

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VILSON DONIZETE MATIAS

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A DINÂMICA ÓSSEA EM
RATAS INDUZIDAS A OVÁRIO POLICÍSTICO**

ARARAQUARA-SP
2018

VILSON DONIZETE MATIAS

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A DINÂMICA ÓSSEA
EM RATAS INDUZIDAS A OVÁRIO POLICÍSTICO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara-UNIARA- como requisito a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Montezor

**ARARAQUARA-SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

M38e Matias, Vilson Donizete

Efeitos do treinamento de força sobre a dinâmica óssea em ratas induzidas a ovário policístico/Vilson Donizete Matias. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2018.
64f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara
Área de Concentração: Gestão da Inovação

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Montezor

1. Síndrome do ovário policístico. 2. Tecido ósseo. 3. Modificações Morfofisiológicas. 4. Treinamento de força. I. Título.

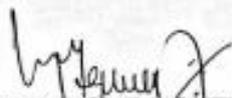
CDU 577.1:66

VILSON DONIZETE MATIAS

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2018.

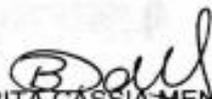
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Profª Drª MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA
Universidade de Araraquara - UNIARA



Profª Drª RITA CASSIA MENEGATI DORNELLES
Faculdade de Odontologia - UNESP - Araçatuba

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àquela que foi muito cedo, mas mesmo após sua partida me manteve firme no caminho correto e constante, através de seu legado, onde estiver, está em meu coração.

Maria José Matias, minha mãe in memoriam.

Para meu amigo e sempre Mestre José Sales de Magalhães e sua querida esposa Josefina Camargo Sales de Magalhães, pelo incentivo na minha vida quando mais precisei.

Para meu filho Gabriel, amor da minha vida, que é a razão de todo esforço.

Para minha esposa Viviane Ferreira, um ser humano fantástico, a quem só tenho a agradecer por compartilhar todos os momentos.

Para Guilherme, meu enteado que juntos, hoje posso afirmar que temos uma família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por toda saúde, ao meu pai **João Matias Filho e meus irmãos** por simplesmente existirem em minha vida, e demais familiares.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luís Henrique Montrezor**, pela disponibilidade de me orientar, pela boa vontade e paciência, uma pessoa para ter como exemplo.

Agradeço aos colaboradores **Prof^a Dr^a Keiko Okino Neonaka e Ddo Victor Fabrício** - UFSCAR São Carlos, **Prof. Dr. Jorge Alberto Achcar** – UNIARA.

Aos **Professores** do Programa de Pós-graduação, pelo profissionalismo, conhecimento e seriedade. Pela colaboração para minha formação e desenvolvimento desse trabalho.

Aos **Funcionários** da Uniara, pela solicitude, gentileza e educação, nas diversas vezes que necessitei dos mesmos, em especial à **Sandra Pavanelli**.

Aos **Colegas** que caminharam comigo no Mestrado, pelo carinho e apoio nas horas mais difíceis.

Finalmente, agradeço à **CAPES**, pelo apoio financeiro.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

(Albert Einstein)

EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A DINÂMICA ÓSSEA EM RATAS INDUZIDAS A OVÁRIO POLICÍSTICO

RESUMO

A síndrome do ovário policístico (SOP) é um distúrbio endócrino caracterizada por anovulação crônica e hiperandrogenismo, tanto em mulheres como em modelos animais. Atualmente, o tratamento para a SOP não está restrito apenas a abordagens reprodutivas, como infertilidade, anovulação e hirsutismo. Tem-se orientado as pacientes para a promoção e prevenção da saúde, além de modificações no estilo de vida, principalmente relacionadas à atividade física. Estudos demonstram que 50% das mulheres com SOP são obesas e apresentam alterações metabólicas como resistência à insulina, hiperinsulinemia e dislipidemia, aumentando o risco de desenvolver o *diabetes mellitus* e doenças cardiovasculares. Além disso, a SOP pode induzir modificações na dinâmica óssea. O presente trabalho procurou estabelecer relações entre os possíveis benefícios do treinamento de força com alterações ósseas relacionadas à SOP. Foram utilizadas 60 ratas Wistar adultas induzidas à SOP com dose única de valerato de estradiol (VE), 2mg/0,2 mL/rata (i.m.). Após a indução as ratas foram divididas em 4 grupos: controle, controle/treino, SOP, SOP/treino. Cada grupo foi composto por 5 animais (n=5). O treinamento utilizado foi a escalada em escada com peso fixado à cauda das ratas, 3x/semana. Os tempos experimentais foram definidos em 30, 45 e 60 dias após a indução. Os resultados mostram que o VE induziu a formação de cistos ovarianos nas ratas SOP e SOP/treino. A massa corporal das ratas controle e controle/treino foi maior do que das ratas SOP e SOP/treino. Houve redução da massa ovariana e do índice gonadossomático (IGS) nas ratas SOP e SOP/treino em relação às controle e controle/treino. As ratas controle/treino conseguiram escalar a escada com carga máxima maior que as ratas SOP/treino. Houve redução no volume ósseo das ratas SOP e SOP/treino em relação às ratas controle e controle/treino. Finalmente, a densidade mineral óssea (DMO) das ratas SOP e SOP/treino foi maior comparada às controle e controle/treino e a carga máxima óssea das ratas SOP/treino foi maior que a das ratas SOP. Os resultados sugerem que o modelo animal utilizado tem características morfofuncionais relacionadas à SOP e que a dinâmica óssea, tanto em dados biofísico quanto biomecânicos foram alterados pela indução da síndrome. Além disso, o exercício físico da escalada em escada alterou o volume ósseo, a densidade óssea e a carga máxima óssea. Contudo, estudos endócrinos, moleculares e genéticos deverão ser realizados para que se possa melhorar a compreensão das inter-relações entre os ovários e os ossos.

Palavras Chave: síndrome do ovário policístico, modificações morfofisiológicas, tecido ósseo, treinamento de força.

EFFECTS OF FORCE TRAINING ON BONE DYNAMICS IN FEMALE RATS INDUCED TO POLYCYSTIC OVARIAN

ABSTRACT

Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is an endocrine disorder characterized by chronic anovulation and hyperandrogenism both in woman and animals. Currently, treatment for PCOS is not restricted only to reproductive approaches, as infertility, anovulation and hirsutism. Patients not only have been advised as to health promotion and prevention, but also changes in life style and specially, physical activity. Studies show that 50% of women with PCOS are obese and have metabolic dysfunctions such as insulin resistance, hyperinsulinaemia, and dyslipidaemia, increasing the risk of *diabetes mellitus* and cardiovascular diseases. Moreover, POCS may induce alterations in bone dynamics. The present work aims at stablishing connections between possible benefits of strength training and bone alterations related to POCS. Sixty female Wistar rats induced to POCS by an only dose of estradiol valerate (EV), 2mg/0,2 mL/rat (m.i.) were used. After induction, the rats were sorted into 4 groups: control, control/training, POCS, POCS/training. Each group was composed by 5 animals (n=5). The chosen training method was stairs climbing with weight attached to the rats' tails, three times a week. Experimental periods were defined in 30, 45 and 60 days after induction. Results show that EV induced ovarian cysts in POCS and POCS/training rats. Mass reduction and gonadosomatic index (GSI) were assessed in relation to control and control/training rats. The control/training rats were able to climb stairs with maximum load higher than the load of POCS/training rats. Bone volume reduction in POCS and POCS/training rats was observed in relation to control/training rats. Finally, POCS/training rats' bone mineral density (BMD) was higher than in POCS rats. Results suggest that the animal model used has morphofunctional characteristics related to POCS and also that bone dynamics, both in biophysical and biomechanical data were altered by the syndrom induction. Furthermore, stairs climbing altered bone volume, bone density and bone maximum load. However, endocrine, molecular and genetic studies must be carried out in order to improve understanding of relation between ovaries and bones.

Keywords: polycystic ovarin, bone tissue, morfological change, resistance training.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMU- Unidade básica de remodelação óssea

Ca²⁺- Íons de cálcio

DMO- Densidade mineral óssea

DTH- dihidrotestosterona

E2- Estradiol

FA- Fosfatase Alcalina

FSH- Hormônio folículo estimulante

GH- Hormônio do crescimento

GnRH- Hormônio liberador da gonadotrofina

IGS- Índice Gonadossomático

Mg²⁺- Magnésio

OPG- Osteoprotegerina

PI- Fosfato

P4- Progesterona

PTH- Paratormônio

RANKL- Ligante para o receptor de ativação do fator nuclear Kappa B

RI- Resistência à insulina

SOP- Síndrome do Ovário Policístico

TF- Treinamento de força

TFR- Treinamento de força resistido

VE- Valerato de Estradiol

WNT- Via de sinalização intracelular

LISTA DE FIGURA

- Figura 1-** Imagem do treinamento de força em escada das ratas 30, 45 e 60 dias22
- Figura 2-** Imagem do equipamento mecânico MTS (modelo TESTSTAR II). para os testes biomecânico das ratas dos grupos 30, 45, 60 dias26
- Figura 3-** Variação média da massa corporal (em gramas) das ratas dos grupos 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....27
- Figura 4** –Variação média da massa ovariana total (A) e entre ovários direitos e esquerdos (B) (em gramas) das ratas dos grupos 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino .28
- Figura 5** – Variação média do índice gonadossomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino29
- Figura 6** – Variação média da glicemia (mg/dL) das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....30
- Figura 7** - Variação plasmática média da fosfatase alcalina (FA) (U/L) das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.30
- Figura 8** – Variação média da carga máxima (A) e carga máxima voluntária carregada (CMVC) das ratas do grupo 30 dias: controle/treino, SOP/treino.....31
- Figura 9** - Variação média dos dados biométricos dos fêmures das ratas do grupo 30: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm³). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm³). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm³).32
- Figur 10** - Variação média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) carga máxima, em kilonewton (KN). (B) rigidez, em Newton por milímetro (N/mm). (C) ponto de fratura na carga máxima em Kilonewton (KN).....33
- Figura 11** - Variação média da massa corporal (em gramas) das ratas dos grupos 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....34
- Figura 12** – Variação média da massa ovariana total (A) e entre ovários direitos e esquerdos (B) (em gramas) das ratas dos grupos 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.35
- Figura 13** – Variação média do índice gonadossomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.36
- Figura 14** – Variação média da glicemia (mg/dL) das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....36

Figura 15 - Variação plasmática média da fosfatase alcalina (U/L) das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino	37
Figura 16 – Variação média da carga máxima (A) e carga máxima voluntária carregada (CMVC) das ratas do grupo 45 dias: controle/treino, SOP/treino.	37
Figura 17 - Variação média dos dados biométricos dos fêmures das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm ³). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³).....	38
Figura 18 - Variação média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas do grupo 45: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm ³). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³).....	39
Figura 19 - Variação média da massa corporal (em gramas) das ratas dos grupos 60 dias: controle, controle treinadas, SOP e SOP treinadas.....	40
Figura 20 - Variação média da massa ovariana total (A) e entre ovários direitos e esquerdos (B) (em gramas) das ratas dos grupos 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....	41
Figura 21 - Variação média do índice gonadossomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....	42
Figura 22 - Variação média da glicemia (mg/dL) das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....	42
Figura 23 - Variação plasmática média da fosfatase alcalina (U/L) das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.....	43
Figura 24 - Variação média da carga máxima (A) e carga máxima voluntária carregada (CMVC) das ratas do grupo 60 dias: controle/treino, SOP/treino.....	44
Figura 25 - Variação média dos dados biométricos dos fêmures das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm ³). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³).....	45
Figura 26 - Variação média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas do grupo 60: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm ³). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm ³).....	46
Figura 27 - Fotomicrográficas ilustrando os ovários das ratas dos grupos Controle (A - 30dias, B - 45 dias e C - 60 dia); Controle/treino (D - 30 dias, E - 45 dias e F - 60 dias); SOP (G - 30 dias, H - 45 dias e I - 60 dias) e Sop/treino (J - 30 dias, K – 45 dias e L – 60 dias). F = folículo. CL = corpo lúteo. Setas indicam os cistos foliculares, Coloração: HE. Aumento inicial: 400x.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Tecido ósseo	14
1.2. Síndrome do Ovário Policístico.....	15
1.3. Treinamento de força	17
1.4. Modulação do tecido ósseo a partir do treinamento de força	19
2. HIPÓTESE.....	21
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVO.....	21
4.1. Geral	21
4.2. Específico	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1. Animais.....	22
5.2. Indução da SOP	22
5.3. Protocolo de treinamento	23
5.4. Eutanásia.....	24
5.5. Obtenção do plasma.....	24
5.6. Dosagens plasmáticas de glicose e fosfatase alcalina.....	25
5.7. Análise morfológica dos ovários	25
5.8. Índice gonadossomático (IGS)	26
5.9. Análise da qualidade do tecido ósseo	26
5.10. Modelo de estudo.....	28
5.11. Análise estatística	28
6. RESULTADOS	29
7. DISCUSSÃO	50
8. CONCLUSÕES.....	54
9. REFERÊNCIAS	55
10. ANEXO	
Aprovação do comitê de ética	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo desempenha importantes atividades dinâmicas, tanto nos aspectos biomecânicos como metabólicos. Participa ativamente na regulação de alguns eixos da homeostase sistêmica do organismo ao longo de toda a vida por meio de interações com vários outros tecidos, órgãos e sistemas. Exerce funções de sustentação do corpo, proteção, locomoção e hematopoiese. É um tecido metabolicamente ativo e está envolvido no controle do equilíbrio mineral do cálcio, magnésio e fosfato (MACKIE, TATARCZUCH, MIRAMS, 2011). Em modelos murinos, o papel endócrino do osso é evidenciado no controle do metabolismo energético por meio da osteocalcina (CLEMES, KARSENTY, 2011).

Os ossos estão continuamente em processos de formação e degradação, num mecanismo denominado remodelamento ósseo. O remodelamento ósseo serve a dois propósitos: reparação tecidual e manutenção das concentrações séricas de íons cálcio (Ca^{2+}), fosfato (Pi) e magnésio (Mg^{2+}), essenciais para diferentes funções do organismo (TORTORA, 2010). No esqueleto em desenvolvimento, essa atividade é primariamente voltada para a formação e o crescimento ósseos, processos pelos quais o osso atinge sua forma e tamanho ideais. No adulto, a atividade metabólica envolve, predominantemente, a remodelação (KATCHBURIAN et al., 1999), um processo fisiológico contínuo no qual a formação óssea é correspondente à reabsorção, sendo regulada por diversos fatores, como mecanismos intracelulares, influência hormonal, fatores locais e externos. Alterações nesse processo podem resultar em diferentes distúrbios, entre eles a osteoporose (NAJJAR et al., 1977).

O processo de remodelação óssea ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), sendo caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos. Cada BMU é geográfica e cronologicamente separada de outros conjuntos celulares (FROST, 1991; BORELLI, 1994), sugerindo que a sequência de ativação de eventos celulares responsáveis pela remodelação seja também controlada localmente por fatores gerados no microambiente ósseo (FROST, 1991). Os sinais que iniciam a remodelação óssea não estão completamente identificados, mas é evidente que forças mecânicas podem ser capazes de alterar a arquitetura óssea local (TURNER et al., 2004).

A ação de compressão, tensão, torção ou cisalhamento dos músculos esqueléticos sobre os ossos são os principais mecanismos que levam ao ganho de massa e resistência óssea durante

as atividades com cargas, e não a força da gravidade sobre o peso corporal. Essa teoria, descrita por Harold Frost, é conhecida como “The Mechanostat” (FROST, 1987) e preconiza que os ossos submetidos à tensão/compressão são biologicamente estimulados, aumentando a formação óssea.

Estudos indicam importante relação entre o controle glicêmico e a atividade de osteoblastos e osteoclastos (PARHAMI, 2003). A insulina, por sua vez, é capaz de estimular a expressão do fator ligante nuclear kappa I (RANKL) e reduzir a expressão de osteoprotegerina (OPG), estimulando a atividade de osteoclastos (ACKERT- BICKNELL, 2001). Estudos genéticos revelam que proteínas da via de sinalização intracelular *Wnt*, é a principal reguladora da massa óssea e está envolvida na fisiopatologia de doenças distintas como a osteoporose, pseudoglioma e condições com alta densidade óssea (WILLIAMS, 2011). Ademias componentes da família, *Wnt5b* e a *Wnt10b*, se encontram associados a doenças endócrinas, como diabetes tipo 2 e obesidade (TAMASI, 2003; HAMRICK, 2009).

1.2. SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO (SOP)

A SOP é uma desordem endócrina heterogênea observada entre 6 a 21% das mulheres em idade reprodutiva (YILDIZ; BOZDAG; YAPICI et al., 2012). Dessa porcentagem, 50% das pacientes com SOP são obesas (LIM; NORMAN; DAVIS et al., 2012) e na maioria dos casos, a SOP promove alterações metabólicas como resistência à insulina (RI), hiperinsulinemia e dislipidemia, aumentando o risco de desenvolver o diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (DIAMANTI-KADARAKIS; DUNAIF, 2012), hipertensão arterial sistêmica (CIBULA et al., 2000), disfunção endotelial (PARADISI et al., 2001), obesidade central (LORD et al., 2006), e marcadores pró-inflamatórios crônicos (KELLY et al., 2001), além de baixa aptidão física (ORIO et al., 2006).

Foi descrita pela primeira vez por Stein e Leventhal em 1935, que relataram um quadro com sinais e sintomas correlacionados à anovulação. Neste contexto, foram incluídas mulheres que apresentavam histórico de infertilidade, distúrbios menstruais, hirsutismo e obesidade, juntamente com a demonstração de ovário aumentado de volume com cistos e hipertrofia do estroma. Posteriormente denominada Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), considerada como um distúrbio hormonal complexo de base funcional, caracterizada pela anovulação crônica hiperandrogênica, repercutindo na reprodução, estética e metabolismo (MARCONDES et al., 2007). O que antes tinha como diagnóstico apenas manifestações clínicas e anatômicas, passou a incorporar critérios bioquímicos e ultrassonográficos (MARCONDES et al., 2011).

