103$
OVXE	2,537	$2,509 \pm 0,100$	$2,556 \pm 0,131$	$2,607 \pm 0,103$
OVXRE		$2,482 \pm 0,101$	$2,484 \pm 0,132$	$2,566 \pm 0,104$
SHAME		$2,568 \pm 0,107$	$2,561 \pm 0,140$	$2,646 \pm 0,111$
SHAMR		$2,571 \pm 0,100$	$2,579 \pm 0,131$	$2,563 \pm 0,103$
SHAMRE		$2,592 \pm 0,107$	$2,610 \pm 0,140$	$2,637 \pm 0,110$

Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, PRÉ-OP- pré-operatório.

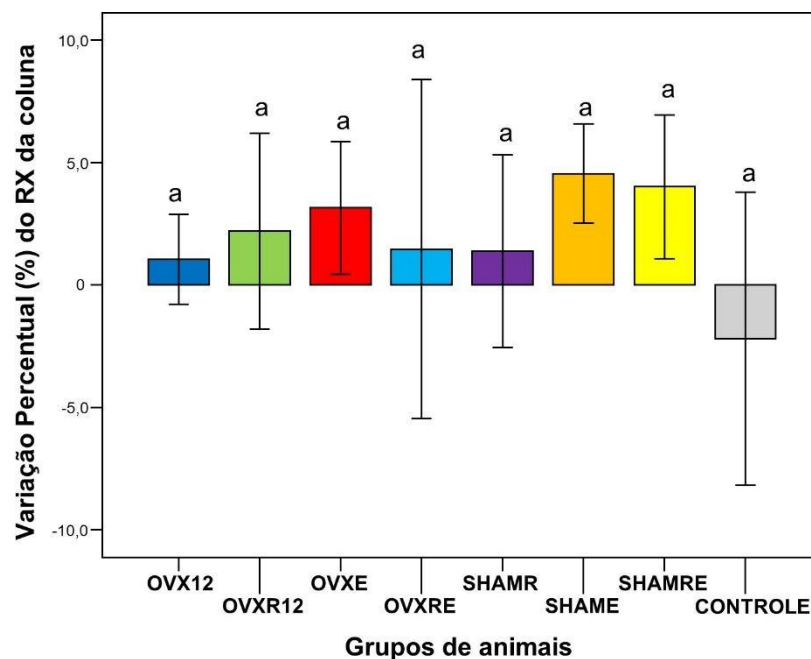
Figura 47 – Gráfico de linhas representando a média ajustada dos grupos para a variável Radiografia da Coluna dos ratos ao longo de 12 semanas, considerando a radiografia da coluna pré-teste como covariável = 2,537.



Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas.

Não foram observadas diferenças estatísticas na variação percentual ($\Delta\%$) do RX da Coluna dos ratos entre os grupos: OVX12 (1,5%), OVXR12 (2,1%), OVXE (2,8%), OVXRE (1,1%), SHAMR (1,0%), SHAME (4,3%), SHAMRE (3,9%) e CONTROLE (-2,5%) (Figura 48).

Figura 48 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias da Coluna nos diferentes grupos ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão.



Letras iguais diferenças não significativas entre os grupos, $p > 0,05$. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas.

Por outro lado, em relação a análise das radiografias do Fêmur dos ratos, a ANCOVA mostrou que havia relacionamento entre os escores do RX do fêmur do pré-teste e do pós-teste ($F_{2,106} = 0,380$; $p = 0,68$; $\eta^2 = 0,007$). As médias e o desvio-padrão ajustados estão apresentados na Tabela 13.

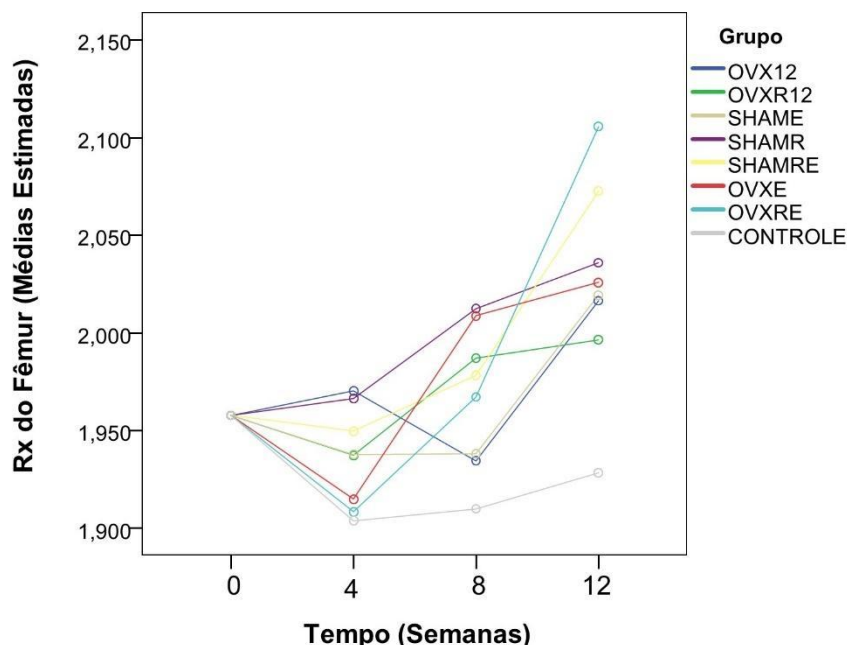
Tabela 13 – Radiografias dos fêmures das ratas expressos em média $\pm$ desvio-padrão em milímetros de alumínio (mmAl) ao longo de 12 semanas de seguimento.

GRUPOS	PRÉ-OP	4 SEMANAS	8 SEMANAS	12 SEMANAS
CONTROLE		1,904 $\pm$ 0,065	1,910 $\pm$ 0,064	1,928 $\pm$ 0,079
OVX12		1,970 $\pm$ 0,064	1,934 $\pm$ 0,063	2,016 $\pm$ 0,079
OVXR12		1,937 $\pm$ 0,066	1,987 $\pm$ 0,064	1,996 $\pm$ 0,081
OVXE	1,958	1,915 $\pm$ 0,065	2,009 $\pm$ 0,064	2,026 $\pm$ 0,080
OVXRE		1,908 $\pm$ 0,065	1,967 $\pm$ 0,064	2,106 $\pm$ 0,081
SHAME		1,938 $\pm$ 0,068	1,938 $\pm$ 0,067	2,019 $\pm$ 0,084
SHAMR		1,966 $\pm$ 0,064	2,012 $\pm$ 0,063	2,036 $\pm$ 0,079
SHAMRE		1,950 $\pm$ 0,068	1,978 $\pm$ 0,067	2,073 $\pm$ 0,084

Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, PRÉ-OP- pré-operatório.

Houve um efeito de interação significativo entre os grupos e as medidas em 4, 8 e 12 semanas, mostrando diferenças estatísticas depois que os escores do fêmur do pré-teste foram controlados ($F_{14,106} = 3,755$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,33$). Isso indica que a variação do fêmur dos ratos ao longo do tempo foi diferente entre os grupos (Figura 49).

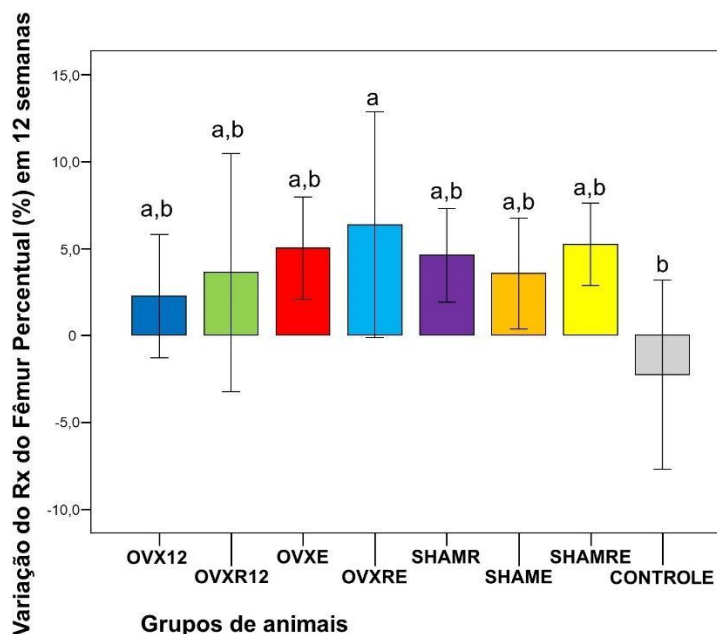
Figura 49 – Gráfico de linhas representando a média ajustada dos grupos para a variável Radiografias do Fêmur dos ratos ao longo de 12 semanas, considerando as radiografias da coluna pré-teste como covariável = 1,958.



Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas.

A variação percentual do RX do Fêmur dos ratos foi similar entre os grupos: OVX12 (3,0%), OVXR12 (1,9%), OVXE (3,5%), OVXRE (7,6%), SHAMR (4,0%), SHAME (3,1%), SHAMRE (5,9%) e CONTROLE (-1,5%), havendo, no entanto, maior ganho no grupo OVXRE em comparação ao grupo de referência (7,6% vs. -1,5%, respectivamente; $p = 0,01$) (Figura 50).

Figura 50 – Gráfico da variação Percentual dos Radiografias do Fêmur nos diferentes grupos ao longo de 12 Semanas expressos em valores de média $\pm$ desvio-padrão.

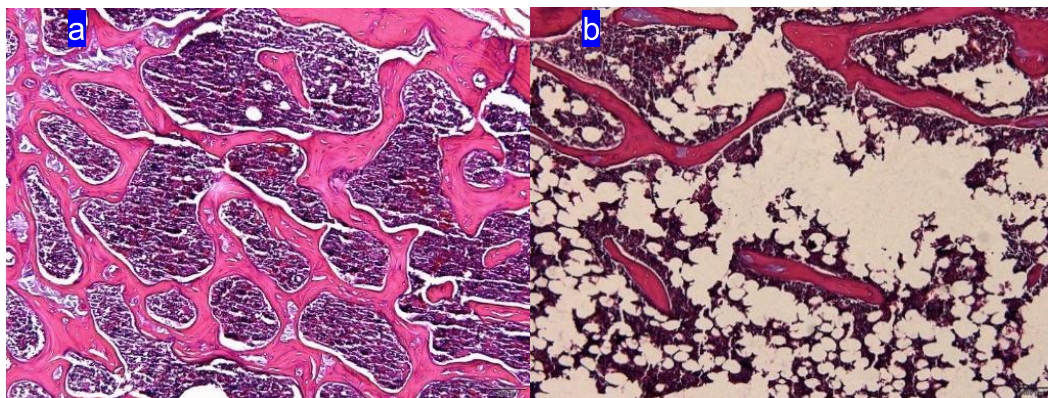


Letras diferentes (a, b) indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p > 0,05$. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas.

5.2.4 Parâmetros Histológicos

A análise histomorfométrica é uma ferramenta essencial para compreender as alterações estruturais e funcionais no tecido ósseo (Cho et al., 2018). Abaixo pode-se observar uma lâmina de microscopia demonstrando alterações ósseas típicas do processo osteoporótico: afilamento das trabéculas, diminuição da quantidade de trabéculas visualizadas, aumento do espaço entre as trabéculas, conectividade reduzidas e degeneração adiposa. Observam-se essas características mais pronunciadas no animal do grupo ovariectomia (OVX) (b) comparativo com animal do grupo CONTROLE (a) (Figura 51).

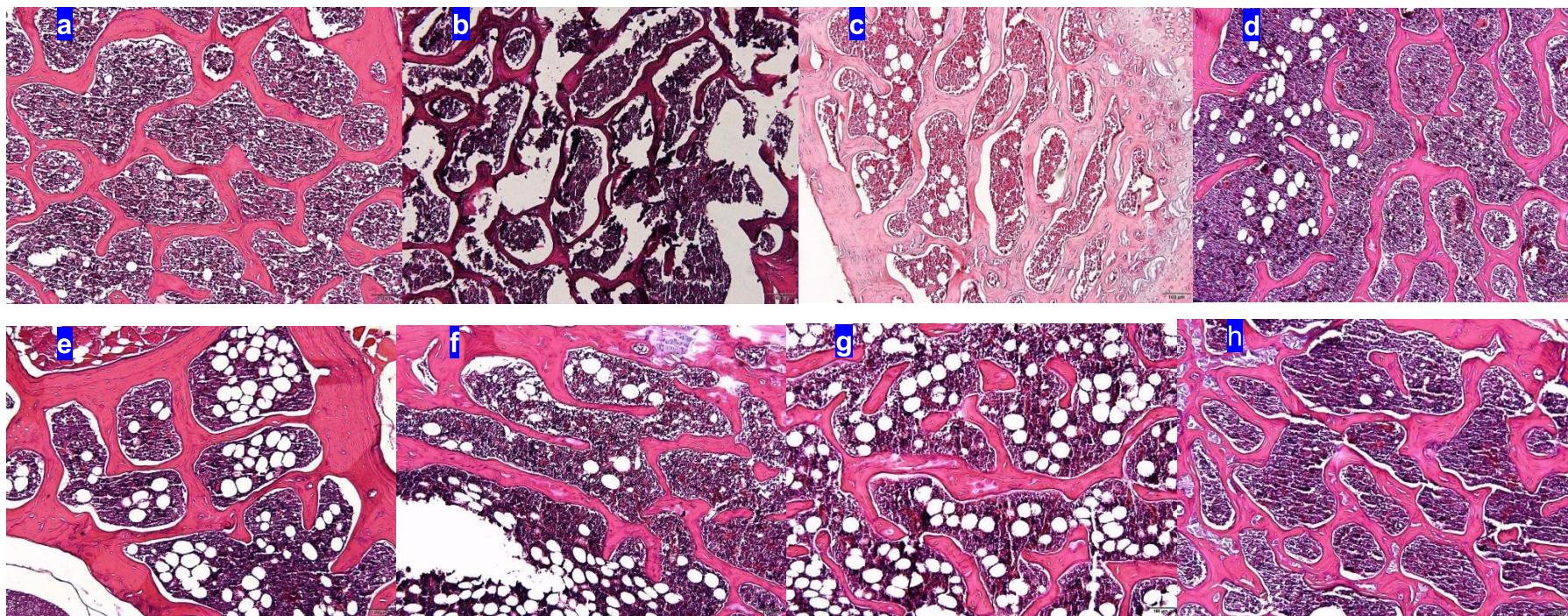
Figura 51 – Imagem histológica do osso aumento em 10X: osso com estrutura mantida (a) e osteoporose instalada (b)- trabéculas mais finas, diminuição da quantidade de trabéculas visualizadas, aumento do espaço entre as trabéculas, conectividade reduzidas e degeneração gordurosa intensa.



