

FREDERICO SOUZALIMA CALDONCELLI FRANCO

**EFEITOS DA OVARECTOMIA, INGESTÃO DE CAFEÍNA E EXERCÍCIO
AERÓBICO ASSOCIADOS À ADEQUAÇÃO OU NÃO DE CÁLCIO
ALIMENTAR NA COMPOSIÇÃO CORPORAL, NO TECIDO ÓSSEO E NO
BALANÇO DE CÁLCIO EM RATAS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2009

FREDERICO SOUZALIMA CALDONCELLI FRANCO

**EFEITOS DA OVARIECTOMIA, INGESTÃO DE CAFEÍNA E EXERCÍCIO
AERÓBICO ASSOCIADOS À ADEQUAÇÃO OU NÃO DE CÁLCIO
ALIMENTAR NA COMPOSIÇÃO CORPORAL, NO TECIDO ÓSSEO E NO
BALANÇO DE CÁLCIO EM RATAS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

Aprovado: 20 de março de 2009

Prof. Júlio Orlando Tirapegui Toledo

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo

Profª. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(co-orientadora)

Prof. Antônio José Natali
(co-orientador)

Profª. Neuza Maria Brunoro Costa
(Orientadora)

Em Memória de Luiz Carlos de Lima Franco;

Orgulho,
quem sempre teve fui eu,
por ser teu filho.

À Minha Mãe
Caráter, Educação e Princípios Morais.

Foi o alicerce,
que me ensinou para viver.

À Minha Esposa
Pela dedicação à família;
que possibilitou dedicar-me a esta conquista.

Aos Meus Filhos:
que esta vitória seja o exemplo,
de que o impossível de se alcançar,
é o que não se tenta realizar.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela excelência em ensino, pesquisa e extensão;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, por ter possibilitado estes anos de afastamento para meu aperfeiçoamento;

À CAPES, pela bolsa, que representa grande suporte aos estudantes de pós-graduação;

À FAPEMIG (CDS 1562/05), pelo apoio financeiro, que viabilizou o desenvolvimento do presente estudo, favorecendo o conhecimento científico em Minas Gerais;

À Bioclin[®], por ter cedido com presteza os kits para análises bioquímicas;

À profa. Neuza Maria Brunoro Costa, pela paciência, conhecimentos passados e motivação para o crescimento profissional. Orientadora de todos os momentos, do empenho nos experimentos às confraternizações;

Ao prof. Antônio José Natali, sempre sereno e competente, agindo nos momentos corretos;

À profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, conselheira sempre atenciosa nas correrias do laboratório;

Ao prof. Júlio Orlando Tirapegui Toledo, pelo esforço ao deslocar à Viçosa e nos agraciar com seus conhecimentos;

Ao prof. Ricardo Junqueira Del Carlo, pela atenção dedicada e conselhos proferidos desde os momentos da qualificação;

À profa. Tânia Toledo de Oliveira, pelo apoio incansável nas análises realizadas no Laboratório Biofármaco e a palavra motivadora a todo instante;

Ao prof. Lúcio Alberto de Miranda Gomide, quem gentilmente possibilitou as análises de resistência óssea no Departamento de Tecnologia de Alimentos;

Ao prof. Sérgio Luis Pinto da Matta, simpática “figura” que me recebeu em seu laboratório de braços abertos;

Ao prof. Paulo Roberto Cecon pelo apoio nas análises estatísticas;

Aos animais de experimentação que possibilitam a eterna busca do conhecimento científico;

Ao grande amigo Adão Custódio de Paula (Biotério), pela amizade e presteza a todo o momento;

Ao Carlos Cardoso (representante da Beckman Coulter do Brasil), pelas vindas corridas de Belo Horizonte para auxiliar nas análises dos biomarcadores ósseos;

Aos companheiros de laboratórios, Ricardo de Brito Antonucci e Cassiano Oliveira da Silva (Nutrição), José Geraldo Pinto (Biofármaco), Thiago Souza Barbosa (DTA), Eduardo Resende Pereira (Química), Alex de Freitas Bhering Cardoso (Biologia Geral), Adão Carlos Cardoso, Cláudio Veridiano Cardoso e Maria José Fialho Castro (Veterinária), Juliano de Sousa Cardoso (Biotério) e José Geraldo Machado (Educação Física), companheiros de batalha;

Às alunas de iniciação científica Sandra Tavares Silva, Maria Emília Andrade e Sabrina Murayama, que o preciosismo das análises não fique como implicância, mas como a busca pela perfeição;

Aos colegas de experimento Miguel Carneiro Junior, Levy Rezende, Sílvio Fernandes, Bruno Gonzaga, Luciana Gontijo, Susana Ferreira, Karina Silva, Cynthia Castro, Bárbara Braga, Matheus Ornelas, Bruna Helena, Natália Santos, Regiane Ramos, Aline Leoucadio, Jamille Locatelli, Winder e Judson Quintão, pelo esforço nos momentos árduos e a alegria dos churrascos nos finais de experimentos.

BIOGRAFIA

FREDERICO SOUZALIMA CALDONCELLI FRANCO, filho de Luiz Carlos de Lima Franco e Maria Aparecida Caldoncelli Franco, nasceu em 22 de maio de 1967, na cidade de Rio Pomba – MG.

Em janeiro de 1985, iniciou o Curso de Educação Física na Universidade Federal de Viçosa – MG, concluindo-o em janeiro de 1989.

De março de 1989 a março de 1995 atuou como professor de ensino do 1º e 2º graus do Colégio Regina Coeli de Rio Pomba – MG.

De agosto de 1989 a agosto de 1995 atuou como professor de ensino do 1º e 2º graus da “Escola Estadual Prof. José Borges de Moraes” de Rio Pomba – MG.

De abril de 1989 a janeiro de 1993 atuou como técnico das equipes de voleibol da Prefeitura Municipal de Rio Pomba – MG.

Em julho de 1990, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciências do Voleibol, nível de especialização, na Universidade Gama Filho - RJ, concluindo-o em maio de 1991.

De fevereiro de 1994 a setembro de 1995 atuou como técnico das equipes de voleibol femininas do Tabajara Esporte Clube (Ubá – MG).

Em setembro de 1995, passou no concurso público da Escola Agrotécnica Federal de Machado – MG, sendo transferido para a Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba – MG em abril de 1996.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição Humana e Saúde, nível de especialização, na Universidade Federal de Lavras – MG, concluindo-o em maio de 2003.

Em março de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em dezembro de 2004.

Em março de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS	xx
LISTA DE QUADROS	xxii
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxiv

Capítulo I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Osteoponeia e osteoporose	1
1.1.1. Características gerais	1
1.1.2. Modelo animal para osteoporose	2
1.2. Ovariectomia	4
1.2.1. Composição corporal	4
1.1.2. Tecido ósseo	5
1.1.3. Balanço de cálcio	7
1.3. Cafeína	8
1.3.1. Composição corporal	10
1.3.2. Tecido ósseo	11
1.3.3. Balanço de cálcio	13
1.4. Exercício	14

1.4.1. Composição corporal	15
1.4.2. Tecido ósseo	16
1.4.3. Balanço de cálcio	18
1.5. Cálcio	18
1.5.1. Composição corporal	19
1.5.2. Tecido ósseo	20
1.5.3. Balanço de cálcio	21
1.6. Justificativas	22
1.7. Objetivo Geral	24
1.7.1. Justificativas e objetivos específicos	24
1.7.1.1. Capítulo III	24
1.7.1.2. Capítulo IV	24
1.7.1.3. Capítulo V	25
1.7.1.4. Capítulo VI	25
1.7.1.5. Capítulo VII	26
1.8. Referências Bibliográficas	27

Capítulo II: DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA

2. Materiais e métodos	39
2.1. Animais de experimentação	39
2.2. Cirurgia de ovariectomia ou laparotomia	41

2.3. Ingestão de cálcio alimentar	42
2.4 Administração de cafeína	45
2.5. Protocolo de exercício	45
2.6. Determinação do coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	46
2.7. Determinação da composição corporal	46
2.8. Avaliação do desempenho: concentração de lactato sanguínea	48
2.9. Avaliação da resistência óssea	49
2.10. Determinação do conteúdo mineral ósseo	50
2.11. Determinação do cálcio urinário	52
2.12. Determinação de marcadores bioquímicos ósseos	53
2.13. Determinação do balanço de cálcio	54
2.2. Referências Bibliográficas	56

Capítulo III: EFEITOS DA OVARIECTOMIA E INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE A COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATAS WISTAR EXERCITADAS OU NÃO.

3.1. Introdução	58
3.2. Materiais e Métodos	61
3.2.1. Animais de Experimentação	61
3.2.2. Administração de cafeína	61
3.2.3. Protocolo de Exercício	62

3.2.4. Determinação do coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	62
3.2.5. Determinação do composição corporal	62
3.2.6. Avaliação do desempenho: concentração de lactato sanguínea	63
3.2.7. Análise estatística	63
3.3. Resultados	64
3.3.1. Desempenho	64
3.3.2. Peso Corporal	65
3.3.3. Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	68
3.3.4. Composição corporal	69
3.4. Discussão	72
3.5. Referências Bibliográficas	81

**Capítulo IV: EFEITOS DA OVARECTOMIA, EXERCÍCIO AERÓBICO E
INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE A COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATAS
WISTAR COM 50% DA RECOMENDAÇÃO DE CÁLCIO ALIMENTAR.**

4.1. Introdução	86
4.2. Materiais e métodos	89
4.2.1. Animais de experimentação	89
4.2.2. Administração de cafeína	90
4.2.3. Protocolo de Exercício	90
4.2.4. Determinação do coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	91

4.2.5. Determinação da composição corporal	91
4.2.6. Avaliação do desempenho: concentração de lactato sanguínea	92
4.2.7. Análise estatística	92
4.3. Resultados	92
4.3.1. Desempenho	92
4.3.2. Peso Corporal	93
4.3.3. Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	96
4.3.4. Composição corporal	97
4.4. Discussão	101
4.5. Referências Bibliográficas	106

Capítulo V: A INFLUÊNCIA DA OVARIECTOMIA E INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE O TECIDO ÓSSEO EM RATAS WITAR EXERCITADAS OU NÃO.

5.1. Introdução	111
5.2. Materiais e métodos	113
5.2.1. Animais de experimentação	113
5.2.2. Administração de cafeína	114
5.2.3. Protocolo de exercício	114
5.2.4. Avaliação da resistência óssea	115
5.2.5. Determinação do conteúdo de mineral ósseo	115

5.2.6. Determinação do cálcio urinário	116
5.2.7. Determinação de marcadores bioquímicos ósseos	116
5.2.8. Análise estatística	117
5.3. Resultados	117
5.3.1. Peso Corporal	117
5.3.2. Resistência óssea	118
5.3.3. Conteúdo mineral ósseo	121
5.3.4. Biomarcadores ósseos e excreção urinária de cálcio	122
5.4. Discussão	125
5.5. Referências Bibliográficas	133

Capítulo VI: IMPACTO DA OVARIECTOMIA, INGESTÃO DE CAFEÍNA E EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE O TECIDO ÓSSEO EM RATAS WISTAR COM 50% DA RECOMENDAÇÃO DE CÁLCIO DIETÉTICO.

6.1. Introdução	140
6.2. Materiais e métodos	142
6.2.1. Animais de experimentação	142
6.2.2. Administração de cafeína	143
6.2.3. Protocolo de exercício	143
6.2.4. Avaliação da resistência óssea	143
6.2.5. Determinação do conteúdo de mineral ósseo	144

6.2.6. Determinação do cálcio urinário	144
6.2.7. Determinação de marcadores bioquímicos ósseos	145
6.2.8. Análise estatística	145
6.3. Resultados	146
6.3.1. Peso Corporal	146
6.3.2. Resistência óssea	148
6.3.3. Conteúdo mineral ósseo	151
6.3.4. Biomarcadores ósseos e excreção urinária de cálcio	153
6.4. Discussão	155
6.5. Referências Bibliográficas	162

Capítulo VII: O IMPACTO DA OVARIECTOMIA E DA INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE O BALANÇO DE CÁLCIO EM RATAS WISTAR.

7.1. Introdução	168
7.2. Materiais e métodos	170
7.2.1. Animais de experimentação	170
7.2.1.1. Experimento I – Animais sedentários	171
7.2.1.2. Experimento II – Animais exercitados	171
7.2.2. Cirurgia de ovariectomia	172
7.2.3. Administração de cafeína e ingestão de cálcio	172
7.2.4. Determinação do balanço de cálcio	173

7.2.5. Análise Estatística	175
7.3. Resultados	175
7.3.1. Experimento I – Animais sedentários	175
7.3.2. Experimento II – Animais exercitados	179
7.3.3. Experimento I vs. Experimento II	181
7.4. Discussão	183
7.5. Referências Bibliográficas	193

Capítulo VIII: CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1 Conclusão do capítulo III.....	198
8.2. Conclusão do capítulo IV	198
8.3. Conclusão do capítulo V	199
8.4. Conclusão do capítulo VI	199
8.5. Conclusão do capítulo VII	199
8.6. Considerações Finais	200

ANEXOS

Anexo I - Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária sob o Parecer nº 80/2007	205
Anexo II - Agradecimentos aos Coordenadores dos Laboratórios utilizados para as Análises	206

RESUMO

FRANCO, Frederico Souzalima Caldoncelli, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbico associados à adequação ou não cálcio alimentar na composição corporal, no tecido ósseo e no balanço de cálcio em ratas.** Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa. Co-orientadores: Antônio José Natali e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Ratas Wistar adultas foram alocadas em 16 grupos num delineamento fatorial de 2 x 2 x 2 x 2 para os fatores: Ovariectomia (OVX ou SHAM), Cafeína (Placebo ou 6 mg cafeína/dia), Exercício (sedentário ou corrida em esteira a 16 m/min) e Cálcio (ingestão de 100 ou 50% da dose recomendada). Os objetivos deste estudo foram: 1) verificar os efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbico na composição corporal de ratas consumindo a dose recomendada de cálcio alimentar (Capítulo III); 2) verificar se o consumo da metade da recomendação de cálcio interferiria nos efeitos da ovariectomia, cafeína e exercício sobre a composição corporal (Capítulo IV); 3) verificar os efeitos da ovariectomia, cafeína e exercício no tecido ósseo de ratas consumindo a dose recomendada de cálcio (Capítulo V); 4) verificar se o consumo da metade da recomendação de cálcio afetaria os efeitos da ovariectomia, cafeína e exercício sobre o tecido ósseo (Capítulo VI); e 5) verificar os efeitos da ingestão de cálcio e de cafeína e da ovariectomia sobre o balanço de cálcio em ratas sedentárias ou exercitadas (Capítulo VII). No capítulo III, verificou-se que a ovariectomia promoveu maior ganho de peso e gordura corporal; o exercício aumentou a água e proteína, além de reduzir a gordura e cinzas corporais; contudo, a ingestão de cafeína não interferiu na composição corporal. No capítulo IV, a baixa ingestão

de cálcio não alterou os efeitos da ovariectomia, exercício e cafeína sobre a composição corporal, contudo, o exercício e a abstinência de cafeína minimizaram as perdas de massa magra promovidas pela ovariectomia. Os resultados do capítulo V evidenciaram que a deficiência de estrogênio reduziu o conteúdo mineral e a resistência óssea, além de elevar a mobilização e diminuir a formação óssea. O exercício atenuou os efeitos da ovariectomia, porém, reduziu o zinco ósseo. Já a cafeína, apesar de não afetar a resistência óssea, elevou as perdas urinárias e ósseas de cálcio e a mobilização óssea. No capítulo VI, observou-se que o baixo consumo de cálcio potencializou a interação entre os fatores Ovariectomia e Cafeína, afetando negativamente o tecido ósseo; contudo, a prática do exercício melhorou os parâmetros ósseos analisados. No capítulo VII, observou-se que a inadequação de cálcio elevou a eficiência da absorção, porém, reduziu o seu balanço. Observou-se ainda que a ovariectomia diminuiu o balanço e a absorção de cálcio; e que a ingestão de cafeína elevou o balanço e a absorção de cálcio intestinal. O exercício elevou a absorção de cálcio e reduziu sua perda fecal. Assim, conclui-se que ovariectomia elevou a deposição de gordura corporal e a mobilização de cálcio ósseo; que a ingestão de cafeína não afetou a composição corporal, mas quando associada à inadequação de cálcio, prejudicou o tecido ósseo, apesar de melhorar o balanço de cálcio; que a baixa ingestão de cálcio prejudicou o tecido ósseo e o balanço de cálcio, não afetando a composição corporal; e que o exercício físico atenuou os efeitos negativos da ovariectomia. Portanto, a prática de atividade física reduziu o risco de obesidade e de fraturas osteoporóticas, associadas à deficiência estrogênica e inadequação alimentar de cálcio.