Seu diagnóstico, segundo o Consenso Rotterdam, depende da presença de dois dos três fatores: anovulação crônica; sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo e presença de padrão ultrassonográfico de ovário policístico (ROTTERDAM, 2004). Em 2009, a Androgen Excess and PCOS Society determinou como obrigatória presença de hiperandrogenismo (clínico e ou/ bioquímico) e oligoanovulação e/ou ovário(s) policístico(s) na ultrassonografia como critério diagnóstico para a SOP, após a exclusão de outras causas. (AZZIZ et al., 2009). Os distúrbios do ciclo menstrual e, da mesma forma, distúrbios da fisiologia menstrual podem causar vários estados patológicos, incluindo infertilidade, aborto recorrente e neoplasias malignas (BRAERWALD et al., 2012).

Os objetivos do tratamento para SOP não se restringem à abordagem das repercussões reprodutivas, como infertilidade, anovulação e hirsutismo; eles também são direcionados para a promoção e prevenção da saúde cardiovascular. Nesse sentido, tem sido dado destaque às medidas não farmacológicas, especialmente a orientação nutricional e a prática regular de exercício e/ou atividade física. Apesar das estratégias de tratamento de longa duração para a SOP não serem totalmente conhecidas (HOEGER et al., 2004), parece ser fato que mudanças no estilo de vida, como modificações na dieta (BRUNER; CHAD; CHIZEN, 2002; NORMAN et al., 2007), prática regular de exercício físico e perda de peso (ESHRE, 2004; NORMAN et al., 2007; PALOMBA et al., 2008; ROESSLER et al., 2013), sejam mandatórias, somado à cessação do tabagismo, controle do estresse e consumo moderado de álcool (NORMAN et al., 2007).

No entanto, estudos em mulheres portadoras da SOP apresentam dificuldades que prejudicam a evolução dos conhecimentos por vários motivos: elevado tempo de vida média para estudos longitudinais, dificuldade de acesso ao órgão alvo (hipotálamo, hipófise, ovário e tecido ósseo), heterogeneidade da síndrome e dificuldade de manipulação genética (ARAUJO, 2017). Assim, a utilização de modelos animais pode trazer contribuições importantes para o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da SOP e, possivelmente, para estratégias terapêuticas de prevenção desta síndrome.

Modelos de estudos que utilizam ovelhas e primatas com características semelhantes às pacientes humanas com SOP, tem-se mostrado inviáveis devido aos elevados custos. Os modelos animais com roedores podem exibir distúrbios reprodutivos e metabólicos similares à SOP em humanos, além de apresentarem período de vida reprodutiva mais curto e facilidades na manutenção e no manuseio dos animais (WALTER et al., 2012). Ratas induzidas à SOP com andrógenos, estrógenos, inibidores de aromatase, antiprogéstágenos, influências ambientais e

modificações genéticas têm sido utilizadas com resultados relevantes (FRANKS, 2012; SHI; VINE, 2012).

Ratas expostas a elevados níveis de andrógenos e estrógenos ao longo do período neonatal apresentaram diferentes características reprodutivas durante a vida adulta, inclusive anovulação e cistos ovarianos (MARCONDES et al., 2015). Tais resultados corroboram com outros estudos que mostraram que ratas submetidas a elevadas concentrações de estradiol e progesterona apresentaram anovulação crônica (ALEXANDERSON et al., 2010; MAHAMED et al., 2011).

Desde o início da maturidade sexual (por volta de 3 meses) até a idade de 12 meses, a duração média do ciclo estral em ratas é de 4 dias. Esta curta duração faz com que ratas sejam bons modelos animais para se investigar alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (MARCONDES, 2007). Sendo assim, ratas Wistar induzidas à SOP com valerato de estradiol demonstram ser um modelo viável e promissor para mimetizar os efeitos patológicos da SOP em mulheres (BROWER, 1986; PEREIRA et al., 2014; MONTREZOR et al., 2015).

1.3. TREINAMENTO DE FORÇA

O exercício resistido é caracterizado por contrações musculares realizadas contra resistências, podendo-se utilizar pesos, aparelhos de resistência hidráulica, eletromagnética, molas e elásticos. O treinamento físico é definido como treinamento resistido ou de força quando o programa de treino utiliza os exercícios resistidos, havendo assim fortalecimento e hipertrofia musculares promovem benefícios à densidade mineral óssea (DMO), melhorias para a coordenação e a estabilidade (WILHELM et al., 2012).

O treinamento de força tem demonstrado ser eficiente em adaptar o sistema neuromuscular em diversas populações (KREMER et al., 2002; ROTAMESS et al., 2009). Entretanto, a elaboração de tais programas demanda a correta e individual manipulação das variáveis de treinamento (ZATSIORSKY, KRAMER, 2008; PRESTES et al., 2016). O aumento do volume de treinamento por meio do aumento periódico do número de séries para o mesmo grupo muscular na sessão ou o aumento da frequência semanal de estímulos, têm sido as principais formas de atender ao princípio da sobrecarga progressiva sem alterar a capacidade física predominante (CHANDLER, BROWN, 2003).

Embora seja relativamente fácil estudar os efeitos do exercício físico em humanos, torna-se difícil determinar as adaptações musculares fenotípicas em resposta aos diferentes modelos de treinamento físico. Esta limitação é primariamente devido à natureza invasiva das

biopsias musculares e ao risco inerente à utilização de humanos. Considerando a heterogeneidade, uma pequena amostra poderia não refletir acuradamente a resposta muscular. Além disso, estudos em humanos podem ser influenciados pela motivação, técnica de movimento durante o treinamento, testes físicos e estilo de vida dos sujeitos. Para evitar estes problemas inúmeros modelos animais têm sido utilizados (GANYEA, 1976; BALDWIN et al., 1977; LAURENT et al., 1978; SHIGUEMOTO et al., 2007).

Recentemente, foi sugerido que as sessões de menor duração em e maior frequência maximizam as adaptações neuromusculares em humanos, isso pode ser devido à manutenção da síntese proteica (DANKEL et al., 2016). Entretanto, as orientações quanto à frequência de treinamento ainda diferem da prática (HACKETT, JOHNSON, CHOW, 2013). Ao longo de seis meses de dieta e exercícios aeróbios, pacientes foram capazes de sustentar melhora no metabolismo de carboidratos confirmando a hipótese de que é possível melhorar a sensibilidade insulínica e restaurar a função menstrual e a fertilidade em mulheres obesas com SOP (HUBER-BUCHHOLZ, CAREY, NORMAN, 1999).

Na mesma linha de investigação Thomson et al. (2008), avaliaram os efeitos dos exercícios físicos aeróbios e resistidos combinados com dietas de restrição calórica e concluíram que a prática de exercícios providenciou mudanças benéficas na composição corporal, com aproximadamente 45% de redução de massa gorda e 60% de preservação de massa magra, mas não houve benefícios adicionais nos fatores de risco cardiovasculares, níveis hormonais e função reprodutiva em relação ao grupo que seguiu apenas uma dieta restritiva. É consensual que atividades físicas de maior sobrecarga decorrente da massa corporal, bem como o treinamento de força, causem estímulos osteogênicos devido ao aumento do estresse mecânico localizado nos ossos (CREIGHTON et al., 2001). Tem-se estudado que programas de exercícios físicos em humanos, bem como experimental em animais, têm demonstrado que quando realizados exercícios de alta intensidade e que apresentem grande impacto sobre as estruturas ósseas, são recomendados para promover carga mecânica suficiente para deformar e estimular a neoformação óssea (SHIGUEMOTO, 2007). Entretanto, os processos fisiológicos responsáveis pelas respostas a esse esforço não são claramente explicados.

Uma possível justificativa para o aumento da densidade mineral óssea com o treinamento de força é o efeito piezoelétrico ósseo. Isso é sugerido pela presença de sinais bioquímicos possivelmente decorrentes da sobrecarga aplicada ao osso. Essa teoria se aplica a qualquer deformação ou sobrecarga óssea causada por compressão, tensão, torção ou cisalhamento desse tecido. Essas ações mecânicas geram diferenças no potencial elétrico dos

ossos, que agem como um campo elétrico, estimulador da atividade celular, levando à deposição de minerais nos pontos de estresse (MENKES et al., 1993).

A preservação da massa magra em mulheres com SOP tem importância potencial na manutenção e promoção contínua da redução de massa corporal e do metabolismo basal (VIGORITO et al., 2007, THOMSON et al., 2011). Segundo Cosar et al. (2008), a taxa metabólica basal diminui com a idade, diminuindo a porcentagem de massa magra. A obesidade/excesso de peso tem efeitos deletérios sobre a função reprodutiva onde o exercício físico e o controle dietético são recomendados como intervenções clínicas de primeira linha para o tratamento clínico das mulheres com SOP, especialmente para aquelas com excesso de peso e obesidade (THYFALT, 2008). Mudanças no estilo de vida e exercício físico restauram a função ovulatória, diminuem a produção de andrógenos ovarianos, diminuem o estado inflamatório e diminuem a sensibilidade à insulina em mulheres com SOP (THOMSON et al., 2011). Independente da redução da massa corporal, o exercício físico é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina no músculo estriado esquelético em indivíduos com RI (COKER et al., 2009). Assim, a prática de exercícios físicos pode influenciar mudanças positivas na composição corporal e no condicionamento físico de mulheres com SOP.

Há novas ideias sobre os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos protetores do exercício físico contra uma miríade de doenças, incluindo demência, câncer, obesidade e doença da retina. Contudo, ainda não estão esclarecidos como esses mecanismos podem melhorar tais doenças (FEBBRAIO, 2016). Kogure (2011), sugere que o treinamento de força resistido (TFR) praticado regularmente pode ser considerado um tratamento não farmacológico de primeira linha em mulheres com SOP, representando uma opção terapêutica que promove alterações na composição corporal, restaura a função reprodutiva, e aumenta os níveis de força máxima.

1.4. MODULAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO A PARTIR DO TREINAMENTO DE FORÇA NA SOP

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a SOP ocorre em 4-8% das mulheres em todo o mundo. O Instituto Nacional de Saúde Americano documentou que a síndrome afeta aproximadamente 5 milhões de mulheres em idade reprodutiva nos Estados Unidos (OMS, 2011). O desequilíbrio hormonal é importante característica em muitas mulheres com síndrome do ovário policístico. Além disso, a influência de várias doenças endócrinas e suas relevâncias para os ossos têm sido documentadas. As concentrações plasmáticas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), insulina, hormônio folículo estimulante (FSH),

hormônio luteinizante (LH), andrógenos, estrógenos, hormônio do crescimento (GH), cortisol, paratormônio (PTH), calcitonina, insulina, cortisol, vitamina D, estão alterados em pacientes com SOP, estes hormônios influenciam o metabolismo ósseo direta e indiretamente o desequilíbrio nas concentrações plasmáticas desses hormônios resulta em maior prevalência de osteoporose em mulheres com SOP (KRISHNAN, MUTHUSAMI, 2017).

A hiperinsulinemia associada à resistência a insulina desempenha função vital no desenvolvimento de SOP. A hiperinsulinemia pode aumentar as concentrações plasmáticas de andrógenos, que por sua vez pode aumentar a resistência à insulina; assim, a sinalização da insulina pode atuar aumentando a reabsorção óssea, diminuindo a expressão de osteoprotegerina e aumentando expressão RANKL. Portanto, é possível que o aumento nas concentrações séricas de insulina em mulheres que sofrem com a SOP pode modular as atividades de osteoblastos, reduzindo a formação óssea (KRISHNAN, MUTHUSAMI, 2017).

Segundo Tortora (2010), a tensão em um osso altera-se em resposta à atividade física vigorosa e repetida, e pode ser influenciada por fraturas ou pela deformidade física. Assim, a organização dos ósteons não é estática, se altera com o tempo e em resposta à pressão e/ou estresse submetidos ao esqueleto. Desta forma, pode-se afirmar que várias condições endócrinas, como hiperglicemia e diabetes mellitus, e componentes da síndrome metabólica, tais como a obesidade e a resistência à leptina apontam mecanismos fisiopatológicos comuns e interdependentes com doenças ósseas (MARCONDES, 2017).

Os efeitos adversos da inflamação crônica na remodelação óssea e na qualidade óssea são cada vez mais reconhecido (MANOLAGAS, 2010). Além da disfunção endócrina, as mulheres com SOP estão em maior risco de inflamação subclínica crônica (MURRI et al., 2013) e potencialmente em maior risco de distúrbios endócrinos (MURRI et al., 2013), a força óssea foi atenuada em mulheres com SOP e associadas à inflamação, que, por sua vez, foi positivamente predita por relação cintura-altura aumentada e o corrente uso de contraceptivos orais. As questões de saúde das mulheres com SOP devem levar em consideração o impacto tanto da condição, quanto do tratamento na saúde óssea a longo prazo (KRISHNAN, MUTHUSAMI, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Mulheres com SOP têm maior incidência de sobrepeso e obesidade, dislipidemia, hiperinsulinemia, diabetes mellitus tipo II e, conseqüentemente, maior risco de doenças cardiovasculares e problemas ósseos. Além disso, por apresentarem anovulação,

hiperandrogenemia e resistência à insulina, a composição corporal proporcional entre músculo estriado esquelético e tecido adiposo pode ser modificada, alterando o metabolismo ósseo. Assim, a prática de exercício físico resistido, por apresentar gasto calórico e tensão óssea pode trazer benefícios no controle dos distúrbios ósseos e metabólicos causados pela SOP. Desta forma, analisar possíveis efeitos da prática de exercícios físicos resistidos com o metabolismo ósseo em ratas Wistar adultas induzidas à SOP, como modelo experimental, pode contribuir para a compreensão de mecanismos fisiopatológicos interrelacionados a esses eventos orgânicos

3. HIPÓTESE

Ratas induzidas à SOP com VE tem maior probabilidade desenvolver distúrbios no metabolismo ósseos.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

O presente trabalho procurou estabelecer relações entre o treinamento de força com alterações ósseas relacionadas à SOP.

4.2. Específicos

- Induzir SOP em ratas Wistar adultas;
- Submeter as ratas ao treinamento de força;
- Realizar dosagens de Fosfatase alcalina;
- Realizar dosagens plasmáticas de glicose;
- Analisar as alterações biomecânicas (carga máxima, rigidez e ponto de fratura na carga máxima) e biofísicas (volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral) dos fêmures das ratas induzidas à SOP.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizadas 60 ratas Wistar adultas com três meses, pesando entre 150g e 200g no início dos experimentos, obtidas no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP - USP. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade de Araraquara - UNIARA, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e luminosidade (ciclos 12h x 12h). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram pesados inicialmente e todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as normas vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA – UNIARA), sob protocolo número 025/16.

Os ciclos estrais foram verificados manualmente por meio da coleta do lavado vaginal com auxílio de uma pipeta. Um volume aproximado de 1,5 mL de solução salina 0,9% foi introduzido e aspirado das vaginas das ratas. Este líquido foi colocado em uma lâmina histológica e o conteúdo presente foi examinado ao microscópico de luz para identificar as fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro). A caracterização de cada fase do ciclo é baseada na proporção entre os elementos observados no lavado vaginal: células epiteliais, células queratinizadas, muco e leucócitos (MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002; SOARES 2014). A verificação do ciclo estral teve a periodicidade de 3x/semana ao longo dos tempos experimentais. Após a indução à SOP, a verificação dos ciclos estrais continuou até a realização da eutanásia dos animais, conforme o tempo de duração dos grupos experimentais: 30, 45 e 60 dias. Além disso, os animais foram pesados semanalmente a partir da indução à SOP e no final de cada etapa experimental (BRAWER, 1986; MONTREZOR et al., 2015).

5.2. Indução da SOP

A indução para ovário policístico foi realizada com dose única de valerato de estradiol (Sigma-Aldrich). O hormônio foi dissolvido em óleo mineral e administrado intramuscular na dose de 2 mg/0,2 ml/rata (BRAWER et al., 1986; PEREIRA et al., 2014; MONTREZOR et al., 2015). Os animais controle receberam injeção intramuscular de 0,2 ml de óleo mineral. Após a injeção hormonal, os animais foram divididos em grupo 30 dias após indução; grupo 45 dias após indução e grupo 60 dias após indução. Para cada grupo de animais tratados, havia um grupo de animais controle. Os tempos propostos após a indução fazem referência ao tempo necessário

para que seja instalada a SOP (BRAWER, 1986; PEREIRA et al., 2014; MONTREZOR et al., 2015).

5.3. Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento foi realizado de acordo com Hornberger, Farrar et al., (2004). Inicialmente as ratas foram condicionadas ao treinamento de força com escalada em escadas, sem carga, por uma semana, com descanso de 120 segundos no topo da escada (1,1 x 0,18 m, degrau de 2 cm, inclinação de 80° (Fig.1). Posterior ao condicionamento, as cargas foram fixadas na porção proximal da cauda dos animais com uma tira autoadesiva e a escalada na escada na fase inicial, quando necessário, era estimulada por um toque manual no dorso do animal. No topo da escada as ratas encontraram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por 120 segundos.

O procedimento foi repetido até que as ratas subissem as escadas três vezes consecutivas, sem o toque no dorso. Nos três dias seguintes ao condicionamento, as ratas iniciaram o protocolo de treinamento de força progressiva. A primeira sessão de treinamento consistiu em escalar a escada 8 vezes, com tempo médio de 12 segundos por subida, carregando progressivamente cargas mais pesadas.

Na primeira sessão, foi utilizada carga equivalente a 75% da massa corporal do animal. No topo da escada elas descansaram por 120 segundos. Posteriormente, um peso de 30 gramas foi adicionado à cauda da rata e o processo de escalada foi repetido. Este procedimento foi repetido sucessivamente até que a carga alcançada não permitiu que a rata conseguisse subir a escada. Então, a carga transportada com sucesso até o topo da escada foi considerada a carga máxima para a sessão. O protocolo de treinamento foi realizado durante os tempos da pesquisa (30, 45, 60 dias), 3 vezes por semana com 8 escaladas por treino, sendo realizados testes de carga ao final de cada semana de treinamento para ajustes das cargas.

Figura. 1. Imagem das ratas em treinamento de força em escalada na escada.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.4. Eutanásia

Ao final de cada período experimental os animais foram sacrificados com anestesia geral injetável (Pentobarbital sódio 3%, 0,6 ml/100g de peso corporal).