5.2.4.1 Coluna

Abaixo seguem imagens da coluna dos animais número 1 de cada grupo para comparação visual das alterações ósseas (Figura 52).

Figura 52 – Imagens de microscopia histológica em ampliação de 10x da coluna evidenciando o primeiro animal de cada grupo experimental: CONTROLE, OVX12, OVXR12, OVXE, OVXRE, SHAME, SHAMR e SHAMRE.



Legenda: a- CONTROLE, b- OVX12, c- OVXR12, d- OVXE, e- OVXRE, f- SHAME, g- SHAMR, h- SHAMRE, CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas.

A análise óssea pelo software Fiji ImageJ avaliando as imagens histológicas da coluna do grupo OVX apresentou uma média de BV de 848.678,9 μm^2 , com BV/TV 58% (Tabela 14). A ANOVA de um caminho mostrou diferenças estatísticas entre os grupos em relação aos indicadores histológicos da coluna: BV ($F_{7,54} = 3,358$; $p = 0,005$), TV ($F_{7,54} = 6,794$; $p < 0,001$) e Razão BV/TV ($F_{7,54} = 3,241$; $p = 0,006$) (Tabela 14). O grupo OVXRE apresentou maior escore no BV ($p = 0,02$) e na razão BV/TV ($p = 0,03$). O grupo OVXRE apresentou maior escore no TV quando comparado aos grupos ($p = 0,02$), OVXR12 ($p < 0,001$), OVXE ($p < 0,001$), SHAMR ($p = 0,007$) e SHAMRE ($p = 0,01$). Não houve diferença estatística entre o grupo OVX12 e os demais grupos OVX ($p > 0,05$). O grupo SHAME apresentou maior escore em relação aos grupos OVXR12 ($p = 0,006$) e OVXE ($p = 0,003$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em relação aos indicadores histológicos da coluna Tb. Th ($F_{7,54} = 1,472$; $p = 0,20$) e Tb. Sp ($F_{7,54} = 1,484$; $p = 0,19$) (Tabela 14).

Tabela 14 – Histologia Coluna Fiji ImageJ – Média $\pm$ Desvio-padrão de indicadores histológicos da coluna vertebral de ratos submetidos a diferentes tratamentos.

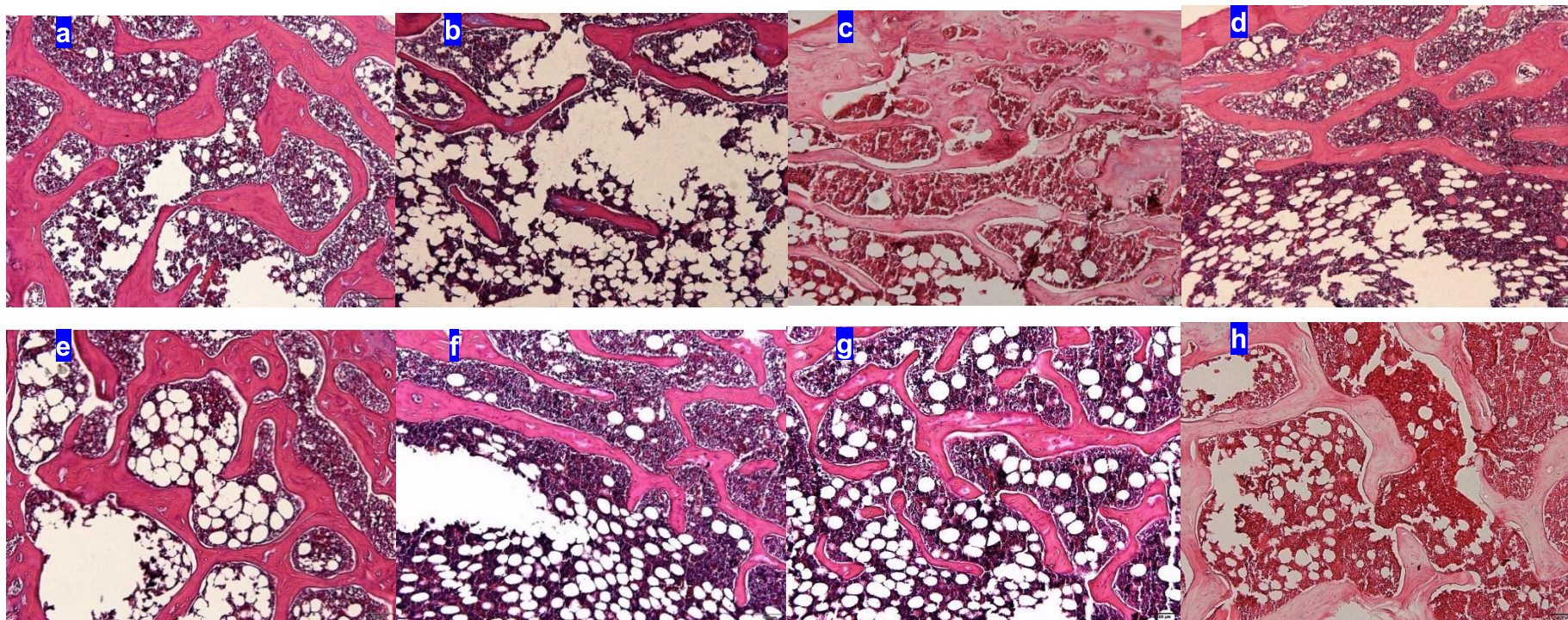
GRUPOS	BV μm^2	TV μm^2	Razão %	Tb. Th μm	Tb. Sp μm
CONTROLE	761673,6 $\pm$ 65767,7 ^a	1465665,6 $\pm$ 14844,7 ^{ac}	0,52 $\pm$ 0,04 ^a	17,03 $\pm$ 11,54	160,70 $\pm$ 61,17
OVX12	848678,9 $\pm$ 124850,8 ^{ab}	1468807,0 $\pm$ 9162,4 ^{abc}	0,58 $\pm$ 0,97 ^{ab}	10,00 $\pm$ 5,91	144,26 $\pm$ 98,84
OVXR12	903123,3 $\pm$ 84123,1 ^{ab}	1460769,8 $\pm$ 1508,4 ^a	0,62 $\pm$ 0,06 ^{ab}	12,04 $\pm$ 13,12	200,47 $\pm$ 55,46
OVXE	783114,7 $\pm$ 70451,5 ^{ab}	1460236,4 $\pm$ 0000,0 ^a	0,54 $\pm$ 0,05 ^{ab}	9,96 $\pm$ 1,95	123,78 $\pm$ 45,91
OVXRE	933789,1 $\pm$ 84321,2 ^b	1477365,0 $\pm$ 0000,0 ^b	0,63 $\pm$ 0,06 ^b	7,63 $\pm$ 1,24	197,85 $\pm$ 88,74
SHAME	786563,4 $\pm$ 137994,9 ^{ab}	1474300,6 $\pm$ 5376,9 ^{bc}	0,53 $\pm$ 0,09 ^{ab}	14,36 $\pm$ 5,53	220,41 $\pm$ 157,40
SHAMR	838319,9 $\pm$ 98917,4 ^{ab}	1464502,9 $\pm$ 0000,0 ^{ac}	0,57 $\pm$ 0,07 ^{ab}	9,53 $\pm$ 2,11	138,46 $\pm$ 17,98
SHAMRE	795680,4 $\pm$ 60785,6 ^{ab}	1464502,9 $\pm$ 0000,0 ^{ac}	0,54 $\pm$ 0,04 ^{ab}	9,85 $\pm$ 2,04	141,41 $\pm$ 42,49

Nas colunas, letras diferentes a,b,c indicam diferenças estatísticas entre grupos, $p < 0,05$ pelo teste post-hoc de Bonferroni; Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, BV- volume ósseo total, TV- volume total de tecido, BV/TV do volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido, Tb. Th- espessura óssea trabecular, Tb. Sp- espaço ósseo trabecular, μm - micrômetros, %- porcentagem.

5.2.4.2 Fêmur

Abaixo seguem imagens do Fêmur dos animais número 1 de cada grupo para comparação visual das alterações ósseas (Figura 53).

Figura 53 – Imagens de microscopia histológica em ampliação de 10x do fêmur evidenciando o primeiro animal de cada grupo experimental: CONTROLE, OVX12, OVXR12, OVXE, OVXRE, SHAME, SHAMR e SHAMRE.



Legenda: a- CONTROLE, b- OVX12, c- OVXR12, d- OVXE, e- OVXRE, f- SHAME, g- SHAMR, h- SHAMRE, CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas.

A análise óssea pelo Fiji ImageJ avaliando as imagens histológicas do fêmur pelo software demonstrou uma média de BV de 810.806,4 μm^2 , com BV/TV 55% (Tabela 15). A razão BV/TV 0,52 no grupo CONTROLE evidencia um valor abaixo de todos os outros grupos daquele valor encontrado nos animais ovariectomizados e SHAM demonstrando que a qualquer tipo de intervenção apresentam maior razão particularmente nos grupos de tratamento aditivo. A ANOVA de um caminho mostrou diferença estatística entre os grupos em relação aos indicadores histológicos do fêmur TV ($F_{7,54} = 3,468$; $p = 0,004$) (Tabela 15). O grupo SHAME apresentou maior escore em relação aos grupos ($p = 0,01$), OVX12 ($p = 0,01$), OVXR12 ($p = 0,006$) e SHAMR ($p = 0,009$) (Tabela 15). Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em relação aos indicadores histológicos do fêmur BV ($F_{7,54} = 2,102$; $p = 0,06$), Razão BV/TV ($F_{7,54} = 2,033$; $p = 0,07$), por outro lado os indicadores Tb. Th ($F_{7,54} = 2,099$; $p = 0,06$) e Tb. Sp ($F_{7,54} = 1,260$; $p = 0,29$) não apresentaram significâncias estatísticas (Tabela 15).

Tabela 15 – Histologia Fêmur Fiji ImageJ Média $\pm$ Desvio-padrão de indicadores histológicos do fêmur de ratos submetidos a diferentes tratamentos.

GRUPOS	BV μm^2	TV μm^2	Razão %	Tb. Th μm	Tb. Sp μm
CONTROLE	810806,4 $\pm$ 113411,7 ^a	1468763,3 $\pm$ 0000,0 ^{ac}	0,55 $\pm$ 0,08 ^a	11,20 $\pm$ 2,79	147,47 $\pm$ 58,04
OVX12	851318,4 $\pm$ 117685,0 ^{ab}	1468763,3 $\pm$ 0000,0 ^{abc}	0,58 $\pm$ 0,08 ^{ab}	11,02 $\pm$ 3,88	135,89 $\pm$ 25,02
OVXR12	938579,2 $\pm$ 74043,1 ^{ab}	1468258,2 $\pm$ 7295,5 ^a	0,64 $\pm$ 0,05 ^{ab}	7,93 $\pm$ 1,44	221,43 $\pm$ 89,40
OVXE	957350,1 $\pm$ 95650,8 ^{ab}	1475729,5 $\pm$ 3038,6 ^b	0,65 $\pm$ 0,06 ^b	8,97 $\pm$ 2,07	217,70 $\pm$ 110,21
OVXRE	933525,5 $\pm$ 96237,0 ^a	1470919,2 $\pm$ 0000,0 ^{bc}	0,63 $\pm$ 0,06 ^{ab}	8,62 $\pm$ 2,10	172,02 $\pm$ 55,27
SHAME	840975,9 $\pm$ 123041,7 ^{ab}	1470919,2 $\pm$ 0000,0 ^{ac}	0,57 $\pm$ 0,08 ^{ab}	11,64 $\pm$ 3,68	160,94 $\pm$ 45,98
SHAMR	913161,5 $\pm$ 137843,9 ^{ab}	1468527,9 $\pm$ 6760,8 ^{ac}	0,62 $\pm$ 0,09 ^{ab}	8,29 $\pm$ 3,35	171,90 $\pm$ 75,55
SHAMRE	940198,5 $\pm$ 75067,4 ^{ab}	1470912,1 $\pm$ 0000,0 ^{ac}	0,64 $\pm$ 0,05 ^{ab}	8,45 $\pm$ 2,91	182,58 $\pm$ 111,81

*diferença estatística em relação ao grupo de referência, $p = 0,007$; letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Legenda: CONTROLE- referência (nenhuma intervenção) - 12 semanas, OVX12- Ovariectomia - 12 semanas, OVXR12- Ovariectomia + Risedronato de Sódio - 12 semanas, OVXE- Ovariectomia + Exercício - 12 semanas, OVXRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, SHAME- cirurgia simulada + Exercício - 12 semanas, SHAMR- Cirurgia Simulada + Risedronato de Sódio - 12 semanas, SHAMRE- Ovariectomia + Risedronato de Sódio+ Exercício - 12 semanas, BV- volume ósseo total, TV- volume total de tecido, BV/TV do volume ósseo total dividido pelo volume total de tecido, Tb. Th- espessura óssea trabecular, Tb. Sp- espaço ósseo trabecular, μm - micrômetros, %- porcentagem.

Outra avaliação histológica das lâminas foi realizada através da observação das lâminas pelos histopatologistas (Apêndice 1). Esse foi um questionário padronizado e entregue aos mesmos para apreciação da microscopia. Após a análise das respostas foi realizada uma avaliação do coeficiente de correlação intraclasse (CCI). Isso foi evidenciado na Tabela 16, relacionando-se os resultados apresentados com a concordância Inter avaliadores na análise de lâminas histológicas dos animais submetidos a diferentes tratamentos. Essa inspeção é essencial para garantir a confiabilidade das classificações e minimizar vieses interpretativos.

Tabela 16 – Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) aleatório de duas vias e intervalo de confiança de 95% (IC95%) da concordância absoluta interobservador (n = 2) das classificações histológicas por região.

Região	CCI	IC95%	Classificação (IC95%)
Coluna (n = 62)	0,72	(0,52 – 0,84)	Moderada (Moderada – Boa)
Fêmur (n = 62)	0,74	(0,50 – 0,86)	Moderada (Moderada – Boa)
Todas (n = 124)	0,77	(0,67 – 0,84)	Boa (Moderada – Bom)

6 DISCUSSÃO

A osteoporose é uma doença metabólica do osso definida pela diminuição da densidade mineral óssea e pela degradação da organização da matriz óssea, resultando em maior fragilidade com risco aumentado de fraturas (Cho et al., 2018; Khan et al., 2024) e diretamente relacionado ao aumento da mortalidade (Hart et al., 2017). A doença decorre de um desequilíbrio no remodelamento ósseo, com predomínio da reabsorção óssea mediada por osteoclastos sobre a formação óssea pelos osteoblastos (Khan et al., 2024). Esse processo está intrinsecamente ligado a fatores hormonais, genéticos e ambientais (Schini et al., 2023). A deficiência de estrogênio, especialmente em mulheres pós-menopáusicas, é um fator crítico que acelera a perda óssea, conforme destacado por Rachner, Khosla e Hofbauer (2011). Além disso, mecanismos moleculares, como a ativação excessiva da via RANK/RANKL/OPG, desempenham um papel central na regulação do ciclo de remodelação óssea (Tobeiha et al., 2020).