ABSTRACT

FRANCO, Frederico Souzalima Caldoncelli, DSc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009. **Effects of ovariectomy, caffeine intake and aerobic exercise associated or not with the adequate intake of calcium on body composition, on bone tissue and on balance of calcium in rats.** Advisor: Neuza Maria Brunoro Costa. Co-Advisors: Antônio José Natali and Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Wistar adult female rats were allocated into 16 groups in a factorial 2 x 2 x 2 x 2 design: Ovariectomy (OVX or SHAM), Caffeine (Placebo or 6 mg caffeine/day), Exercise (sedentary or treadmill running at 16 m/min) and Calcium (100 or 50% of the recommended intake). The objectives of the current study were: 1) To evaluate the effects of ovariectomy, caffeine intake and aerobic exercise on body composition of female rats fed the recommended dose of dietary calcium (Chapter III); 2) To verify whether the intake of 50% of the recommended dose of dietary calcium alters the effects of ovariectomy, caffeine and exercise on body composition (Chapter IV); 3) To evaluate the effects of the ovariectomy, caffeine and exercise on bone tissue of female rats fed the recommended dose of dietary calcium (Chapter V); 4) To verify whether the intake of 50% of the recommended dose of dietary calcium alters the effects of ovariectomy, caffeine and exercise on bone tissue (Chapter VI); and 5) To evaluate the effects of calcium and caffeine intake and ovariectomy on calcium balance in sedentary and exercised female rats (Chapter VII). In Chapter III, it was observed that the ovariectomy promoted higher body weight gain and raised body fat; the exercise raised body water and protein and reduced fat and ash; however, the intake of caffeine did not affect body composition. In Chapter IV, the low

intake of calcium did not alter the effects of ovariectomy, exercise and caffeine on body composition; however, the exercise and caffeine abstinence minimized the lean mass losses promoted by the ovariectomy. In Chapter V, it was verified that the estrogen deficiency reduced bone mineral content and resistance, increased bone resorption and reduced bone formation. The exercise attenuated the effects of ovariectomy, but, it reduced bone zinc. Although caffeine intake have not affected bone resistance, it raised urinary and bone calcium losses and bone resorption. In Chapter VI, it was observed that the low calcium intake strengthened the interaction between ovariectomy and caffeine, in such way that bone tissue was negatively affected; however, the exercise improved the bone parameters analyzed. In Chapter VII, observed that inadequate calcium intake improved its absorption efficiency in the gut, but reduced calcium balance. It was also observed that the ovariectomy reduced calcium balance and absorption, and that caffeine intake raised calcium balance and intestinal absorption. The exercise improved calcium absorption and reduced its fecal output. In conclusion, the ovariectomy raised body fat deposition and bone calcium resorption; the intake of caffeine did not affect body composition, but when associated with inadequate calcium intake, it is harmful to bone tissue, although the calcium balance was improved; the low calcium intake reduced its balance and was harmful to bone tissue, but did not affect body composition; the exercise mitigated the negative effects of ovariectomy. Thus, the exercise training reduced the risk of obesity and osteoporosis fractures, associated with estrogen deficiency and inadequate calcium intake.

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

AIN-93M	Dieta purificada para roedores desenvolvida pelo <i>American Institute of Nutrition</i>
AMP	Adenosina monofosfato
°C	Graus Celsius
Ca ²⁺	Íons de cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CEA	Coeficiente de Eficiência Alimentar
CMO	Conteúdo mineral ósseo
CO ₂	Gás carbônico
CRMV-MG	Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais
CTx	Teleopeptídeo do colágeno tipo I carboxi-terminal
DMO	Densidade mineral óssea
g	Gramas
GH	Hormônio do crescimento
HCl	Ácido clorídrico
m/min	Metros por minuto
Média±DP	Média mais ou menos desvio padrão
Média±EPM	Média mais ou menos erro padrão médio
mg/dia	miligrama por dia

mg/kg/dia	Miligrama por quilo de peso corporal por dia
μL	microlitro
mL	mililitro
mmol/L	Milimol por litro
N	Normal
N/g	Newton por grama
nM BCE/ mM Creatinina	Nanomol de equivalente de colágeno ósseo por milimol de creatinina
NTx	Teleopeptídio do colágeno tipo I amino-terminal
OVX	Ovariectomia
pg/mL	Picograma por mililitro
PTH	Hormônio da paratireóide
RS	Reticulo sarcoplasmático
SHAM	Laparotomia
TRAP	Fosfatase alcalina tártaro resistente
UFV	Universidade Federal de Viçosa
USA	Estados Unidos da América
VO ₂ max	Volume de oxigênio máximo

LISTA DE QUADROS

Capítulo III:

2.1. Delineamento experimental	40
2.2. Dieta AIN-93M	43
2.3. Composição da Mistura de Minerais	44
2.4. Cronograma da oferta de dieta e coleta de fezes e urina	55
7.1. Cronograma da oferta de dieta e coleta de fezes e urina	174

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II:

2.1. Aparelho texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc.-USA)	50
---	----

Capítulo III:

3.1 – Concentração de lactato sanguíneo dos animais exercitados no teste de desempenho	64
3.2a. Peso corporal durante o experimento para o fator Ovário	67
3.2b. Peso corporal durante o experimento para o fator Exercício	67
3.2c. Peso corporal durante o experimento para o fator Cafeína	68

Capítulo IV:

4.1. Concentrações de lactato sanguíneo nos animais exercitados durante o teste de desempenho	93
4.2a. Peso corporal durante o experimento para o fator Ovário	95
4.2b. Peso corporal durante o experimento para o fator Exercício	95
4.2c. Peso corporal durante o experimento para o fator Cafeína	96

LISTA DE TABELAS

Capítulo III:

3.1. Peso corporal inicial e final dos animais	66
3.2. Ganho de peso corporal (g), consumo de dieta (g) e coeficiente de eficiência alimentar (%) para efeito principal dos fatores	69
3.3. Composição corporal para efeito principal dos fatores	71

Capítulo IV:

4.1. Peso corporal inicial e final dos animais	94
4.2. Ganho de peso corporal (g), consumo de dieta (g) e coeficiente de eficiência alimentar (%) dos animais	97
4.3. Percentagem de proteína na carcaça vazia dos animais para interação Ovário e Exercício	98
4.4. Percentagem de proteína na carcaça vazia dos animais para interação Ovário e Cafeína	99
4.5. Composição corporal para efeito principal dos fatores	100

Capítulo V:

5.1. Peso corporal inicial e final dos animais	119
5.2. Resistência óssea do fêmur para efeito principal dos fatores	120
5.3. Conteúdo mineral na tíbia para efeito principal dos fatores	122

5.4. Excreção urinária de cálcio e biomarcadores ósseos para efeito principal dos fatores	124
---	-----

Capítulo VI:

6.1. Peso corporal inicial e final dos animais	147
6.2. Resistência óssea do fêmur para interação Ovário e Cafeína	149
6.3. Resistência óssea do fêmur para efeito principal dos fatores	150
6.4. Conteúdo mineral ósseo na tíbia para efeito principal dos fatores	152
6.5. Excreção Urinária de Cálcio e Biomarcadores Ósseos para efeito principal dos fatores	154

Capítulo VII:

7.1. Balanço de cálcio para interação Ovário e Cálcio	176
7.2. Balanço de cálcio para interação Cálcio e Cafeína	177
7.3. Balanço de cálcio para efeito principal dos fatores	178
7.4. Balanço de cálcio para interação Cálcio e Cafeína	180
7.5. Balanço de cálcio para efeito principal dos fatores	181
7.6. Balanço de cálcio para o fator Exercício	182

CAPÍTULO I:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. OSTEOPENIA E OSTEOPOROSE

1.1.1. Características gerais

Osteopenia é uma patologia óssea, caracterizada pela redução na massa óssea devido à mobilização se tornar maior que a formação óssea durante o seu remodelamento, resultado da menor atividade dos osteoblastos ou maior dos osteoclastos (Hankenson, Cavaliere *et al.*, 2003). Porém, a mais conhecida condição de perda óssea em humanos é a osteoporose pós-menopausa, que é caracterizada pela redução da massa óssea e aumentos na fragilidade e risco de fratura (Tosun, Bolukbasi *et al.*, 2006; Hind e Burrows, 2007). Para a *Organização Mundial de Saúde* (OMS), indivíduos com densidade mineral óssea (DMO) maiores que 1,0 desvios padrão abaixo da média são osteopênicos, e maiores que 2,5 desvios padrão são osteoporóticos (Kelley e Kelley, 2006; Kanis, Burlet *et al.*, 2008).

A incidência de osteoporose tem crescido muito nos últimos anos, apresentando altos custos financeiros em seu tratamento. Nos Estados Unidos, a prevalência de osteoporose em mulheres pós-menopausa é de 38% e estima-se que 1,5 milhões de fraturas sejam associados à osteoporose, sendo esperado triplicar este índice no ano de 2040, decorrente do aumento na expectativa de vida (Tosteson, Melton *et al.*, 2008). O gasto anual americano, por pessoa, no tratamento da osteoporose aproxima-se a U\$60 mil, onde só o custo com drogas para tratamento alcança U\$600 por paciente (Tosteson, Melton *et al.*, 2008). Em 2000, foi estimada na Europa cerca de 2,7 milhões de novas fraturas ósseas (quadril, antebraço, úmero e coluna vertebral) em mulheres e homens acima de 50 anos (Kanis, Burlet *et al.*, 2008). Estas

fraturas representavam 34,8% de todas as fraturas mundiais (Johnell e Kanis, 2006), o que acarretou um custo de 36 bilhões de euros (Kanis, Burlet *et al.*, 2008).

Em decorrência dessa nova realidade, a década atual foi nomeada pela OMS como a “Década do osso e articulação”, tendo como objetivo compreender os avanços das pesquisas em desordens músculo-esqueléticas para melhorar, prevenir e tratar tais patologias. Duas condições crônicas associadas à idade, osteoporose e osteoartrites, são as problemáticas, devido à complexa natureza histórica das doenças e à ausência de tratamento de restabelecimento (Hankenson, Cavaliere *et al.*, 2003). Em virtude das condições músculo-esqueléticas serem associadas à idade, a prevalência desta doença está inserida numa proporção epidêmica. Visando promover estudos mais avançados para a prevenção e tratamento destas patologias, modelos animais têm sido usados para a compreensão do desenvolvimento e restabelecimento destas desordens.

1.1.2. Modelo animal para osteoporose

O modelo animal ideal para estudos de patologias ósseas, como osteopenia e osteoporose, deve ser capaz de induzir a mobilização óssea na ausência da secreção de estrogênio. Esta deficiência hormonal promove perdas ósseas em mulheres, principalmente pós-menopausa, por acarretar o desequilíbrio do remodelamento ósseo (Hankenson, Cavaliere *et al.*, 2003). Mackey *et al.* (1995) sugeriram que um modelo animal deve apresentar características fisiológicas semelhantes às dos humanos, como, a presença de ciclos menstruais e padrões hormonais observadas em primatas não-humanos.

Recentes estudos observaram que a maioria dos modelos animais utilizados para osteoporose baseia-se na cirurgia de ovariectomia (OVX)(Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007; Dai, Ma *et al.*, 2008), pois a supressão do estrogênio afeta direta ou indiretamente os osteoclastos, ao elevar citocinas, e

conseqüentemente, incrementar a mobilização óssea (Feyen, Gobel *et al.*, 2006; Nomura, Shibahara *et al.*, 2007). Outros modelos animais para osteoporose são induzidos por administração de glicocorticóides (Hankenson, Cavaliere *et al.*, 2003); por desuso induzido pelo repouso prolongado, paralisia ou imobilização (Rittweger, Frost *et al.*, 2005); pela falta da gravidade em vôos espaciais (Shackelford, Leblanc *et al.*, 2004), como também a deficiência nutricional de cálcio (Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998).

O informe da *Conferência Internacional de Modelos Animais em Prevenção e Tratamento da Osteoporose* realizada em Cairns (Austrália, 1995) junto a vários estudos relaciona vários modelos animais (Arias e Szejnfeld, 1997; Jerome e Peterson, 2001; Turner, Maran *et al.*, 2001). Os modelos mais comuns para a indução da osteoporose são os da gonadectomia, usados em camundongo (Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Cano, Dapia *et al.*, 2008), ratos (Fuchs, Shea *et al.*, 2007; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007; Dai, Ma *et al.*, 2008), coelhos, cachorro e primatas não humanos (Jerome e Peterson, 2001).

Segundo Arias *et al.* (1997), um modelo animal adequado para estudar os efeitos da osteoporose deve preencher os seguintes requisitos: 1) possibilitar a indução de osteopenia por diferentes mecanismos em machos e fêmeas; 2) permitir o estudo do metabolismo de cálcio e fósforo, como também a coleta das amostras; 3) responder à ação das drogas utilizadas para o tratamento da osteoporose; e 4) propiciar a pesquisa de técnicas diagnósticas não invasivas para uso posterior em humanos. Mackey *et al.* (1995) relataram que além destes fatores, o modelo animal deveria ser pequeno, apresentar taxas de remodelação que sejam semelhantes à privação hormonal na mulher pós-menopausa, ser facilmente encontrado, manuseado e tratado, como também apresentar baixo custo para a experimentação. Até o momento, tem-se verificado que ratos, camundongos e primatas não humanos são eficientes em imitar estas condições (Hankenson, Cavaliere *et al.*, 2003).

O padrão de carga mecânica suportada pelo esqueleto entre os modelos animais de roedores (quadrúpede) e humanos (bípede) são diferentes. Entretanto, tem-se observado similaridade da arquitetura óssea na vértebra e fêmur entre ratos e humanos, sugerindo que ratos podem ser úteis na caracterização das alterações ósseas associadas com idade, deficiência hormonal e efeitos terapêuticos. O modelo de ratas ovariectomizadas (OVX) parece ser útil aos estudos da prevenção e tratamento da perda óssea seguida da depleção de estrogênio, pois OVX induz maior *turnover* ósseo no fêmur e redução trabecular óssea, similar à osteopenia e osteoporose, como observadas em humanos, reduzindo a força mecânica e agravando o risco de fratura (Li, Jee *et al.*, 2003).

1.2. OVARIECTOMIA

A ovariectomia é a cirurgia de retirada dos ovários que tem sido usada para induzir os efeitos da menopausa em animais por excluir a secreção do hormônio estrogênio (Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007). A osteoporose pós-menopausa é a principal patologia promovida pela disfunção hormonal dos estrogênios, sendo caracterizada pela redução da matriz orgânica, em função da ausência de estrógeno e baixa atividade osteoblástica (Guyton, 1997). Contudo, outro efeito colateral da disfunção do hormônio estrogênio está relacionado à obesidade, afetando diretamente a composição corporal de mulheres pós-menopausa.

1.2.1. Composição corporal.

Osteoporose, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e obesidade são comorbidades que ocorrem em função das alterações metabólicas e corporais agravadas pela menopausa em mulheres (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Zhang, Dong *et al.*, 2008). A prevalência de obesidade cresceu rapidamente nos últimos anos, podendo ainda ter seus níveis

incrementados pelo aumento na expectativa de vida. A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública, sendo associadas com maior risco de diabetes tipo II, hipertensão e doenças cardiovasculares (Flier, 2004; Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005), prejudicando a qualidade de vida especialmente das mulheres pós-menopausa. Estudos com humanos e animais (Flier, 2004; Han, Kai *et al.*, 2004; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006) mostraram que a obesidade pós-menopausa acontece em função da maior ingestão de alimentos e à disfunção hormonal, elevando o peso e os estoques de gordura corporal (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Lemieux, Picard *et al.*, 2003; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006).

O aumento na gordura central e alteração do perfil lipídico e glicídico sanguíneo são algumas das anormalidades metabólicas que elevam o risco de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica em mulheres pós-menopausa e animais deficientes de estrogênio (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Lemieux, Picard *et al.*, 2003), afetando negativamente a composição corporal. A reposição hormonal, controle de dieta e exercício físico são as terapias mais empregadas na prevenção destas desordens metabólicas. Shinoda *et al.* (2002) sugeriram que, em animais OVX, o treinamento de um programa de exercício reduz os estoques de gordura corporal, e conseqüentemente, melhora a composição corporal.

Embora o estrogênio seja conhecido como um supressor da gordura corporal, sobretudo a visceral (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006), pouco se tem estudado sobre os efeitos do treinamento de um programa de exercício aeróbico associado à ausência do estrogênio causada pela ovariectomia sobre a composição corporal, especialmente quando associado ao consumo de cafeína.

1.2.2. Tecido ósseo

O osso é um tecido dinâmico que é renovado e remodelado durante toda a vida dos mamíferos (Hankenson, Cavaliere *et al.*, 2003), sendo um tecido conjuntivo rígido, inflexível,

ao qual a matriz extracelular é preenchida com sais de cálcio e fosfato por um processo chamado de mineralização. O osso é altamente vascularizado e metabolicamente muito ativo, apresentando funções como: suporte e proteção para o corpo e seus órgãos, além de reserva iônica de cálcio e fósforo (Kierszenbaum, 2004).

O remodelamento ósseo acontece por meio da mobilização óssea pelos osteoclastos e formação pelos osteoblastos, apresentando uma taxa anual de remodelamento de 50% em jovens, e de 5% em adultos (Swaminathan, 2001). Os ossos atuam como reservatório de minerais, como de cálcio, magnésio e fósforo, além de hidroxiapatitas $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, potássio e sódio. O cálcio é o principal mineral ósseo, e quando em níveis baixos no sangue, é mobilizado do osso para restabelecer seus níveis sanguíneos, o que pode promover um desequilíbrio negativo no processo de remodelamento ósseo, agravando a osteoporose (Martini e Wood, 2002; Costa e Peluzio, 2008).

Segundo Gurr (1999), o mecanismo de remodelamento ósseo promovido pela deficiência de estrogênio ocorre em diversas etapas, na seguinte seqüência: 1) níveis de estrógeno reduzidos afetam o esqueleto, moldando a um aumento na mobilização óssea, aumento do cálcio ionizado circulante, diminuição do 1,25 dihidroxivitamina D₃ e redução do estímulo no transporte intestinal ativo de cálcio; 2) a deficiência de estrogênio reduz a eficiência de utilização do cálcio, promovendo uma perda óssea relacionada à deficiência do substrato de cálcio; 3) o estrogênio tem efeito primário sobre o osso e intestino, assim, um aumento na ingestão de cálcio poderia aumentar a absorção do cálcio nos ossos, mas não a sua deposição. Dessa forma, um aumento na ingestão de cálcio poderia corrigir este problema se a deficiência de estrogênio reduzisse apenas a eficiência na absorção. Tais mecanismos desenvolvem a mobilização óssea acarretando maior fragilidade óssea e risco de fraturas osteoporóticas.