5.5. Obtenção do Plasma

Imediatamente após a eutanásia, foi coletado sangue por meio de punção cardíaca e/ou arco aórtico com seringas de 5 mL e agulhas 30x0,7mm, acondicionado em tubos *vacutainer* de 10 mL com heparina e mantidos em gelo. O sangue foi centrifugado (300 rpm x 20 minutos) para a separação do plasma que foi acondicionado em eppendorfs e congelado a -80° C para posteriores análises de glicose e fosfatase alcalina.

5.6. Dosagens plasmáticas de glicose e fosfatase alcalina

As dosagens glicêmicas foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático da marca Bio Plus – Bio- 2000, utilizando o *kit* comercial Labtest e foi seguindo as recomendações do fabricante, o processo, baseia-se na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho. O aparelho permite selecionar o comprimento de onda (λ) da radiação adequado à análise de um determinado componente, bem como determinar a concentração de uma espécie em solução, verificando a variação de absorbância (ou transmitância) em função da concentração de várias soluções-padrão.

As dosagens plasmáticas de fosfatase alcalina foram realizadas em analisador automático Cobas Integra 400 (Roche), por ensaio colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial Labtest (Belo Horizonte, MG, Brasil), em conformidade com as recomendações do *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), de acordo com o seguinte princípio: em presença dos íons magnésio e zinco, o p-nitrofenil fosfato é clivado pelas fosfatases em fosfato e p-nitrofenol. O p-nitrofenol liberado é diretamente proporcional à atividade catalítica da fosfatase alcalina, determinada pela medida do aumento da absorbância a 409 nm (IFCC, 1984).

5.7. Análise morfológica dos ovários

Imediatamente após a eutanásia, foi realizada laparotomia e os ovários foram retirados, dissecados, pesados e fixados em solução de formaldeído 4% (preparada a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7.2, em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, foram lavados em água corrente por 2 horas, desidratados em álcool (70°, 80°, 90° e 100° GL), diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina.

Para as análises morfológicas em microscopia de luz, para a comprovação da formação dos cistos ovarianos, foram realizados cortes histológicos de 5 micras de espessuras nos blocos de parafina e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram confeccionadas na Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

5.8. Índice Gonadossomático (IGS)

Imediatamente antes da eutanásia os animais foram pesados e, após a eutanásia, os ovários foram retirados, dissecados e pesados, como descritos anteriormente. Ambos os pesos foram utilizados para a determinação do índice gonadossomático: [(massa dos ovários/massa corporal) x100]. Logo após, os ovários foram fixados (formaldeído 10%) para posteriores confecções de lâminas histológicas.

5.9. Análises da qualidade do tecido ósseo

Os fêmures direitos de cada animal foram retirados cirurgicamente, adequadamente dissecados, etiquetados e mantidos em freezer (- 80° C) para posteriores análises. Os fêmures foram testados mecanicamente, até sua fratura completa, em teste de flexão em 3 pontos à velocidade de 0,05 mm/s (3 mm/min) no equipamento mecânico MTS (modelo TESTSTAR II), com célula de carga de 100 Kgf (Fig. 2) (AKHTER et al., 2001, ROBERTSON et al., 2006). A força foi aplicada na superfície anterior porque há maior estabilidade do osso com o aparato mecânico, minimizando a rotação durante o teste (BUHL et al., 2001). Os dados de força (carga ou *load*) e deslocamento (deformação absoluta ou *displacement*) foram obtidos diretamente do sistema MTS e registrados pelo *software* do computador acoplado à máquina de ensaio. Os registros destes dados foram utilizados para aquisição e cálculo das propriedades estruturais: força máxima (*maximum load*), força no limite elástico (*yieldload*) e rigidez extrínseca ou estrutural (*stiffness*). A rigidez extrínseca foi calculada como sendo a inclinação da porção mais linear da região elástica da curva força-deslocamento (AKHTER et al., 2001; HUANG et al., 2003). Os fêmures foram utilizados para a determinação da densidade mineral óssea e para o conteúdo mineral ósseo (CMO). A DMO do fêmur direito foi calculada usando o Princípio de Arquimedes, isto é, obtendo a medida da massa do osso no ar e medindo novamente o peso após submergir num volume específico de água destilada. A partir desses dois parâmetros, a densidade foi então calculada utilizando-se a fórmula: (MUHAMMAD et al., 2013).

$$D = (w1 / w1 - w2) \times P \quad (1).$$

Onde: D = densidade,

W = peso (w1 - peso no ar e w2 - peso na água)

P = densidade da água em determinada temperatura, expressa em g/cm³.

A composição de todo o fêmur direito foi determinada pelas diferentes pesagens do osso. Para essa análise, foi feita a consideração de que o mesmo é basicamente composto por três principais elementos: água, matriz orgânica e matriz mineral. Dessa forma, os fêmures passaram por um processo de retirada total do ar em seu interior, ficando 24 horas submersos em água destilada, sob vácuo, os fêmures foram pesados ao serem retirados da água, enquanto saturados com a água destilada (peso úmido - m_w). Posteriormente, foram colocados em estufa a 100° C durante 24 horas para evaporação de toda água e, no dia seguinte, foram pesados novamente (peso seco - m_d). Finalmente, para obtenção da massa mineral, os fêmures foram levados ao forno a 800° C (mufla), durante 48 horas, acondicionados em barcas de cerâmica, das quais foram feitas pesagem inicial, antes de serem colocadas no forno e pesagem final, após o resfriamento das mesmas. A diferença entre essas duas pesagens é o peso da matéria mineral (peso das cinzas - m_a) (MUHAMMAD et al., 2013).

O percentual de água, matéria orgânica e mineral foram calculados da seguinte forma:

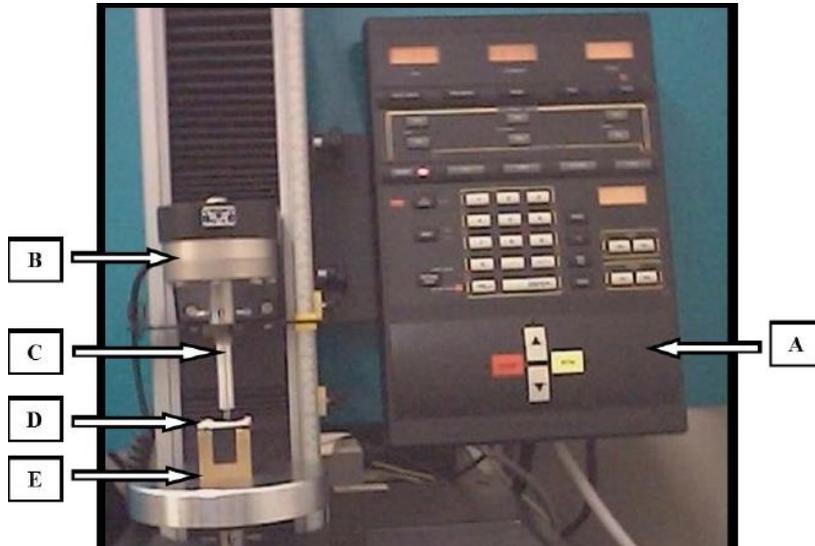
$$\% \text{ água} = \% W = 100 (m_w - m_d) / m_w$$

$$\% \text{ orgânica} = \% O = 100 (m_d - m_a) / m_w$$

$$\% \text{ cinzas} = \% A = 100 m_a / m_w.$$

As propriedades biomecânicas dos fêmures das ratas foram avaliadas pelo ensaio de flexão em 3 pontos. A tensão de ruptura (N), a rigidez extrínseca (N/mm), a tenacidade (mJ) e a resiliência (mJ) foram analisadas por software e calculadas a partir da curva de carga/deflexão, registrados a parâmetros padronizados de célula de carga a 2000 N de capacidade a velocidade de 5mm/min (MARTIN,1990).

Figura. 2. Imagem do equipamento mecânico MTS (modelo TESTSTAR II) para os testes biomecânicos. Máquina de Ensaio Universal Instron (Modelo 4444) utilizada para ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. A: painel de controle B: célula de carga ligada à ponte de extensiométrica (1kN); C: base cilíndrica para a aplicação da carga (Força); D: osso (Fêmur de rato); E: suporte.



5.10. Modelo de estudo

Estudo caso controle, com duração de 30, 45, 60 dias. As ratas foram divididas nos seguintes sub-grupos: Controle (Cont), Controle treino (Cont/treino), SOP e SOP/treino. Os tempos experimentais após a indução da SOP foram de 30, 45 e 60 dias. Cada grupo foi composto por 5 animais ($n = 5$).

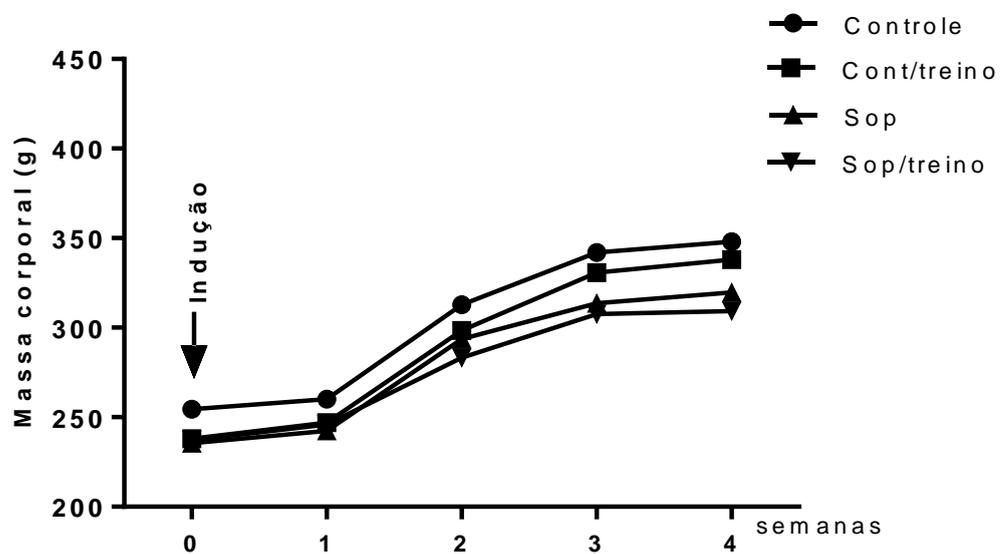
5.11. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 7.1. Para os dados não-paramétricos a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via, seguida por *post hoc* teste de Tukey ou ANOVA de duas vias seguida por *post hoc* teste de Bonferroni, quando aplicável. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Em todos os casos foi considerada diferença significativa quando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

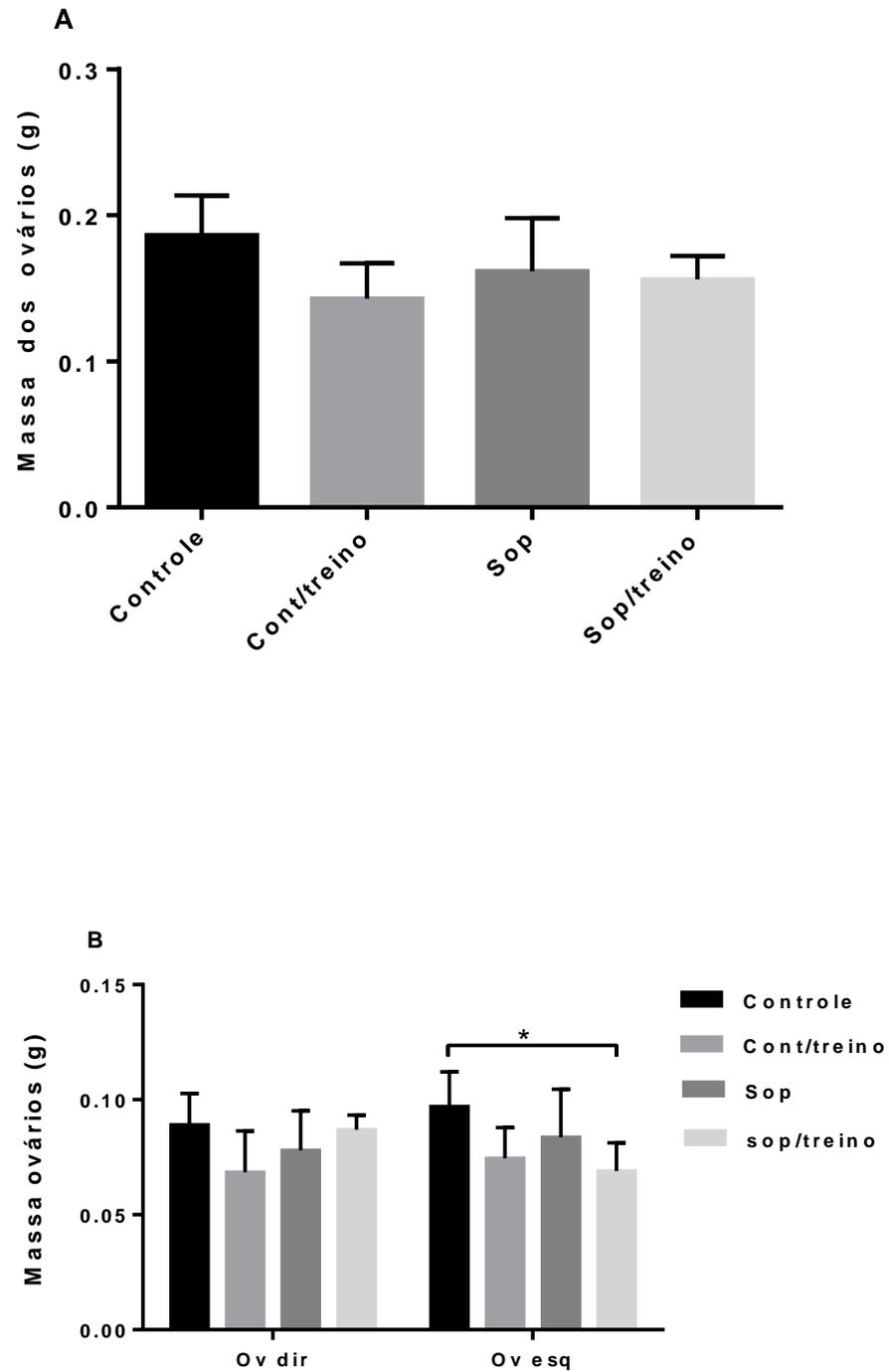
Os resultados das variações médias da massa corporal das ratas do grupo 30 dias são observados na figura 3. Observa-se que não houve diferença significativa de massa corporal entre os grupos controle, controle/treino, SOP e SOP/treino.

Figura 3 - Variação média da massa corporal (em gramas) das ratas dos grupos 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



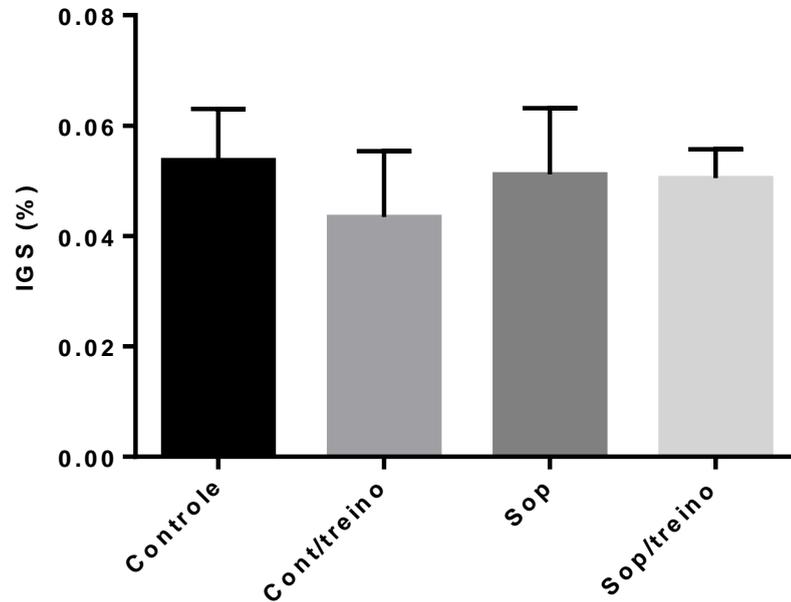
Observa-se na figura 4A que não houve variações significantes entre as médias das massas totais dos ovários. Quando comparou-se as massas médias entre os ovários, houve redução da massa dos ovários esquerdos do grupo SOP/treino em relação ao grupo controle (Fig. 4B).

Figura 4 –Variação média da massa ovariana total (A) e entre ovários direitos e esquerdos (B) (em gramas) das ratas dos grupos 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM. * $p < 0.05$.