É aconselhável que todas as mulheres no período pós-menopausa devam continuar ou adotar medidas gerais de estilo de vida para abrandar a perda óssea (James; Carroll, 2006). Medidas de estilo de vida incluem ingestão adequada de cálcio, de vitamina D e exercícios físicos (Leboff et al., 2022). As mulheres também devem receber aconselhamento sobre prevenção de quedas e, se possível, evitar medicamentos que aumentem a perda óssea (por exemplo, glicocorticóides) (Leboff et al., 2022).

As intervenções terapêuticas para tratamento da osteoporose incluem abordagens farmacológicas e modificações no estilo de vida (Grossman et al., 2018). Os bisfosfonatos, como o risedronato e o ácido zoledrônico, permanecem a base do tratamento devido à eficácia na redução de fraturas vertebrais e não vertebrais (Gehrke et al., 2023). A escolha da terapia deve ser baseada na eficácia, na segurança, no custo, na conveniência e no risco de fratura do indivíduo (Eastell et al., 2019). Alendronato, ácido zoledrônico, risedronato, ibandronato, denosumabe, abaloparatida, teriparatida, romosozumabe, raloxifeno, bazedoxifeno, lasofoxifeno, estrogênio com progesterona, tibolona e calcitonina reduziram o risco de fraturas vertebrais (Adler et al., 2016). Os agentes anabólicos (teriparatida, abaloparatida, romosozumabe) (Adler et al., 2016; Genant et al., 2017; Kendler et al., 2018) e denosumabe tiveram a maior eficácia relativa, embora poucos ensaios tenham

comparado diretamente os medicamentos para prevenção de fraturas (McClung et al., 2012).

O uso de bifosfonatos orais como o alendronato ou o risedronato, semanal ou mensal, apresenta vantagens devido à sua eficácia, custo favorável e disponibilidade de dados de segurança de longo prazo (Halasi et al., 2018; Camacho et al., 2020; Leboff et al., 2022). Além disso o risedonato apresenta eficácia na redução de fraturas vertebrais e de quadril e evidências que mostram benefício residual na fratura após a conclusão de um curso de terapia de cinco anos (Ke et al., 2021). As limitações dos bisfosfonatos orais incluem o regime de dosagem complexo e a baixa adesão de longo prazo à terapia (Fontalis; Eastell, 2020). Bifosfonatos orais não devem ser usados como terapia inicial em pacientes com distúrbios esofágicos (acalasia, esclerodermia envolvendo o esôfago, estenoses esofágicas), incapacidade de seguir os requisitos de dosagem (por exemplo, manter-se assentado ou de pé por pelo menos 30 a 60 minutos após a ingestão do comprimido) ou doença renal crônica avançada (Kendler et al., 2018). Bifosfonatos orais também devem ser evitados após certos tipos de cirurgia bariátrica em que anastomoses cirúrgicas estão presentes no trato gastrointestinal (por exemplo, bypass gástrico em Y de Roux) (Kendler et al., 2018). Contudo, novas terapias emergem como alternativas promissoras, como os agentes anabólicos, estimulantes da formação óssea (Adler et al., 2016).

Agentes anabólicos não são considerados terapia inicial para a maioria dos pacientes. Possíveis candidatos para agentes anabólicos incluem mulheres na pós-menopausa com qualquer um dos seguintes: risco muito alto de fratura, fratura por fragilidade prévia, contraindicações ou intolerância a quaisquer bifosfonatos e fratura por fragilidade e/ou declínio na DMO com outros agentes para osteoporose apesar da adesão ao tratamento (Eastell et al., 2019; Shoback et al., 2020). Os principais medicamentos anabólicos utilizados atualmente são a teriparatida, a abaloparatida e o romosozumabe (Shoback et al., 2020). A teriparatida, um fragmento do paratormônio humano recombinante (PTH 1-34), atua estimulando diretamente os osteoblastos e promovendo a formação óssea (Rooney et al., 2020). Protocolos clínicos evidenciam que a teriparatida aumenta a densidade mineral óssea (DMO) na coluna vertebral e reduz significativamente o risco de fraturas vertebrais e não vertebrais (Oliveira et al., 2021). A teriparatida tem um longo histórico de segurança, enquanto existem menos dados para o uso a longo prazo da abaloparatida (Kendler et al., 2018). O romosozumabe induz uma resposta de DMO maior do que a

abaloparatida ou a teriparatida, mas a experiência clínica é limitada e os efeitos colaterais a longo prazo são incertos (Kendler et al., 2018). A teriparatida e a abaloparatida são administradas como uma injeção subcutânea diária (Kendler et al., 2018). O romosozumabe é administrado por um profissional de saúde uma vez por mês com duas injeções subcutâneas (Kendler et al., 2018).

De forma similar, a abaloparatida, um análogo do PTHrP (proteína relacionada ao paratormônio), mostrou resultados positivos em ensaios clínicos, com menores riscos de fratura e perfil de segurança favorável em comparação à teriparatida (Miller et al., 2016). A maior especificidade da abaloparatida pelo receptor PTH1 contribui para uma menor estimulação da reabsorção óssea, o que a torna uma alternativa viável para populações específicas (Miller et al., 2016).

O denosumabe é um anticorpo monoclonal humano que inibe o RANKL e apresenta destacada importância na regulação da atividade osteoclástica (Cummings et al., 2009). Ao bloquear o RANKL, o denosumabe reduz a diferenciação, a função e a sobrevivência dos osteoclastos, resultando em uma diminuição significativa da reabsorção óssea (Cummings et al., 2009; McClung et al., 2012). O denosumabe é uma alternativa aos bifosfonatos orais para mulheres com alto risco de fratura que têm dificuldade com os requisitos de dosagem da medicação (Li et al., 2021). No entanto, o risco aumentado de fratura vertebral é evidente após a descontinuação do denosumabe, portanto, a necessidade de tratamento indefinido deve ser abordada com os pacientes antes do início do denosumabe (Cummings et al., 2009).

O romosozumabe, por sua vez, representa uma abordagem inovadora ao inibir a esclerostina, uma proteína secretada pelos osteócitos que regula negativamente a formação óssea (Saag et al., 2017). Ensaios clínicos demonstraram que o romosozumabe não apenas aumenta a formação óssea, mas também reduz a reabsorção, promovendo melhorias significativas na DMO e redução no risco de fraturas vertebrais e de quadril (Saag et al., 2017). No entanto, efeitos colaterais, como eventos cardiovasculares, requerem monitoramento rigoroso (Saag et al., 2017).

O tratamento com teriparatida/abaloparatida é geralmente limitado a 18 a 24 meses e com romosozumabe a 12 meses (Leboff et al., 2022). No entanto, o tratamento com teriparatida pode ser continuado após 24 meses em indivíduos selecionados se o risco de fratura permanecer alto (Leboff et al., 2022). Após a terapia inicial com um agente anabólico ser descontinuada, os pacientes devem ser tratados com um agente antirreabsortivo (de preferência um bifosfonato) para preservar os

ganhos na DMO da terapia anabólica (Kendler et al., 2018). Para mulheres que não conseguem tolerar bifosfonatos orais ou IV, denosumabe ou raloxifeno são alternativas (Leboff et al., 2022). O risco aumentado de fratura vertebral se desenvolve logo após a descontinuação do denosumabe, portanto, a necessidade de administração indefinida deve ser discutida com os pacientes antes de seu início (Leboff et al., 2022).

A administração de suplementos de cálcio e vitamina D é de suma importância para a manutenção da homeostase mineral e da saúde óssea, otimizando os efeitos das terapias farmacológicas (Grossman et al., 2018). O aumento da ingestão de laticínios ou alimentos ricos em cálcio devem ser encorajado se a ingestão dietética de cálcio estiver abaixo dos níveis recomendados (Sahni et al., 2014). Além disso, a ingestão total de cálcio (dieta mais suplementos) não deve exceder rotineiramente 2000 mg/dia, devido à possibilidade de efeitos adversos (Bauer, 2013). A vitamina D é encontrada no leite, no óleo de fígado de bacalhau e em alguns óleos de peixe (Leboff et al., 2022). A exposição à luz solar também aumenta as concentrações de vitamina D (Leboff et al., 2022). No entanto, o uso de produtos de proteção solar bloqueia efetivamente a síntese de vitamina D na pele (Leboff et al., 2022). Além disso, a pele de pessoas com mais de 70 anos não converte a vitamina D tão eficientemente quanto em indivíduos mais jovens (Leboff et al., 2022). Portanto, suplementos de vitamina D são necessários para adultos mais velhos e para pessoas que evitam a luz solar (Leboff et al., 2022). O limite superior seguro para a dosagem de vitamina D não está claro (Leboff et al., 2022). Apesar disso, a adesão ao tratamento permanece um desafio significativo (Leboff et al., 2022). Estudos indicam que taxas reduzidas de adesão comprometem a eficácia clínica e aumentam o risco de fraturas (Schini et al., 2023).

6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental de osteoporose em ratas ovariectomizadas tem sido amplamente utilizado na pesquisa biomédica devido à sua capacidade de replicar os aspectos fisiopatológicos da osteoporose pós-menopáusia em humanos (Dai et al., 2014). Esse modelo foi escolhido para o experimento porque são indivíduos isogênicos e consanguíneos, o que oferece uma menor variabilidade na população que forma a amostra (Fraga, 2009). Além disso, esses animais apresentam uma alta

resistência ao manuseio, pouca propensão a doenças e se adequam bem à manipulação (Fraga, 2009). Ademais, foram utilizadas ratas após a primeira cria, garantindo que o ciclo reprodutivo ovariano estava intacto e funcional.

6.1.1 Escolha da idade apropriada do rato no momento da OVX

A idade das ratas desempenha um papel fundamental para padronização do modelo na época da OVX (Francisco et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2020). Ratos de 2 a 11 meses que comumente passam por OVX, podem ser divididos em três grupos, ou seja, <6 meses, 6-9 meses e >9 meses (Yousefzadeh et al., 2020).

Ratos < 6 meses de idade apresentam algumas desvantagens que limitam sua utilidade para pesquisa de osteoporose (Yousefzadeh et al., 2020). Em resposta à OVX, efeitos adversos como aumento da conectividade trabecular foram observados em ratas de 3 meses de idade que podem ser devidos a taxa de crescimento mais rápida nos jovens, em comparação com as ratas mais velhas (Yousefzadeh et al., 2020). Além disso, ratas com idade < 6 meses apresentam maior perda após OVX, menor remodelação óssea de Havers e trabecular, e menor sensibilidade das vértebras lombares do que nos ossos longos, características que são efeitos de confusão nesse grupo de animais (Liu et al., 2015; Yousefzadeh et al., 2020).

Em ratas de 6-9 meses de idade, o crescimento esquelético diminui (Francisco et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2020). Tem sido sugerido que a idade mínima de ratas para estudos de osteoporose deva ser de 6 meses de idade (Yousefzadeh et al., 2020). As ratas de 6 a 9 meses de idade apresentam a melhor resposta ao modelo quando comparados com os animais menores do que 3 meses ou acima de 10 meses de idade (Yousefzadeh et al., 2020). Além disso, ratas com 6-9 meses de idade têm um nível estável de marcadores de remodelação óssea no soro e na urina (Yousefzadeh et al., 2020). Efeitos de confusão de crescimento ósseo longitudinal e envelhecimento que são observados em ratos < 6 e > 9 meses, respectivamente não são observados em ratos com idade entre 6-9 meses (Yousefzadeh et al., 2020).

Ratas com idade > 9 meses não são apropriados para o modelo ovariectomizado de osteoporose (Francisco et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2020). Como suas respostas a OVX e a administração medicamentos são lentas, o tempo de estudo seria muito mais prolongado, isso resulta em altos custos (Yousefzadeh et al., 2020). Além disso, o efeito da osteoporose que ocorre após a OVX pode ser devido

ao processo de envelhecimento e não à OVX em si (Yousefzadeh et al., 2020). Ademais, ao contrário dos humanos, existe uma baixa resposta do osso cortical comparado ao osso trabecular que foi relatada em ratas com idade > 9 meses (Francisco et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2020).

Em resumo, de acordo com a literatura disponível, ratas de 6-9 meses de idade são recomendados como os mais apropriados para pesquisa de osteoporose (Francisco et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2020), fato que difere bastante da maior parte da literatura sendo utilizados animais mais jovens na maior parte dos estudos (Jin et al., 2019).

6.1.2 Seleção do método cirúrgico e verificação do sucesso da OVX

Existem vários métodos cirúrgicos para realização de OVX em ratas, bem como vários parâmetros para verificação de OVX após a cirurgia que serão discutidos abaixo (Sankar et al., 2014; Yousefzadeh et al., 2020; Rowe et al., 2023).

OVX em ratas podem ser feitas por incisões via ventral ou dorsal. No método ventral, a incisão da pele é feita pela via única transversa lateral (Sankar et al., 2014) ou uma incisão longitudinal única (PoPović, 2016). A duração da cirurgia e o tempo de cicatrização da ferida na via ventral são curtos (< 10 minutos e < 9 dias, respectivamente), porém, o trato gastrointestinal é manipulado e a taxa de mortalidade nas primeiras 24 horas após a cirurgia é alta (30%), razão pela qual este procedimento não é recomendado (Yousefzadeh et al., 2020). No método dorsal, a pele é aberta por uma única incisão na linha média, duas incisões dorsolaterais, ou uma única incisão dorsolateral (Yousefzadeh et al., 2020). Duas incisões cutâneas dorsolaterais são principalmente recomendadas, pois não há necessidade de sutura do músculo; além disso, em comparação com uma incisão única na linha média, a incisão na pele é mais curta em comprimento [1-1,5 versus (vs) 1-3 centímetros (cm)], duração da cirurgia (< 10 vs. > 15 min), e o tempo de cura da ferida (9-10 vs. 10-14 dias) (Yousefzadeh et al., 2020).

Após a cirurgia, as ratas ovariectomizadas devem ser alojadas individualmente por uma semana para evitar possível contaminação e reabertura da ferida. Administração de midazolam [0,5-2 mg/kg por via intramuscular (IM) ou por via subcutânea (Sc) a cada 4 a 6 horas] e gentamicina (5 mg/kg por via intramuscular por

5 dias) ou antibióticos em pó também são sugeridos para reduzir o risco de automutilação e infecção da pele após sutura (Yousefzadeh et al., 2020).