A osteoporose é uma complexa doença atribuída à idade, deficiência estrogênica pós-menopausa e desordens clínicas (Flier, 2004; Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005). O estrogênio promove um aumento na atividade osteoblástica e no crescimento ósseo, por incrementar a retenção de cálcio e os depósitos da matriz óssea (Mcmanus, Davey *et al.*, 2008). Sua deficiência promove aumento no *turnover* ósseo (Rapuri, Kinyamu *et al.*, 2002; Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008), produzindo um desequilíbrio no remodelamento ósseo, onde a mobilização sobrepõe à sua formação, resultando no incremento da fragilidade e suscetibilidade à fratura (Hara, Kobayashi *et al.*, 2007; Dai, Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008), devido à perda de massa óssea (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007). As conseqüências da deficiência de estrogênio sobre o tecido ósseo em mulheres pós-menopausa e ratas ovariectomizadas (OVX) tem sido largamente estudadas (Chubak, Ulrich *et al.*, 2006; Dai, Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Kim *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008), sendo bastante reportada quando combinada à suplementação de cálcio (Gala, Diaz-Curiel *et al.*, 2001; Stear, Prentice *et al.*, 2003; Bischoff-Ferrari, Rees *et al.*, 2008; Lambert, Eastell *et al.*, 2008). No entanto, pouco tem sido estudado quando associado ao baixo consumo de cálcio (Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998).

1.2.3. Balanço de cálcio

O cálcio dietético é absorvido no duodeno por transporte ativo, sendo dependente da 1,25-dihidroxitamina D₃ e receptores intestinais, e no íleo por difusão passiva estimulada pela presença de lactose e acidez (Guyton, 1997). A absorção fracional de cálcio é atenuada com o passar da idade, onde crianças apresentam taxa próxima de 60%, jovens adultos de 25%, e mulheres pós-menopausa reduzem sua absorção fracional em 0,21% ao ano (Heaney, 1989). A redução na absorção de cálcio promove menor concentração de cálcio circulante,

elevando a síntese e liberação de hormônio da paratireóide (PTH), para restaurar seus níveis sanguíneos, promovendo também a reabsorção de cálcio nos túbulos renais distais (Costa e Peluzio, 2008).

Presume-se que a deficiência do hormônio estrogênio seja o principal fator de risco para a osteoporose em mulheres pós-menopausa. Este tipo de osteoporose é frequentemente associado com a má absorção intestinal de cálcio, redução na síntese de vitamina D ativa e balanço negativo de cálcio devido à redução na secreção de estrogênio (Kobayashi, Hara *et al.*, 2002; Zhang, Dong *et al.*, 2008). O balanço negativo de cálcio promove perdas de massa óssea e redução no conteúdo e na densidade de mineral ósseo, elevando os riscos de fraturas nessa população (Kobayashi, Hara *et al.*, 2002; Altimari, Moraes *et al.*, 2006; Park, Omi *et al.*, 2008; Rodriguez, Dimarco *et al.*, 2009).

O aumento na ingestão de cálcio poderia elevar sua absorção, mas não necessariamente a deposição óssea de cálcio durante a menopausa. Dessa forma, a suplementação de cálcio não é o fator preponderante no tratamento da osteoporose, mas a deficiente ingestão de cálcio poderia intensificar esta patologia (Huang, Chang *et al.*, 2008). A ingestão de cálcio de mulheres brasileiras entre 40 e 80 anos de idade, varia entre 240 a 625 mg/dia (Velásquez-Meléndez, Martins *et al.*, 1997; Montilla, Aldrghi *et al.*, 2004; Batista, Priore *et al.*, 2006), representando uma inadequação dietética de 48 a 80% desse mineral, de acordo com as recomendações do *Institute of Medicine* (Iom, 1998), o que expõe esta população ao maior risco de balanço de cálcio negativo e subseqüentes fraturas osteoporóticas.

1.3. CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é a substância psicoativa mais consumida no mundo, sendo encontrada em café, chá, refrigerantes sabor cola, entre outros (Paluska, 2003; Altimari,

Moraes *et al.*, 2006; Rodriguez, Dimarco *et al.*, 2009). A cafeína, uma substância lipossolúvel, alcança seus níveis de pico no plasma entre 30 e 120 minutos após sua ingestão, e aproximadamente 100% da ingestão oral podem ser rapidamente absorvidas pelo trato digestório (Braga e Alves, 2000). Todavia, a ingestão de altas doses de cafeína, além aumentar a diurese (Birnbbaum e Herbst, 2004; Ruxton, 2008), pode causar prejuízo ao organismo, tais como desordens reprodutivas e cognitivas (Paluska, 2003), aumento da pressão sanguínea (James, Wilson *et al.*, 2004), efeito carcinogênico (Caubet, Comte *et al.*, 2004), menor absorção de cálcio (Heaney, 2002), e principalmente, elevação da excreção de cálcio urinário (Massey e Sutton, 2004).

A cafeína é muito consumida como suplemento nutricional, por atletas e praticantes de atividade física, objetivando o incremento do desempenho. A ingestão de cafeína apresenta evidências de ser uma substância ergogênica ao desempenho durante o exercício aeróbico (Hogervorst, Bandelow *et al.*, 2008) quando consumida em doses baixas de 3-6 mg/kg peso corporal/dia (Bell e Mclellan, 2002; Doherty, Smith *et al.*, 2004). Sua ação está associada à ativação de mecanismos de efeito central e periférico que desencadeiam importantes alterações metabólicas e fisiológicas (Altimari, Moraes *et al.*, 2006; Rodriguez, Dimarco *et al.*, 2009).

O principal efeito da cafeína sobre o desempenho física está associado com sua ação direta no músculo esquelético, elevando a transmissão de estímulos na interação neuro-muscular (Kalmar e Cafarelli, 2004), como a capacidade de antagonismo aos receptores de adenosina (Halldner, Aden *et al.*, 2004; Altimari, Moraes *et al.*, 2006). Tem sido sugerido que a cafeína aumenta o tempo até a fadiga durante o exercício (Kalmar e Cafarelli, 2004) em função do aumento da liberação dos íons de cálcio (Ca^{2+}) do retículo sarcoplasmático (RS) (Germinario, Esposito *et al.*, 2004; James, Wilson *et al.*, 2004), da redução do limiar de excitabilidade e prolongamento da duração da contração, e inibição da recaptura do Ca^{2+} pelo

RS (Braga e Alves, 2000; James, Wilson *et al.*, 2004). No entanto, esta substância poderia afetar o exercício aeróbico principalmente por elevar a mobilização e oxidação de ácidos graxos e poupar os estoques de glicogênio muscular (Hespel, Op't Eijnde *et al.*, 2002; Ruxton, 2008). Todavia, Rodriguez et al. (2009) relatam que o efeito ergogênico da cafeína é mais relacionado à sua capacidade de estimulação do sistema nervoso central do que a percepção do esforço como opositor ao seu papel na mobilização de ácidos graxos e poupar glicogênio muscular. Tais benefícios da ingestão de cafeína sobre o desempenho poderia então afetar direta e/ou indiretamente, a composição corporal e o tecido ósseo.

1.3.1. Composição corporal

A cafeína poderia alterar a composição corporal por reduzir o peso, a gordura e a água corporais (Birnbaum e Herbst, 2004; Ruxton, 2008), em função de elevar a taxa metabólica basal, a mobilização e oxidação de ácidos graxos, como também devido à sua ação diurética (Hespel, Op't Eijnde *et al.*, 2002; Birnbaum e Herbst, 2004; Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005; Ruxton, 2008).

A ingestão de cafeína pode estimular o aumento na taxa de metabolismo basal, a liberação de catecolaminas (Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005; Altimari, Moraes *et al.*, 2006) e reduzir a taxa de glicogenólise muscular durante o exercício aeróbico. Portanto, ela pode poupar glicogênio devido ao aumento da mobilização e oxidação da gordura intra e extra-muscular (Hespel, Op't Eijnde *et al.*, 2002; Mclellan e Bell, 2004), que levaria à diminuição do peso e da gordura corporal. Além do mais, Wang et al. (2006) sugerem que a cafeína pode reduzir a absorção de lipídios por reduzir o fluxo linfático. Desta forma, a ingestão de cafeína poderia minimizar o aumento de peso e de estoques de gordura promovido pela deficiência de estrogênio, entretanto, pouco se sabe do impacto da ingestão de cafeína em mulheres pós-menopausa.

A possível ação da cafeína em prolongar o exercício até a fadiga (Kalmar e Cafarelli, 2004) poderia diretamente promover o maior desempenho do exercício, e indiretamente estimular a síntese protéica, elevando a massa magra na composição corporal. Todavia, estes efeitos não foram identificados por alguns autores (Acheson, Gremaud *et al.*, 2004; Franco, 2004). Em nosso estudo prévio, observou-se que a ingestão de cafeína associada à creatina não interferiu no peso, gordura, proteína e água da carcaça e vísceras em ratos machos, entretanto, não foi investigada a ingestão isolada de cafeína (Franco, 2004). Portanto faltam evidências que suportem as suposições da ingestão da cafeína sobre a composição corporal em mulheres pós-menopausa.

1.3.2. Tecido ósseo

O consumo de cafeína tem sido relacionado com a perda de massa óssea (Jasminka e Kerstetter, 2000; Massey e Sutton, 2004; Tsuang, Sun *et al.*, 2006), em função de o seu efeito diurético elevar a excreção urinária de cálcio (Chen e Whitford, 1999; Heaney e Rafferty, 2001). Também é mencionado que a cafeína poderia inibir a mineralização óssea, diferenciação de osteoblastos e formação da matriz extracelular (Massey e Sutton, 2004), podendo agravar o risco de osteoporose devido às alterações na microestrutura, redução na densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) (Chen e Whitford, 1999; Dew, Day *et al.*, 2007), resultando numa maior suscetibilidade à fratura (Rapuri, Gallagher *et al.*, 2001; Heaney, 2002; Tsuang, Sun *et al.*, 2006). Todavia, outros estudos não identificaram efeitos deletérios da cafeína sobre o tecido ósseo (Lloyd, Johnson-Rollings *et al.*, 2000; Rico, Canal *et al.*, 2002).

A administração de cafeína tem sido associada à acelerada perda óssea em mulheres pós-menopausa com baixa ingestão de cálcio (menos de 800mg/dia) e ingestão de cafeína referente a 2 ou mais xícaras de café (Heaney, 2002). Contudo, o efeito negativo da cafeína

sobre DMO poderia ser minimizado pela adição de cálcio dietético (Iom, 1998). Tais efeitos deletérios podem ser intensificados devido ao fato de o osso representar o maior reservatório corporal de cálcio (Jasminka e Kerstetter, 2000), sendo o cálcio ósseo o primeiro a ser excretado (Ashizawa, Fujimura *et al.*, 1997). Apesar de autores sugerirem que o impacto da ingestão de cafeína sobre os metabolismos de cálcio e ósseo serem mais graves em indivíduos com inadequação do cálcio alimentar (Heaney, 2002; Wetmore, Ichikawa *et al.*, 2008), não são encontrados estudos investigando o efeito da ingestão de cafeína e baixo teor de cálcio alimentar em mulheres pós-menopausa, o que se faz necessário.

Huang *et al.* (2002), demonstraram que uma alta dose de cafeína aumentou o comprimento ósseo, mas reduziu o peso e a DMO. No entanto, em nosso estudo anterior, foi observado que a ingestão de cafeína associada à creatina não alterou o comprimento, espessura, peso e resistência óssea (Franco, 2004). Isto implica na necessidade de maiores investigações, sendo necessário para tanto a utilização de outros parâmetros de avaliação do remodelamento ósseo.

Marcadores bioquímicos são métodos não invasivos usados para identificar alterações agudas no *turnover* ósseo, pois refletem o processo de remodelamento, sendo úteis na administração de doenças ósseas metabólicas (Swaminathan, 2001). A formação óssea é promovida pelos osteoblastos, que sintetizam e secretam diversas proteínas no soro como marcadores de sua atividade, tendo como os mais comuns marcadores a fosfatase alcalina óssea, osteocalcina e peptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo 1 (Watts, Jenkins *et al.*, 2001). A deoxipiridinolina e os produtos da degradação dos teleopeptídeos do colágeno tipo I, aminoterminal (NTx) e carboxiterminal (CTx), são sensíveis marcadores de mobilização óssea promovida pelos osteoclastos (Scariano, Garry *et al.*, 2003). Estes marcadores bioquímicos são facilmente identificados por técnicas de imunoenaios no soro e na urina (Swaminathan, 2001).

Os resultados dos estudos com cafeína sobre o tecido ósseo ainda são controversos e inconclusivos, especialmente quando associada à deficiência estrogênica. Isto sugere que além dos parâmetros até o momento avaliados, análises de marcadores ósseos, conteúdo de cálcio e resistência óssea poderiam elucidar esta inconsistência nos resultados.

1.3.3. Balanço de cálcio

O efeito da ingestão de cafeína ao longo prazo sobre o metabolismo de cálcio é complexo, podendo afetar inclusive sua absorção intestinal (Jasminka e Kerstetter, 2000; Heaney, 2002), reduzindo sua biodisponibilidade. Heaney et al. (2002) relataram perda de 5 mg de cálcio por xícara de café, induzindo o seu balanço negativo. Além do mais, a ingestão de altas doses de cafeína (Chen e Whitford, 1999; Heaney, 2002; Massey e Sutton, 2004) e cafeína combinada a creatina (Franco, 2004) poderiam elevar a excreção de cálcio urinário, interferindo negativamente nos estoques corporais de cálcio (Huang, Yang *et al.*, 2002), principalmente em mulheres pós-menopausa. O efeito deletério da cafeína torna-se mais pronunciado quando o cálcio dietético é inadequado (Heaney, 2002), onde a perda urinária não é compensada após 24 horas do consumo de cafeína (Jasminka e Kerstetter, 2000; Massey e Sutton, 2004). Isto indica que mulheres brasileiras, as quais exibem inadequação de cálcio dietético, estariam sujeitas a maiores riscos de desordens do metabolismo de cálcio, especialmente por apresentarem elevado consumo de produtos ricos em cafeína.

Poucos estudos têm focado atenção na influência da ingestão de cafeína sobre o balanço e absorção de cálcio. Chen et al. (1999) relataram que a administração de cafeína (25 e 100 mg/kg/dia) em ratos Sprague-Dawley não afetaram o conteúdo fecal e o balanço de cálcio. Heaney et al. (1982), num estudo epidemiológico pesquisando mulheres de meia idade, não verificaram alteração no balanço e absorção de cálcio em função a ingestão de cafeína. Todavia, identificaram correlação negativa entre a ingestão de cafeína e o balanço de

cálcio, mostrando uma tendência ao balanço negativo de cálcio. Contudo, o impacto do consumo de cafeína sobre o metabolismo de cálcio é complexo, onde a ausência de estudos e a inconsistência nos resultados evidenciam que os mecanismos de sua ação ainda são desconhecidos.

1.4. EXERCÍCIO

A *Organização Mundial da Saúde* (OMS) recomenda a prática de exercício aeróbico (caminhar, pedalar, correr, etc.) pelo menos 5 sessões por semana de 30 minutos/dia de baixa a moderada intensidade como forma de melhorar a qualidade de vida.

O exercício é conhecido como um meio de prevenir as morbidades e mortalidade por doenças crônicas. Estudos prospectivos em indivíduos adultos mostram que o baixo nível de aptidão física é fortemente associado com doença cardíaca coronariana, hipertensão, diabetes tipo II, bem como mortalidade por doenças cardíacas, câncer, entre outras (Lohman, Ring *et al.*, 2008). Tem-se verificado que a baixa aptidão física é associada com um perfil de fator de risco para doenças crônicas, desde a juventude até idades mais avançadas. Por outro lado, a prática cotidiana de exercício promove adaptações positivas sobre os sistemas cardiovascular e locomotor (Bircher, Knechtle *et al.*, 2005; Lohman, Ring *et al.*, 2008) que resulta na melhoria da capacidade funcional e qualidade de vida.

Um estudo recente mostra que mulheres buscam terapias alternativas para os sintomas da menopausa, ao qual incluem o aumento e manutenção do alto nível de aptidão física. A prática de atividade física tem sido proposta para prevenir e atenuar sintomas vasomotores relacionados à menopausa, bem como sintomas psicológicos, como ansiedade, estresse e depressão (Nelson, Sammel *et al.*, 2008).

1.4.1. Composição corporal

Estudos com humanos (Bircher, Knechtle *et al.*, 2005; Irving, Davis *et al.*, 2008; Nelson, Sammel *et al.*, 2008) e animais (Hongu e Sachan, 2000; Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004) mostram que o exercício de moderada intensidade apresenta benefícios à composição corporal, caracterizando-se como ótima estratégia para reduzir o peso e a deposição de gordura (Irving, Davis *et al.*, 2008; Lohman, Ring *et al.*, 2008). Estes benefícios do exercício são devidos ao aumento no gasto energético, sendo importante estratégia para modificar a composição corporal e o tratamento da obesidade.

O grande interesse na prevenção e tratamento da obesidade tem aumentado o número de estudos direcionados à perda de gordura para conhecer a intensidade ideal do exercício para maximizar a oxidação de gordura, em particular a gordura visceral abdominal (Bircher, Knechtle *et al.*, 2005; Irving, Davis *et al.*, 2008). Segundo Irving *et al.* (2008), o treinamento de um programa de exercício de alta intensidade, entre 70 a 80% do consumo de VO_2max , seria o ideal para induzir um maior déficit de energia, reduzir o peso corporal e perda de gordura, por 2 razões: 1) o exercício de alta intensidade induz secreção dos hormônios lipolíticos, incluindo GH e epinefrina, o que poderia facilitar o maior gasto de energia e oxidação de gordura; 2) em níveis equivalentes de gasto de energia, o exercício de alta intensidade favoreceria o balanço energético negativo, quando comparado ao exercício de baixa intensidade.

Bircher *et al.* (2005) relataram que determinar o limiar de lactato seria um método adequado para se identificar o nível de intensidade do exercício, e conseqüentemente, controlar a intensidade do treinamento físico. Estes autores identificaram em estudos recentes, de acordo com gênero, tipo de exercício e aptidão do indivíduo, que a concentração sanguínea de lactato para a maior oxidação de gordura variava entre 1,5 e 3,5 mmol/L. Contudo estes valores contrastaram aos valores de VO_2max , sugerido para este fim que é de 35 a 75%.