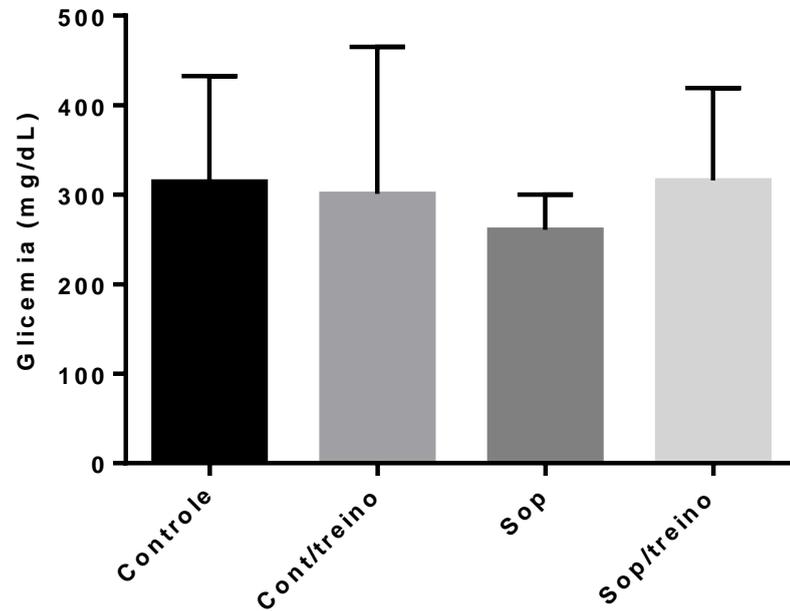
As variações médias dos índices gonadossomáticos das ratas do grupo 30 dias estão demonstradas na figura 5. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Figura 5 – Variação média do índice gonadosomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



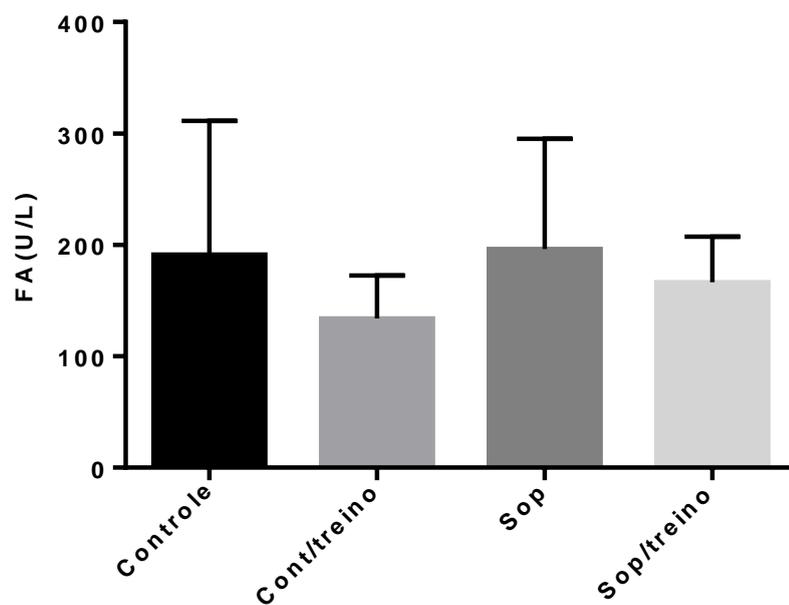
A variação da média da glicemia para as ratas do grupo 30 dias está demonstrada na figura 6. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

Figura 6 – Variação média da glicemia (mg/dL) das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



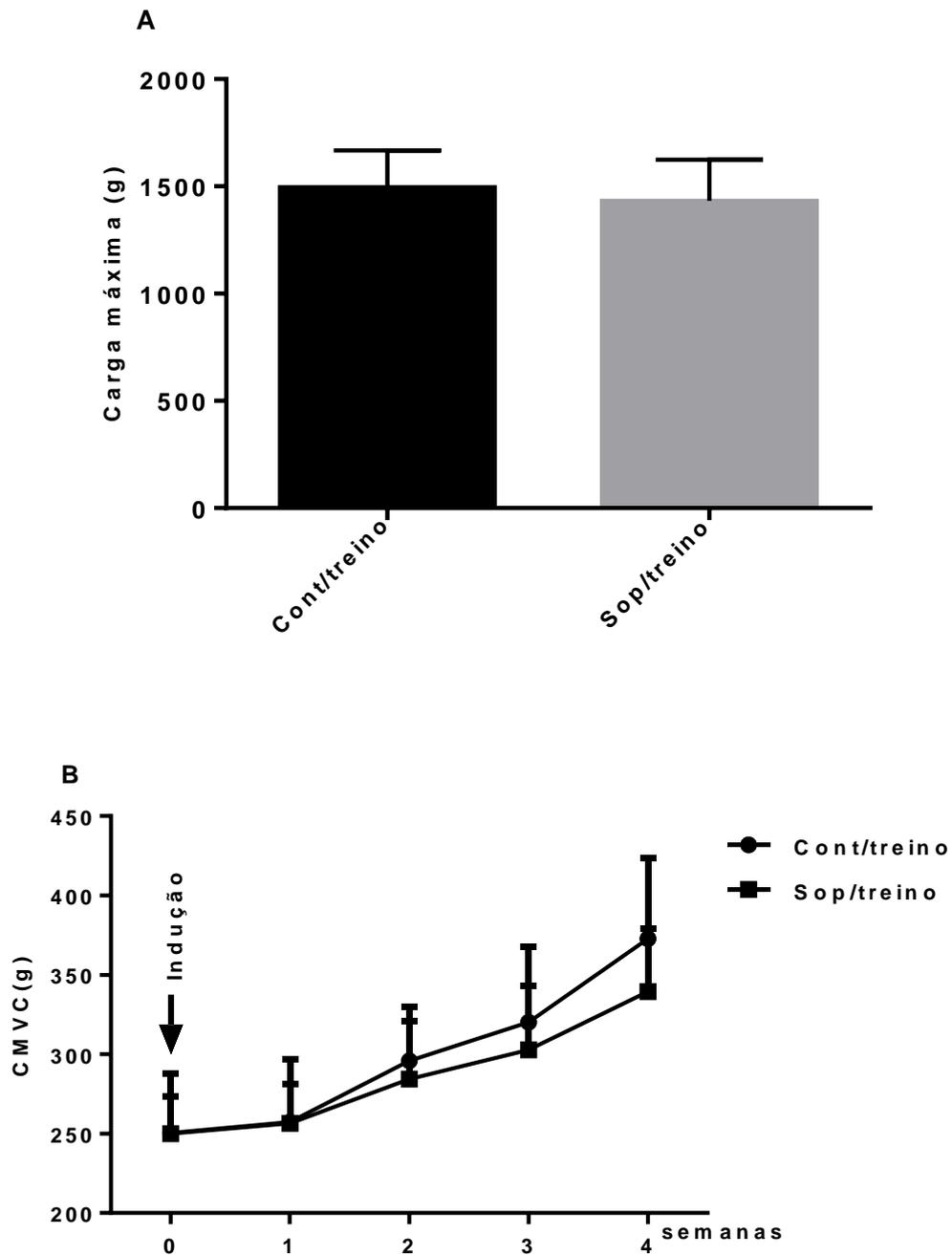
Observa-se na figura 7 a variação plasmática média da fosfatase alcalina para as ratas do grupo 30 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

Figura 7 - Variação plasmática média da fosfatase alcalina (FA) (U/L) das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



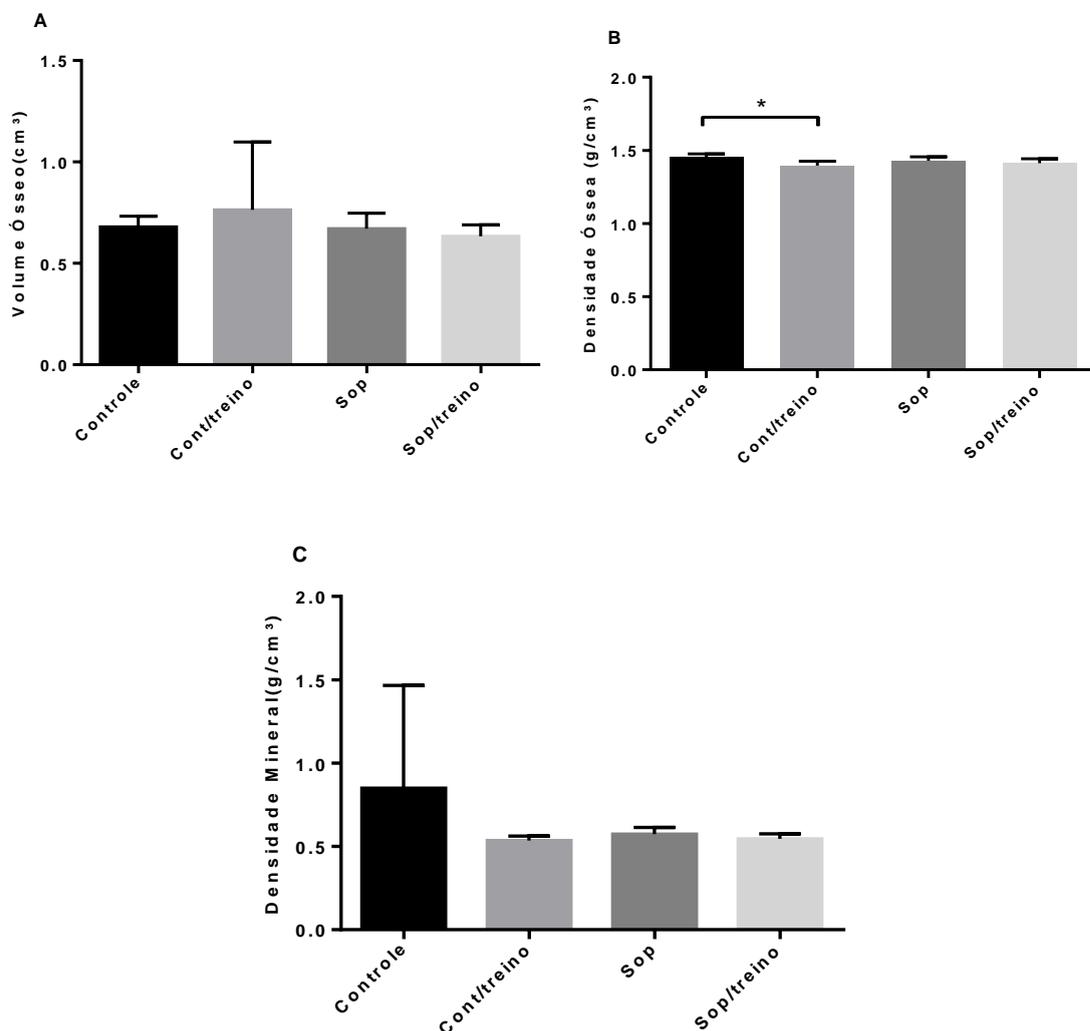
Observa-se na figura 8 as variações médias da carga máxima (A) e carga máxima voluntária carregada (CMVC) (B) entre os grupos controle/treino e SOP/treino. Não houve diferenças significante entre os tratamentos.

Figura 8 – Variação média da carga máxima (A) e carga máxima voluntária carregada (CMVC) das ratas do grupo 30 dias: controle/treino, SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



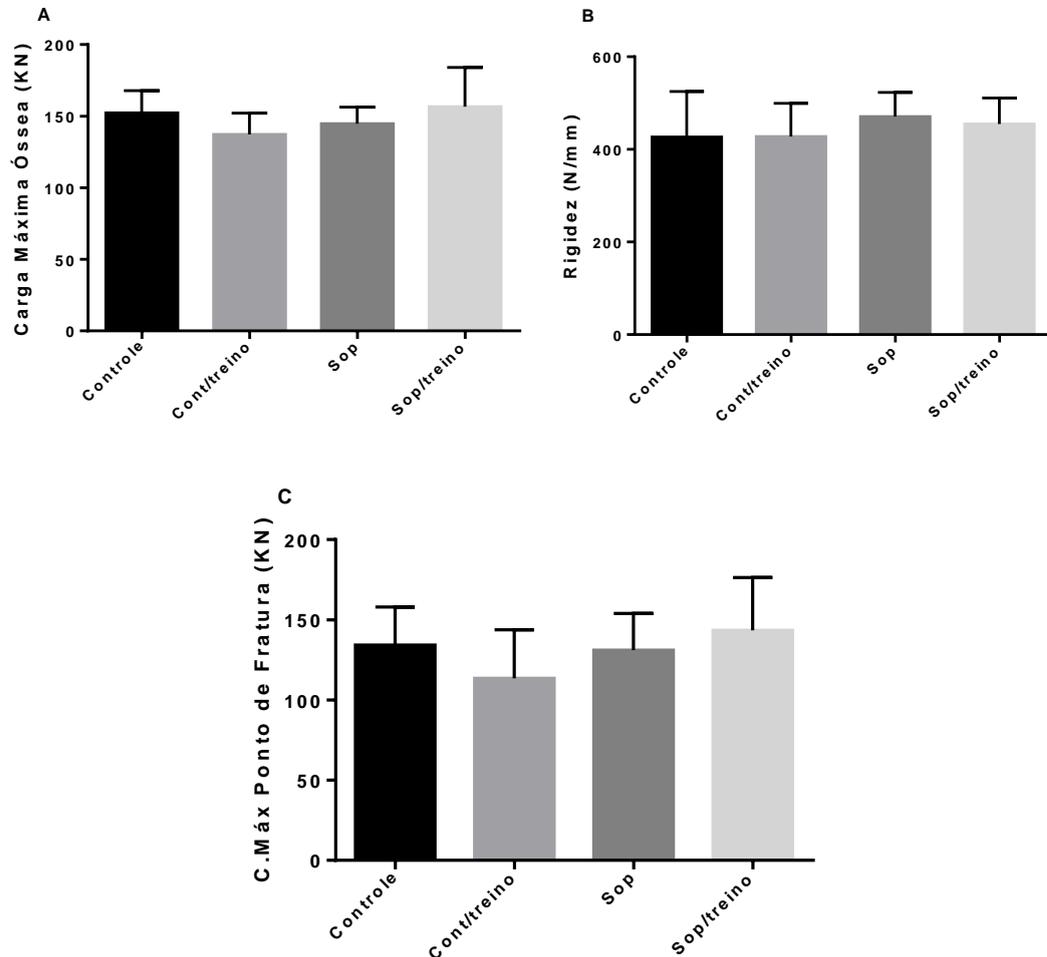
Pode-se observar na figura 9 as variações biométricas dos fêmures das ratas do grupo 30 dias. A densidade óssea do grupo controle/treino foi menor em relação ao grupo controle (Fig. 9B). Não foram observadas diferenças significante para o volume ósseo (Fig. 9A) nem para a densidade mineral (Fig. 9C) entre os grupos estudados.

Figura 9 - Variação média dos dados biométricos dos fêmures das ratas do grupo 30: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm^3). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. * $p < 0.05$.



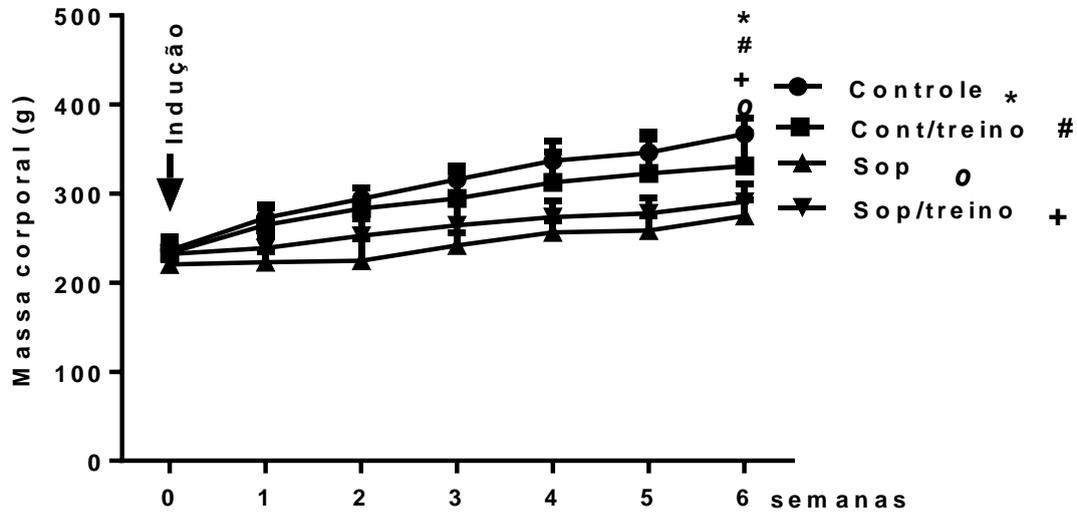
Na figura 10 estão representadas as variações biomecânicas dos fêmures das ratas do grupo 30 dias. Não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros analisados: carga máxima (Fig. 10A), rigidez (Fig. 10B) e carga máxima no ponto de fratura (Fig. 10C).

Figura 10- Variação média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas do grupo 30 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) carga máxima, em kilonewton (KN). (B) rigidez, em Newton por milímetro (N/mm). (C) ponto de fratura na carga máxima em Kilonewton (KN). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. * $p < 0,05$.



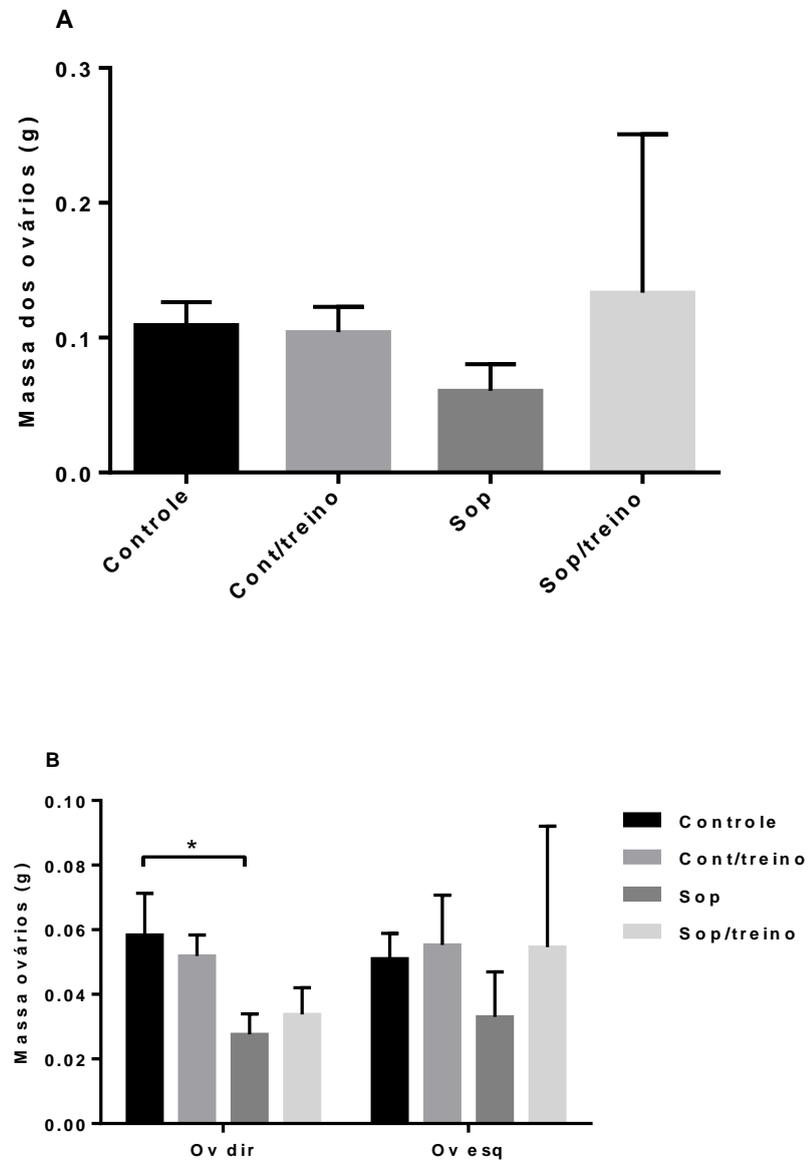
Na figura 11 são apresentadas as variações médias da massa corporal para o grupo 45 dias. Ao final deste período experimental houve diferenças significantes entre todos os tratamentos. As ratas do grupo controle apresentaram a maior massa corporal ($316,05 \pm 46,13$ g), seguidas do grupo controle/treino ($297,40 \pm 43,26$ g), SOP/treino ($265,50 \pm 27,31$ g) e SOP ($246,85 \pm 26,03$ g).