6.1.3 Seleção de locais ósseos

Os efeitos do OVX nos ossos não são uniformes nos locais ósseos (Francisco et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2020), além disso, OVX não induz perda óssea em alguns locais, como a metáfise da tíbia distal e as vértebras caudais (Yousefzadeh et al., 2020). Existem relatos de que em 36 semanas após OVX a perda óssea é maior (~ 57-64%) em ossos longos (incluindo úmero, ulna, fêmur distal e tíbia proximal) em comparação com a coluna vertebral (~ 57-64%) e ossos cranianos (~1-3%) (Liu et al., 2015; Yousefzadeh et al., 2020). Ademais, observam-se perdas ósseas significativas no úmero, fêmur, tíbia e coluna vertebral 4 semanas após o OVX, indicando que essas regiões são mais sensíveis a OVX (Liu et al., 2015; Yousefzadeh et al., 2020). As regiões de interesse (ROI) em ossos de ratos são limitadas à tíbia proximal, vértebras lombares, e o fêmur, pois são os principais locais de fratura em humanos e são clinicamente relevantes (Francisco et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2020). A tíbia proximal, a vértebra lombar e o fêmur também são comparáveis com a dos humanos devido à alta sensibilidade à OVX (Liu et al., 2015; Yousefzadeh et al., 2020).

6.1.4 Tempo necessário para verificação de Osteoporose induzida por OVX

Em modelos experimentais com ratos, a ovariectomia (OVX) induz um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, em que a taxa de reabsorção óssea supera a de formação, resultando em perda de massa óssea (Yousefzadeh et al., 2020). Perda óssea precoce significativa no osso trabecular da tíbia proximal, do colo do fêmur e do corpo vertebral lombar é observada em 14, 30 e 60 dias após a OVX, respectivamente (Yousefzadeh et al., 2020).

6.1.5 Marcadores de remodelação óssea

Medição de marcadores de remodelação óssea no soro liberados durante a formação e reabsorção de osso, são recomendados para a verificação do metabolismo ósseo (Hlaing; Compston, 2014; Yousefzadeh et al., 2020). Em uma

análise post hoc do *Fracture Intervention Trial*, quanto maior o declínio na fosfatase alcalina específica do osso após o início do alendronato, maior a redução nas fraturas da coluna e do quadril (Giangregorio et al., 2014). Em ratos, os marcadores de formação óssea como a FA, de acordo com a literatura, apresentam níveis normais ~38-78 U/L, em ratas fêmeas com 6 meses de idade (Yousefzadeh et al., 2020). OVX aumenta soro FA em 30-60% após 1-6 semanas (Yousefzadeh et al., 2020). O fósforo sérico (P) aumenta em ratos ovariectomizados a partir da semana 1 e permanece elevado até a semana 9, e então restaura aos níveis normais na semana 17 (Yousefzadeh et al., 2020). Os resultados quanto aos níveis séricos de cálcio (Ca) são controversos, mas na maioria dos estudos níveis inalterados de cálcio sérico foram relatados nas semanas 1, 2 e 17 pós OVX (Yousefzadeh et al., 2020).

6.1.6 Densitometria Radiográfica

A densitometria radiográfica (DR) foi empregada como método para quantificar a densidade óssea, demonstrando-se uma ferramenta eficaz no diagnóstico e no direcionamento terapêutico de doenças osteometabólicas, bem como no estudo de reparação óssea em fraturas e na avaliação de procedimentos cirúrgicos (Konell, 2016). Devido ao elevado custo associado à aquisição de equipamentos sofisticados para exames rotineiros de densidade óssea, a DR apresenta-se como uma alternativa econômica, precisa e eficiente, demandando apenas equipamentos simples para sua realização (Fonzar, 2010).

Os autores, Louzada et al. (1998) ressaltam uma metodologia de fácil execução, pelos equipamentos simples onde se utilizam um microcomputador, scanner comercial e programas de fácil acesso e manipulação (Antonietto, 2010).

Por fim, este estudo investigou as alterações ósseas, bioquímicas e estruturais em ratas submetidas à ovariectomia, contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos na perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio.

6.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS

6.2.1 Análise do Peso Corporal

O papel do exercício combinado com medicação no grupo OVXRE como modulador de ganho de peso merece atenção. Este efeito pode refletir não apenas o aumento de massa muscular, mas também melhorias metabólicas induzidas pela medicação, indicando uma interação que pode ser explorada em estudos futuros para otimização de tratamentos (Deriggi-Pisani et al., 2023).

A ausência de relação entre peso inicial e final ($F_{2,106} = 0,300$; $p = 0,74$) fortalece a hipótese de que as intervenções experimentais são as principais responsáveis pelas variações observadas no peso Tabela 10 e Figura 45.

A ovariectomia é amplamente utilizada como modelo para estudos de deficiência estrogênica e consequente menopausa (Thapa; Nandy; Rendina-Ruedy 2022). Os resultados obtidos podem ser extrapolados para investigar estratégias do manejo do peso em mulheres na pós-menopausa, principalmente considerando intervenções não farmacológicas, como o exercício (Thapa; Nandy; Rendina-Ruedy 2022).

A deficiência do estrogênio tem sido associada ao aumento do peso corporal, deposição de massa gorda e citocinas pró-inflamatórias, que podem atuar como mediadores da perda óssea (Deriggi-Pisani et al., 2023). A perda desse hormônio altera toda a dinâmica óssea, aumentando a reabsorção e diminuindo a formação (Thapa; Nandy; Rendina-Ruedy 2022). O estrogênio não só afeta a diferenciação das células precursoras mais em direção aos osteoclastos ativos e menos em direção aos osteoblastos formadores de osso, mas também pode afetar sua energética celular (Thapa; Nandy; Rendina-Ruedy 2022). O aumento da adiposidade e da inflamação pós-menopausa também pode levar indiretamente à perda de massa óssea (Thapa; Nandy; Rendina-Ruedy 2022).

O déficit estrogênico também pode estar associado à redução da expressão de receptores de leptina no hipotálamo, resultando em menor sensação de saciedade, aumento na ingestão alimentar e, consequentemente, incremento da massa corporal (Haddad; Salazar; Hernandez, 2015). Adicionalmente, em indivíduos do sexo feminino com deficiência estrogênica, observa-se a possibilidade de redução do gasto energético basal, um fator que colabora de sobremaneira para o acúmulo de massa

corporal (Haddad; Salazar; Hernandez, 2015). Estudos indicam que a ovariectomia em ratos leva a um aumento do apetite (hiperfagia) e ganho de peso, mas esse ganho de peso não parece influenciar diretamente a densidade mineral óssea (DMO) ou a força biomecânica dos ossos (Jiang, 2008). Isso sugere que o aumento de peso induzido pela ovariectomia não oferece um efeito protetor significativo sobre a saúde óssea nesses modelos animais (Jiang, 2008). Além disso, a ativação da via de sinalização NF- κ B após a ovariectomia tem sido associada tanto à perda óssea quanto ao ganho de peso (Saleh et al., 2020). A ativação do NF- κ B em tecidos específicos, como os ossos longos e o tecido adiposo perigonadal, regula o ganho de peso e a perda óssea pós-ovariectomia (Huang et al., 2024). Isso indica que a sinalização celular e as vias inflamatórias podem desempenhar papéis críticos na regulação dessas alterações metabólicas e ósseas (Medina-Contreras et al., 2020). A ovariectomia induz alterações metabólicas significativas, sendo o ganho de peso uma das mais marcantes (Medina-Contreras et al., 2020). Essas alterações incluem aumento do tecido adiposo devido a deficiência de estrogênio que resulta em maior deposição de gordura, especialmente na região visceral (Zoth et al., 2012), redução do gasto energético basal, indicado por estudos em que a ovariectomia diminui a taxa metabólica basal, contribuindo para o ganho de peso (Medina-Contreras et al., 2020) e alterações no apetite levando a aumento da ingesta calórica em ratas ovariectomizadas, associado à desregulação dos mecanismos centrais de regulação do apetite (Liu et al., 2024).

O uso de bifosfonatos, embora seu mecanismo de ação seja primariamente voltado à inibição da atividade osteoclástica, sugere-se que podem influenciar indiretamente o metabolismo energético (Russell, 2011). No presente estudo, ratas tratadas com bifosfonatos apresentaram menor ganho de peso em comparação ao grupo controle ovariectomizado (Figura 42). Esses achados corroboram evidências que apontam para possíveis efeitos moduladores dos bifosfonatos no tecido adiposo e no metabolismo basal, embora o mecanismo subjacente ainda não esteja completamente elucidado (Zoth et al., 2012).

Além do uso de risedronato de sódio para o tratamento da osteoporose, esse medicamento também apresenta benefícios metabólicos indiretos (Kittithaworn; Toro-Tobon; Sfeir, 2023). Seus efeitos incluem: manutenção da massa magra (Ke et al., 2021), efeitos anti-inflamatórios (Iannitti et al., 2012) e impacto no ganho de peso (Yano et al., 2014). Ao preservar a densidade mineral óssea, o risedronato também

ajuda a manter a integridade muscular (Ke et al., 2021), colabora com a redução da inflamação sistêmica contribuindo para a melhoria do metabolismo geral (Iannitti et al., 2012) e embora seu efeito direto sobre o peso corporal ainda não esteja completamente elucidado, o risedronato pode influenciar positivamente a composição corporal (Yano et al., 2014). Fatos esses observados no nosso estudo, os grupos OVXR12 e SHAMR ao apresentarem as menores variações de peso observados no comparativo entre os grupos (Figura 44).

A atividade física tem sido reconhecida como uma intervenção eficaz na melhora da DMO e na regulação do peso corporal (Wang et al., 2020). Neste aspecto, o exercício físico tem sido proposto como uma opção não farmacológica, fácil acesso e eficaz para prevenir e tratar os efeitos da osteoporose e reduzir a reabsorção óssea e o risco de fraturas (Deriggi-Pisani et al., 2023). Ademais, a prática de atividades físicas atenua a sensação de dor, aprimora a estabilidade postural, melhora a amplitude de movimento e contribui significativamente para a melhora global da qualidade de vida (Deriggi-Pisani et al., 2023). Mulheres na pós-menopausa devem se envolver em exercícios de sustentação de peso por pelo menos 30 minutos na maioria dos dias da semana e incorporar exercícios de fortalecimento muscular e postura de dois a três dias por semana (Brooke-Wavell, 2022). Exercícios que aumentam a força muscular e melhoram o equilíbrio podem conferir o maior benefício para a redução de fraturas, diminuindo o risco de quedas (Giangregorio et al., 2014). Para pacientes com fragilidade ou histórico de fratura vertebral, caminhada rápida é um exercício de sustentação de peso suficiente e seguro (Giangregorio et al., 2014; Cao; Gregoire, 2016).

Em estudos de coorte prospectivos, o exercício foi associado a um risco reduzido de fratura de quadril em mulheres mais velhas (Mcarthur; Laprade; Giangregorio, 2016). Em uma meta-análise de 10 ensaios, Kemmler et al. (2013) encontraram que o exercício reduziu a ocorrência de fraturas gerais em adultos mais velhos [4,8 versus 10,9 por cento no grupo de controle; risco relativo (RR) 0,49, intervalo de confiança (IC) de 95% 0,31-0,76] (Kemmler; Häberle; Stengel, 2013). A redução em fraturas vertebrais não foi estatisticamente significativa (três ensaios, 18 versus 30 por cento; RR 0,56, IC de 95% 0,30-1,04) (Kemmler; Häberle; Stengel, 2013), possivelmente devido ao pequeno número de pacientes incluídos nos ensaios de fratura vertebral. Uma meta-análise subsequente de 20 ensaios, Hoffmann et al. (2020) demonstraram de forma semelhante que as intervenções de exercícios

reduziram o número de fraturas osteoporóticas gerais e importantes, embora os regimes supervisionados tenham reduzido as fraturas em maior extensão do que os regimes não supervisionados (Hoffmann et al., 2020). Exercícios de carga, como corrida em esteira, promovem estímulos mecânicos benéficos para o osso, aumentando a atividade osteoblástica e reduzindo a reabsorção óssea em ratos de laboratório (Wang et al., 2020). No grupo de ratas ovariectomizadas submetidas a exercícios físicos, houve atenuação do ganho de peso associado à ovariectomia (Figura 44).

O exercício físico é uma estratégia eficaz para mitigar os efeitos da ovariectomia sobre o peso corporal e o metabolismo (Yang; Li; Gao, 2023). Entre seus principais benefícios, destacam-se a redução do peso corporal, melhora da sensibilidade à insulina e preservação da massa magra (Speretta et al., 2012; Colberg et al., 2016; Yang; Li; Gao, 2023). Estudos mostram que o exercício regular reduz o ganho de peso em ratas ovariectomizadas (Speretta et al., 2012), melhora a captação de glicose pelos tecidos periféricos (Colberg et al., 2016) e ajuda a manter a massa muscular, essencial para o metabolismo basal (Yang; Li; Gao, 2023). Em ratas ovariectomizadas, a prática de exercícios físicos tem demonstrado eficácia significativa na diminuição do acúmulo de gordura visceral, contribuindo para a modulação do metabolismo lipídico e a melhoria da composição corporal (Yang; Li; Gao, 2023).

A combinação do risedronato com o exercício físico oferece uma abordagem integrada para mitigar os efeitos adversos da ovariectomia (Yang; Li; Gao, 2023). Dentre os efeitos estão os seguintes: sinergia na saúde óssea (Yang; Li; Gao, 2023), melhora da composição corporal (Yano et al., 2014) e redução da inflamação (Albrahim et al., 2023). O estímulo mecânico do exercício potencializa os efeitos do risedronato na densidade mineral óssea (Yang; Li; Gao, 2023), enquanto o exercício reduz o acúmulo de gordura, o risedronato preserva a massa óssea e muscular (Yano et al., 2014) e a combinação dessas intervenções atenua os marcadores inflamatórios induzidos pela deficiência de estrogênio (Albrahim et al., 2023). Na avaliação dos nossos resultados podemos observar uma interação sinérgica, com aumento significativo da variação do peso corporal no grupo submetido a ovariectomia, risedronato e exercícios combinados em comparação aos grupos tratados isoladamente (Figura 45).

Portanto, enquanto o ganho de peso é uma consequência comum da ovariectomia em ratos, a interação entre ganho de peso e saúde óssea em modelos de ratos ovariectomizados é influenciada por fatores hormonais e metabólicos complexos, que ainda estão sendo investigados (Yang; Li; Gao, 2023). As evidências sugerem que essas estratégias oferecem benefícios complementares, com impacto positivo na composição corporal, no metabolismo e na saúde óssea (Albrahim et al., 2023).