Em estudos com modelo animal, Ferreira et al. (2007) verificaram que o exercício aeróbico de muito baixa intensidade em esteira (12 m/min) não alterou a gordura e a composição corporal de ratos; já Shinoda et al. (2002) identificaram melhoria na composição corporal quando ratos correram a 26 m/min, que é considerado um exercício de alta intensidade. Contudo, ainda não se conhece o impacto da corrida aeróbia de baixa intensidade (16 m/min) sobre a composição corporal, como também seus efeitos como anti-obesidade em indivíduos com deficiência de estrogênio induzida pela ovariectomia.

1.4.2. Tecido ósseo

O exercício promove adaptações positivas ao esqueleto ósseo, especialmente para a prevenção e tratamento da osteoporose (Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Park, Kim *et al.*, 2008). Tem sido sugerido que o estresse mecânico gerado pelo exercício constitui um dos mais importantes estímulos para a formação óssea (Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Rittweger, Frost *et al.*, 2005; Turner e Robling, 2005; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007), tendo um papel decisivo na prevenção da perda óssea em mulheres pós-menopausa e em ratas OVX (Barengolts, Kouznetsova *et al.*, 1996; Honda, Sogo *et al.*, 2003; Fuchs, Shea *et al.*, 2007). Nesta população, diferentes tipos de exercício como o exercício de força (Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Figard, Mougín *et al.*, 2007), caminhada (Tosun, Bolukbasi *et al.*, 2006), corrida (Huang, Lin *et al.*, 2003; Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004; Fuchs, Shea *et al.*, 2007), natação (Hart, Shaw *et al.*, 2001) e saltos verticais (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007) mostram benefícios sobre o tecido ósseo. Benefícios estes que ocorrem sobre o peso (Huang, Lin *et al.*, 2003), densidade e conteúdo mineral (Fuchs, Shea *et al.*, 2007; Nordstrom, Hogstrom *et al.*, 2008; Park, Kim *et al.*, 2008), resistência (Barengolts, Kouznetsova *et al.*, 1996; Honda, Sogo *et al.*, 2003; Huang, Lin *et al.*, 2003) e marcadores de remodelamento ósseos (Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004; Tosun,

Bolukbasi *et al.*, 2006; Figard, Mougin *et al.*, 2007; Park, Kim *et al.*, 2008). Contudo, outros autores não verificaram alguns destes benefícios (Maimoun, Simar *et al.*, 2005; Chubak, Ulrich *et al.*, 2006; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Huang, Chang *et al.*, 2008).

Estudos com animais OVX são usados para imitar a osteoporose em mulheres pós-menopausa (Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004; Figard, Mougin *et al.*, 2007), sendo o efeito osteogênico do exercício sobre ratas OVX variado conforme a intensidade e duração (Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998; Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004; Fuchs, Shea *et al.*, 2007), bem como o tipo do exercício (Hart, Shaw *et al.*, 2001; Honda, Sogo *et al.*, 2003; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007).

Barengolts *et al.* (1994) mostraram que corrida em ratas Sprague-Dawler OVX de 9 meses de idade preveniu a perda de CMO na tíbia e fêmur, como também a perda da taxa volume esponjoso/volume total da tíbia. Honda *et al.* (2003) afirmaram que a corrida produz maior benefício ao osso em ratas deficiente em estrogênio por OVX do que nas SHAM, sugerindo que o maior *turnover* ósseo seria mais sensível à carga mecânica. Para Hubal *et al.* (2005), a DMO da tíbia em camundongos OVX exercitadas não diferiu dos animais normais, sugerindo que o exercício atenuaria o declínio na DMO causada pela deficiência de estrogênio. Li *et al.* (2003) sugeriram que a área de porosidade e o remodelamento cortical em ratas OVX elevam drasticamente no colo femoral de forma similar em humanos.

O efeito do exercício sobre o tecido ósseo varia conforme o tipo, intensidade, duração e frequência do exercício (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007). Fuchs *et al.* (2007) mostraram que o programa de corrida em esteira a 22-24 m/min, por 60 minutos, com 5° de inclinação elevou o CMO do fêmur e vértebras em ratas OVX. Por outro lado, estudos relatam inconsistência nos resultados de programas de treinamento de corrida em esteira (12 m/min por 60 min; 12 m/min por 120 min ou 18 m/min por 60 min) sobre a DMO e força de fratura óssea (Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998). No entanto, ainda não são

conhecidos os benefícios do exercício de corrida aeróbia de baixa intensidade (16 m/min por 30 min/dia) sobre o tecido ósseo em animais ovariectomizadas consumindo cafeína e baixos teores de cálcio.

1.4.3. Balanço de cálcio

O exercício é conhecido como um potente meio de reduzir os riscos de fraturas osteoporóticas, por elevar a massa óssea (Huang, Lin *et al.*, 2003; Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004), onde alguns estudos relatam que este benefício do exercício poderia ser em função do melhor balanço de cálcio (Leblanc, Evans *et al.*, 1983; Lutz, Chen *et al.*, 1987; Yeh e Aloia, 1990). LeBlanc *et al.* (1983) relataram redução no balanço de cálcio após animais pararem de exercitar. Lutz *et al.* (1987) mostraram que a corrida forçada restabeleceu o balanço de cálcio positivo após 28 dias de sedentarismo. Isto sugere que o treinamento de um programa de exercício poderia elevar a absorção líquida e o balanço de cálcio, resultando na melhoria da qualidade de vida. Contudo, ainda não se conhece o impacto do treinamento de um programa de corrida aeróbia sobre o balanço de cálcio em mulheres pós-menopausa ingerindo cafeína e recebendo baixos teores de cálcio dietético.

1.5. CÁLCIO

A ingestão de cálcio por mulheres brasileiras entre 40 e 80 anos de idade, varia entre 240 a 625 mg/dia (Velásquez-Meléndez, Martins *et al.*, 1997; Montilla, Aldrghi *et al.*, 2004; Batista, Priore *et al.*, 2006), representando à inadequação dietética de 48 a 80% desse mineral, de acordo com as recomendações do *Institute of Medicine* (Iom, 1998). Esta prática alimentar poderia afetar negativamente a composição corporal, o tecido ósseo e o balanço de cálcio destes indivíduos.

1.5.1. Composição corporal

Cada vez mais a obesidade tem sido reconhecida como um problema de origem multifatorial, onde estão envolvidos fatores ambientais, nutricionais, fisiológicos e genéticos. Dentro dessa complexidade, inúmeros estudos científicos atuais apontam para fatores cada vez mais específicos, na tentativa de encontrar saídas para esse grande problema de saúde pública.

Recentes estudos têm apontado a baixa ingestão de cálcio como desencadeante de uma disfunção no metabolismo lipídico decorrente da regulação dos conteúdos de cálcio intracelular (Shi, Dirienzo *et al.*, 2001; Zemel, Thompson *et al.*, 2004). Shi *et al.* (2001) estudaram camundongos obesos consumindo dieta com 0,4 e 1,3% de cálcio dietético, e identificaram que animais ingerindo baixo teor de cálcio recuperaram o peso e a gordura corporal após restrição calórica, o que não ocorreu aos animais consumindo maior teor de cálcio. Zemel *et al.* (2004) estudaram por 24 semanas indivíduos obesos consumindo dieta com vários teores de cálcio (de 400 a 1300 mg/dia), e observaram que o maior teor de cálcio derivado de fonte láctea promoveu redução na gordura corporal. Tais achados parecem ser decorrentes da ação anti-lipogênica e lipolítica dos altos conteúdos de cálcio dietético. Uma explicação para este efeito seria pela atuação dos hormônios do metabolismo de cálcio, cuja menor ingestão interferiria em seu metabolismo incrementando a deposição de gordura e reduzindo sua oxidação. Por outro lado, ao ser ingerido em quantidades adequadas, o cálcio suprimiria a ação destes hormônios, e assim, o acúmulo de gordura, estimulando a oxidação lipídica.

Estudos se fazem necessários para investigar as possíveis alterações sobre a composição corporal da baixa ingestão de cálcio, em razão do seu potencial na gênese da obesidade. Pouco se sabe da influência da baixa ingestão de cálcio associada à administração de cafeína e prática do exercício aeróbico, sugerindo-se que esta associação preveniria a

deposição de gordura corporal. Menos ainda é conhecido sobre esta combinação de efeitos em mulheres pós-menopausa, ao qual exibem maior retenção de gordura corporal decorrente da disfunção hormonal.

1.5.2. Tecido ósseo

A baixa ingestão de cálcio é uma prática alimentar entre as mulheres brasileiras, sendo referido que estas mulheres consomem próximo à metade de sua recomendação dietética diária (Velásquez-Meléndez, Martins *et al.*, 1997; Montilla, Aldrghi *et al.*, 2004; Batista, Priore *et al.*, 2006). Este comportamento pode elevar o risco de um balanço de cálcio negativo e agravar o risco de osteoporose (Huang, Chang *et al.*, 2008), por afetar o metabolismo de cálcio e a homeostase óssea (Wetmore, Ichikawa *et al.*, 2008).

A ingestão dietética de cálcio é importante para a obtenção de um esqueleto forte. Estudos têm mostrado que a baixa ingestão de cálcio resulta em múltiplas deficiências esqueléticas (Welch, Turner *et al.*, 2008). Welch *et al.* (2008) estudando por 8 semanas ratas Fisher 344 alimentadas com baixa e adequada recomendação de cálcio dietética sobre o tecido ósseo, verificaram que a ingestão inadequada de cálcio diminuiu a DMO, porém, não afetou a força óssea quando comparada ao adequado consumo de cálcio.

A deficiência do estrogênio na menopausa promove aumento no *turnover* ósseo (Rapuri, Kinyamu *et al.*, 2002; Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008), produzindo desequilíbrio no seu remodelamento (Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; D'amelio, Grimaldi *et al.*, 2008) e acarretando maior fragilidade (Hara, Kobayashi *et al.*, 2007; Dai, Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008). Embora a influência da ovariectomia sobre a excreção urinária de cálcio e metabolismo ósseo (Dick, Devine *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008), como também suas conseqüências associadas à suplementação de cálcio sobre o tecido ósseo têm sido reportadas (Gala, Diaz-Curiel *et al.*,

2001; Stear, Prentice *et al.*, 2003; Bischoff-Ferrari, Rees *et al.*, 2008; Lambert, Eastell *et al.*, 2008), pouco se estudou até o momento sobre sua associação com o baixo consumo de cálcio, ao qual tem sido sugerido que a perda óssea é acelerada, elevando o risco de fratura (Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998).

1.5.3. Balanço de cálcio

O cálcio é o principal mineral ósseo (Mitamura, Hara *et al.*, 2002; Costa e Peluzio, 2008), cuja absorção líquida apresenta função linear à sua ingestão dietética (Bronner, Salle *et al.*, 1992). Estudos sugerem que a baixa ingestão de cálcio, apesar de elevar a eficiência na absorção de cálcio, reduz o balanço de cálcio e a massa óssea, podendo agravar a saúde óssea na osteoporose (Hitz, Eskildsen *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008; Zhang, Dong *et al.*, 2008).

A deficiência do cálcio dietético pode reduzir sua absorção intestinal levando a menores conteúdos de cálcio sangüíneos (Hitz, Eskildsen *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008; Zhang, Dong *et al.*, 2008). Este reduzido nível de cálcio circulante poderia estimular a liberação de paratormônio (PTH) sangüíneo para restaurar seus níveis no sangue. Por sua vez, o PTH, além de diminuir a excreção urinária de cálcio e elevar sua mobilização óssea, promoveria maior absorção intestinal de cálcio (Costa e Peluzio, 2008; Mcmanus, Davey *et al.*, 2008). Desta forma, este poderia ser um possível mecanismo pelo qual o baixo teor de cálcio alimentar poderia elevar a eficiência de sua absorção intestinal.

A osteoporose pós-menopausa é associada com balanço negativo de cálcio devido sua insuficiente ingestão dietética e deficiência estrogênica diminuir a absorção intestinal de cálcio. O baixo consumo de cálcio, constatado na população de mulheres brasileiras, poderia reduzir o balanço de cálcio, podendo prejudicar mais ainda a homeostase óssea. Adicionalmente, o aumento na ingestão de cafeína tem mostrado incrementar as perdas de

cálcio urinário, podendo afetar negativamente o seu balanço. Em contrapartida, o exercício aeróbico parecer ser uma estratégia eficaz para a prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopausa. Porém, existem poucas evidências de seus benefícios sobre o balanço de cálcio nesta população, aonde estudos se fazem necessários.

1.6. JUSTIFICATIVAS

A deficiência de estrogênio pós-menopausa aumenta o risco de fraturas osteoporóticas por reduzir a massa e resistência óssea, e diminuir a absorção e o balanço de cálcio. Além disso, a composição corporal sofre alterações pelo aumento da ingestão alimentar, levando ao acúmulo de gordura e do peso corporal. Isto nos levou a investigar as alterações corporais decorrentes da deficiência estrogênica em ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia, associando essa condição ao consumo de cafeína e de cálcio e à prática de atividade física.

A cafeína é uma substância psicoativa, cujo consumo tem sido incrementado devido à alta ingestão de produtos como café, chás, refrigerantes tipo cola, chocolate, entre outros na alimentação humana. Em baixas doses (3-6 mg/kg), a cafeína pode elevar o desempenho físico, todavia, pode elevar a diurese e afetar negativamente o tecido ósseo. O consumo de cafeína pode afetar a composição corporal por poupar o glicogênio muscular ao elevar a mobilização e oxidação de ácidos graxos, decorrente à maior liberação de catecolaminas e inibição da fosfodiesterase. Em razão ao seu efeito diurético, pode reduzir o conteúdo de água corporal, como também elevar a função renal, incrementando a perda de cálcio na urina. Esta maior perda de cálcio pode promover sua mobilização óssea para atender às necessidades fisiológicas corporais, elevando a fragilidade dos ossos. Além do mais, recentes estudos mostraram que a cafeína pode inibir a mineralização óssea e a diferenciação dos osteoblastos. A ingestão de cafeína apresenta uma correlação negativa com o balanço de cálcio, o que pode

prejudicar ainda mais o tecido ósseo. Desta forma, o consumo de cafeína por indivíduos deficientes de estrogênio pode reduzir os estoques de gordura corporal, a resistência óssea e o balanço de cálcio.

O consumo de cálcio dietético na população brasileira de mulheres varia de 240 a 625 mg/dia, representando uma deficiência de 48 a 80% de suas recomendações diárias. O baixo consumo de cálcio alimentar pode, dentre outras coisas, elevar a deposição de gordura e o peso corporal, visto que a baixa concentração de cálcio intracelular estimula a lipogênese e inibe a lipólise. O balanço de cálcio é diretamente relacionado à sua ingestão, onde a baixa ingestão de cálcio alimentar acarreta, conseqüentemente, baixos níveis sanguíneos. Isto estimula a secreção do hormônio da paratireóide (PTH), que ativa a vitamina D e diminui a excreção de cálcio urinário e aumenta a absorção intestinal e a mobilização óssea de cálcio para restabelecer seus níveis adequados no sangue. Desta forma, o baixo consumo de cálcio alimentar pode prejudicar o tecido ósseo por elevar sua mobilização, tornando-o mais frágil. Tais mecanismos desencadeados pela baixa ingestão de cálcio podem ser potencializados pelo consumo de cafeína promovendo maior fragilidade óssea em mulheres pós-menopausa.

A *Organização Mundial da Saúde* (OMS) recomenda a prática de exercício aeróbico (caminhar, pedalar, correr, etc.) pelo menos 5 sessões por semana de 30 minutos/dia de baixa a moderada intensidade como forma de melhorar a qualidade de vida. A prática do exercício tem sido associada à prevenção e tratamento de diversas morbidades, como as doenças crônicas não transmissíveis. Seus benefícios sobre a composição corporal são atribuídos ao maior gasto energético, reduzindo o peso e a gordura corporal. O exercício de impacto eleva a força óssea e tem sido apontado como o principal estimulador do efeito osteogênico promovido pela prática de atividade física. O exercício pode ainda elevar a absorção intestinal de cálcio, incrementando a oferta deste mineral, e assim, favorecendo a resistência óssea. Contudo, pouco se conhece sobre os efeitos da prática do exercício aeróbico de baixa

intensidade sobre a composição corporal, o tecido ósseo e o balanço de cálcio quando associados à deficiência de estrogênio, baixa ingestão de cálcio alimentar e consumo de cafeína.

1.7. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbico associados à adequação ou não de cálcio alimentar sobre a composição corporal, o tecido ósseo e o balanço de cálcio em ratas Wistar.

1.7.1. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.7.1.1. CAPÍTULO III

A prevalência da obesidade tem elevado, sendo o exercício aeróbico uma ótima estratégia para a sua prevenção e tratamento. Mulheres pós-menopausa e idosas normalmente participam de programas de exercícios aeróbicos de baixa intensidade como caminhadas, ao qual pouco se sabe dos seus efeitos sobre a composição corporal. O aumento na ingestão de cafeína poderia afetar a composição corporal diretamente e/ou indiretamente afetando a massa magra corporal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da cirurgia de ovariectomia, do exercício aeróbico de baixa intensidade em esteira e da ingestão de cafeína sobre a composição corporal em ratas Wistar.

1.7.1.2. CAPÍTULO IV

Estudos recentes sugerem que o baixo teor de cálcio dietético apresenta efeito lipogênico, elevando o risco de obesidade. Considerando a baixa ingestão de cálcio por mulheres adultas brasileiras, os riscos de obesidade relacionados à deficiência estrogênica

pós-menopausa, poderiam impactar a composição corporal e qualidade de vida. Por outro lado, o consumo de cafeína associado à prática de exercício poderia contrapor ou atenuar os efeitos da baixa ingestão de cálcio e da deficiência estrogênica, reduzindo a deposição de gordura corporal e o risco de obesidade. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da ovariectomia, do exercício aeróbico de baixa intensidade e da ingestão de cafeína sobre a composição corporal em ratas Wistar com 50% da recomendação de cálcio alimentar.