Figura 11 - Variação média da massa corporal (em gramas) das ratas dos grupos 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM. *. #. °. + $p < 0.05$.



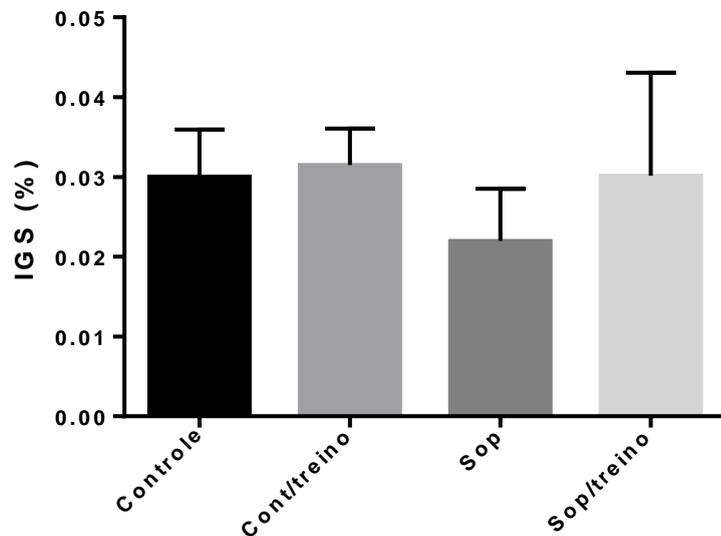
As variações médias das massas ovarianas totais e para ambos os ovários dos grupos 45 dias são apresentadas na figura 12. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as massas ovarianas totais (Fig. 12A). Contudo, os ovários direitos do grupo SOP apresentaram menor massa comparados aos do grupo controle (Fig. 12B).

Figura 12 – Variação média da massa ovariana total (A) e entre ovários direitos e esquerdos (B) (em gramas) das ratas dos grupos 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM. * $p < 0.05$.



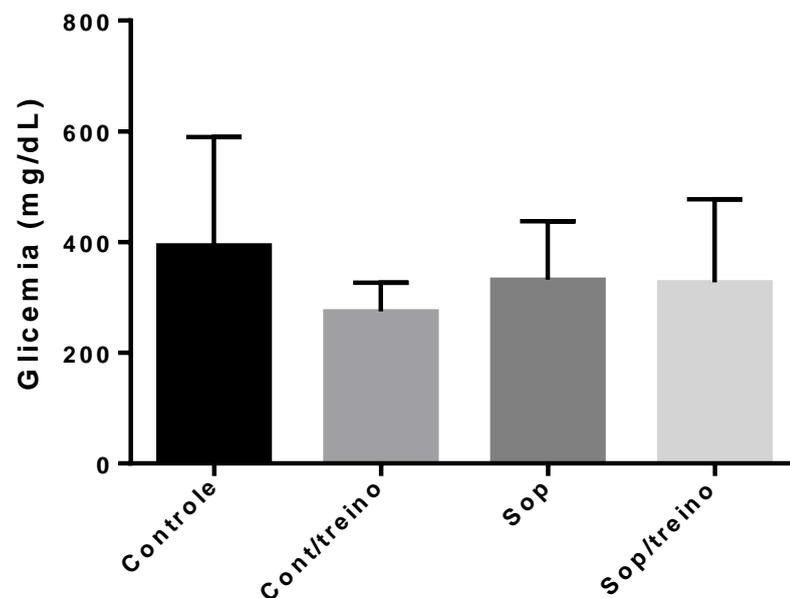
As variações médias dos índices gonadossmáticos das ratas do grupo 45 dias estão demonstradas na figura 13. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Figura 13 – Variação média do índice gonadossomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



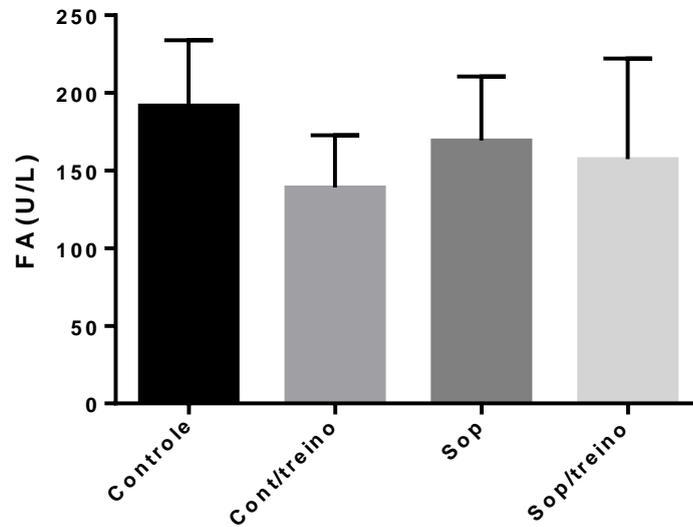
As variações médias da glicemia para as ratas do grupo 45 dias estão representadas na figura 14. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Figura 14 – Variação média da glicemia (mg/dL) das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



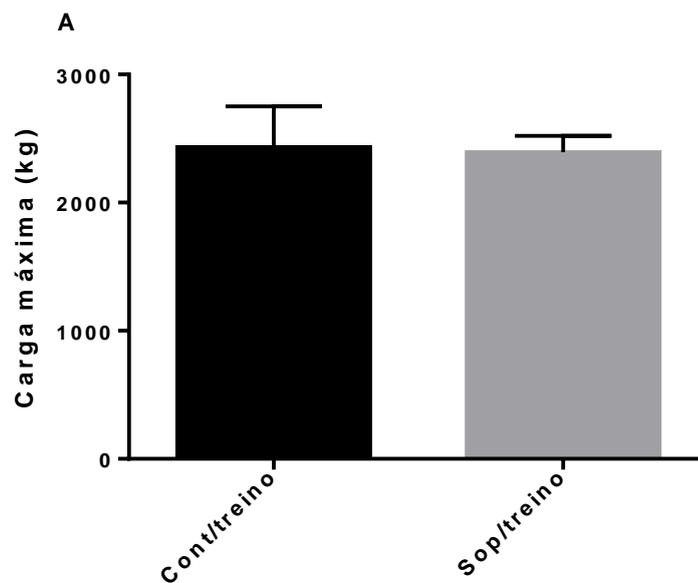
Na figura 15 observa-se as variações plasmáticas da fosfatase alcalina para as ratas do grupo 45 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

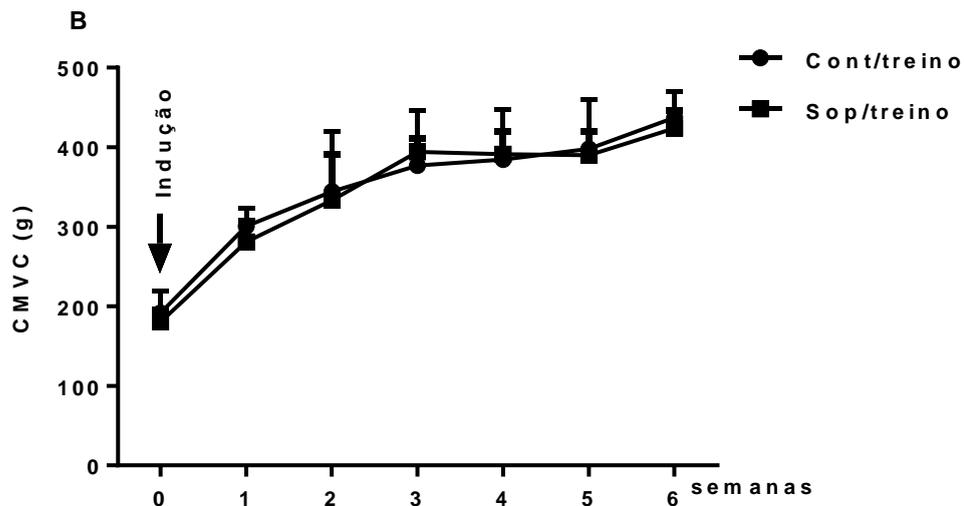
Figura 15 - Variação plasmática média da fosfatase alcalina (U/L) das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



Pode-se observar na figura 16 as variações médias da carga máxima (A) e as variações média da CMVC (B) entre as ratas dos grupos 45 dias. Não houve diferenças significantes entre os grupos analisados.

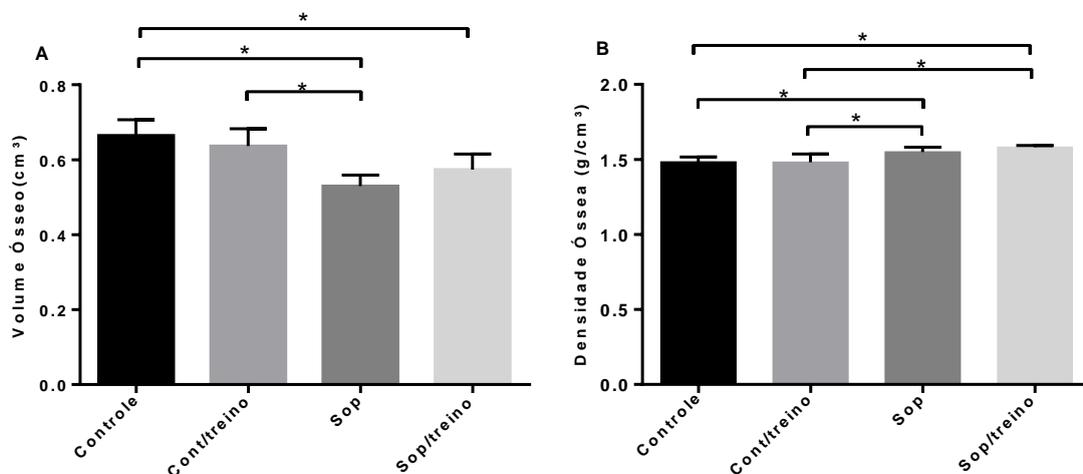
Figura 16 – Variação média da carga máxima (A) e carga máxima voluntária carregada (CMVC) das ratas do grupo 45 dias: controle/treino, SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.

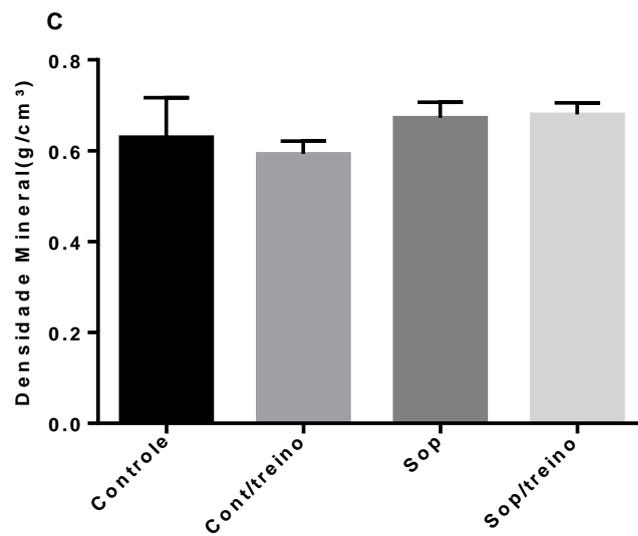




As variações biométricas dos fêmures das ratas do grupo 45 dias estão demonstradas na figura 17. Observa-se que o volume ósseo dos grupos SOP e SOP/treino foram menores em relação ao grupo controle, e o volume ósseo grupo SOP também foi menor que do grupo controle/treino (Fig. 17A). Em relação à densidade óssea, os grupos SOP e SOP/treino apresentaram maiores densidades comparados aos grupos controle e controle/treino (Fig. 17B). Não foram observadas diferenças significantes para a densidade mineral dos grupos analisados (Fig. 17C).

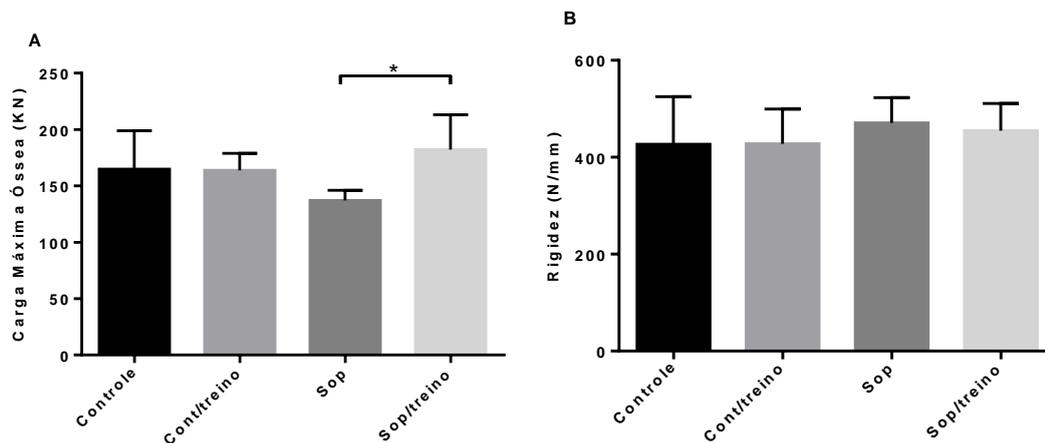
Figura 17 - Variação média dos dados biométricos dos fêmures das ratas do grupo 45 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm^3). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. * $p < 0.05$.

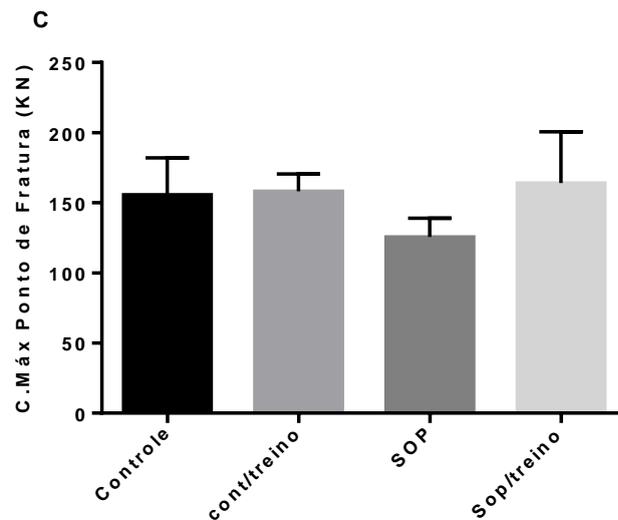




Na figura 18 pode-se observar as variações biomecânicas dos fêmures das ratas do grupo 45 dias. Nota-se que a carga máxima do grupo SOP foi menor do que no grupo SOP/treino (Fig. 18A). Não foram observadas variações significativas nem da rigidez (Fig. 18B) nem da carga máxima no ponto de fratura (Fig. 18C).

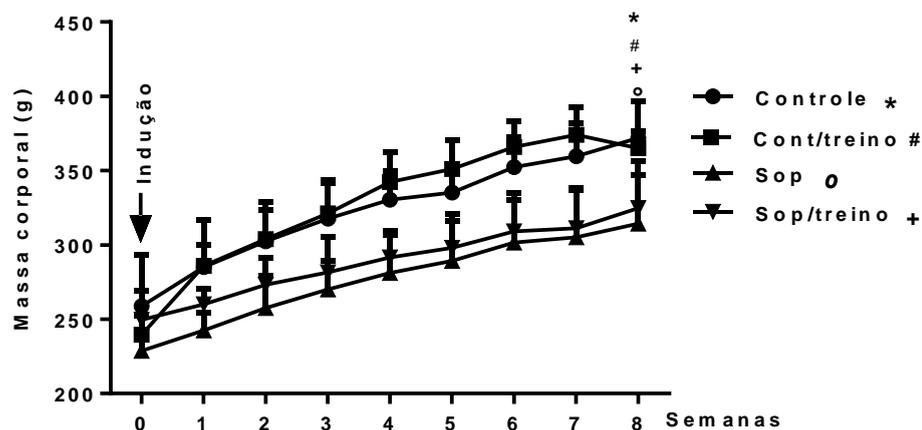
Figura 18 - Variação média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas do grupo 45: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm³). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm³). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm³). Os resultados são apresentados em média ± DPM. *p<0.05.