6.2.2 Análise de Parâmetros de Marcadores Ósseos

Em modelos de ratos ovariectomizados, que são frequentemente utilizados para simular a osteoporose pós-menopausa, observam-se alterações laboratoriais específicas nos níveis de cálcio, fosfatase alcalina e fósforo (Brent, 2023). Os marcadores de turnover ósseo mudam mais sensivelmente do que a densidade mineral óssea, dessa forma muitos pesquisadores analisam esses marcadores para avaliar os efeitos terapêuticos dos tratamentos na osteoporose (Guo et al., 2021). De acordo com a literatura médica, as ratas ovariectomizadas apresentam uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo (Cho et al., 2018; Saleh et al., 2020) enquanto os níveis de fosfatase alcalina aumentam significativamente (Saleh et al., 2020).

A elevação da FA nos grupos OVX (Tabela 11) reforça o impacto da ovariectomia no metabolismo ósseo, sendo um marcador sensível de alterações no turnover ósseo em estados de deficiência estrogênica (Schini et al., 2023). As variações entre as combinações terapêuticas (p. ex. OVXRE vs. OVX12) sugerem que intervenções como exercício e medicação podem modular o metabolismo ósseo (Naylor et al., 2019).

A ovariectomia induz alterações típicas de estados de deficiência estrogênica, incluindo aumento do turnover ósseo (elevação da FA) e leve redução de cálcio e fósforo (Vasikaran et al., 2011). Esses achados refletem alterações metabólicas esperadas, alinhadas com o modelo de osteopenia pós-menopausa.

Intervenções como exercício (p. ex. OVXR12) e medicação combinados (p. ex. OVXRE) mostraram modulação parcial dos níveis de cálcio e FA, sugerindo benefícios potenciais para a saúde óssea (Schini et al., 2023). A redução mais acentuada nos

níveis de fósforo no grupo OVXR pode refletir maior mobilização óssea, exigindo análise adicional para confirmar esses efeitos (Bauer, 2019).

Os grupos SHAM e CONTROLE apresentaram estabilidade metabólica maior, com menor FA e níveis adequados de cálcio e fósforo, sugerindo ausência de alterações metabólicas significativas em comparação com os grupos ovariectomizados (Naylor et al., 2019).

Os marcadores de remodelação óssea, como a fosfatase alcalina específica do osso e os derivados catabólicos do colágeno tipo I, têm sido amplamente utilizados na prática clínica e em pesquisas para avaliar a atividade óssea e prever o risco de fraturas (Eastell et al., 2019). Essas alterações refletem o aumento da remodelação óssea e a perda de massa óssea associadas à deficiência de estrogênio, que é induzida pela ovariectomia (Eastell et al., 2019). A fosfatase alcalina elevada é um marcador de aumento da atividade osteoblástica, enquanto a redução do cálcio e do fósforo plasmáticos podem estar relacionados ao aumento da reabsorção óssea e à alteração no metabolismo mineral (Saleh et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Embora não significativas, as tendências de redução nos grupos ovariectomizados podem refletir maior excreção renal de fósforo ou sua utilização no processo de remodelação óssea, característico de estados de deficiência estrogênica (Vasikaran et al., 2011). No entanto, as diferenças entre os grupos não alcançaram significância estatística ($F_{7,54} = 1,755$; $p = 0,12$), indicando que a variabilidade entre os grupos foi insuficiente para identificar uma alteração consistente (Michelsen et al., 2013).

Os níveis de FA são mais elevados nos grupos OVX devido ao ritmo da remodelação óssea, portanto, as observações dos níveis de FA no grupo OVX são consistentes com as de estudos anteriores (Ali et al., 2023). Níveis baixos de FA são encontrados em grupos de tratamento, incluindo o grupo controle não ovariectomizado (Ali et al., 2023). No presente estudo, observou-se um aumento significativo nos níveis de FA nos grupos ovariectomizados (Tabela 11), corroborando os achados de estudos prévios.

Esses achados são consistentes com o que se observa em humanos com osteoporose pós-menopausa, onde a deficiência de estrogênio leva a um desequilíbrio na remodelação óssea, resultando em perda óssea e alterações nos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.

6.2.3 Análise de Imagens Radiográficas

O uso de técnicas de imagem para avaliação óssea tem se mostrado essencial em estudos que investigam a osteoporose e os efeitos de tratamentos farmacológicos e intervenções não farmacológicas, como os exercícios físicos (Martel; Monga; Chang, 2022).

A DR desempenha um papel crucial no estudo da osteoporose em ratas ovariectomizadas, servindo como uma ferramenta essencial para a avaliação da DMO e das alterações ósseas induzidas pela ovariectomia (Cherif et al., 2018). Este modelo animal é amplamente utilizado para simular a perda óssea pós-menopausa em humanos, permitindo a investigação de intervenções terapêuticas e a compreensão dos mecanismos subjacentes à osteoporose (Yousefzadeh et al., 2020).

A técnica de absorciometria por dupla energia de raios X (DEXA) é frequentemente utilizada para medir a DMO em ratos ovariectomizados, tanto in vivo quanto ex vivo (Cherif et al., 2018). Estudos demonstram que a DEXA é capaz de detectar mudanças significativas na DMO em locais como a coluna lombar e a metáfise proximal da tíbia, que são predominantemente compostos por osso trabecular, logo após a ovariectomia (Camacho et al., 2020). A precisão e a reprodutibilidade da DEXA são destacadas, com coeficientes de variação baixos, o que a torna uma ferramenta confiável para monitorar mudanças na DMO ao longo do tempo (Camacho et al., 2020). Além disso fornece informações preditivas úteis sobre a eficácia de agentes anti-osteoporóticos e perfis de diagnóstico de qualidade óssea para pesquisa clínica (Cho et al., 2018). A DMO e a resistência óssea reduzem significativamente na osteoporose, independentemente das causas (Cho et al., 2018).

Além da DEXA, a tomografia computadorizada quantitativa (TCQ) também é utilizada para avaliar a densidade mineral volumétrica, especialmente em ossos pequenos, onde a DEXA pode ter limitações (Camacho et al., 2020). A TCQ tem a vantagem de medir a densidade mineral volumétrica (DMV), o que pode proporcionar uma avaliação mais detalhada das alterações ósseas em resposta a tratamentos farmacológicos (Deshpande et al., 2023). Outros métodos, como a densitometria portátil (PIXImus), também foram avaliados e se mostraram eficazes na detecção da perda óssea induzida pela ovariectomia, oferecendo vantagens em termos de velocidade de varredura e portabilidade (Binkley et al., 2003).

Neste estudo utilizamos a técnica de DR para avaliar as alterações ósseas em ratas ovariectomizadas conforme preconizado por Louzada (Antonietto, 2010). A avaliação dos exames de imagem não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos. Vários fatores podem ter influenciado nesse resultado. Petersen et al. (2000) encontraram medições de DEXA foram problemáticas para a precisão devido a uma superestimação tanto do DMO quanto da área do osso em ratos de laboratório devido ao tamanho dos mesmos, visto que os parâmetros de varredura, as medições do mineral ósseo corporal total não puderam ser recomendadas em ratos pequenos com baixa DMO (Petersen et al., 2000). Chrerif et al. (2018) demonstraram que a DEXA subestimou a DMO lombar in vivo em ratos com sobrepeso, e esse erro de medição está relacionado ao peso corporal e à gordura abdominal (Cherif et al., 2018). Tal erro também pode acontecer em animais de baixo peso (Cherif et al., 2018). A realização da DR pode ser utilizada para medir a densidade óssea em animais tão pequenos quanto os ratos, porém a calibração do aparelho e interpretação dos seus resultados é um desafio.

Em resumo, a densitometria radiográfica, é uma ferramenta valiosa para o estudo da osteoporose em ratas ovariectomizadas, permitindo a avaliação das alterações radiográficas, demonstrando uma técnica reprodutível para avaliação da perda óssea e evidenciando a eficácia das intervenções terapêuticas.

6.2.4 Análise de Parâmetros Histológicos

A análise histomorfométrica é uma ferramenta essencial para compreender as alterações estruturais e funcionais no tecido ósseo (Cho et al., 2018). A ovariectomia induz um estado de deficiência estrogênica que resulta em aumento da reabsorção óssea e redução da formação óssea, levando à osteopenia (Deriggi-Pisani et al., 2023). Os perfis histológicos dos ossos corticais e trabeculares alteram-se principalmente em animais osteoporóticos (Cho et al., 2018). Além disso, o impacto de inúmeras substâncias anti-osteoporóticas foi estimado na histologia óssea (Cho et al., 2018). Alguns índices histomorfométricos de massas ósseas diminuem visivelmente, enquanto os índices de reabsorção óssea aumentam, essas alterações foram consideradas boas preditoras da eficácia de medicamentos anti-osteoporóticos (Cho et al., 2018).

Estudos prévios Deriggi-Pisani et al. (2023), demonstraram que modelos de ratas ovariectomizadas apresentam diminuição significativa na densidade mineral óssea, alterações histomorfométricas, como aumento da porosidade óssea, redução na espessura trabecular e um aumento impressionante no número de adipócitos nos grupos OVX sedentários (Deriggi-Pisani et al., 2023).

Na avaliação comparativa da coluna, os animais ovariectomizados e submetidos a intervenção apresentaram um BV maior comparado aos animais do grupo CONTROLE particularmente o grupo OVXRE (Tabela 14). Fato não comprovado nos animais dos grupos SHAM submetidos a qualquer um dos tratamentos. A razão entre BV/TV demonstrou que os animais ovariectomizados submetidos a qualquer tipo de intervenção apresentam maior volume ósseo, particularmente os grupos de tratamento sinérgico.

A avaliação Tb. Th demonstrou uma diminuição do tamanho das trabéculas em todos os grupos comparados com o CONTROLE. Por outro lado, a avaliação Tb. Sp evidenciou um aumento nos espaços entre as trabéculas em todos os grupos ovariectomizados e mesmo nos grupos SHAM, porém mais intenso nos OVX12. Esses achados não apresentaram significância estatística.

Na avaliação comparativa do fêmur, os animais ovariectomizados e submetidos a intervenção apresentaram um BV maior comparado aos animais do CONTROLE particularmente o grupo OVXRE, OVXR e SHAMR (Tabela 15). Conforme demonstrado no estudo de Wang et al. (2023), a estrutura trabecular óssea de ratos nos grupos não submetidos a tratamento estava relativamente intacta, com arranjo regular e interconexão em uma estrutura de rede, menor tecido de medula óssea e quase nenhum vacúolo lipídico (Wang et al., 2023). No grupo OVX, por outro lado, a estrutura trabecular óssea (BT) foi muito comprometida apresentando-se quebrada ou até mesmo reduzida com muitos tecidos de medula óssea e vacúolos lipídicos na cavidade medular (Cho et al., 2018). Por outro lado, os grupos de tratamento com suplementação medicamentosa, alimentar ou exercícios apresentaram osteoporose relativamente leve com menos quebras e reduções de osso trabecular, indicando o evidente efeito anti-osteoporose em ratos ovariectomizados (Wang et al., 2023) ou ganho de massa óssea (Cho et al., 2018). Os controles OVX apresentaram reduções significativas ($p < 0,01$) em BV/TV em comparação aos controles operados (Cho et al., 2018). Os grupos OVX mostram reabsorção no tecido ósseo, perda mineral grave,

tecido trabecular disperso com formato fragmentado e rara atividade de formação óssea (Wang et al., 2023).

Em estudos com animais, o exercício é geralmente considerado como um fator que aumenta o pico de massa óssea (Li et al., 2014). Joo et al. (2016) mostraram que a corrida em esteira melhora a microarquitetura óssea trabecular, a densidade óssea e a geometria cortical em ratas fêmeas jovens em crescimento. Tromp et al. (2006) mostraram que a carga mecânica tem efeitos benéficos no conteúdo mineral ósseo e na DMO de ratos ovariectomizados. Nossas descobertas estão de acordo com estudos anteriores e sugerem que a cirurgia foi bem-sucedida nesse estudo.

Assim, ratas ovariectomizadas apresentaram alta taxa de renovação óssea, com o aumento na reabsorção óssea sendo maior do que a formação (Li et al., 2014). Os resultados desse estudo corroboram essas observações, com as ratas ovariectomizadas apresentando alterações significativas na microarquitetura óssea, como redução na densidade trabecular e aumento da separação entre as trabéculas (Li et al., 2014). Mais importante, o exercício aumentou significativamente a massa óssea nos ratos do grupo OVXE, o que pode ser atribuído a uma redução da reabsorção e um aumento na produção de tecido ósseo, pois a superfície de reabsorção total foi diminuída enquanto a superfície de formação trabecular foi aumentada em comparação com o grupo OVX (Li et al., 2014). Essas alterações sugerem uma alteração da homeostase óssea, típica da osteoporose pós-menopausa (Li et al., 2014). Neste estudo, os grupos OVX mostraram perfis histológicos osteoporóticos típicos, como evidenciado pela redução drástica na massa óssea cortical e trabecular, bem como aumento no tecido conjuntivo do osso cortical (Tabelas 14 e 15).

O exercício físico é reconhecido como um método de tratamento não medicamentoso eficaz para a conservação da saúde óssea (Troy et al., 2018). Em ratas, exercícios de impacto, como saltos ou corrida em esteira, demonstraram efeitos benéficos na microarquitetura óssea, incluindo aumento da espessura trabecular e redução da porosidade (Speretta et al., 2012). Nosso estudo demonstrou aumento significativo na estrutura da massa óssea cortical e do osso trabecular, particularmente observado nos grupos submetidos aos tratamentos com medicamento e exercícios físicos (Tabelas 14 e 15).

Outro ponto importante foi a avaliação histológica das lâminas pelos e histopatologistas. Isso foi evidenciado na Tabela 16, relacionando-se os resultados

apresentados com a concordância Inter avaliadores na análise de lâminas histológicas dos animais submetidos a diferentes tratamentos. Um Coeficiente de Correlação Intraclass (CCI) superior a 0,70 é amplamente reconhecido como aceitável em estudos científicos, particularmente em análises subjetivas, como as realizadas em histopatologia. No presente estudo, os valores obtidos para as diferentes regiões avaliadas, bem como para a amostra total, situaram-se dentro desse intervalo, conferindo validade às avaliações realizadas.

A leve superioridade do CCI no fêmur (0,74) em comparação à coluna (0,72) pode refletir diferenças na complexidade estrutural das regiões ósseas, variações na qualidade técnica das lâminas e a potencial clareza maior nos critérios de avaliação do fêmur em comparação à coluna.

Os resultados indicaram uma concordância Inter avaliadores variando de moderada a boa (CCI: 0,50 – 0,84), com desempenho superior observado na análise da amostra total (CCI: 0,77). Esses dados reforçam a confiabilidade das avaliações histológicas realizadas, ao mesmo tempo em que destacam a necessidade de aprimoramentos metodológicos voltados para a redução da subjetividade e o aumento da precisão das análises.