1.7.1.3. CAPÍTULO V

O efeito do exercício sobre o tecido ósseo varia conforme o tipo, intensidade, duração e frequência do exercício. Estudos relatam que ratas treinadas em esteira exibiram aumento na força de fratura óssea quando exercitavam a 24 m/min por 60 min/dia, porém, tais benefícios não foram observados quando treinadas a 13 m/min por 60 min/dia. No entanto, ainda não se conhece o efeito do programa de exercício em baixa intensidade a 16 m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana, sobre o tecido ósseo, como também seus efeitos associados à deficiência de estrogênio e consumo de cafeína. Assim, este estudo investigou o efeito da ovariectomia e ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo em ratas treinadas aerobicamente conforme recomendação da OMS para a melhoria da qualidade de vida.

1.7.1.4. CAPÍTULO VI

O baixo consumo de cálcio aumenta o risco de fragilidade óssea, principalmente quando associadas ao consumo de cafeína e deficiência de estrogênio. O efeito osteogênico do exercício de impacto pode prevenir ou atenuar o risco de fratura óssea. Desta forma, este estudo objetivou avaliar os efeitos da deficiência de estrogênio, ingestão de cafeína e do exercício aeróbico sobre o tecido ósseo em ratas com 50% da recomendação de cálcio dietético.

1.7.1.5. CAPÍTULO VII

A osteoporose pós-menopausa é associada com balanço negativo de cálcio em função de sua ingestão dietética insuficiente e deficiência estrogênica diminuírem a absorção intestinal de cálcio. O baixo consumo de cálcio pode reduzir o seu balanço e, conseqüentemente, prejudicar mais ainda a homeostase óssea. Adicionalmente, o aumento na ingestão de cafeína eleva as perdas de cálcio urinário, podendo afetar negativamente o seu balanço. Em contrapartida, o exercício aeróbico parece ser uma estratégia eficaz para a prevenção e tratamento da osteoporose, porém, existem poucas evidências de seus benefícios sobre o balanço de cálcio. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da ovariectomia, da ingestão de cafeína e do baixo consumo de cálcio sobre o balanço de cálcio em ratas Wistar treinadas aerobicamente em esteira.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acheson, K. J., G. Gremaud, *et al.* Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? American Journal of Clinical Nutrition, v.79, n.1, p.40-6. 2004.

Altimari, L. R., A. C. Moraes, *et al.* Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.42, n.1, p.17-27. 2006.

Arias, M. V. B. e V. L. Szejnfeld. Animal models for osteoporosis. Rev Bras Reumatol, v.37, n.6, p.1-4. 1997.

Ashizawa, N., R. Fujimura, *et al.* A bout of resistance exercise increases urinary calcium independently of osteoclastic activation in men. J Appl Physiol, v.83, n.4, p.1159-63. 1997.

Barengolts, E. I., T. Kouznetsova, *et al.* Effects of progesterone on serum levels of IGF-1 and on femur IGF-1 mRNA in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.11, n.10, p.1406-12. 1996.

Batista, M. C. R., S. E. Priore, *et al.* Avaliação Dietética dos Pacientes Detectados Com Hiperglicemia na “Campanha de Detecção de Casos Suspeitos de Diabetes” no Município de Viçosa, MG. Arq Bras Endocrinol Metab, v.50, n.6, p.1041-9. 2006.

Bell, D. G. e T. M. Mclellan. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. J Appl Physiol, v.93, n.4, Oct, p.1227-34. 2002.

Bircher, S., B. Knechtle, *et al.* Is the intensity of the highest fat oxidation at the lactate concentration of 2 mmol L(-1)? A comparison of two different exercise protocols. Eur J Clin Invest, v.35, n.8, Aug, p.491-8. 2005.

Birnbaum, L. J. e J. D. Herbst. Physiologic effects of caffeine on cross-country runners. J Strength Cond Res, v.18, n.3, Aug, p.463-5. 2004.

Bischoff-Ferrari, H. A., J. R. Rees, *et al.* Effect of calcium supplementation on fracture risk: a double-blind randomized controlled trial. Am J Clin Nutr, v.87, n.6, Jun, p.1945-51. 2008.

Bonnet, N., H. Beaupied, *et al.* Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.22, n.4, Apr, p.578-88. 2007.

Braga, L. C. e M. P. Alves. A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de endurance. . Rev. Bras. Ciên. e Mov., v.8, n.3, p.33-7. 2000.

Bronner, F., B. L. Salle, *et al.* Net calcium absorption in premature infants: results of 103 metabolic balance studies. Am J Clin Nutr, v.56, n.6, Dec, p.1037-44. 1992.

Cano, A., S. Dapia, *et al.* Comparative effects of 17beta-estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. Osteoporos Int, v.19, n.6, Jun, p.793-800. 2008.

Caubet, M. S., B. Comte, *et al.* Determination of urinary ¹³C-caffeine metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 activity. J Pharm Biomed Anal, v.34, n.2, Feb 4, p.379-89. 2004.

Chen, X. e G. M. Whitford. Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. Arch Oral Biol, v.44, n.1, Jan, p.33-9. 1999.

Chubak, J., C. M. Ulrich, *et al.* Effect of exercise on bone mineral density and lean mass in postmenopausal women. Med Sci Sports Exerc, v.38, n.7, Jul, p.1236-44. 2006.

Costa, N. M. B. e M. C. Peluzio. Minerais. In: (Ed.). Nutrição básica e metabolismo. Viçosa: Editora UFV, 2008. Minerais, p.400

D'amelio, P., A. Grimaldi, *et al.* Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. Bone, v.43, n.1, p.92-100. 2008.

Dai, R., Y. Ma, *et al.* Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.4, p.342-9. 2008.

Dew, T. P., A. J. Day, *et al.* Bone mineral density, polyphenols and caffeine: a reassessment. Nutr Res Rev, v.20, n.1, Jun, p.89-105. 2007.

Dick, I. M., A. Devine, *et al.* Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, p.E430-E345. 2005.

Doherty, M., P. Smith, *et al.* Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. J Sports Sci, v.22, n.7, Jul, p.637-43. 2004.

Ferreira, J. C., N. P. Rolim, *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.34, n.8, Aug, p.760-5. 2007.

Feyen, O., U. Gobel, *et al.* Long-term haematopoietic reconstitution and survival without interleukin-7 in a murine syngeneic bone marrow transplantation model. Scand J Immunol, v.64, n.6, Dec, p.601-8. 2006.

Figard, H., F. Mougin, *et al.* Effects of isometric strength training followed by no exercise and Humulus lupulus L-enriched diet on bone metabolism in old female rats. Metabolism, v.56, n.12, Dec, p.1673-81. 2007.

Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.337-50. 2004.

Franco, F. S. C. Efeitos da suplementação de creatina associada ou não à cafeína em ratos submetidos a exercício anaeróbico intermitente. Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2004. 82 p.

Fuchs, R. K., M. Shea, *et al.* Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. Bone, v.41, n.2, Aug, p.290-6. 2007.

Gala, J., M. Diaz-Curiel, *et al.* Short- and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. Br J Nutr, v.86, n.4, Oct, p.521-7. 2001.

Germinario, E., A. Esposito, *et al.* Effects of modulators of sarcoplasmic Ca²⁺ release on the development of skeletal muscle fatigue. J Appl Physiol, v.96, n.2, Feb, p.645-9. 2004.

Gurr, M. Calcium in Nutrition. : International Life Sciences Institute. 1999. 40 p.

Guyton, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.1014 p.

Halldner, L., U. Aden, *et al.* The adenosine A1 receptor contributes to the stimulatory, but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A1 and/or A2A receptors. Neuropharmacology, v.46, n.7, Jun, p.1008-17. 2004.

Han, L. K., F. Kai, *et al.* [Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats]. Yakugaku Zasshi, v.124, n.11, Nov, p.841-6. 2004.

Hankenson, K. D., C. M. Cavaliere, *et al.* Animal models of skeletal disease. In: C. P. Llc (Ed.). Handbook of laboratory animal science: Animal Model. Florida: In: Hau, J., Van Hoosier Jr., G.L., 2003. Animal models of skeletal disease

Hara, K., M. Kobayashi, *et al.* Influence of bone osteocalcin levels on bone loss induced by ovariectomy in rats. J Bone Miner Metab, v.25, n.6, p.345-53. 2007.

Hart, K. J., J. M. Shaw, *et al.* Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. J Appl Physiol, v.91, n.4, Oct, p.1663-8. 2001.

Heaney, R. P. Calcium absorption. J Bone Miner Res, v.4, n.5, Oct, p.795-6. 1989.

Heaney. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. Food Chem Toxicol, v.40, n.9, Sep, p.1263-70. 2002.

Heaney, R. P. e K. Rafferty. Carbonated beverages and urinary calcium excretion. Am J Clin Nutr, v.74, n.3, Sep, p.343-7. 2001.

Heaney, R. P. e R. R. Recker. Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. J Lab Clin Med, v.99, n.1, Jan, p.46-55. 1982.

Hespel, P., B. Op't Eijnde, *et al.* Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxation time in humans. J Appl Physiol, v.92, n.2, Feb, p.513-8. 2002.

Hind, K. e M. Burrows. Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials. Bone, v.40, n.1, Jan, p.14-27. 2007.

Hitz, M. F., P. C. Eskildsen, *et al.* Bioavailability of calcium: comparison of calcium carbonate and milk and the effect of vitamin D, age, and sex using 24-hour urine calcium as a method. Calcif Tissue Int, v.77, n.6, Dec, p.361-6. 2005.

Hogervorst, E., S. Bandelow, *et al.* Caffeine improves physical and cognitive performance during exhaustive exercise. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.10, Oct, p.1841-51. 2008.

Honda, A., N. Sogo, *et al.* High-impact exercise strengthens bone in ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. J Appl Physiol, v.95, n.3, Sep, p.1032-7. 2003.

Hongu, N. e D. S. Sachan. Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. J Nutr, v.130, n.2, p.152-7. 2000.

Huang, T.-H., F.-L. Chang, *et al.* Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. J Bone Miner Metab, v.26, p.350-357. 2008.

Huang, T. H., S. C. Lin, *et al.* Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol, v.95, p.300-307. 2003.

Huang, T. H., R. S. Yang, *et al.* Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. Bone, v.30, n.1, Jan, p.293-9. 2002.

Hubal, M. J., C. P. Ingalls, *et al.* Effects of eccentric exercise training on cortical bone and muscle strength in the estrogen-deficient mouse. J Appl Physiol, v.98, n.5, p.1674-81. 2005.

Iom. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamine D and Fluoride. Washington, D.C.: The National Academic Press. 1998. 489 p. (Dietary References Intakes)

Irving, B. A., C. K. Davis, *et al.* Effect of Exercise Training Intensity on Abdominal Visceral Fat and Body Composition. Med Sci Sports Exerc, Oct 8. 2008.

Iwamoto, J., C. Shimamura, *et al.* Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. J Bone Miner Metab, v.22, n.1, p.26-31. 2004.

Iwamoto, J., T. Takeda, *et al.* Effect of exercise on tibial and lumbar vertebral bone mass in mature osteopenic rats: bone histomorphometry study. J Orthop Sci, v.3, n.5, p.257-63. 1998.

James, R. S., R. S. Wilson, *et al.* Effects of caffeine on mouse skeletal muscle power output during recovery from fatigue. J Appl Physiol, v.96, n.2, Feb, p.545-52. 2004.

Jansson, J. O., S. Moverare-Skrtic, *et al.* Leukemia inhibitory factor reduces body fat mass in ovariectomized mice. Eur J Endocrinol, v.154, n.2, Feb, p.349-54. 2006.

Jasminka, Z. I. e J. E. Kerstetter. Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium. Journal of the American College of Nutrition, v.19, n.6, p.715-737. 2000.

Jerome, C. P. e P. E. Peterson. Nonhuman primate models in skeletal research. Bone, v.29, n.1, Jul, p.1-6. 2001.

Johnell, O. e J. A. Kanis. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int, v.17, n.12, Dec, p.1726-33. 2006.

Kalmar, J. M. e E. Cafarelli. Central fatigue and transcranial magnetic stimulation: effect of caffeine and the confound of peripheral transmission failure. J Neurosci Methods, v.138, n.1-2, Sep 30, p.15-26. 2004.

Kanis, J. A., N. Burlet, *et al.* European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int, v.19, n.4, Apr, p.399-428. 2008.

Kelley, G. A. e K. S. Kelley. Exercise and bone mineral density at the femoral neck in postmenopausal women: a meta-analysis of controlled clinical trials with individual patient data. Am J Obstet Gynecol, v.194, n.3, Mar, p.760-7. 2006.

Kierszenbaum, A. L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. Elsevier: Rio de Janeiro: Elsevier. 2004

Kobayashi-Hattori, K., A. Mogi, *et al.* Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet. Biosci Biotechnol Biochem, v.69, n.11, Nov, p.2219-23. 2005.

Kobayashi, M., K. Hara, *et al.* Effects of vitamin K2 (menatetrenone) on calcium balance in ovariectomized rats. Jpn J Pharmacol, v.88, n.1, Jan, p.55-61. 2002.

Lambert, H. L., R. Eastell, *et al.* Calcium supplementation and bone mineral accretion in adolescent girls: an 18-mo randomized controlled trial with 2-y follow-up. Am J Clin Nutr, v.87, n.2, Feb, p.455-62. 2008.

Leblanc, A. D., H. J. Evans, *et al.* Changes in total body calcium balance with exercise in the rat. J Appl Physiol, v.55, n.1 Pt 1, Jul, p.201-4. 1983.

Lemieux, C., F. Picard, *et al.* The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. Obes Res, v.11, n.3, Mar, p.477-90. 2003.

Li, C. Y., W. S. Jee, *et al.* Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. Calcif Tissue Int, v.72, n.1, Jan, p.42-9. 2003.

Lloyd, T., N. Johnson-Rollings, *et al.* Bone status among postmenopausal women with different habitual caffeine intakes: a longitudinal investigation. J Am Coll Nutr, v.19, n.2, Apr, p.256-61. 2000.

Lohman, T. G., K. Ring, *et al.* Relationships among fitness, body composition, and physical activity. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1163-70. 2008.

Lutz, J., F. Chen, *et al.* Hypokinesia-induced negative net calcium balance reversed by weight-bearing exercise. Aviat Space Environ Med, v.58, n.4, Apr, p.308-14. 1987.

Mackey, M. S., M. L. Stevens, *et al.* The ferret as a small animal model with BMU-based remodeling for skeletal research. Bone, v.17, n.4 Suppl, Oct, p.191S-196S. 1995.

Maimoun, L., D. Simar, *et al.* Response of bone metabolism related hormones to a single session of strenuous exercise in active elderly subjects. Br J Sports Med, v.39, n.8, Aug, p.497-502. 2005.

Martini, L. e R. J. Wood. Relative bioavailability of calcium-rich dietary sources in the elderly. Am J Clin Nutr, v.76, n.6, Dec, p.1345-50. 2002.

Massey, L. K. e R. A. Sutton. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. J Urol, v.172, n.2, Aug, p.555-8. 2004.

McLellan, T. M. e D. G. Bell. The impact of prior coffee consumption on the subsequent ergogenic effect of anhydrous caffeine. Int J Sport Nutr Exerc Metab, v.14, 6, p698-708. 2004.

Mcmanus, J. F., R. A. Davey, *et al.* Intermittent Fugu parathyroid hormone 1 (1-34) is an anabolic bone agent in young male rats and osteopenic ovariectomized rats. Bone, v.42, n.6, Jun, p.1164-74. 2008.

Mitamura, R., H. Hara, *et al.* Supplemental feeding of difructose anhydride III restores calcium absorption impaired by ovariectomy in rats. J Nutr, v.132, n.11, p.3387-93. 2002.

Montilla, R. N. G., J. M. A. Aldrghi, *et al.* Relação cálcio/proteína da dieta de mulheres no climatério. Rev Assoc Med Bras, v.50, n.1, p.52-4. 2004.

Nelson, D. B., M. D. Sammel, *et al.* Effect of Physical Activity on Menopausal Symptoms among Urban Women. Med. Sci. Sports Exerc., v.40, n.1, p.50-58. 2008.

Nomura, T., T. Shibahara, *et al.* Establishment of a murine model of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol, v.43, n.3, Mar, p.257-62. 2007.

Nordstrom, A., M. Hogstrom, *et al.* Effects of different types of weight-bearing loading on bone mass and size in young males: a longitudinal study. Bone, v.42, n.3, p.565-71. 2008.

Notomi, T., N. Okimoto, *et al.* Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. J Bone Miner Res, v.18, n.1, Jan, p.140-9. 2003.

Paluska, S. A. Caffeine and exercise. Curr Sports Med Rep, v.2, n.4, Aug, p.213-9. 2003.

Park, H., K. J. Kim, *et al.* Effect of combined exercise training on bone, body balance, and gait ability: a randomized controlled study in community-dwelling elderly women. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.254-9. 2008.

Park, J. H., N. Omi, *et al.* Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.218-25. 2008.

Rapuri, P. B., J. C. Gallagher, *et al.* Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. Am J Clin Nutr, v.74, n.5, Nov, p.694-700. 2001.

Rapuri, P. B., H. K. Kinyamu, *et al.* Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women. J Clin Endocrinol Metab, v.87 5, p.2024-32. 2002.

Renno, A. C., A. R. Silveira Gomes, *et al.* Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. Exp Gerontol, v.42, n.6, Jun, p.517-22. 2007.

Rico, H., M. L. Canal, *et al.* Effects of caffeine, vitamin D, and other nutrients on quantitative phalangeal bone ultrasound in postmenopausal women. Nutrition, v.18, n.2, p.189-93. 2002.

Rittweger, J., H. M. Frost, *et al.* Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. Bone, v.36, n.6, Jun, p.1019-29. 2005.

Rodriguez, N. R., N. M. Dimarco, *et al.* Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. J Am Diet Assoc, v.109, n.3, Mar, p.509-27. 2009.

Ruxton, C. H. S. The impact of caffeine on mood, cognitive function, performance and hydration: a review of benefits and risks. Nutrition Bulletin, v.33, p.15-25. 2008.

Scariano, J. K., P. J. Garry, *et al.* Serum leptin levels, bone mineral density and osteoblast alkaline phosphatase activity in elderly men and women. Mech Ageing Dev, v.124, n.3, Mar, p.281-6. 2003.

Shackelford, L. C., A. D. Leblanc, *et al.* Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. J Appl Physiol, v.97, n.1, Jul, p.119-29. 2004.