Observa-se na figura 19 as variações médias das massas corporais das ratas dos grupos 60 dias. Houve diferenças significante entre todos os tratamentos propostos e o grupo controle. A maior massa corporal foi observada no grupo controle/treino ($332,24 \pm 45,36$ g), seguido do grupo controle ($327,96 \pm 42,10$ g), grupo SOP/treino ($291,68 \pm 32,05$ g) e grupo SOP ($279,88 \pm 36,16$ g)

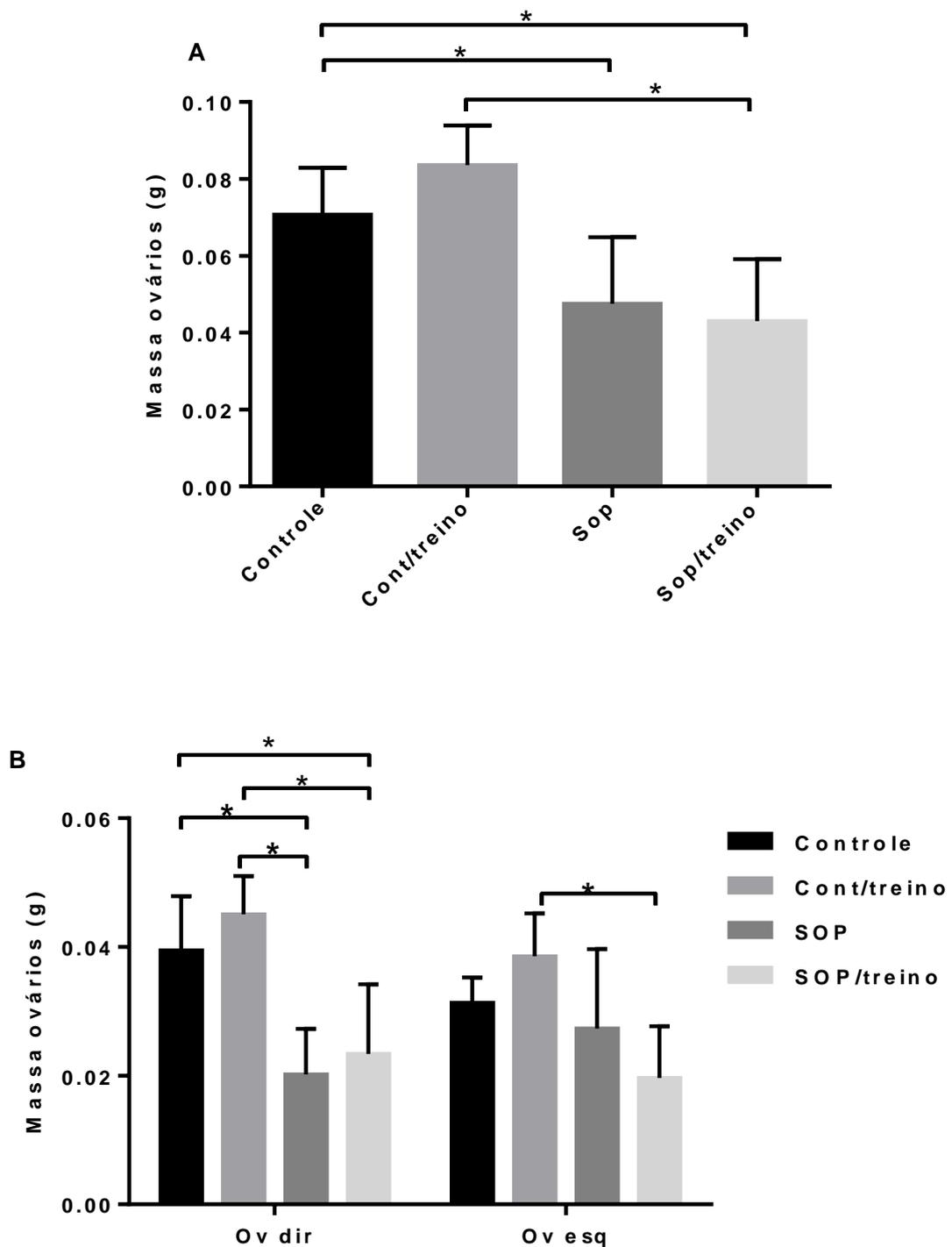
Figura 19 - Variação média da massa corporal (em gramas) das ratas dos grupos 60 dias: controle, controle treinadas, SOP e SOP treinadas. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM. *. #. °. + $p < 0.05$.



Na figura 20 estão representadas as variações médias das massas ovarianas das ratas do grupo 60 dias. Nota-se que os grupos SOP e SOP/treino apresentaram menores massas ovarianas totais comparados ao grupo controle. Além disso, o grupo SOP/treino apresentou menor massa total comparado ao grupo controle/treino (Fig. 20A). Quanto às massas de cada ovário, observa-se que, para ovários direitos, os grupos SOP e SOP/treino apresentaram

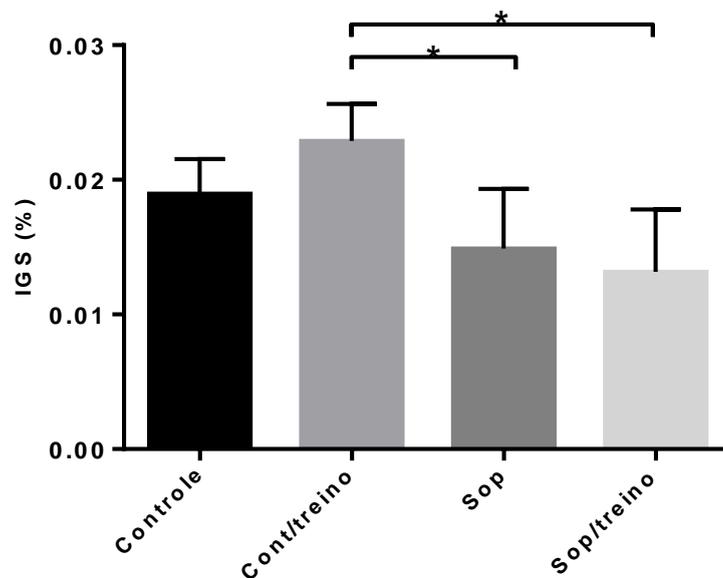
menores médias comparados aos grupo controle e controle/treino (Fig. 20B). Em relação aos ovários esquerdos, o grupo SOP/treino apresentou menor massa comparado ao grupo controle/treino (Fig. 20B).

Figura 20 - Variação média da massa ovariana total (A) e entre ovários direitos e esquerdos (B) (em gramas) das ratas dos grupos 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM. * $p < 0.05$.



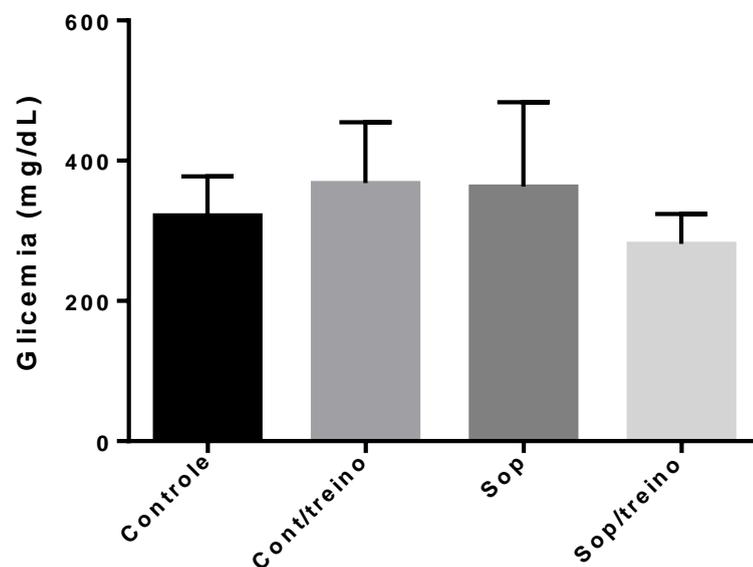
As variações médias do IGS são apresentadas na figura 21. Nota-se que os grupos SOP e SOP/treino apresentaram menores IGS comparados ao grupo controle/treino.

Figura 21 - Variação média do índice gonadossomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM. $p < 0.05$.



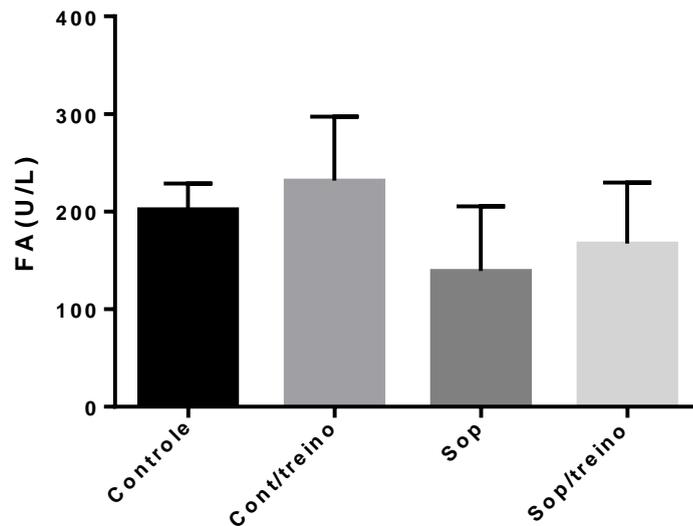
As variações da glicemia das ratas do grupo 60 dias estão demonstradas na figura 22. Não foram observadas variações significante entre os grupos estudados.

Figura 22 - Variação média da glicemia (mg/dL) das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.



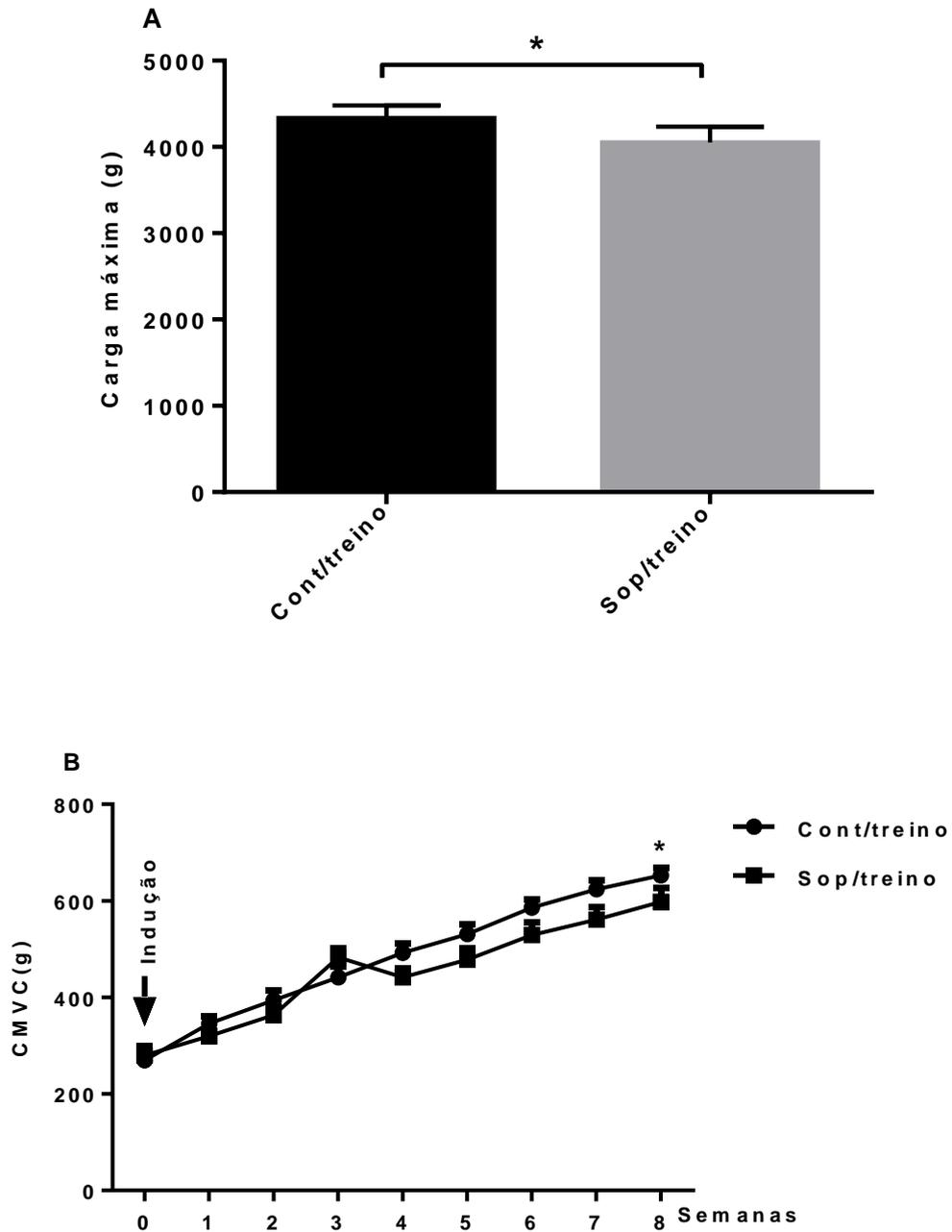
Na figura 23 estão representados os resultados das concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina do grupo 60 dias. Não foram observadas variações significantes entre os grupos estudados.

Figura 23 - Variação plasmática média da fosfatase alcalina (U/L) das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM..



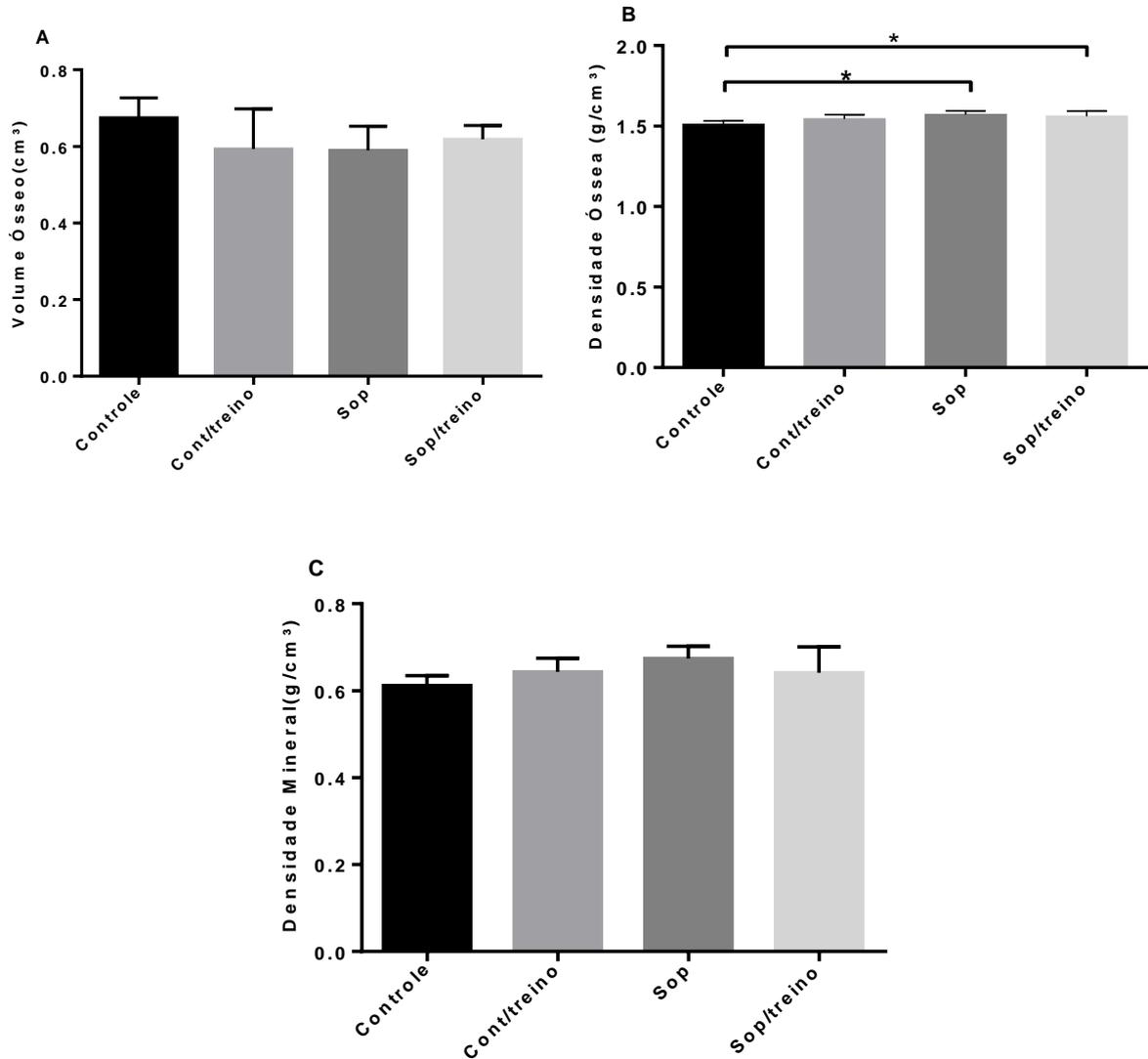
Pode-se observar na figura 24 as variações médias da carga máxima e da CMVC entre as ratas dos grupos 60 dias. Nota-se que o grupo SOP/treino apresentou menor carga máxima comparado ao grupo controle/treino (Fig. 24A). Foi observadas diferenças significantes para a CMVC entre os dois grupos (Fig. 24B).

Figura 24 - Variação média da carga máxima (A) e carga máxima voluntária carregada (CMVC) das ratas do grupo 60 dias: controle/treino, SOP/treino. Os resultados são apresentados em médias \pm DPM.. * $p < 0.05$.