Neste estudo, observamos que as ratas submetidas ao exercício físico apresentaram melhora significativa nos parâmetros histomorfométricos, com aumento da espessura trabecular e uma redução da separação trabecular, mesmo após a ovariectomia. Isso pode ser atribuído ao estímulo mecânico que favorece a formação óssea por meio da ativação de osteoblastos e inibição de osteoclastos (Yang; Li; Gao, 2023). Além disso, também evidenciamos que o grupo submetido ao tratamento com risedronato apresentou preservação substancial da microarquitetura óssea, caracterizada por incremento na densidade trabecular e redução da porosidade cortical, achados que corroboram dados consistentes relatados na literatura prévia (Yang; Li; Gao, 2023).

Embora o exercício possa ser considerado uma alternativa natural às intervenções farmacológicas, também é importante explorar até que ponto ele complementa esses tratamentos comprovados (Ireland; Rittweger, 2017). Atualmente, apenas alguns estudos investigaram as interações entre o exercício e os antirreabsortivos, embora os resultados iniciais sejam promissores (Ireland; Rittweger, 2017). Os bifosfonatos tiveram um efeito aditivo na redução da perda óssea em astronautas quando combinados com exercícios resistidos (Ireland; Rittweger, 2017).

A combinação do risedronato com o exercício físico mostrou efeitos sinérgicos, resultando em uma melhora mais expressiva na microarquitetura óssea em comparação aos tratamentos isolados (Tabelas 14 e 15). Esses achados sugerem que o uso combinado de terapias farmacológicas e não farmacológicas pode potencializar os benefícios no tratamento da osteopenia induzida pela deficiência estrogênica.

Os resultados obtidos estão alinhados com a literatura, que enfatiza os benefícios do exercício físico e do risedronato na prevenção da perda óssea induzida pela deficiência estrogênica (Li et al., 2014). Estudos como o de Leblanc et al. (2013) destacam que a combinação de intervenções pode ser mais eficaz na preservação da qualidade óssea do que intervenções isoladas (Ireland; Rittweger, 2017). Deve-se considerar fatores como medidas objetivas de carga óssea, momento de duração da atividade, a motivação dos indivíduos e o modo como o exercício é realizado (Ireland; Rittweger, 2017). Há evidências de que a carga de alto impacto (alta intensidade) é benéfica para os ossos (Troy et al., 2018). A carga de alto impacto combinada com outros exercícios que produzem grandes forças de reação articular (como o treinamento de resistência) tem um efeito positivo no osso (Ireland; Rittweger, 2017; Troy et al., 2018). Além disso, uma combinação de carga de alto impacto parece ser favorável em oposição ao treinamento de alto impacto, impacto ímpar ou resistência sozinha (Troy et al., 2018). Embora os efeitos da atividade física na DMO possam ser modestos, eles têm implicações clinicamente significativas em termos de redução no risco de fratura a longo prazo (Ireland; Rittweger, 2017; Troy et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

Os resultados desta dissertação evidenciaram que o modelo de ratas ovariectomizadas é uma ferramenta valiosa para o estudo da osteoporose pós-menopáusia, permitindo a avaliação dos efeitos combinados de intervenções farmacológicas e não farmacológicas. A associação entre o risedronato e o exercício físico mostrou um impacto positivo na preservação da densidade mineral óssea e na qualidade óssea, demonstrando o potencial de uma abordagem integrada para mitigar os efeitos da deficiência estrogênica. Apesar das limitações inerentes ao modelo animal, este estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre estratégias terapêuticas que podem ser adaptadas para populações humanas, destacando a importância de futuros estudos translacionais que validem e expandam as evidências aqui obtidas.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A presente dissertação analisou os efeitos da ovariectomia, da prática de exercício físico e da administração de risedronato em ratas de laboratório, utilizando-as como modelo experimental para o estudo da osteoporose associada ao período pós-menopáusico. Apesar das limitações inerentes ao estudo, os achados obtidos fornecem subsídios relevantes que podem fundamentar futuras investigações científicas e contribuir para o aprimoramento das abordagens terapêuticas direcionadas à osteoporose em humanos.

8.1 CENÁRIOS PROSPECTIVOS

Futuros estudos podem concentrar-se na investigação dos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos combinados do exercício físico e do risedronato na remodelação óssea (Yang; Li; Gao, 2023). O uso de técnicas de biologia molecular, como análise de expressão gênica e proteômica, pode revelar vias celulares envolvidas na formação e reabsorção óssea (Hernandez, 2006).

Um aspecto relevante a ser explorado envolve a realização de estudos de intervenção de longa duração, essenciais para avaliar os efeitos persistentes do risedronato e da prática de exercícios físicos sobre a densidade mineral óssea e a microarquitetura óssea (Yang; Li; Gao, 2023). Além disso, tais investigações permitirão examinar potenciais efeitos adversos e a segurança das intervenções em um horizonte temporal ampliado (Black et al., 1996).

Adicionalmente, a incorporação de biomarcadores emergentes relacionados à remodelação óssea, como a osteocalcina sérica intacta e fosfatase alcalina óssea melhor representam o processo de formação óssea enquanto as piridinolinas e fragmentos telopeptídeos carboxi e amino-terminais do colágeno tipo I melhor refletem a reabsorção óssea (Saraiva; Lazaretti-Castro, 2002).

E ainda explorar investigações sobre combinações terapêuticas que incluam outros agentes farmacológicos, como anticorpos monoclonais, aliados ao risedronato e ao exercício físico (Langdahl et al., 2017; Yang; Li; Gao, 2023). Essas combinações podem potencializar a eficiência terapêutica e melhorar a qualidade óssea (Chandran, 2022).

8.2 SUGESTÕES PARA NOVOS ESTUDOS

Estudos que explorem a tradutibilidade dos resultados obtidos em ratas para seres humanos. Protocolos que avaliem as diferenças entre os dois modelos podem ajudar a adaptar as intervenções para contextos clínicos reais. Investigar o impacto de diferentes modalidades de exercício (como treinamentos de resistência, aeróbico e/ou intervalado) sobre a saúde óssea em modelos animais e humanos (Nikander et al., 2010). Analisar os efeitos do risedronato e do exercício físico sobre outros sistemas do corpo, como o cardíaco e o muscular, ampliando uma visão mais global do impacto terapêutico (Helge et al., 2010). Investigar os efeitos das intervenções em populações de diferentes idades, gêneros e condições metabólicas. Essa abordagem pode trazer dados relevantes para tratamentos personalizados. Incorporar novos protocolos de experimentos que contemplem variáveis como comorbidades, regime alimentar e fatores de estresse, permitindo uma maior representatividade das condições clínicas reais.

Uma linha de investigação promissora envolve a análise da associação entre o risedronato e a prática de exercícios físicos, com foco na identificação de potenciais efeitos sinérgicos na atenuação da perda óssea. Tal abordagem configura-se como uma estratégia relevante para o aprimoramento das diretrizes terapêuticas voltadas para indivíduos em fase pós-menopáusia. Além disso, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas multimodais, que integrem intervenções farmacológicas e não farmacológicas, apresenta-se como uma área de grande potencial, promovendo maior adesão ao tratamento medicamentoso e contribuindo para a redução do risco de fraturas ósseas. A geração e utilização de dados consistentes são fundamentais para a formulação de diretrizes clínicas mais robustas, capazes de atender às demandas específicas de diferentes populações.

Dessa forma, os achados do presente estudo destacam a relevância de estratégias terapêuticas combinadas para o manejo da osteoporose, particularmente em populações de maior vulnerabilidade, como mulheres em período pós-menopáusico. Pesquisas futuras poderão investigar o impacto de modalidades variadas de exercício físico e diferentes regimes de dosagem de bisfosfonatos, além de explorar as interações entre esses tratamentos e outros fatores moduladores, como a composição dietética e a suplementação de cálcio.

9 REFERÊNCIAS

- ADLER, R. A. et al. Managing Osteoporosis in Patients on Long-Term Bisphosphonate Treatment: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 1, p. 16-35, 2016.
- ALBRAHIM, T. et al. Effects of Regular Exercise and Intermittent Fasting on Neurotransmitters, Inflammation, Oxidative Stress, and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Cortex of Ovariectomized Rats. **Nutrients**, v. 15, n. 19, p. 4270, 2023.
- ALI, M. et al. The bone-protective benefits of amino-conjugated calcium in an ovariectomized (OVX) rat model. **Life Sciences**, v. 328, p. 121927, 2023.
- ANTONIETTO, E. **Densidade mineral óssea de vértebras de ratos Wistar suspensos pela cauda por 15 e 36 dias**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- ARANTES, H. P.; SILVA, A. G.; LAZARETTI-CASTRO, M. Bisphosphonates in the treatment of metabolic bone diseases. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 206-12, 2010.
- BAUER, C. D. Calcium Supplements and Fracture Prevention. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 16, p. 1537-43, 2013.
- BAUER, C. D. Clinical Use of Bone Turnover Markers. **JAMA**, v. 322, n. 6, p. 569, 2019.
- BINKLEY, N. et al. Bone Loss Detection in Rats Using a Mouse Densitometer. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 2, p. 370-5, 2023.
- BLACK, D. M. et al. Atypical Femur Fracture Risk versus Fragility Fracture Prevention with Bisphosphonates. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 8, p. 743-53, 2020.
- BLACK, D. M. et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. **Lancet**, v. 348, n. 9041, p. 1535-41, 1996.
- BOGNI, F. H. **Efeito do Envelhecimento e do Treinamento Resistido sobre ossos de ratos**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Carlos.
- BOLAM, K. A.; UFFELEN, J. G. Z.; TAAFFE, D. R. The effect of physical exercise on bone density in middle-aged and older men: A systematic review. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 11, p. 2749-62, 2013.
- BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 606-15, 2008.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-42, 2003.

BRENT, B. M. Pharmaceutical treatment of bone loss: From animal models and drug development to future treatment strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 244, p. 108383, 2023.

BROOKE-WAVELL, K. Strong, steady and straight: UK consensus statement on physical activity and exercise for osteoporosis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 16, n. 56, p. 837-46, 2022.

CAI, L. et al. Cytokines: The links between bone and the immune system. **Injury**, v. 55, n. 2, p. 111203, 2024.

CAMACHO, P. M. et al. American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis— 2020 Update Executive Summary. **Endocrine Practice**, v. 26, n. 5, p. 564-70, 2020.

CAO, J. J.; GREGOIRE, B. R. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. **Nutrition Research**, v. 36, n. 4, p. 320-7, 2016.

CARTER, M. I.; HINTON, P. S. Physical activity and bone health. **Missouri Medicine**, v. 111, n. 1, p. 59-64, 2014.

CHANDRAN, M. The why and how of sequential and combination therapy in osteoporosis. A review of the current evidence. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 66, n. 5, p. 724-38, 2022.

CHEN, L. et al. Biomechanical Characteristics of Osteoporotic Fracture Healing in Ovariectomized Rats: A Systematic Review. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153120, 2016.

CHERIF, R. et al. Dual-energy X-ray absorptiometry underestimates in vivo lumbar spine bone mineral density in overweight rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 36, n. 1, p. 31-9, 2018.

CHO, C.-S. et al. Anti-osteoporotic effects of mixed compositions of extracellular polymers isolated from *Aureobasidium pullulans* and *Textoria morbifera* in ovariectomized mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 2018.

COHEN, J. A power primer. **Psychological Bulletin**, v. 112, n. 1, p. 155-9, 1992.

COLBERG, R. S. et al Physical Activity/Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 39, n. 11, p. 2065-79, 2016.

COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1; p. 419-47, 2001.

COMPSTON, J. E., MCCLUNG, M. R.; LESLIE, D. W. Osteoporosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 364-76, 2019.

CORREA, L. B. **Efeito Anti-Inflamatorio do Galato de Metila na Artrite Experimental: Elucidacao do Mecanismo de Ação**. 2019. Tese (Doutorado) – Ministerio da Saude Fundacao Oswaldo Cruz.

COSMAN, F. et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359-81, 2014.

CRANDALL, J. C. et al. Comparative Effectiveness of Pharmacologic Treatments to Prevent Fractures. **Annals of Internal Medicine**, v. 161, n. 10, p. 711, 2014.

CREMERS, S. et al. Pharmacology of bisphosphonates. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 1052-62, 2019.

CUMMINGS, S. R. et al. Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 8, p. 756-65, 2009.

DAI, Q. G. et al. Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: an in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats. **Oral Diseases**, v. 20, n. 5, p. 514-20, 2014.

DALMOLIN, F. et al. Celioscopia e salpingectomia parcial em fêmea canina gestante. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p.1675-82, 2013.

DALY, M. R. et al. Exercise for the prevention of osteoporosis in postmenopausal women: an evidence-based guide to the optimal prescription. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 23, n. 2, p. 170-80, 2019.

DERIGGI-PISANI, F. G. et al. Role of resistance training in bone macro and micro damages in an estrogen absence animal model. **Life Sciences**, v. 317, p. 121417, 2023.

DESHPANDE, N. et al. Alternatives to DEXA for the assessment of bone density: a systematic review of the literature and future recommendations. **Journal of Neurosurgery Spine**, v. 38, n. 4, p. 436-45, 2023.

DOMANDER, R.; FELDER, A. A.; DOUBE, M. BoneJ2 - refactoring established research software. **Wellcome Open Research**, v. 6, p. 37, 2021.

DOUBE, M. et al. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. **Bone**, v. 47, n. 6, p. 1076-9, 2010.

EASTELL, R. et al. Pharmacological Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 5, p. 1595-622, 2019.

FALLAHNEZHAD, S. et al. Combined effects of photobiomodulation and alendronate on viability of osteoporotic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 182, p. 77-84, 2018.

FONTALIS, A.; EASTELL, R. The challenge of long-term adherence: The role of bone turnover markers in monitoring bisphosphonate treatment of osteoporosis. **Bone**, v. 136, p. 115336, 2020.

FONZAR, J. F. **Avaliacao Qualitativa e Quantitativa do Reparo Osseo por imagens processada pelos programas ImageJ e ODR**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.

FRAGA, S. D. N. **Reparo Osseo com utilização de células tronco em ratos submetidos a desnutricao neonatal**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

FRANCISCO, I. J. et al. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 2, p. 189-96, 2011.

GEHRKE, B. et al. Long-term consequences of osteoporosis therapy with bisphosphonates. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 68, p. e220334 2023.

GENANT, K. H. et al. Effects of Romosozumab Compared With Teriparatide on Bone Density and Mass at the Spine and Hip in Postmenopausal Women With Low Bone Mass. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 1, p. 181-7, 2017.

GIANGREGORIO, L. M. et al. Too Fit to Fracture: Exercise recommendations for individuals with osteoporosis or osteoporotic vertebral fracture. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 3, p. 821-35, 2014.

GROSSMAN, C. D. et al. Vitamin D, Calcium, or Combined Supplementation for the Primary Prevention of Fractures in Community-Dwelling Adults. **JAMA**, v. 319, n. 15, p. 1592, 2018.