Shi, H., D. Dirienzo, *et al.* Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. Faseb J, v.15, n.2, Feb, p.291-3. 2001.

Shinoda, M., M. G. Latour, *et al.* Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. International Journal of Obesity, v.26, p.335-343. 2002.

Stear, S. J., A. Prentice, *et al.* Effect of a calcium and exercise intervention on the bone mineral status of 16-18-y-old adolescent girls. Am J Clin Nutr, v.77, n.4, Apr, p.985-92. 2003.

Swaminathan, R. Biochemical markers of bone turnover. Clin Chim Acta, v.313, n.1-2, Nov, p.95-105. 2001.

Tosteson, A. N., L. J. Melton, 3rd, *et al.* Cost-effective osteoporosis treatment thresholds: the United States perspective. Osteoporos Int, v.19, n.4, Apr, p.437-47. 2008.

Tosun, A., N. Bolukbasi, *et al.* Acute effects of a single session of aerobic exercise with or without weight-lifting on bone turnover in healthy young women. Mod Rheumatol, v.16, n.5, p.300-4. 2006.

Tsuang, Y. H., J. S. Sun, *et al.* Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on formation of osteoporosis. J Orthop Surg Res, v.1.7. 2006.

Turner, C. H. e A. G. Robling. Exercises for improving bone strength. Br J Sports Med, v.39, n.4, Apr, p.188-9. 2005.

Turner, R. T., A. Maran, *et al.* Animal models for osteoporosis. Rev Endocr Metab Disord, v.2, n.1, Jan, p.117-27. 2001.

Velásquez-Meléndez, G., I. S. Martins, *et al.* Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública, v.31, n.2, p.157-162. 1997.

Wang, S., S. K. Noh, *et al.* Epigallocatechin gallate and caffeine differentially inhibit the intestinal absorption of cholesterol and fat in ovariectomized rats. J Nutr, v.136, n.11, Nov, p.2791-6. 2006.

Watts, N. B., D. K. Jenkins, *et al.* Comparison of bone and total alkaline phosphatase and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women treated with alendronate. Osteoporos Int, v.12, n.4, p.279-88. 2001.

Welch, J. M., C. H. Turner, *et al.* High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. Bone, v.42, n.4, p.660-8. 2008.

Wetmore, C. M., L. Ichikawa, *et al.* Association between caffeine intake and bone mass among young women: potential effect modification by depot medroxyprogesterone acetate use. Osteoporos Int, v.19, n.4, Apr, p.519-27. 2008.

Yeh, J. K. e J. F. Aloia. Effect of physical activity on calciotropic hormones and calcium balance in rats. Am J Physiol, v.258, n.2 Pt 1, Feb, p.E263-8. 1990.

Zemel, M. B., W. Thompson, *et al.* Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. Obes Res, v.12, n.4, Apr, p.582-90. 2004.

Zhang, Y., X.-L. Dong, *et al.* Fructus ligustri lucidi extract improves calcium balance and modulates the calciotropic hormone level and vitamin D-dependent gene expression in aged ovariectomized rats. Menopause, v.5, n.3, p.1-8. 2008.

CAPÍTULO II:

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais Experimentais

O estudo foi realizado com 160 ratas Wistar adultas de 160 dias de idade (peso médio: $275,5 \pm 22,8$ g; média \pm DP), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – MG (Brasil), tendo os procedimentos experimentais aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG, parecer nº 80/2007.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, por 11 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60% e fotoperíodo de 12 horas. Os animais receberam diariamente de 18 a 20 gramas de dieta AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) e água deionizada *ad libitum*.

Após 3 semanas de recuperação das cirurgias de ovariectomia (OVX) ou laparotomia (SHAM), as ratas foram alocadas em 16 grupos (n=10), num delineamento fatorial $2 \times 2 \times 2 \times 2$ para os fatores Exercício, Ovário, Cafeína e Cálcio (Quadro 2.1), permanecendo por mais 8 semanas nos respectivos tratamentos.

Para maior facilidade de análise e discussão dos resultados, os tratamentos foram apresentados, na tese, em dois sub-grupos, quais sejam, dos animais com 100% e dos animais com 50% de adequação de cálcio na dieta. Assim, nos capítulos que se seguem, foram incluídos separadamente os grupos acima, contendo 80 animais, separados em 8 tratamentos (n=10), num delineamento fatorial $2 \times 2 \times 2$.

Quadro 2.1. Delineamento experimental

Grupo	Denominação	Exercício	Ovário	Cafeína	Cálcio
1	SS-Ca ¹⁰⁰	(-)	(+)	(-)	100%
2	SO-Ca ¹⁰⁰	(-)	(-)	(-)	100%
3	SS-Ca ⁵⁰	(-)	(+)	(-)	50%
4	SO-Ca ⁵⁰	(-)	(-)	(-)	50%
5	SS-Ca ¹⁰⁰ Caf	(-)	(+)	(+)	100%
6	SO-Ca ¹⁰⁰ Caf	(-)	(-)	(+)	100%
7	SS-Ca ⁵⁰ Caf	(-)	(+)	(+)	50%
8	SO-Ca ⁵⁰ Caf	(-)	(-)	(+)	50%
9	ES-Ca ¹⁰⁰	(+)	(+)	(-)	100%
10	EO-Ca ¹⁰⁰	(+)	(-)	(-)	100%
11	ES-Ca ⁵⁰	(+)	(+)	(-)	50%
12	EO-Ca ⁵⁰	(+)	(-)	(-)	50%
13	ES-Ca ¹⁰⁰ Caf	(+)	(+)	(+)	100%
14	EO-Ca ¹⁰⁰ Caf	(+)	(-)	(+)	100%
15	ES-Ca ⁵⁰ Caf	(+)	(+)	(+)	50%
16	EO-Ca ⁵⁰ Caf	(+)	(-)	(+)	50%

Legenda por Fatores: Exercício [E(+): exercitadas ou S(-): sedentárias]; Ovário [O(-): ovariectomizadas ou S(+): SHAM]; Cafeína [Caf(+): ingestão de cafeína ou (sem o Caf(-)): sem ingestão de cafeína]; Cálcio (Ca⁵⁰: adequação de 50% ou Ca¹⁰⁰: adequação de 100%).

Legenda por Grupo: **Grupo 1:** ratas sedentárias, laparotomia (SHAM), sem ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; **Grupo 2:** ratas sedentárias, ovariectomizadas (OVX), sem ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; **Grupo 3:** ratas sedentárias,

SHAM, sem ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio; Grupo 4: ratas sedentárias, OVX, sem ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio; Grupo 5: ratas sedentárias, SHAM, ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; Grupo 6: ratas sedentárias, OVX, ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; Grupo 7: ratas sedentárias, SHAM, ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio; Grupo 8: ratas sedentárias, OVX, ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio; Grupo 9: ratas exercitadas, SHAM, sem ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; Grupo 10: ratas exercitadas, OVX, sem ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; Grupo 11: ratas exercitadas, SHAM, sem ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio; Grupo 12: ratas exercitadas, OVX, sem ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio; Grupo 13: ratas exercitadas, SHAM, ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; Grupo 14: ratas exercitadas, OVX, ingestão de cafeína e adequação de 100% de cálcio; Grupo 15: ratas exercitadas, SHAM, ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio; Grupo 16: ratas exercitadas, OVX, ingestão de cafeína e adequação de 50% de cálcio.

2.2. Cirurgia de Ovariectomia ou Laparotomia

Os animais dos grupos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 eram ratas inteiras, que sofreram a cirurgia de laparotomia (SHAM), ou seja, promoveu-se a incisão do abdome para induzir o estresse cirúrgico e seus efeitos, porém, sem a retirada dos ovários. Os animais dos grupos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 sofreram a cirurgia de ovariectomia (OVX), com incisão abdominal para retirada dos ovários. Antes das respectivas cirurgias, cada rata recebeu anestesia com Ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) intramuscular. Nas primeiras 5 horas após as cirurgias, os animais permaneceram em câmara aquecida, a fim de manter a temperatura corporal. Após este período pós-operatório, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais até sua pronta recuperação, recebendo, nesse período, dieta comercial peletizada e água

deionizada *ad libitum*, como também anti-inflamatório (Ketofen: 2 mg/kg) por 3 dias e antibiótico (Ampicilina sódica: 30 mg/kg) por 5 dias, ambos subcutâneos. Todos os procedimentos cirúrgicos do estudo foram desenvolvidos no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da UFV, acompanhados pela Médica Veterinária Paloma Sayegh Arreguy Silva (CRMV-MG: 7593).

2.3. Ingestão de Cálcio Alimentar

Diariamente, os animais dos grupos 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 e 14 receberam dieta AIN-93M em pó (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) contendo 100% da recomendação de cálcio para ratos (0,5% de cálcio da dieta). Os animais dos grupos 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 e 16 receberam dieta AIN-93M em pó (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) contendo 50% da recomendação de cálcio para ratos (0,25% de cálcio da dieta).

Os ingredientes da dieta AIN-93M estão discriminados no Quadro 2.2.

A dieta Cálcio 100% possuía 3,5% da mistura de minerais (Quadro 2.2) contendo 14,29% de cálcio, apresentando, então, uma concentração de cálcio de 0,5%, ou seja, 5,0 g de cálcio por 1 kg de dieta. A dieta Cálcio 50%, que tinha uma mistura de minerais com 7,145% de cálcio, exibiu uma concentração de cálcio de 0,25%, ou seja, 2,5 g de cálcio por 1 kg de dieta.

A diferença das dietas em relação aos conteúdos de cálcio foi determinada pela quantidade de carbonato de cálcio presente na mistura de minerais, que era a fonte de cálcio desta dieta (Quadro 2.3). Na dieta Cálcio 100% adicionou-se uma mistura de minerais contendo 357 g de carbonato de cálcio por quilograma de mistura de minerais, sendo que o carbonato de cálcio apresentava 40,04 % de cálcio. Já na dieta Cálcio 50%, a mistura de minerais recebeu 178,5 g de carbonato de cálcio por quilograma de mistura mais o mesmo valor de sacarose para completar o volume de 1 kg de mistura de minerais. Desta forma, as

misturas de minerais das dietas Cálcio 100% e Cálcio 50% possuíam uma concentração de cálcio de 14,29 e 7,145%, respectivamente.

Quadro 2.2. Dieta AIN-93M

INGREDIENTES	%
Caseína (85 % de proteína)	14,00
Amido Dextrinizado (92 % tetrossacarídeos)	15,50
Sacarose	10,00
Óleo de Soja	4,00
Fibra (Celulose microfina)	5,00
Mistura de Minerais	3,50
Mistura de Vitaminas	1,00
L-Cistina	0,18
Bitartarato de Colina	0,25
Amido de Milho	46,57
TOTAL	100,00

Quadro 2.3. Composição da Mistura de Minerais

INGREDIENTES	g/kg mistura
Carbonato de Cálcio Anidro (40,04 % Ca)	357,00
Fosfato de Potássio Monobásico (22,76 % P; 23,73 % K)	196,00
Citrato de Potássio, tripotássio, monohidrato (36,16 % K)	70,78
Cloreto de Sódio (39,34 % Na; 60,66 % Cl)	74,00
Sulfato de Potássio (44,67 % K; 18,39 % S)	46,60
Óxido de Magnésio (60,32 % Mg)	24,00
Citrato de Ferro (16,5 % Fe)	6,06
Carbonato de Zinco (52,14 % Zn)	1,65
Carbonato de Manganês (47,79 % Mn)	0,63
Carbonato de Cobre (57,47 % Cu)	0,30
Iodato de Potássio (59,3 % I)	0,01
Selenato de Sódio Anidro (41,79 % Se)	0,01025
Paramolibdato de Amônia 4 Hidrato (54,34 % Mo)	0,00795
Meta Silicato de Sódio 9 Hidrato (9,88 % Si)	1,45
Sulfato de Cromo e Potássio 12 Hidrato (10,42 % Cr)	0,275
Cloreto de Lítio (16,38 % Li)	0,0174
Ácido Bórico (17,5 % B)	0,0815
Fluoreto de Sódio (17,5 % F)	0,0635
Carbonato de Níquel (45 % Ni)	0,0318
Vanadato de Amônia (43,55 % V)	0,0066
Sacarose	221,03
TOTAL	1000,00

2.4. Administração de Cafeína

Diariamente, os animais dos grupos 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15 e 16 receberam suplementação de 6 mg de cafeína em pó/kg de peso corporal, adicionada à dieta dos animais. Os animais dos grupos 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 e 12 receberam apenas a dieta. As doses de suplementação de cafeína (Chemistry[®] – China) foram identificadas em estudos recentes como doses moderadas utilizadas em humanos e animais (Doherty, Smith *et al.*, 2004; Hartley, Lovallo *et al.*, 2004; O'connor, Motl *et al.*, 2004; Hadjicharalambous, Georgiades *et al.*, 2006; Chapman e Stager, 2008; Glaister, Howatson *et al.*, 2008).

2.5. Protocolo de Exercício

Os animais dos grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 eram animais sedentários, e foram mantidos em suas respectivas gaiolas durante todo o período de experimento.

Após um período de 2 semanas de recuperação da cirurgia, 80 animais foram submetidos a um processo de adaptação ao exercício de corrida em esteira (8 m/min, 10 min/dia por 5 dias). Em seguida, estes animais foram subdivididos em 8 grupos (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16) e foram submetidos a um programa progressivo de exercício aeróbico de corrida em esteira (Insight – Brasil), 5 sessões por semana, por um período de 8 semanas, conforme adaptação de Iwamoto *et al.* (Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004).

No 1º dia da 1ª semana, os animais correram numa velocidade de 10 m/min por 10 minutos. Este tempo foi aumentando de 5 em 5 minutos diariamente até o 5º dia de exercício da semana, onde estes animais exercitaram por 30 minutos. No 1º dia da 2ª semana, os animais correram numa velocidade de 10 m/min por 30 minutos. Esta velocidade foi aumentada de 2 em 2 m/min, diariamente, até chegar a 16 m/min, velocidade mantida durante as demais semanas de experimento.

2.6. Determinação do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA)

O peso corporal foi monitorado semanalmente sempre no mesmo horário do dia (9 horas), usando balança eletrônica digital (Marte - Brasil), onde o ganho de peso corporal foi determinado pela diferença entre os pesos no dia do sacrifício e o do 1º dia da 1ª semana.

O consumo de dieta alimentar foi monitorado diariamente, para a determinação do coeficiente de eficiência alimentar por porcentagem. Diariamente, foram fornecidas de 18 a 20 g de dieta em pó nos comedouros dos animais, e ao final de cada semana, as sobras de dietas nos comedouros, quando presentes, eram pesadas.

As análises de consumo de dieta e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) por porcentagem foram realizados em 5 animais por grupo.

$$\text{CEA}\% = (\text{ganho de peso corporal} / \text{consumo de dieta}) \times 100$$

2.7. Determinação da Composição Corporal

Ao final da 8ª semana, os animais sofreram eutanásia com CO₂, e toda a gordura visceral foi retirada e pesada. A carcaça vazia (músculos e ossos) foi separada e armazenada em freezer (-20°C) para a determinação das frações: água, gordura, proteínas e cinzas.

O percentual hídrico foi avaliado pelo método gravimétrico por evaporação de água em estufa (Fanem – Brasil) a 105°C por 24 horas. Pratos de alumínio foram secos em estufa à 105°C por 1 hora. Após este tempo, foram pesados e as carcaças dos animais colocadas dentro dos mesmos para serem novamente pesados. A diferença encontrada corresponde ao peso úmido do animal. Os pratos com as carcaças foram mantidos em estufa à 105°C por 24 horas para que se evaporasse todo o conteúdo de água presente. Após este período, os pratos com os animais foram resfriados em dessecadores por 30 minutos até atingir temperatura ambiente, e então, pesados novamente. Deste peso, descontou-se o peso do prato para se obter o peso do

rato desidratado, que, por sua vez, quando subtraído do peso dos animais úmido, determinava-se o conteúdo de água dos animais.

A percentagem de gordura foi determinada pelo processo gravimétrico utilizando-se o aparelho de Soxhlet, usando solvente éter etílico por 8 horas de extração. Cartuchos de papel de filtro foram confeccionados, secados em estufa à 105°C por 1 hora e pesados antes de receberem as carcaças dos ratos desidratados. O animal desidratado foi macerado com um pistilo de louça e colocado dentro dos cartuchos, sendo novamente pesados. Este peso foi subtraído pelo peso do cartucho vazio para determinar o peso dos ratos com gordura. O cartucho com o animal foi colocado no aparelho Soxhlet montado com extratores grandes e balões de 500 mL, onde foi colocado éter etílico até transbordar o sistema de refluxo. Em seguida, foi adicionado mais éter, porém, desta vez não deixando transbordar o sistema de refluxo. O aparelho foi então ligado, fazendo com que o éter evaporasse pelo sistema e transbordasse no sistema de refluxo, ao qual carregava a gordura extraída para o balão. Este processo foi realizado por 8 horas de fluxo contínuo ou intermitente quando necessário. Após este tempo, o cartucho foi escorrido e o excesso de éter foi evaporado até estabilizar o peso do mesmo. O cartucho, então, foi pesado, e desse peso foi subtraído o peso do cartucho vazio para determinar o peso do rato desengordurado. Este peso foi subtraído do peso do rato com gordura para o cálculo do conteúdo de gordura da carcaça dos animais.

O rato desengordurado presente no cartucho foi utilizado para a análise do percentual de proteína, que foi calculado em triplicata pelo método indireto de determinação do nitrogênio ($\text{Proteína (g)} = \text{nitrogênio (g)} \times 6,25$) pela metodologia de Kjeldahl (Aoac, 1998). O conteúdo do cartucho (rato desengordurado) foi triturado em um mix liquidificador até se transformar em pó. Deste, pesou-se uma alíquota de aproximadamente 20 mg colocando em papel manteiga para ser digerida num processo que continha 1 g de mistura digestora e 3 mL de ácido sulfúrico. A digestão foi realizada por um programa progressivo de temperatura que

se chegava a 420°C por 2 horas. Após a amostra ser digerida e esfriada em temperatura ambiente, destilou-se a amostra utilizando hidróxido de sódio (50%) no destilador de Kjeldahl por 8 minutos cada amostra, ao qual se coletou o destilado em ácido bórico (4%). O produto da destilação retido no ácido bórico, então, foi titulado com ácido clorídrico (0,05 N), sendo registrado o volume gasto para a viragem de cor. O peso da amostra, o volume de HCl da titulação e o fator do HCl foram usados para determinar a quantidade de nitrogênio presente na amostra, e subseqüentemente, a percentagem de proteína.