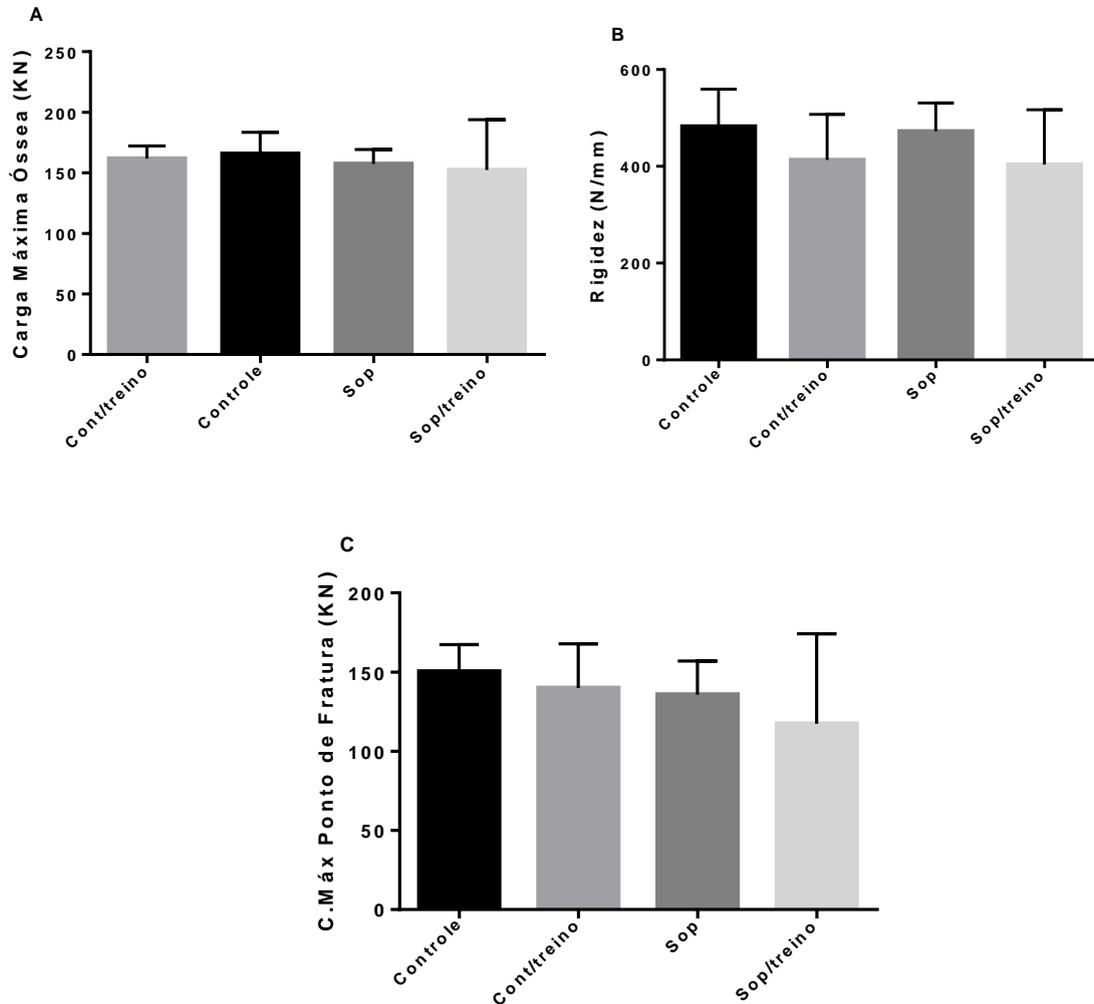
Na figura 25 estão demonstradas as variações biométricas dos fêmures das ratas do grupo 60 dias. A densidade óssea dos grupos SOP e SOP/treino foram maiores do que o grupo controle (Fig. 25B). Não foram observadas diferenças significantes para o volume ósseo (Fig. 25A) nem para a densidade mineral (Fig. 25C).

Figura 25 - Variação média dos dados biométricos dos fêmures das ratas do grupo 60 dias: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm^3). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. * $p < 0.05$.



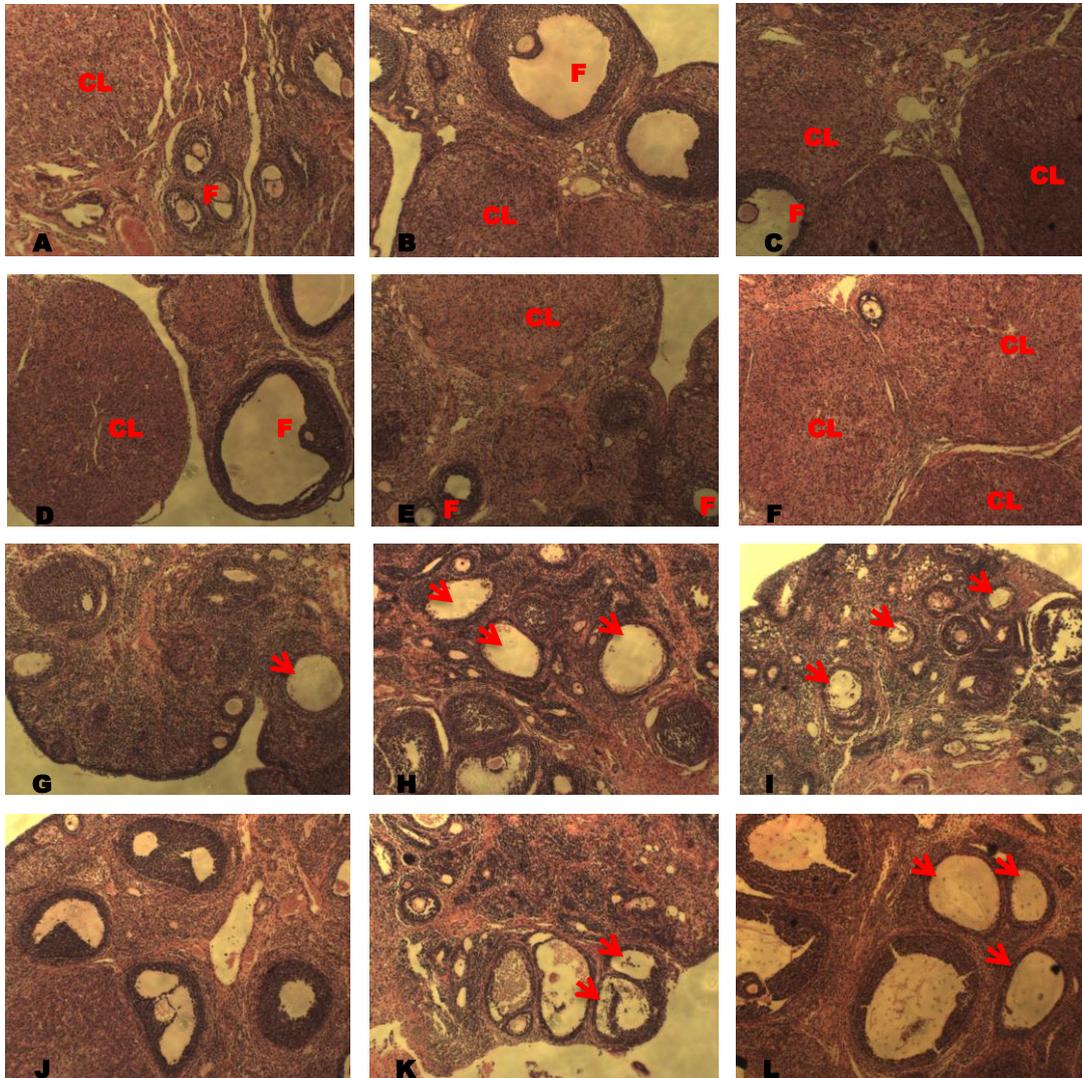
Os dados biomecânicos das ratas do grupo 60 dias estão demonstrados na figura 26. Não foram observadas diferenças significativas para nenhuma variável analisada: carga máxima (Fig. 26A), rigidez (Fig. 26B) e carga máxima no ponto de fratura (Fig. 26C).

Figura 26 - Variação média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas do grupo 60: controle, controle/treino, SOP e SOP/treino. (A) volume ósseo, em centímetro cúbico (cm³). (B) Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm³). (C) densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm³). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. *p<0.05.



Observa-se na figura 27 as fotomicrografias ilustrando os ovários das ratas para todos os grupos ao longo dos tempos experimentais. Há maior número de folículos e corpos lúteos nos ovários das ratas dos grupos controle e controle/treino (A a F) e maior número de cistos nos grupos SOP e SOP/treino (G a K).

Figura 27 - Fotomicrográficas ilustrando os ovários das ratas dos grupos Controle (A - 30dias, B - 45 dias e C - 60 dia); Controle/treino (D - 30 dias, E - 45 dias e F - 60 dias); SOP (G - 30 dias, H - 45 dias e I - 60 dias) e Sop/treino (J - 30 dias, K - 45 dias e L - 60 dias). F = folículo. CL = corpo lúteo. Setas indicam os cistos foliculares, Coloração: HE. Aumento inicial: 400



7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que houve a formação de cistos ovarianos nas ratas que receberam valerato de estradiol e sugerem que as massas corporais e ovarianas, o índice gonadossomático, a carga máxima, o volume ósseo, a densidade óssea e a carga máxima óssea foram alteradas em decorrência dos efeitos do treinamento, da alteração ovariana e dos tempos experimentais.

A SOP é um tipo de síndrome metabólica feminina, que pode predispor a glicemias elevadas e perfil lipídico anormal, os quais estão muitas vezes associados a este quadro clínico (McDOWELL, 2006). Estas alterações metabólicas costumam ocorrer tanto em pacientes obesas quanto magras (COOK et al., 2011). A predisposição para obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia e, possivelmente, doença cardiovascular têm origem na resistência insulínica que pode ser observada em graus variados nas mulheres afetadas (TEHRANI et al., 2011).

No presente estudo, as ratas dos grupos SOP e SOP/treino apresentaram as menores massas corporais em relação aos grupos controle e controle/treino, para os tempos 45 e 60 dias. Sendo assim, sugere-se que mesmo treinando, as ratas induzidas à síndrome tiveram reduções em suas massas corporais. Não há consenso na literatura em relação a alterações na massa corporal de animais induzidos à SOP. Ratas induzidas à SOP com DHT (dihidrotestosterona) apresentaram aumentos significativos em suas massas corporais magra e gorda em relação às controle. Além disso, foram observados aumentos significativos na composição histológica e no peso total do tecido adiposo abdominal nos animais SOP (CALDWELL et al., 2014; CALDWELL et al., 2017). A SOP induzida com excesso de DHT em camundongos também promoveu aumento na massa corporal e nos depósitos de tecido adiposo (van HOUTEN et al., 2012; MARCONDES et al., 2017). Por outro lado, também utilizando um modelo de indução com DHT, um estudo demonstrou que não houve diferença entre a massa corporal dos animais induzidos em relação aos controle, sugerindo que sobrepeso e obesidade não necessariamente estão associados com infertilidade (MA et al., 2017).

No presente trabalho não foi observado anestro contínuo nas ratas induzidas em relação às controle (dados não mostrados) e não foram realizadas as dosagens dos esteroides ovarianos; contudo, a observação de cistos ovarianos e a menor presença de folículos ovarianos e corpos lúteos nos ovários das ratas induzidas, sugerem comprometimento das funções ovarianas relacionadas à fertilidade. Além disso, as ratas dos grupos SOP e SOP/treino tiveram alterações em suas massas ovarianas e reduções do IGS comparadas às controle. O treinamento de força realizado não reverteu a redução do IGS nas ratas do grupo SOP. Alterações na morfologia dos ovários, principalmente relacionadas à

massa e ao tamanho, foram observadas em macacas (ABBOTT et al., 1998), roedoras (WU et al., 2010) e ovelhas (WEST et al., 2001), com comprometimento da fertilidade. Shi e Vine (2012), observaram que ratas induzidas à SOP com VE apresentaram redução das massas ovarianas, alterações endócrinas e fertilidade reduzida. Por outro lado, há estudos onde as massas ovarianas não foram diferentes entre as fêmeas induzidas à SOP e as fêmeas controle, porém com presença de cistos ovarianos e diminuição no número de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos (CALDWELL et al., 2014; MA et al., 2017). A SOP é importante causa primária de subfertilidade e infertilidade associadas à anovulação em mulheres adultas (AZZIZ et al., 2016), independente da massa corporal e do tamanho do ovário (JOHAM et al., 2015).

Exercícios físicos podem ajudar na redução da massa corporal, porém a perda de massa corporal em mulheres com SOP e que treinam é modesta, mesmo com programas de treinamentos intensificados (HARRISON et al., 2011; HARRISON et al., 2012; AZZIZ et al., 2016). Estudos em animais também demonstram que fêmeas com ovários policísticos têm maior massa corporal que as controle (ALEXANDRE et al., 2007; TYNDALL et al., 2012). Os resultados deste trabalho sugerem que o treinamento físico de escalada em escada pode ser eficaz na redução da massa corporal em ratas induzidas à SOP. Contudo, as ratas SOP que não treinaram tiveram massas corporais menores em relação às SOP/treino, o que pode ser associado ao ganho de massa muscular adquirido durante 45 e 60 dias de treinamento, corroborando com Lee e Farrar (2003), que demonstraram que o exercício físico resistido promove aumento da massa muscular. Apesar do treinamento de escalada em escada ter reduzido a massa corporal das ratas SOP/treino em relação às controle/treino, a força máxima das ratas controle/treino foi maior, o que pode sugerir que alterações endócrinas ovarianas associadas ao ovário policístico podem comprometer a força muscular estriada esquelética.

A SOP é frequentemente associada a disfunções metabólicas, incluindo obesidade, aumento da adiposidade abdominal, resistência à insulina, síndrome metabólica e DM-2, predispondo aumento glicêmico em mulheres, independente da massa corporal (FAUSER et al., 2012). Apesar de vários trabalhos demonstrarem aumentos nas concentrações plasmáticas de glicose em mulheres com SOP (DUNAIF et al., 1989; HARRISON et al., 2011; HARRISON et al., 2012; STEPTO et al., 2013; AZZIZ et al., 2016) e em animais induzidos à SOP (CALDWELL et al., 2016, MA et al., 2017), no presente trabalho não foram observadas diferenças na glicemia entre ratas induzidas à SOP e ratas controle, independentemente do treinamento de escala em escada. Tal observação pode estar associada a alterações endócrinas, relacionadas à insulina, leptina e esteroides ovarianos e/ou ao modelo de estudo utilizado. O treinamento resistido está associado com alterações metabólicas, modulando os níveis

plasmáticos de insulina e glicose, redução da sensibilidade à insulina e alterações no perfil lipídico (LEITE et al., 2013).

A fosfatase alcalina é considerada um marcador bioquímico da atividade óssea (GOES et al., 2012), indicando atividade osteogênica (VIEIRA, 1999). Dados do nosso laboratório demonstram elevações nas concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina em ratas induzidas à SOP (BONFÁ, 2017), assim como variações nas concentrações de fosfatase alcalina em meio de cultura de osteoblastos desafiados com esteroides ovarianos (BRANCAGLIÃO et al., 2017). Há relatos de efeitos de hormônios esteroides sobre a atividade da fosfatase alcalina e suas relações com a síntese de osteocalcina e mineralização da matriz extracelular (KAPUR e REDDI, 1989). Contudo, no presente trabalho não houve variações significativas nas concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina.

Estudos mostram que a SOP pode alterar a dinâmica óssea, porém os resultados ainda são controversos (ZBOROWSKI et al., 2000; CALDWELL et al., 2017; KRISHNAN, MUTHUSAMI, 2017). No presente trabalho foram analisados os dados biofísicos (volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral) e biomecânicos (carga máxima óssea, rigidez e carga máxima no ponto de fratura) de todos os animais com o objetivo de tentar estabelecer correlações entre a SOP, o treinamento físico e o tecido ósseo. Os resultados relacionados ao volume ósseo foram influenciados de maneira transitória pela SOP e pelo tempo. Quarenta e cinco dias após a indução, o volume ósseo das ratas SOP foi menor comparado às ratas controle. O mesmo foi observado para as ratas SOP/treino, que tiveram menor volume ósseo que as ratas controle. Sessenta dias após a indução à SOP, não houve diferença entre os grupos. O treinamento de escalada em escada não demonstrou interferência sobre o volume ósseo.

A densidade óssea das ratas SOP e SOP/treino foi maior comparada às ratas controle, 45 e 60 dias após a indução, não havendo influência do treinamento. Contudo, o treinamento de escada em escada diminuiu a densidade óssea das ratas controle/treino em relação às ratas controle, 30 dias após a indução. Estudos demonstram aumento na densidade óssea em mulheres com SOP em decorrência do hiperandrogenismo (ZBOROWSKI et al., 2000; CASTELO-BRANCO et al., 2003). Tais alterações são associadas a mudanças na dinâmica óssea, principalmente no equilíbrio entre produção e absorção da matriz óssea e na diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos e osteoclastos (SINGULANI, 2014). Por outro lado, ratas induzidas à SOP com DHT demonstraram redução da densidade óssea (CALDWELL et al., 2014). Estudos *in vitro* demonstram redução da viabilidade e da mineralização de osteoblastos desafiados por esteroides ovarianos (KLEIN-NULEND et al., 2015; BONFÁ, 2017; BRANCAGLIÃO et al., 2017). Os resultados do presente estudo também mostram que a

carga máxima óssea das ratas SOP/treino foi maior que as ratas SOP, 45 dias após a indução. O treinamento físico para mulheres com SOP têm sido preconizado como parte do tratamento, sem descrições de efeitos sobre o metabolismo ósseo (AZZIZ et al., 2016); contudo, são necessários mais estudos para a compreensão de mecanismos moleculares e genéticos que estejam relacionados com a SOP e o tecido ósseo.

Compreender as etiologias da SOP é essencial para identificar biomarcadores e novas terapias e entender se a SOP é uma série de desordens diferentes com fenótipos comuns ou a mesma desordem com fenótipos diferentes, ou a combinação de ambas. Apesar de diversos estudos utilizarem pacientes humanas portadoras de SOP, é crescente a busca por modelos animais que possam ser utilizados para que se possa realizar manipulações genéticas, compreender os mecanismos moleculares e estudar as fisiopatologias de órgãos e sistemas que não podem ser realizados em humanos. Sabemos que o nosso modelo para estudos de interações entre órgãos em ratas induzidas à SOP com VE, não é o modelo ideal; contudo, pode-se sugerir, diante dos nossos resultados, que o modelo utilizado tem características morfofuncionais relacionadas a SOP e que a dinâmica óssea, tanto em dados biofísico quanto biomecânicos foram alterados pela indução da síndrome. Além disso, o exercício físico da escalada em escada alterou o volume ósseo, a densidade óssea e a carga máxima óssea. Porém, estudos endócrinos, moleculares e genéticos deverão ser realizados para que se possa melhorar a compreensão desses mecanismos entre os ovários e os ossos.

8. CONCLUSÕES

- O valerato de estradiol induziu a formação de cistos ovarianos característicos de SOP;
- O treinamento de força de escalada em escada promoveu aumento da carga máxima total e carga máxima voluntária carregada das ratas Cont/treino em relação as ratas SOP/treino;
- Não houve variações significantes nas concentrações plasmáticas de glicose e de fosfatase alcalina;
- A SOP induziu redução no volume ósseo e aumento na densidade óssea das ratas;
- O treinamento aumentou a carga máxima óssea entre os animais SOP 45 dias.

9. REFERÊNCIAS

ABBOTT. D.H, DUMESIC. D.A, EISNER, J.R, COLMAN. R.J, KENNITZ. J.W. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies in prenatally androgenized female rhesus monkeys. **Trends Endocrinol. Metab**, v. 9, p. 62-67, 1998.

ALEXANDERSON. C. et al. A single early post natal estradiol injection affects morphology and gene expression of the ovary and parametrial adipose tissue in adult female Ratas. **Steroid Biochem Mol Biol**, v, 122, p. 82- 90, 2010.