GUO, Y. et al. Remote-controllable bone-targeted delivery of estradiol for the treatment of ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 248, 2021.

HADDAD, T. P.; SALAZAR, M.; HERNANDES, L. Histomorfometria da matriz orgânica do fêmur de ratas ovariectomizadas tratadas com alendronato de sódio. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 1, p. 100-4, 2015.

HALASI, A. et al. Tight control: a new therapeutic strategy in the management of osteoporotic patients. **Osteoporosis International**, v. 29, n. 12, p. 2677-83, 2018.

HARRIS, S. T. et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: A randomized controlled trial. **JAMA**, v. 282, n. 14, p. 1344-52, 1999.

HART, N. H. et al. Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 17, n. 3, p. 114-39, 2017.

HELGE, W. E. et al. Recreational football training decreases risk factors for bone fractures in untrained premenopausal women. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 20, n. s1, p. 31-9, 2010.

HENG, C. B. et al. The bioelectrical properties of bone tissue. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 6, n. 2, p. 120-30, 2023.

HERNANDEZ, C. J.(2006). A biomechanical perspective on bone quality. **Bone**, v. 39, n. 6, p. 1173-81, 2006.

HLAING, T. T.; COMPSTON, E. J. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 51, n. 2, p. 189-202, 2014.

HOFFMANN, I. et al. Exercise Reduces the Number of Overall and Major Osteoporotic Fractures in Adults. Does Supervision Make a Difference? Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 37, n. 11, p. 2132-48, 2020.

HONDA, A.; UMEMURA, Y.; NAGASAWA, S. Effect of High-Impact and Low-Repetition Training on Bones in Ovariectomized Rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 9, p. 1688-93, 2001.

HOWE, T. E. et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 7, p. 1-167, 2011.

HUANG, F. et al. Activation of NF-κB signaling regulates ovariectomy-induced bone loss and weight gain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1870, n. 7, p. 167320, 2024.

IANNITTI, T. et al. Bisphosphonates: focus on inflammation and bone loss. **American Journal Therapeutics**, v. 19, n. 3, p. 228-46, 2012.

IRELAND, A.; RITTWEGGER, J. Exercise for osteoporosis: how to navigate between overeagerness and defeatism. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 17, n. 3, p. 155-61, 2017.

ITO, M. et al. Effects of risedronate on trabecular microstructure and biomechanical properties in ovariectomized rat tibia. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 9, p. 1042-8, 2005.

JAMES, M.-S. M.; CARROLL, S. High-intensity resistance training and postmenopausal bone loss: a meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 17, n.8, p. 1225-40, 2006.

JEE, W. Y. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 1, n. 3, p. 193-207, 2001.

JIANG, J. Ovariectomy-induced hyperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 11, p. 2106-10, 2008.

JIN, Z. et al. Bone mesenchymal stem cell therapy for ovariectomized osteoporotic rats: a systematic review and meta-analysis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 20, n. 1, p. 556, 2019.

JOHNSON, L. F. B. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 606-15, 2008.

JOHNSTON, D. B.; WARD, E. The Ovariectomized Rat as a Model for Studying Alveolar Bone Loss in Postmenopausal Women. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2015.

JOO, J. H. et al. A novel pyrazole derivative protects from ovariectomy-induced osteoporosis through the inhibition of NADPH oxidase. **Scientific reports**, v. 6, p. 22389, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013c. p. 92-124.

KANIS, J. A. et al European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 30, n. 1, p. 3-44, 2019.

KARIM, A. K. et al. Ethical considerations regarding animal experimentation. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 63, p. E255-66, 2022.

KE, C. H. et al. Dynamic Effects of the Third Generation Bisphosphonate of Risedronate on Rat Osteoporotic Fractures for Clinical Usage Guidance. **Orthopaedic Surgery**, v. 13, n. 8, p. 2433-41, 2021.

KEMMLER, W.; HÄBERLE, L.; STENGEL, V. S. Effects of exercise on fracture reduction in older adults. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 7, p. 1937-50, 2013.

KENDLER, L. D. et al Effects of teriparatide and risedronate on new fractures in postmenopausal women with severe osteoporosis (VERO): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 230-40, 2018.

KHAN, A. A. et al. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 1, p. 3-23, 2015.

KHAN, A. A. et al. Osteoporotic Fractures: Diagnosis, Evaluation, and Significance From the International Working Group on DXA Best Practices. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 99, n. 7, p. 1127-41, 2024.

KITTITHAWORN, A.; TORO-TOBON, D.; SFEIR, G. J. Cardiovascular benefits and risks associated with calcium, vitamin D, and antiresorptive therapy in the management of skeletal fragility. **Women's Health**, v. 19, p. 174550572311700, 2023.

KONELL, A. L. Contribuição ao conhecimento do esqueleto da codorna japonesa (*Coturnix japonica*) com especial atenção a densidade óssea por meio de densitometria óptica radiográfica. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.

KOO, K. T.; LI, Y. M. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. **Journal of Chiropractic Medicine**, v. 15, n. 2, p. 155-63, 2016.

LANGDAHL, L. B. et al. Romosozumab (sclerostin monoclonal antibody) versus teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis transitioning from oral bisphosphonate therapy: a randomised, open-label, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10102, p. 1585-94, 2017.

LEBLANC, A. et al. Bisphosphonates as a supplement to exercise to protect bone during long-duration spaceflight. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 7, p. 2105-14, 2013.

LEBOFF, S. M. et al. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 33, n. 10, p. 2049-102, 2022.

LI, J. et al. Trabecular Bone Microarchitecture Evaluation in an Osteoporosis Mouse Model. **Journal of Visualized Experiments**, n. 199, 2023.

LI, L. et al. Influence of Exercise on Bone Remodeling-Related Hormones and Cytokines in Ovariectomized Rats: A Model of Postmenopausal Osteoporosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112845, 2014.

LI, N. An Updated Systematic Review of Cost-Effectiveness Analyses of Drugs for Osteoporosis. **PharmacoEconomics**, v. 39, n. 2, p. 181-209, 2021.

LIU, H. et al. Effect of gut hormones on bone metabolism and their possible mechanisms in the treatment of osteoporosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1372399, 2024.

LIU, L. X. et al Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, n. 4, p. 392-398, 2015.

LIU, P. et al. Effects of Mechanical Stress Stimulation on Function and Expression Mechanism of Osteoblasts. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 830722, 2022.

LOUZADA, M. J. Q. et al.. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica." **RBE- Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998.

LUENGO-MATEOS, M. et al. Protocol for ovariectomy and estradiol replacement in mice. **STAR Protocols**, v. 5, n. 1, p. 102910, 2024.

MAGRINI, T. Complex Materials: The Tough Life of Bone. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 43, n. suppl 1, p. e20200438, 2021.

MALACON, K. et al. Trends in Management of Osteoporosis Following Primary Vertebral Compression Fracture. **Journal of the Endocrine Society**, v. 7, n. 7, p. bvad085, 2023.

MALHAN, D. et al. An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 666, 2018.

MANOLAGAS, C. S. 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. 115-37, 2000.

MANOLAGAS, C. S.; JILKA, L. R. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling — Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 5, p. 305-11, 1995.

MARTEL, D.; MONGA, A.; CHANG, G. Osteoporosis Imaging. **Radiologic Clinics of North America**, v. 60, n. 4, p. 537-45, 2022.

MATHAVAN, N. et al. Characterising bone material composition and structure in the ovariectomized (OVX) rat model of osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 97, n. 2, p. 134-44, 2015.

MCARTHUR, C.; LAPRADE, J.; GIANREGGORGIO, M . L. Suggestions for Adapting Yoga to the Needs of Older Adults with Osteoporosis. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 22, n. 3, p. 223-6, 2016.

MCCLUNG, M. R. et al. Effect of denosumab treatment on the risk of fractures in subgroups of women with postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 1, p. 211-8, 2012.

MCKAY, A. H. (2005). "Bounce at the Bell": a novel program of short bouts of exercise improves proximal femur bone mass in early pubertal children. **British Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 8, p. 521-6, 2005.

MEDINA-CONTRERAS, J. et al. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 475, n. 1-2, p. 261-76, 2020.

MENDES, J. M. **Bifosfonatos Aspectos de Seguranca**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa.

MICHELSSEN, J. Reference intervals for serum concentrations of three bone turnover markers for men and women. **Bone**, v. 57, n. 2, p. 399-404, 2013.

MILLER, D. P. et al. Effect of Abaloparatide vs Placebo on New Vertebral Fractures in Postmenopausal Women With Osteoporosis. **JAMA**, v. 316, n. 7, p. 722, 2016.

NAYLOR, K. E. et al. Clinical utility of bone turnover markers in monitoring the withdrawal of treatment with oral bisphosphonates in postmenopausal osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 30, n. 4, p. 917-22, 2019.

NIKANDER, R. et al. Targeted exercise against osteoporosis: A systematic review and meta-analysis for optimising bone strength throughout life. **BMC Medicine**, v. 8, n. 1, p. 47, 2010.

OFTADEH, R. et al. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 137, n. 1, p. 010802, 2015.

OLIVEIRA, L. G. et al. Atualização do tratamento medicamentoso da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 56, n. 5, p. 550-7, 2021.

OLIVEIRA, M. T. **Programa computacional ODR ATA para densitometria ossea baseado na densitometria radiografica**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

PATEL, D.; SAXENA, B. Decoding osteoporosis: Understanding the disease, exploring current and new therapies and emerging targets. **Journal of Orthopaedic Reports**, v. 4, n. 4, p. 100472, 2025.

PETERSEN, M. M. et al. Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Small Rats with Low Bone Mineral Density. **Calcified Tissue International**, v. 67, n. 6, p. 455-9, 2000.

POPOVIĆ, T. et al. Experimental model of osteoporosis on 14-week-old ovariectomised rats: a biochemical, histological, and biomechanical study. **Biologia Serbica**, v. 38, n. 1, p. 18-27, 2016.

RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis: Now and the future. **The Lancet**, v. 377, n. 9773, p. 1276-87, 2011.

RAJAPAKSE, S. C. et al. An expression relating breaking stress and density of trabecular bone. **Journal of Biomechanics**, v. 37, n. 8, p. 1241-9, 2004.

RAJASEKARAN, S. et al. Osteoporotic Thoracolumbar Fractures—How Are They Different?—Classification and Treatment Algorithm. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 31, n. 4, p. S49-56, 2017.

REGINSTER, J. Y. et al. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 11, n. 1, p. 83-91, 2000.

REID, R. I. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis: a review of their contribution and controversies. **Skeletal Radiology**, v. 40, n. 9, p. 1191-6, 2011.

RESZKA, A. A.; RODAN, G. A. Bisphosphonate mechanism of action. **Current Rheumatology Report**, v. 5, n. 1, p. 65-74, 2003.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 3, p. 279-302, 2002.

ROMUALDO, C. P. et al. The effect of ovariectomy and 2 antiresorptive therapeutic agents on bone response in rats: A 3-dimensional imaging analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 126, n. 3, p. 218-25, 2018.

ROONEY, M. A. et al. Loading modality and age influence teriparatide-induced bone formation in the human femoral neck. **Bone**, v. 136, p. 115373, 2020.

ROWE, A. A. et al. Murine Orchiectomy and Ovariectomy to Reduce Sex Hormone Production. **Journal of Visualized Experiments**, n. (201), p. 10.3791, 2023.

RUSSELL, G. G. R. Bisphosphonates: The first 40years. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 2-19, 2011.

SAAG, G. K. et al. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 15, p. 1417-27, 2017.

SAHNI, S. et al. Protective Association of Milk Intake on the Risk of Hip Fracture: Results from the Framingham Original Cohort. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 8, p. 1756-62, 2014.

SALEH, N. et al. Novel approach for pathogenesis of osteoporosis in ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoporosis. **Experimental Gerontology**, v. 137, p. 110935, 2020.

SANKAR, P. et al. Ovariectomy in forty rats (*Rattus norvegicus*). **Indian Journal of Animal Research**, v. 48, n. 5, p. 516, 2014.

SARAIVA, L. G.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 72-8, 2002.

SCHINDELIN, J. Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-82, p. 1-15, 2012.

SCHINI, M. et al. Bone Turnover Markers: Basic Biology to Clinical Applications. **Endocrine Reviews**, v. 44, n. 3, p. 417-73, 2023.

SHERRINGTON, C. et al. Exercise to prevent falls in older adults: an updated systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 51, n. 24, p. 1750-58, 2017.

SHIMANO, R. C. **Efeitos do exercicio fisico associado ao risedronato em ossos osteopenicos: estudo experimental com ratas ovariectomizadas**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

SHOBACK, D. et al. Pharmacological Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: An Endocrine Society Guideline Update. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 3, p. 587-94, 2020.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, V. D. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 13, n. 4, p. 320-8, 2011.

SPERETTA, G. et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics**, v. 67, n. 12, p. 1469-77, 2012.

SVEDBOM, A. et al. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. **Archives of Osteoporosis**, v. 8, n. 1, p. 137, 2013.

THAPA, S.; NANDY, A; RENDINA-RUEDY, E. Endocrinal metabolic regulation on the skeletal system in post-menopausal women. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1052429, 2022.

TOBEIHA, M. et al. RANKL RANK OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

TROMP, A. M. et al. Additional weight bearing during exercise and estrogen in the rat: the effect on bone mass, turnover, and structure. **Calcified Tissue International**, v. 79, p. 404-15, 2006.

TROY, L. K. et al. Exercise Early and Often: Effects of Physical Activity and Exercise on Women's Bone Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, p. 878, 2018.

TURNER, C. H.; ROBLING, A. G. Designing exercise regimens to increase bone strength. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 31, n. 1, p. 45-50, 2003.

TURNER, S. A. Animal models of osteoporosis - necessity and limitations. **European Cells and Materials**, v. 1, p. 66-81, 2001.

VASIKARAN, S. et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 2, p. 391-420, 2011.

WANG, L. et al. Mechanical regulation of bone remodeling. **Bone Research**, v. 10, n. 1, p. 16, 2022.

WANG, R. et al. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. **Journal of Sport and Health Science**, v. 9, n. 3, p. 211-27, 2020.

WANG, S. et al. Effects of a calcium/vitamin D/Zinc combination on anti-osteoporosis in ovariectomized rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 77, p. 127138, 2023.

WANG, S.-T. et al. Osteoprotective effect of genistein 7-O-phosphate, a derivative of genistein with high bioavailability, in ovariectomized rats. **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 171-9, 2019.

WARTOLOWSKA, K. et al. Use of placebo controls in the evaluation of surgery: systematic review. **BMJ**, v. 348, p. g3253, 2014.

WOJDA, S. J.; DONAHUE, S. W. Parathyroid hormone for bone regeneration. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 10, p. 2586-94, 2018.