O percentual de cinzas foi determinado por incineração à 600°C por 6 horas (Aoac, 1998). Inicialmente, os cadinhos foram aquecidos a 600°C por 1 hora, e posteriormente resfriados em dessecador e pesados em balança de precisão. Em seguida, foram pesados nos cadinhos 2,5 g do rato desengordurado e triturado para posterior incineração em mufla a 300°C por 1 hora até a carbonização da amostra. Em seguida, a temperatura foi elevada para 600°C por mais 5 horas. Após o término do tempo de incineração, reduziu-se a temperatura para 150°C até que os cadinhos atingissem esta temperatura para, então, serem retirados e transferidos para o dessecador. Os cadinhos foram re-pesados e, a diferença do peso do cadinho com a amostra incinerada subtraída do peso do cadinho tarado (vazio) correspondeu ao peso das cinzas daquela amostra.

2.8. Avaliação do Desempenho: Concentração de lactato sangüínea

Na última semana de experimento determinou-se a concentração do lactato sangüínea dos animais exercitados (grupos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16) durante a realização de uma sessão de treino. As medidas foram realizadas em 3 momentos: repouso e após 15 e 30 minutos de corrida. Antes de iniciar o programa de exercício, a extremidade da cauda sofreu pequena incisão com tesoura cirúrgica e o sangue foi coletado para que a concentração de lactato sangüíneo fosse analisada no equipamento Accusport BM-Lactate [Roche® -

Alemanha] por meio de fitas para determinação de lactato sangüíneo da mesma marca. O volume de sangue coletado foi o suficiente para se cobrir a área de leitura da fita de análise, o que correspondeu a uma ou duas gotas de sangue. Aos 15 minutos, o animal foi retirado da esteira para coleta do sangue, e, em seguida, o animal foi reconduzido ao exercício. Este processo não ultrapassou 15 segundos. Ao final do exercício (30 minutos), o animal foi submetido à nova coleta de sangue, e em seguida, levado para sua gaiola.

As análises das concentrações de lactato sangüíneo foram realizadas em 5 animais de cada grupo.

2.9. Avaliação da Resistência Óssea

Após a eutanásia com CO₂, o fêmur direito foi retirado com tesoura cirúrgica e imediatamente dissecado removendo todos os tecidos moles, sendo em seguida seco com papel toalha. Os fêmures foram colocados em potes plásticos e armazenados em refrigerador a aproximadamente 4°C para análises futuras.

O comprimento do fêmur, distância da borda superior da cabeça até a borda inferior do côndilo medial, e a espessura, no ponto intermédio da medida do comprimento, foram aferidos utilizando-se um paquímetro de aço inox (Stainless Hardened - China). O peso ósseo foi aferido em balança de precisão em miligrama (Marte - Brasil). O comprimento relativo, espessura relativa e peso relativo foram calculados em relação ao peso corporal total do momento do sacrifício.

Para a análise da resistência à fratura óssea utilizou-se o teste de fratura por três-pontos no aparelho texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc.-USA), conectado a um computador equipado com o programa *Texture Expert*[®] empregando um “probe” de 3 pontas (Figura 3.1). Cada extremidade óssea foi apoiada sobre hastes inoxidáveis separadas por 2,0 cm de distância e uma terceira haste, apoiada sobre o ponto

intermédio ósseo, realizou uma força necessária para alcançar a fratura (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Shiga, Hara *et al.*, 2003; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007). A terceira haste imprimiu sobre o osso uma força de 5 Newton a uma velocidade de 3 mm/s durante 15 segundos. O aparelho registrou o pico de força necessária para que o osso fraturasse, e desta foi calculada a força relativa de resistência ao peso absoluto do fêmur.



Figura 2.1. Aparelho texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc.- USA).

2.10. Determinação do Conteúdo Mineral Ósseo

Após a eutanásia, a tíbia direita foi removida com tesoura cirúrgica, dissecada removendo todos os tecidos moles, pesada e armazenada em refrigerador a aproximadamente 4°C para futuras análises.

A tíbia foi digerida em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluída em água deionizada para posterior determinação de cálcio, magnésio e zinco por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA)

(Silva, 1990; Huang, Yang *et al.*, 2002). As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada pela Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 1998).

Todas as vidrarias empregadas nestas análises foram desmineralizadas num processo de 4 etapas: lavagem em água corrente e detergente neutro, imersão por 24 horas em água com detergente seguida de enxágüe com água deionizada, imersão em solução de ácido nítrico 10% por 24 horas, seguido de enxágüe com água deionizada, e secagem da vidraria em estufa. Todas as etapas de enxágües foram realizadas em série de 3 repetições.

A tibia de cada animal foi colocada por inteiro em tubos de ensaio individuais específicos para a digestão de minerais. Em seguida, os tubos foram adicionados de 10 mL de ácido nítrico concentrado e mantidos em capela de exaustão de gases por aproximadamente 6 horas até que a tibia estivesse totalmente dissolvida, ou seja, sem identificar fragmentos ósseos. Os tubos de ensaios foram então aquecidos por 16 horas no digestor a uma temperatura inicial de 80°C. A cada 20 minutos a temperatura foi elevada progressivamente em 20°C até alcançar 160°C. Após as primeiras 8 horas de digestão, foram adicionados outros 5 mL de ácido nítrico, evitando que a solução secasse. Ao final da digestão, o produto da digestão foi resfriado na estufa para dar continuidade à análise.

O conteúdo do tubo, uma vez resfriado, foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL com tampa, e completado o volume com água deionizada. Deste balão volumétrico retirou-se uma alíquota para a leitura dos minerais. Para as leituras de cálcio e magnésio, pipetou-se num tubo de ensaio de 10 mL, 100 µL da amostra digerida, 0,5 mL de cloreto de estrôncio a 4,9% e 5 mL de água deionizada. Para a leitura de zinco, pipetou-se 500 µL da amostra digerida e 5 mL de água deionizada. Estas análises foram realizadas em duplicata.

2.11. Determinação do Cálcio Urinário

A urina dos animais foi coletada por 1 dia na 8ª semana experimental num período de 24 horas utilizando-se gaiolas metabólicas individuais. Recipientes plásticos foram colocados embaixo dos funis das gaiolas metabólicas para recolher a urina.

Ao final das 24 horas de coleta da urina, os animais foram retirados da gaiola metabólica, retornando às suas gaiolas individuais de origem. Animais de experimentação, normalmente ao serem manipulados ficam estressados e muitas vezes defecam e urinam. Assim, antes de retirar os animais das gaiolas, estes foram manipulados dentro de suas gaiolas metabólicas, para defecar e urinar, e não se perdesse parte da amostra. A gaiola metabólica de onde foi retirado o animal foi borrifada com água deionizada para retirar a possível urina retida nas paredes da mesma. O volume de urina coletado foi completado para 10 mL com água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2.865 gravidades (Excelsa-Fanem-Brasil). Após a centrifugação, foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20 µL/mL de urina) para a conservação da amostra, e esta armazenada em freezer a aproximadamente -20°C para análises futuras.

Após descongelar a amostra de urina a temperatura ambiente, uma alíquota do sobrenadante da urina centrifugada (3 mL) foi digerida em ácido nítrico concentrado (10 mL) por 16 horas, conforme descrito acima no item 2.10. O produto da digestão foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL com tampa contendo 0,5 mL de cloreto de estrôncio, completado o volume com água deionizada, e levado para a determinação de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA) (Silva, 1990; Aoac, 1998; Huang, Yang *et al.*, 2002).

Todas as vidrarias utilizadas para as análises do cálcio urinário foram desmineralizadas conforme processo descrito acima (item 2.10).

Outra alíquota do sobrenadante da urina centrifugada (50 µL) foi pipetada numa cubeta e diluída por 500 µL de água deionizada para a determinação da creatinina urinária através do método automatizado de espectrometria de UV/VIS, segundo Henry et al. (Henry, Cannon *et al.*, 1974). As análises foram realizadas utilizando kits da marca Bioclin[®] no equipamento ALIZÉ[®] (Biomérieux-França).

2.12. Determinação de Marcadores Bioquímicos Ósseos

Após a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, com auxílio de seringas descartáveis, transferidas para tubos de ensaios de 10 mL e centrifugadas a 2.865 gravidades por 15 minutos (Excelsa-Fanem-Brasil). Deste centrifugado retirou-se o soro em 3 alíquotas de 1,5 mL, que foram armazenados em fracos eppendorf e armazenados em freezer a aproximadamente -20°C para futuras análises.

Uma das alíquotas do soro foi descongelada em temperatura ambiente e pipetada em cubetas para a determinação do conteúdo de fosfatase alcalina óssea (Ostase[®], Beckman Coulter – USA) por meio de sistema imunoensaio (Access[®], USA), pela técnica de quimioluminescência indireta, a partir da curva padrão de 6 pontos. Os resultados da fosfatase alcalina óssea foram obtidos em picograma / mililitro (pg/mL).

Uma alíquota do sobrenadante da urina centrifugada de 24 horas, coletada e armazenada à -80°C, foi utilizada para a determinação do teor do teleopeptídeo N-terminal do colágeno tipo I (NTx) por meio de teste ELISA usando kit Osteomark[®] (EIA, USA). Os valores do NTx foram apresentados como nanomol de equivalente de colágeno ósseo / milimol de creatinina (nM BCE/ mM Creatinina). O conteúdo de creatinina urinária para este cálculo foi determinado conforme referido acima (item 2.11.).

2.13. Determinação do Balanço de Cálcio

Na 8ª semana de experimento, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para quantificar a ingestão da dieta e coletar fezes e urina, a fim de se determinar o balanço ($\text{Balanço} = \text{Ca Ingerido} - \text{Ca Fecal} - \text{Ca Urinário}$) e as percentagens de retenção ($\% \text{ Retenção} = \text{Balanço} / \text{Ca Ingerido}$) e de absorção ($\% \text{ Absorção} = (\text{Ca Ingerido} - \text{Ca Fecal}) / \text{Ca Ingerido}$) de cálcio.

A quantidade de dieta foi controlada diariamente por quatro dias. Nesse período, foram fornecidos 18 g de dieta por dia e ao final de 24 horas, as sobras foram pesadas nos comedouros. Calculou-se a média diária de dieta consumida pelos animais para ser utilizada no cálculo do balanço de cálcio. Uma dieta adicionada de carmim (200 mg/ 100 g de dieta) foi fornecida com o objetivo de marcar as fezes com coloração de azul escuro, facilitando identificar as fezes provenientes da dieta do dia de análise. No primeiro dia de experimento foi colocada dieta marcada com carmim. Nos dois dias seguintes foram oferecidas as dietas sem marcação e, no quarto dia retornou-se com a dieta marcada com carmim no (Quadro 2.4).

O conteúdo de cálcio ingerido foi determinado pela média da quantidade de dieta consumida pelos animais no período de avaliação, multiplicado pelo teor de cálcio de cada dieta (0,5% para dieta com 100% de cálcio e 0,25% para 50% de cálcio).

As fezes foram coletadas em quatro dias. No segundo dia coletaram-se as fezes marcadas com carmim, nos dois dias seguintes coletaram-se todas as fezes, e no quinto dia coletaram-se apenas as fezes não marcadas com carmim (Quadro 2.4). O conteúdo total de fezes foi quantificado e dividido por quatro para se obter a média diária. Estas fezes foram trituradas para se analisar o conteúdo de cálcio da mesma.

O volume de urina de 24 horas coletado foi completado para 10 mL com água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2.865 gravidades (Excelsa-Fanem-Brasil). Após a

centrifugação foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20 µL/mL) para a conservação da amostra, conforme descrito no item 2.11.

Alíquotas das fezes e do sobrenadante da urina centrifugada foram digeridas em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluídas em água deionizada para posterior determinação de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA) (Silva, 1990; Aoac, 1998; Huang, Yang *et al.*, 2002), conforme descrito no item 2.11.

Quadro 2.4. Cronograma da oferta de dieta e coleta de fezes e urina.

	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Dieta	Dieta com carmim	Dieta normal	Dieta normal	Dieta com carmim	
Fezes		Coleta de fezes marcadas.	Coleta de fezes totais.	Coleta de fezes totais.	Coleta de fezes não marcadas
Urina			Início da coleta de urina	Final da coleta de urina	

2.14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aoac. Official methods of analysis. . Washington, D.C. 1998

Bonnet, N., H. Beaupied, *et al.* Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.22, n.4, Apr, p.578-88. 2007.

Chapman, R. F. e J. M. Stager. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1080-6. 2008.

Doherty, M., P. Smith, *et al.* Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. J Sports Sci, v.22, n.7, Jul, p.637-43. 2004.

Fuchs, R. K., M. Shea, *et al.* Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. Bone, v.41, n.2, Aug, p.290-6. 2007.

Glaister, M., G. Howatson, *et al.* Caffeine supplementation and multiple sprint running performance. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.10, Oct, p.1835-40. 2008.

Hadjicharalambous, M., E. Georgiades, *et al.* Influence of caffeine on perception of effort, metabolism and exercise performance following a high-fat meal. J Sports Sci, v.24, n.8, Aug, p.875-87. 2006.

Hartley, T. R., W. R. Lovallo, *et al.* Cardiovascular effects of caffeine in men and women. Am J Cardiol, v.93, n.8, Apr 15, p.1022-6. 2004.

Henry, R. J., D. C. Cannon, *et al.* Clinical chemistry and technics. . New York, . 1974

Honda, A., N. Sogo, *et al.* High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. J Appl Physiol, v.95, n.3, Sep, p.1032-7. 2003.

Huang, T. H., R. S. Yang, *et al.* Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. Bone, v.30, n.1, Jan, p.293-9. 2002.

Iwamoto, J., C. Shimamura, *et al.* Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. J Bone Miner Metab, v.22, n.1, p.26-31. 2004.

O'connor, P. J., R. W. Motl, *et al.* Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. Pain, v.109, n.3, Jun, p.291-8. 2004.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Renno, A. C., A. R. Silveira Gomes, *et al.* Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. Exp Gerontol, v.42, n.6, Jun, p.517-22. 2007.

Shiga, K., H. Hara, *et al.* Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. J Nutr, v.133, n.12, Dec, p.4207-11. 2003.

Silva, J. D. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: Imprensa Universitária. 1990. 165 p.

CAPÍTULO III:

EFEITOS DA OVARIECTOMIA E INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE A COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATAS WISTAR EXERCITADAS OU NÃO.

3.1. INTRODUÇÃO

A osteoporose, as doenças cardiovasculares e a obesidade são co-morbidades que ocorrem em função das alterações metabólicas e corporais agravadas pela menopausa em mulheres (Shinoda M, Latour Mg *et al.*, 2002; Zhang Y, Dong X-L *et al.*, 2008). A prevalência de obesidade cresce no mundo, e tem sido um dos principais problemas de saúde pública, e está associada com maior risco de diabetes tipo II, hipertensão e doenças cardiovasculares (Flier, 2004; Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005), prejudicando a qualidade de vida, especialmente das mulheres pós-menopausa. Estudos com humanos e animais (Flier, 2004; Han, Kai *et al.*, 2004; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006) mostraram que a obesidade pós-menopausa acontece em função da maior ingestão de alimentos e à disfunção hormonal, elevando o peso e os estoques de gordura corporal (Shinoda M, Latour Mg *et al.*, 2002; Lemieux, Picard *et al.*, 2003; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006). Embora o estrogênio seja conhecido como um supressor da gordura corporal, sobretudo a visceral (Shinoda M, Latour Mg *et al.*, 2002; Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006), pouco se sabe do efeito da ausência do estrogênio causada pela ovariectomia sobre a composição corporal, principalmente sobre a gordura intramuscular.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é a substância psicoativa mais consumida no mundo, sendo encontrada em café, chá, refrigerantes sabor cola, entre outros (Paluska, 2003; Deslandes, Veiga *et al.*, 2005; Altimari Lr, Moraes Ac *et al.*, 2006). A cafeína é uma substância ergogênica ao desempenho no exercício aeróbico (Hogervorst, Bandelow *et al.*, 2008) quando consumida em doses baixas de 3-6 mg/kg peso corporal/dia (Bell e Mclellan,

2002; Doherty, Smith *et al.*, 2004). Sua ação está associada à ativação de mecanismos de efeito central e periférico que desencadeia importantes alterações metabólicas e fisiológicas (Altimari Lr, Moraes Ac *et al.*, 2006). A ingestão de cafeína pode estimular o aumento na taxa de metabolismo basal, a liberação de catecolaminas (Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005; Altimari Lr, Moraes Ac *et al.*, 2006) e pode reduzir a taxa de glicogenólise muscular durante o exercício aeróbico. Ela poupa glicogênio devido ao aumento da mobilização e oxidação da gordura intra e extra-muscular (Hespel, Op't Eijnde *et al.*, 2002; Mclellan e Bell, 2004), o que pode levar à diminuição do peso e da gordura corporal. Além do mais, Wang *et al.* (2006) sugeriram que uma dose de cafeína correspondente a 2 xícaras de café, após 5 horas de sua ingestão, poderiam reduzir o fluxo linfático e a absorção de diversos ácidos graxos (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 e 20:4) e do colesterol. Desta forma, a ingestão de cafeína poderia atenuar o aumento de peso e estoques de gordura promovido pela menopausa, no entanto, pouco se sabe do impacto da ingestão de cafeína em ratas com ovariectomia.