ARAÚJO. G.S. Identificação e localização das procinetivas e seus receptores no ovário de ratas com síndrome dos ovários policísticos induzidas por esteroides sexuais. 2017. Dissertação (Mestrado)- Programa de Obstetrícia e Ginecologia, UNIFESP, São Paulo.

AZZIZ. Z.R, CARMINA. E, DEWAIL. Y.D, DIAMENT-KANDARAKIS. E, ESCOBARMORREALE. H.F, FUTTERWEITW et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**, v. 91, n. 1, p. 456- 88, 2009.

AZZIZ. R, CARMINA. E, CHEN. Z, DUNAIF. A, LAVEN. J.S. E, LEGRO. R.S, LIZNEVA . D, NATTERSON-HOROWTIZ. B, TEEDE. H.J, YILDIZ, B.O. **Polycystic ovary syndrome. Nature Reviews**, v. 2, p. 1-18, 2016.

AKHTER. M.P. et al. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice. **Bone**, v. 29, p.121-25, 2001.

BAERWALDAR. A.R; ADAMS. G.P; PIERSON.R.A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: **a review. Hum Reprod Update**, v.18, n. 1, p. 73 – 91, 2012.

BONFÁ. A.L.O. **Fenótipo osteoblástico, biofísica e biomecânica do tecido ósseo em um modelo de ratas induzidas à síndrome do ovário policístico: Estudos in vivo e in vitro**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara, Araraquara.

BORELLI. A. **Envelhecimento ósseo: osteoporose**. In: CARVALHO FILHO, E. T.; APALÉO NETTO, M. Geriatria: fundamentos, clínica terapêutica. São Paulo: Atheneu, 1994. cap.22, p.297-308.

BRAWER. J.R, MUNOZ. M, FAROOKHI. R. Development of the polycystic ovaria condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. **Bio. Reprod**. v. 35 n.3, p. 647-55, 1986.

BALDWIN. K.M, CHEADLE. W.G, MARTINEZ. O.M, COOKE. D.A. Effect of functional overload on enzyme levels in different types of skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 42, p. 312-317, 1977.

BRANCAGLIÃO. L.F. C, BONFÁ. A.L. O, LEMOS. J.E. S, ROCHA, N.F, GONÇALVES, V.M, MONTREZOR, L.H. Effects of ovarian steroids on osteoblast viability and mineralization. **Asian Journal of Biology**, v. 2, n. 3, p. 1-18, 2017.

BRUNER. B, CHAD- KAREN, CHIZEN, D. Effects of Exercise and Nutritional Counseling in Women with Polycystics Ovary Syndrome. **Appl. Physiol.Nutr. Metab.**, v. 31, 2006.

BURR. D.B. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. **Bone**, v.31. n.1, p. 8-11, 2002.

CASTELO-BRANCO, C, GOMÉZ, O, PONS, F, OSABA M.J.M, BALASCH, J, VANRELL, J.A. Secreting ovarian tumors may protect women from osteoporosis. **Gynecologic Oncology**, v.88, n. 2, p.149-152, 2003.

CALDWELL. A.S. L; MIDDLETON. L.J; JIMENEZ. M; DESAI. R; MCMAHON. A.C; ALLAN. C.M; HANDELSMAN. D.J; WALTERS, K.A. Characterization of reproductive, metabolic and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3146-3159, 2014.

CALDWELL. A.S. L, EDWARDS, M.C, DESAI, R, JIMENEZ, M, GLICHRIST, R.B, HANDELSMAN, D.J, WALTERS, K.A. Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome. **PNAS**, v.114, n. 16, p. E3334-E3343, 2017.

CHANDLER. T.J, BROWN, L.E. Conditioning for strength and human performance. Second Edition ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. COKER, R,H. et al. The impact of exercise training compared to caloric restriction on hepatic and peripheral insulin resistance in obesity. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, V. 94, p. 4258- 66, 2009.

COOK, H, BRENNAN, K, AZZIZ, R: Reanalyzing the modified Ferriman-Gallweyscore: is there a simpler method for assessing the extent of hirsutism? **Fertility and sterility**, v. 96, n. 5, p. 1266-1270 e1261, 2011.

CREIGHTON, D.L. et al. Weight-bearing exercise and markers of bone in female athletes. **J Appl Physiol**, v.90, p.565-70, 2001.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E; DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. **Endocr. Rev.** v. 33, p.981-1030, 2012.

DUNAIF, A, SEGAL, K.R, FUTTERWEIT, W, DOBRJANSKY, A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. **Diabetes**, v. 38, p. 1165-1174, 1989.

ESHRE Rotterdam workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Human Reprod**, v.19, n.1, p.41-47, 2004.

FRANKS, S, Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming. **Reproductive and metabolic dysfunction. Endocrinology**; v. 153, n. 6, p. 2536-8, 2012

FROST, H.M. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. **The Anatomical record**. v.219, n.1, p. 1-9, 1987.

FROST, H.M. A new direction for osteoporosis research: a review and proposal. **Bone**, v. 12, p. 429-37, 1991.

GONYEA, W.J.; ERICSON, G.C. An experimental model for the study of exercise-induced skeletal muscle hypertrophy. **J Appl Physiol**, v. 40. N. 4. P. 630-633, 1976.

HACKETT, D.A, JOHNSON, N.A, CHOW, C.M. Training practices and ergogenic aids used by male bodybuilders. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 27. N. 6, p. 1609-17, 2013.

HAMRICK, M.W. Body Fat as a Regulator of Bone Mass: Experimental Evidence from Animal Models. **Clinic Rev Bone Miner Metabol**, v. 7, p. 224-9, 2009.

HARRISON, C.L, LOMBARD. C.B, MORAN, L.J, TEEDE, H.J. Exercise therapy in polycystic ovary syndrome: a systematic review. **Hum. Reprod.** Update, v. 17, p. 171-183, 2011.

HARRISON, C.L, STEPTO, N.K, HUTCHISON, S.K, TEEDE, H.J. The impact of intensified exercise training on insulin resistance and fitness in overweight and obese women with and without polycystic ovary syndrome. **Clin. Endocrinol.** (Oxf.), v.76, p. 351-357, 2012.

HAWLEY, J.A. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. **Clin Exp Physiol**. v.29, p. 218-222, 2002.

HOEGER, K.M. et al. A randomized, 48-week, placebo-controlled trial of intensive lifestyle modification and/or metformin therapy in overweight women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. **Fertil Steril**. v.82, n.2, p. 421-29, 2004.

HUANG, T.H. et al. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **J Appl Physiol**, v.95, p. 300-07, 2003.

HUBER-BUCHHOLZ, M, CAREY, G. P. D.; NORMAN, R. J. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n.4, p.1470-1474, april, 1999.

HORNBERGER, T.A JR, FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29. p. 16- 31, Feb, 2004.

JOHAM, A.E, TEEDE, H.J, RANASINHA, S, ZOUNGAS, S, BOYLE, J. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: data from a large community-based cohort study. **J. Womens Health (Larchmt)**, v. 24, p. 299-307, 2015.

KAPUR, S.P, REDDI, A.H. Influence of testosterone and dihydrotestosterone on bone-matrix induced endochondral bone formation. **Calcified Tissue Internation**, v, 44, n. 2, p. 108-113, 1989.

KATCHBURIAN, E, ARANA, V. **Tecido ósseo. In: Histologia e embriologia oral.** São Paulo: Panamericana, 1999. cap.3, p.40-75.

KELLY, C.C. et al. Low Grade Chronic Inflammation in Women With Polycystic Ovarian Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 86, n.6, p.2453-55, 2001.

KLEIN-NULEND, J, VAN, OERS, R.F.M, BAKKER, A.D, BACABAC, R.G. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 5, p. 855-865, 2015.

KOGURE, G. S. et al. Análise de força muscular e composição corporal de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 7, p. 316–322, 2011.

KRAEMER, W.J, ADAMS, K, CAFARELLI, E, DUDLEY, G.A, DOOLY, C, FEIGENBAUM, M.S, et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 34, v. 2, p. 364-80, 2002.

KRISHNAN, A; MUTHUSAMI, S.R.L. Homonal alterations im PCOS and its influence om bone metabolism. **Jornal of Endocrinology**, v. 232, p. R 99 – 113, 2017.

LAURENT, G.J, SPARROW, M.P, MILLWARD, D.J. Turnover of muscle protein in the fowl. *Biochem. J.* 176: 407-417,197&of muscle protein in the fowl. **Biochem J**, v. 176, p. 407-417, 1978.

LIM, S.S. et al. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis, **Obes.Rev.**, v.14, p.95–109, 2012.

LORD, J. et al. The central issue? Visceral fat mass is a good marker of insulin resistance and metabolic disturbance in women with polycystic ovary syndrome. **BJOG**. v. 113, n.10, p.1203-9, 2006.

MA, Y. et al. Androgen receptor in the ovary theca cells plays a critical role in androgen-induced reproductive dysfunction. **Endocrinology**, v.158, n. 1, p. 98-108, 2017.

MACKIE, E.J, TATARCZUCH, L, MIRAMS. M. The skeleton: a multi-functional complexorgan: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. **J Endocrinol**, 2011 Nov; v. 211, n. 2, p. 109-21, nov. 2011.

MAHAMED, R.R. et al. Effects of metformim on the reproductive system of androgenized female e rats. **Fertil Steril**, v. 95, n. 4, p. 1507- 9, 2011.

MANOLAGAS, S.C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. **Endocr Rev**, v.31, n. 3, p. 266-300, Jun, 2010.

MARCONDES, F.K, BIANCHI, F, TANNO, A. Determination of the Estrous Cycle Phases oa Rats: Some Helpful Consideration. **Brazilian jornal Biology**, v. 62, n. 4, p. 609- 614, 2002.

MARCONDES, R.R, et al. Diffences in neonatal exposure to estradiol ortestosterone on ovarian function anad hormonal level. **Gen Comp Endocrinol**. v. 212, p. 28 – 33, 2015.

MARCONDES, R.R, et al. Exercise differentially affects metabolic functions and white adipose tissue in female letrozole- and dihydrotestosterone-induced mouse models of polycystic ovary syndrome. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 448, p. 66-76, 2017.

MARTIN, R. B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 10, p. 1021–1029, jan. 1990.

MCDOWELL, I: The Theoretical and Technical Foundations of Health Measurement. In: **Measuring Health: A Guide to Rating Scales and Questionnaires**. Edited by Press Oxford University, 3rd edn. New York: Oxford University Press, Inc.; 2006.

MENKES, A. et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged older men. **J Appl Physiol**, v.74, p.2478-84, 1993.

MONTREZOR. L.H. et al. Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in rats with polycystic ovaries breathing control in PCOS. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.217, p. 17-24, 2015.

MURRI. M, LUQUE-RAMÍREZ. M, INSENSER. M, OJEDA-OJEDA. M, ESCOBARMORREALE. H.F. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v. 19, n. 3, p. 268-88, May- Jun, 2013.

MUHAMMAD, S. I., et al. Bone mass density estimation: Archimede's principle versus automatic X-ray histogram and edge detection technique in ovariectomized rats treated with germinated brown rice bioactives. **Clinical interventions in aging**, v. 8, p. 1421-1431, 2013.

NAJJAR, T.; KAHN, D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. **J Oral Surg**, v. 35, n. 5, p. 375-79, 1977.

NORMAN. R.J. et al. The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. **Trends Endocrinol Metab**. v.13, n.6, p.251-57, 2007.

ORIO, F. et al. Cardiopulmonary impairment in young women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.91, n.8, p. 2967-71, 2006.

PALOMBA, S. et al. Structured Exercise Training Programme Versus Hypocaloric Hypoproteic Diet in Obese Polycystic Ovary Syndrome Patients with Anovulatory Infertility: A 24-Week Pilot Study. **Human Reproduction**. v.23, n.3, p.642-50, 2008.

PARADISI, G. et al. Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. **Circulation**. v.103, n.10, p.1410-15, 2001.

PARHAMI F. Possible role of oxidized lipids in osteoporosis: could hyperlipidemia be a risk factor? **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 68, n. 6, p. 373- 378, 2003.

PEREIRA, V. M. et al. Downregulation of natriuretic peptide system and increased steroidogenesis in rat polycystic ovary. **Peptides**, v. 60, p. 80–85, 2014.

PRESTES, J, FOSCHINI, D, MARCHETTI, P,H, CHARRO, M, TIBANA, R.A. **Prescrição e periodização do treinamento de força em academias**: Phorte; 2016.

ROESSLER, K.K. et al. Effects of exercise and group counselling on body composition and VO₂max in overweight women with polycystic ovary syndrome. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica. Nordic Federation of Societies of Obstetrics and Gynecology**, v. 92, p. 272-77, 2013.

ROBERTSON, G. et al. Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2 – /mice. **Bone**, v.39, p. 767-72, 2006.

SHIGUEMOTO, G.E. Et al. Isofravone- Supplemental soy yoghurt associated with resistive physical exercise incase bone mineral density of ovariectomized rats. **Maturistas**, v. 5, p. 261-270, 2007.

SHI, D, VINE, D. F. Animal models of polycystic ovary syndrome: A focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 1, p. 185–193, 2012.

SINGULANI MP. **Análise do potencial esteogênico de células estromais derivadas da medula óssea de ratas adultas e senis submetidas ou não ao treinamento de força**. [s.l.] UNESP – Araçatuba, 2014.

STEPTO, N.K et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp. **Hum. Reprod**, v. 28, p. 777-784, 2013.

TAMASI, J.A, AREY, B.J, BERTOLINI, D.R, FEYEN, J.H. Characterization of bone structure in leptin receptor-deficient Zucker (fa/fa) rats. **J Bone Miner Res**, v. 18, n. 9, p. 1605-11, 2003.

TEHRANI, F.R, RASHIDI, H, AZIZI, F: The prevalence of idiopathic hirsutism and polycystic ovary syndrome in the Tehran Lipid and Glucose Study. **Reproductive biology and endocrinology**: RB&E, v. 9, p. 144, 2011.

THYFAULT, J.P. Setting the stage: possible mechanisms by which acute contraction restores insulin sensitivity in muscle. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, v. 294, p. 04, p. 1103-10, 2008.

THONSON R. L., BUEKLEY J.D.; BRINKWORTH G.D. Exercise for the treatment and management of. Over weight women with polycystic ovary syndrome: a review of the literature. *Obesity Review*, v. 12, n. 5, p. 202-10, 2011.

TORTORA, G.I. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*, 12. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.. TURNER, C. H.; ROBLING, A. Mechanical loading and bone formation. *Bonekey Osteovision*, v. 1, n. 9, p. 15-23, 2004.

THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.*, v. 19, p.41-47, 2004.

THOMSON, R.L. Comparison of aerobic exercise capacity and muscle strength in overweight women with and without polycystic ovary syndrome. *BJOG*. v.116, n.9, p.1242-50, 2008.

VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 43, n. 6, p. 415-422, 1999.

VAN HOUTEN, E.I, KRAMER, P, MCLUSKEY, A, KARELS, B, THEMME, A.P, VISSER, J.A. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS. *Endocrinology*, v. 153. N. 6, p. 2861-2869, 2012.

VIGORITO, C. et al. Beneficial Effects of a Three-Month Structured Exercise Training Program on Cardiopulmonary Functional Capacity in Young Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, v.92, n.4, p. 1379-84, 2007.

YILDIZ, B.O. et al. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum. Reprod.* v.27, p. 3067-73, 2012.

ZATSIORSKY, V.M, KRAEMER, W.J. *Ciência e prática do treinamento de força*. São Paulo: Phorte; 2008.

WATERS, KA, ALLAN, CM, HANDELSMAN, DJ. et al. Rodents models for human Polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod*, v. 86, n. 5, p. 149- 149, 2012.

WILHELM, M et al. Effect of resistance exercises on function in older adults with osteoporosis or osteopenia: a systematic review. **Physiothers Can**, v. 64, n. 4, p. 386-94, 2012.

WILLIAMS, G.A, CALLON, K.E, WATSON, M, et al. Skeletal phenotype of the leptin receptor-deficient db/db mouse. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 8, p. 1698-709, 2011.

WEST, C, FOSTER, D.I, EVANS, N.P, ROBINSON, J, PADMANABHAN, V. Intrafollicular activin availability is altered in prenatally-androgenized lambs. **Mol. Cell Endocrinol**, v. 185, p. 51-59, 2001.

WU, X.Y, LI, Z.L, WU, C.Y, LIU, Y.M, LIN, H, WANG, S.H, XIAO, W.F. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. **Endocr. J**, v. 57, p. 201-209, 2010.



Centro Universitário de Araraquara

Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Centro - Araraquara - SP
CEP 14801-320 - Caixa Postal 68 - Fone/Fax: (16) 3301-7100

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA - UNIARA

Portaria Ministerial n.º 612 de 15.07.2016

Publicada no D.O.U. de 19.07.2016

www.uniara.com

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: nº. 025/16

Título do Projeto: Efeitos do treinamento de força sobre a dinâmica óssea em ratas induzidas à síndrome do ovário policístico

Pesquisador responsável: Vilson Donizete Matias

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos do treinamento de força sobre a dinâmica óssea em ratas induzidas à síndrome do ovário policístico"**, sob sua orientação e com a participação do docente **Luis Henrique Montrezor** foi analisado por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo estabelecer relações entre os possíveis benefícios do treinamento físico resistido com as alterações metabólicas relacionadas à síndrome do ovário policístico. O método inclui a indução para o ovário policístico e análise após a 30, 45 e 60 dias após a injeção de valerato de estradiol associado ao treinamento de força com escalada em escadas. Após a eutanásia serão coletados os ovários, o fêmur direito de cada animal e dosagens plasmáticas de progesterona, testosterona, estradiol, leptina, osteocalcina, fosfatase alcalina, glicose e insulina.

É sugerido que seja realizada as alterações dos itens 5.4 (invasividade dos grupos experimentais) e do item 5.5 (número de animais por caixa) no formulário. No item 7 a referência que justifica a escolha por aprofundamento da anestesia pentobarbital não está no artigo sugerido, mas consta no guia de eutanásia dos animais.

Este Comitê apresenta parecer aprovado com recomendações.

Os autores, ao concluírem o trabalho devem encaminhar ao CEUA-UNIARA o Relatório Final de Atividades, na íntegra contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 31 de agosto de 2016.