XU, J. et al. Effects of Exercise on Bone Status in Female Subjects, from Young Girls to Postmenopausal Women: An Overview of Systematic Reviews and Meta-Analyses. **Sports Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1165-82, 2016b.

XU, R. et al. Transplantation of osteoporotic bone marrow stromal cells rejuvenated by the overexpression of SATB2 prevents alveolar bone loss in ovariectomized rats. **Experimental Gerontology**, v. 84, p. 71-9, 2016a.

YANG, Y.-J.; LI, Y.; GAO, L. Postmenopausal osteoporosis: Effect of moderate-intensity treadmill exercise on bone proteomics in ovariectomized rats. **Frontiers in Surgery**, v. 9, p. 1000464, 2023.

YANO, T. et al. Risedronate improves bone architecture and strength faster than alendronate in ovariectomized rats on a low-calcium diet. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 32, n. 6, p. 653-9, 2014.

YOUSEFZADEH, N. et al. Ovariectomized rat model of osteoporosis: A practical guide. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 89-107, 2020.

ZHANG, Y. et al. Effects of resveratrol on bone metabolism and bone turnover related indexes in ovariectomized osteoporosis rats. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v.66, n. 5, p. 92-7, 2020.

ZOTH, N. et al. Metabolic effects of estrogen substitution in combination with targeted exercise training on the therapy of obesity in ovariectomized Wistar rats. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 130, n. 1-2, p. 64-72, 2012.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Terapia com antireabsorptivos e exercícios físicos nas ratas osteoporóticas ovariectomizadas*" protocolo número 024/2023, sob responsabilidade de **Jair Adriano Kopke de Aguiar, Valdeci Manoel de Oliveira, José Leonardo Rocha de Faria, Vera Maria Peters, Martha de Oliveira Guerra, Marcus Vinicius De Oliveira Ferreira e Ana Eliza Andreazzi** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebra* (exceto homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, bem como normas editadas pelo Conselho de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora na reunião de **02/05/2023**.

We certify that the proposal "*Therapy with antiresorptives and physical exercises in ovariectomized osteoporotic rats*" protocol number 024/2023, under the responsibility of **Jair Adriano Kopke de Aguiar, Valdeci Manoel de Oliveira, José Leonardo Rocha de Faria, Vera Maria Peters, Martha de Oliveira Guerra, Marcus Vinicius De Oliveira Ferreira e Ana Eliza Andreazzi** – which involves the use of animals belonging to the phylum *Chordata*, subphylum *Vertebra* (except human beings), for scientific research purposes – is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, and Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee of Animal Use of the Federal University of Juiz de Fora/MG in the meeting of **02/05/2023**.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2023 a 01/08/2026
Médico Veterinário responsável pela pesquisa ART e vigência	Ricardo Palhares Zschaber de Araujo ART 4335-2023, validade 06/04/2023 a 06/04/2024, validador: eb2716aa90b266287eca314c2585be88
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	88
Peso/Idade	250-300 gramas/30 dias
Sexo	Machos

GERAL 15: Parecer CEUA 1275373 SEI 23071.917349/2023-49 / pg. 1

Procedência dos animais	CBR/UFJF
Local de manutenção dos animais	CBR/UFJF

APROVEITAMOS A OPORTUNIDADE PARA INFORMAR QUE:

- 1) O projeto/treinamento de pesquisa deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado;
- 2) A CEUA/UFJF deve ser informada de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do projeto/treinamento. É papel do pesquisador responsável assegurar medidas imediatas adequadas frente a e evento não previstos.
- 3) Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas à CEUA/UFJF de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas.
 - No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pela CEUA/UFJF e para cada evento realizado nesse período, o pesquisador responsável deverá apresentar um relatório das atividades realizadas;
 - No caso de projeto de pesquisa, esta aprovação tem validade de acordo com o cronograma proposto no protocolo. Os relatórios deverão ser enviados a cada 12 (doze meses), a partir da data de aprovação da CEUA/UFJF.
- 4) Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

Atenciosamente,

CEUA/UFJF



Documento assinado eletronicamente por **Ana Eliza Andreazzi, Coordenador(a) em exercício**, em 12/05/2023, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Adriano Kopke de Aguiar, Professor(a)**, em 12/05/2023, às 14:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1275373** e o código CRC **FEC4B70E**.

GERAL 15: Parecer CEUA 1275373 SEI 23071.917349/2023-49 / pg. 2

11 APÊNDICES

11.1 APÊNDICE 1 - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA ATRAVÉS DA OBSERVAÇÃO DAS LÂMINAS PELOS HISTOPATOLOGISTAS

Histologia óssea

O exame histológico do osso de um paciente com osteoporose pode revelar as seguintes características:

Estrutura do osso trabecular: as trabéculas, ou paredes, do osso podem ser mais grossas, normais ou mais finas do que o normal. Podem ser classificadas em: Normal, Parcialmente reduzido, Marcadamente reduzido ou Ausente.

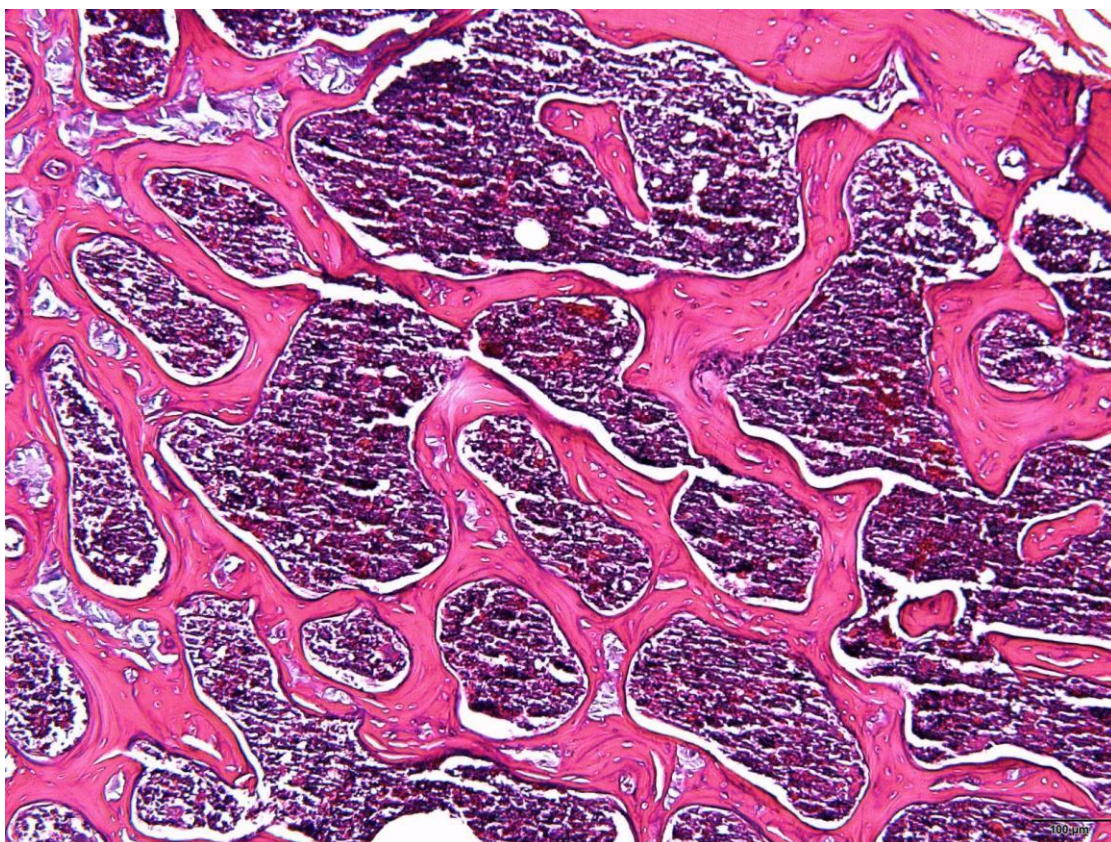
Quantidade de osso trabecular: quantidade de trabéculas visualizadas pode ser classificadas em: 90-100%, 60-90%, 30-60% ou 0-30%.

Referência: BITTO, A. et al. Protective effect of genistein aglycone on the development of osteonecrosis of the femoral head and secondary osteoporosis induced by methylprednisolone in rats. The Journal of Endocrinology, v. 201, n. 3, p. 321-8, 2009

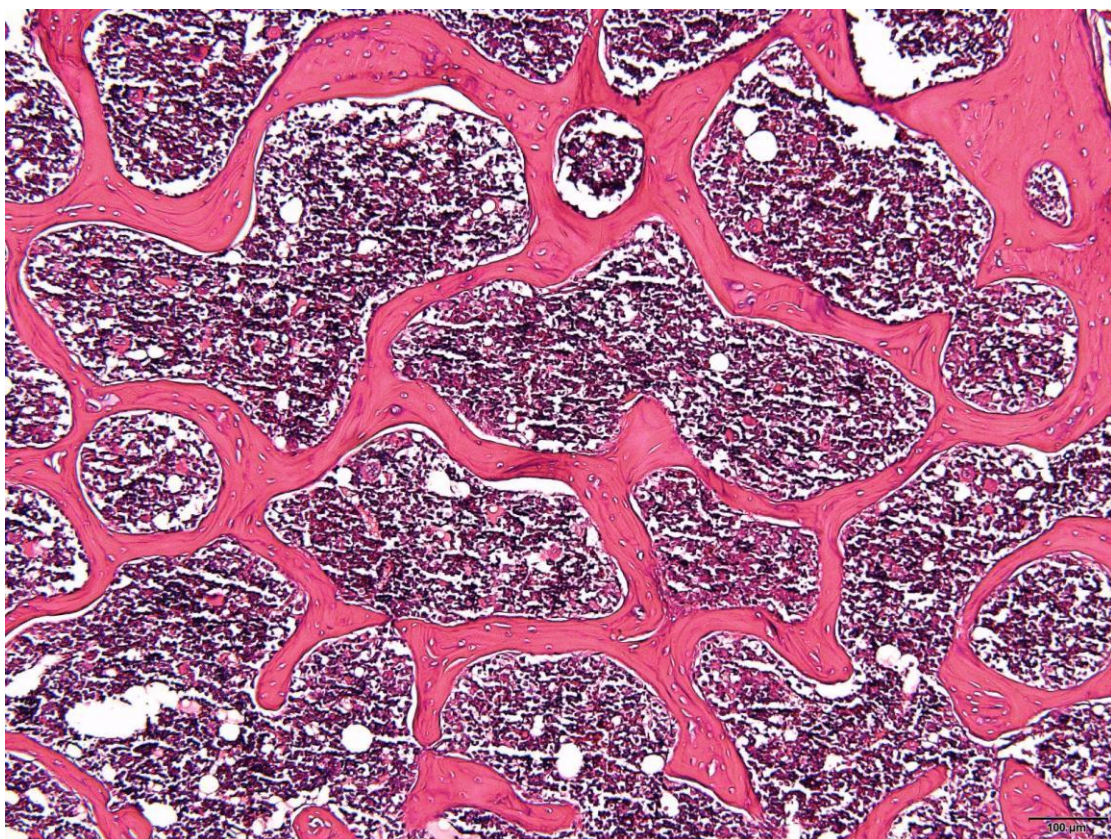
Características	Score
Estrutura do osso trabecular Quantidade do osso trabecular	0- Normal 90-100% 1- Parcialmente reduzido 60-90% 2- Marcadamente reduzido 30-60% 3- Ausente 0-30%

Estrutura do osso trabecular/ Quantidade do osso trabecular

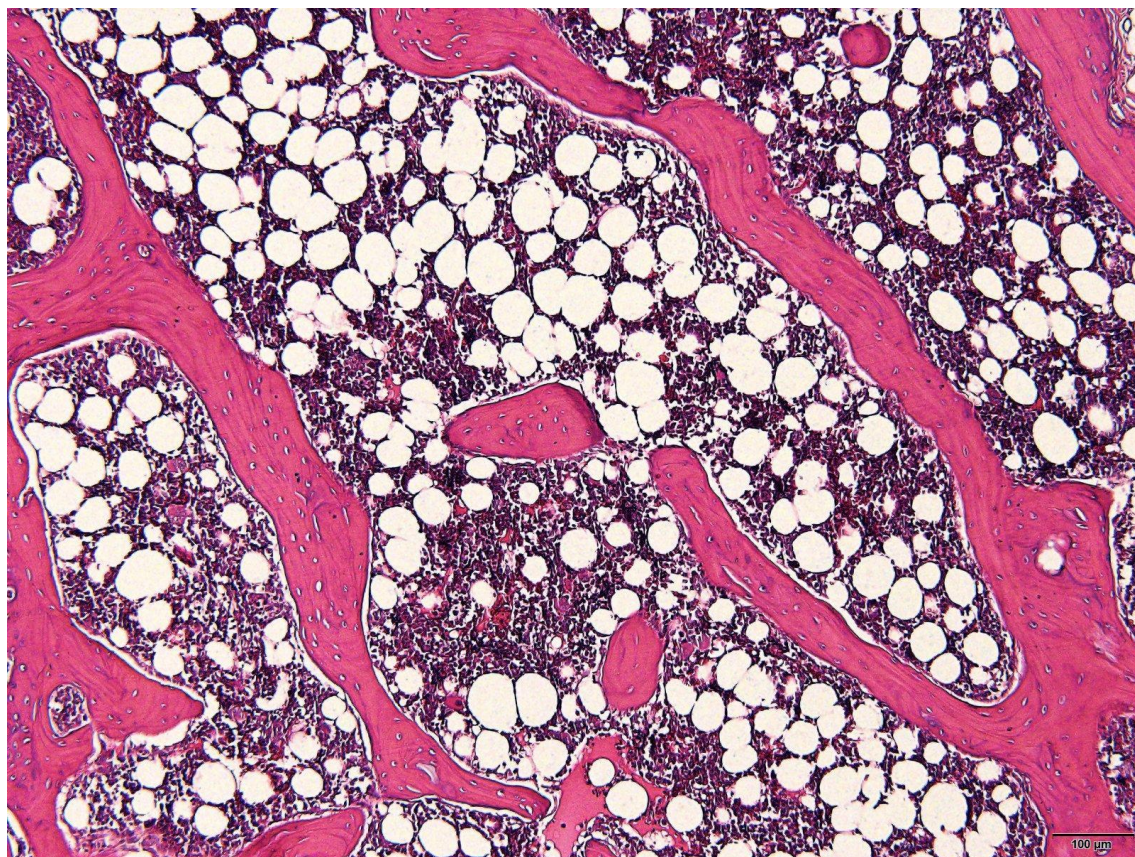
Normal 90-100%



Parcialmente reduzido 60-90%



Marcadamente reduzido 30-60%



Ausente 0-30%