A cafeína ainda poderia alterar a composição corporal por reduzir os conteúdos de água corporal, em função a sua ação diurética (Birnbaum e Herbst, 2004; Ruxton, 2008). A possível ação da cafeína em prolongar o exercício até a fadiga (Kalmar e Cafarelli, 2004) poderia, diretamente, promover maior desempenho no exercício, e, indiretamente, estimular a síntese protéica, elevando a massa magra na composição corporal. Todavia, estes efeitos não foram identificados por alguns autores (Acheson, Gremaud *et al.*, 2004; Franco, 2004), faltando evidências que suportem estas suposições da ingestão da cafeína sobre a composição corporal.

O exercício é conhecido como um meio de prevenir as morbidades e mortalidade por doenças crônicas (Lohman, Ring *et al.*, 2008). O exercício promove adaptações positivas sobre os sistemas cardiovascular e locomotor que resultam em melhoria na capacidade funcional e qualidade de vida. Estudos com humanos (Bircher, Knechtle *et al.*, 2005; Irving,

Davis *et al.*, 2008) e animais (Hongu e Sachan, 2000; Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004) mostram que o exercício de moderada intensidade apresenta benefícios à composição corporal, sendo ótima estratégia para reduzir o peso e a deposição de gordura. Estes benefícios do exercício ocorrem em função do aumento no gasto energético, o que o coloca como importante estratégia para o tratamento da obesidade. Por outro lado, Ferreira *et al.* (2007) verificaram que o exercício aeróbico de muito baixa intensidade em esteira (12 m/min) não promoveu alteração sobre a composição corporal de ratos; já Shinoda *et al.* (2002) identificaram melhoria na composição corporal quando ratos correram a 26 m/min. Contudo, ainda não se conhece o impacto da corrida aeróbia de baixa intensidade a 16 m/min sobre a composição corporal, além de seus efeitos como anti-obesidade em indivíduos com menopausa induzida pela ovariectomia.

A prevalência da obesidade tem elevado rapidamente nos últimos anos, podendo ainda ter seus níveis mais incrementados pelo aumento na expectativa de vida, e conseqüentemente, maior contingente de mulheres pós-menopausa, que exibem tendências à obesidade. O exercício aeróbico parece ser uma ótima estratégia para a prevenção e tratamento à obesidade, porém, mulheres pós-menopausa e idosas normalmente participam de programas de exercícios aeróbicos de baixa intensidade como caminhadas, ao qual pouco se sabe dos seus efeitos sobre a composição corporal nesta população específica. Adicionalmente, o aumento na ingestão de alimentos ricos em cafeína poderia afetar a composição corporal diretamente pelos sugeridos efeitos lipolíticos e diuréticos, e/ou indiretamente por melhorar o desempenho no exercício aeróbico e subsequente elevação da massa magra corporal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da cirurgia de ovariectomia, do exercício aeróbico de baixa intensidade em esteira e da ingestão de cafeína sobre a composição corporal em ratas Wistar.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais experimentais

O estudo foi realizado com 80 ratas Wistar adultas de 160 dias de idade (peso médio: $275,5 \pm 22,8$ g; média \pm DP), submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou laparotomia (SHAM). Os animais foram previamente anestesiados com Ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) intramuscular, recebendo no pós-operatório a administração subcutânea de anti-inflamatório (Ketofen: 2 mg/kg por 3 dias) e antibiótico (Ampicilina sódica: 30 mg/kg por 5 dias). Após 3 semanas de recuperação, os animais foram alocadas em 8 grupos (n=10), num delineamento fatorial 2 x 2 x 2. Os grupos foram, então, assim constituídos: SSP – SHAM Sedentária Placebo; SSC – SHAM Sedentária Cafeína; SEP – SHAM Exercitada Placebo; SEC – SHAM Exercitada Cafeína; OSP – OVX Sedentária Placebo; OSC – OVX Sedentária Cafeína; OEP – OVX Exercitada Placebo; e OEC – OVX Exercitadas Cafeína.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, por 8 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60%, e foto-período de 12 de horas, além de receberam, diariamente, de 18 a 20 gramas de dieta AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) e água deionizada *ad libitum*.

Os animais foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – MG (Brasil), e os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG (Parecer nº 80/2007).

3.2.2. Administração de cafeína

Diariamente, os animais dos grupos SSC, SEC, OSC e OEC receberam suplementação de 6 mg de cafeína/kg de peso corporal/dia, adicionada à dieta dos animais. Os animais dos grupos SSP, SEP, OSP e OEP receberam apenas a dieta. As doses de suplementação de

caféina foram identificadas em estudos recentes como doses moderadas utilizadas em humanos e animais (Doherty, Smith *et al.*, 2004; Hartley, Lovallo *et al.*, 2004; O'connor, Motl *et al.*, 2004; Hadjicharalambous, Georgiades *et al.*, 2006; Chapman e Stager, 2008; Glaister, Howatson *et al.*, 2008).

3.2.3. Protocolo de exercício

Após um período de 2 semanas de recuperação da cirurgia, 40 animais foram submetidos a um processo de adaptação ao exercício de corrida em esteira (8 m/min 10 min/dia por 5 dias). Em seguida, estes animais foram subdivididos em 4 grupos (SEP, SEC, OEP e OEC) e foram submetidos a um programa de exercício aeróbico de corrida em esteira exercitando numa velocidade de 16 m/min durante 30 minutos diários, 5 sessões por semana, num período de 8 semanas, conforme adaptação de Iwamoto et al. (2004).

3.2.4. Determinação do coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

O peso corporal foi monitorado semanalmente, usando balança eletrônica digital (Marte - Brasil), onde o ganho de peso corporal foi determinado pela diferença entre os pesos no dia do sacrificio e o da 1ª semana. O consumo de dieta alimentar foi monitorado diariamente, para a determinação do coeficiente de eficiência alimentar por percentagem.

$$\text{CEA}\% = (\text{ganho de peso corporal} / \text{Consumo de dieta}) \times 100$$

As análises de consumo de dieta e coeficiente de eficiência alimentar por percentagem foram realizados em 5 animais de cada grupo.

3.2.5. Determinação da composição corporal

Ao final da 8ª semana, os animais sofreram eutanásia com CO₂, e toda gordura visceral foi retirada e pesada. A carcaça vazia (músculos e ossos) foi separada e armazenada em

freezer (-20°C) para a determinação das frações: água, gordura, proteínas e cinzas. O percentual hídrico foi avaliado pelo método gravimétrico por evaporação de água em estufa (Fanem – Brasil) a 105°C por 24 horas. O percentual de gordura foi determinado pelo processo gravimétrico no aparelho de Soxhlet usando solvente éter etílico por 8 h/extração. O percentual de proteína foi calculado em triplicata pelo método indireto de determinação do nitrogênio (Proteína (g) = nitrogênio (g) x 6,25) pela metodologia de Kjeldahl. O percentual de cinzas foi determinado por incineração à 600°C por 6 horas (Aoac, 1998).

3.2.6. Avaliação do desempenho: Concentração de lactato sangüínea

Na última semana de experimento determinou-se a concentração do lactato sangüíneo dos animais exercitados (grupos SEP, SEC, OEP e OEC) durante a realização de uma sessão de treino. As medidas foram realizadas em 3 momentos: repouso e após 15 e 30 minutos de corrida. A extremidade da cauda foi cortada com tesoura cirúrgica e o sangue foi coletado para que as concentrações de lactato fossem analisadas no equipamento Accusport BM-Lactate [Roche® - Alemanha] por fitas para determinação de lactato sangüíneo da mesma marca.

As análises das concentrações de lactato sangüíneo foram realizadas em 5 animais de cada grupo.

3.2.7. Análise estatística

Após submeter os dados ao teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), aplicou-se análise de variância [ANOVA: three-way para as interações e os 3 fatores; além de one-way para grupos independentes e combinações], Teste-*t* Pareado ou ANOVA One-Way Medidas Repetidas para medidas do mesmo indivíduo, e testes de correlação de Pearson para determinar a relação entre variáveis. Para as análises de múltiplas comparações *post hoc* foi

utilizado o teste de Tukey em análises paramétricas e Dunn's em análises não-paramétricas. Os cálculos estatísticos foram realizados no software Sigma Stat 3.0 [SPSS], empregando o nível de significância estatística de $P < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Desempenho

A Figura 3.1 apresenta as concentrações de lactato sanguíneo em repouso e após 15 e 30 minutos de corrida. Verificou-se que o lactato sanguíneo elevou-se levemente ($P < 0,05$) do repouso para o momento 15 minutos. Contudo, apesar do lactato elevar entre os 15 e 30 minutos, esta diferença não foi significativa, sugerindo uma tendência em estabilização.

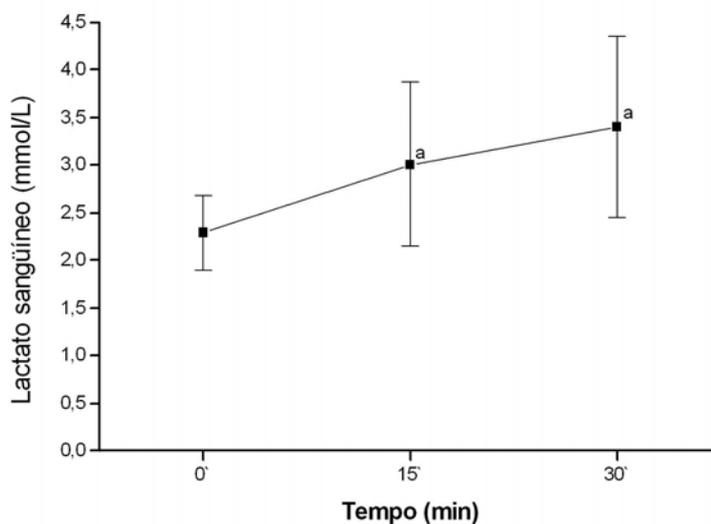


Figura 3.1 – Concentração de lactato sanguíneo dos animais exercitados no teste de desempenho. Valores em média±DP. Significância ($P < 0,05$): ^a vs. 1ª semana para o Teste de ANOVA Medidas Repetidas.

3.3.2. Peso corporal

Não foi observada diferença ($P > 0,05$; Tabela 3.1) no peso inicial dos animais. Ao final da 8ª semana, não houve interação significativa entre os fatores (Ovário, Exercício e Cafeína) para o peso corporal final e ganho de peso. Porém, verificou-se que, tanto em animais consumindo placebo quanto cafeína, a combinação de OVX e sedentarismo exibiram maiores ganhos de peso corporal do que a combinação SHAM e exercício (OSP vs. SEP e OSC vs. SEC, Tabela 3.1; $P < 0,05$). Verificou-se que em animais sedentários, a combinação OVX-Cafeína elevou o peso corporal quando comparado ao SHAM-Placebo (OSC vs. SSP; $P < 0,05$). Ainda, observou-se que entre os animais Sedentários-Placebo, os OVX exibiram maiores ganhos de peso do que os SHAM (OSP vs. SSP; $P < 0,05$).

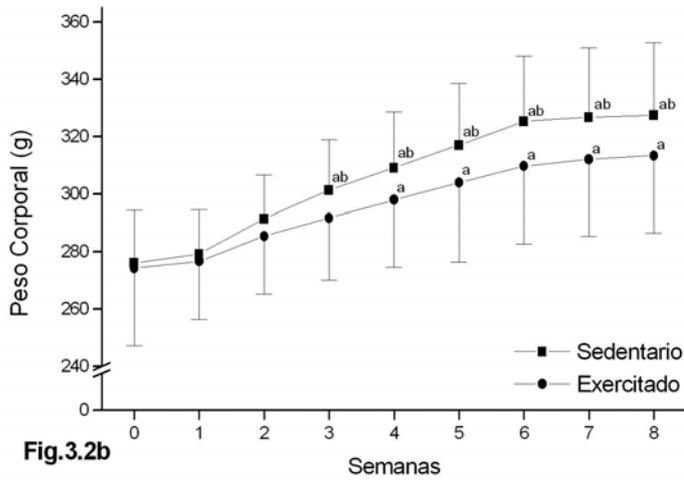
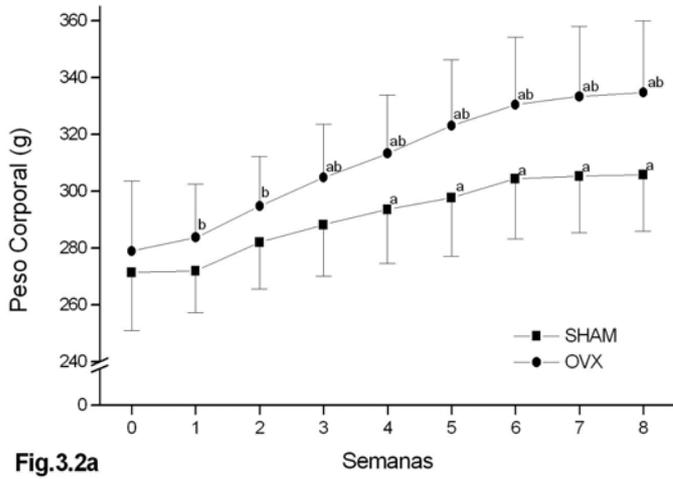
Em todas as variáveis dos três fatores [OVÁRIO (OVX e SHAM), EXERCÍCIO (Sedentários e Exercitados) e CAFEÍNA (Placebo e Cafeína)] identificou-se que o peso corporal elevou-se no decorrer do experimento (Figuras 3.2a, 3.2b e 3.2c). Em relação ao fator Ovário, a partir da 1ª semana, verificou-se que os animais OVX (OSP+OSC+OEP+OEC) exibiram maior peso corporal ($P < 0,001$), comparado aos SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC; Figura 3.2a). Para o fator Exercício, verificou-se que a partir da semana 3, os animais exercitados (SEP+SEC+OEP+OEC) mostraram peso corporal inferior ($P = 0,003$), comparados aos sedentários (SSP+SSC+OSP+OSC; Figura 3.2b). Todavia, não houve alteração ($P > 0,05$), no peso corporal durante todo o experimento ao comparar os animais placebo (SSP+SEP+OSP+OEP) e cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC; Figura 3.2c).

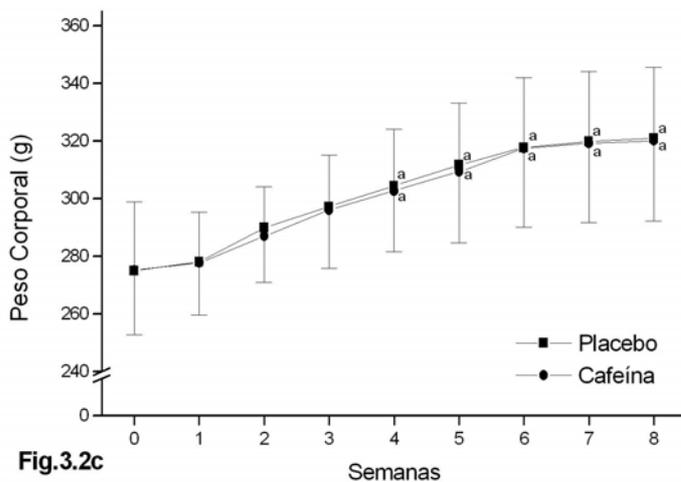
Tabela 3.1. Peso corporal inicial e final dos animais.

	SSP	OSP	SSC	OSC	SEP	OEP	SEC	OEC
Peso Inicial	273,4±16,5 ^a	279,2±21,9 ^a	272,6±17,4 ^a	279,0±19,0 ^a	270,7±25,4 ^a	278,9±26,2 ^a	270,7±24,1 ^a	278,7±33,5 ^a
Ganho Peso	35,5±11,5 ^{bc}	64,7±14,9 ^a	42,1±11,1 ^{ac}	63,6±8,1 ^a	26,8±27,7 ^{bc}	54,3±28,1 ^{ac}	33,0±17,0 ^{bc}	40,7±20,0 ^{ac}

Valores em média±DP. Significância (P< 0,05): médias seguidas pela mesma letra na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F.

SSP (SHAM Sedentário Placebo), OSP (OVX Sedentário Placebo), SSC (SHAM Sedentário Cafeína), OSC (OVX Sedentário Cafeína), SEP (SHAM Exercitado Placebo), OEP (OVX Exercitado Placebo), SEC (SHAM Exercitado Cafeína), OEC (OVX Exercitado Cafeína).





Figuras 3.2a, 3.2b e 3.2c. Peso corporal durante o experimento para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína, respectivamente. Significância ($P < 0,05$): ^a vs. 1ª semana para Teste de ANOVA Medidas Repetidas, ^b vs. SHAM (Figura 3.2a) ou Exercitado (Figura 3.2b) para Teste *t*- Student.

3.3.3. Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

Foi observada correlação positiva (Pearson, $\rho = 0,542$ e $P < 0,001$) entre o ganho de peso corporal ($35,4 \pm 3,6$ g; Média \pm EPM) e o consumo de dieta ($974,0 \pm 8,8$ g) ao longo do experimento. Assim, os dados de ganho de peso corporal foram normalizados pelo consumo de dieta, sendo apresentados como coeficiente de eficiência alimentar em percentagem.

O ganho de peso corporal, o consumo de dieta e o CEA em percentagem não exibiram interação significativa entre os fatores.

Para as combinações de grupos, nos animais Placebos o ganho de peso, o consumo de dieta e CEA em percentagem os animais OVX-sedentários exibiram maiores valores

comparados aos SHAM-exerictados ($P < 0,05$). Para os mesmos parâmetros os animais Sedentários-Cafeína apresentaram maiores valores que os Exercitados-Placebo.

Na análise do efeito principal dos fatores observou-se que o ganho de peso, o consumo de dieta e o CEA em percentagem foram maiores nos animais OVX, sedentários e cafeína quando comparados aos animais SHAM, exercitados e placebo, respectivamente (Tabela 3.2), exceto para o ganho de peso corporal e CEA em percentagem no fator Cafeína, nos quais não foram verificadas alterações significativas.

Tabela 3.2. Ganho de peso corporal (g), consumo de dieta (g) e coeficiente de eficiência alimentar (%) para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Ganho de Peso Corporal (n=20)	34,3±2,9 ^a	55,8±3,3 ^b	51,5±2,7 ^a	38,7±4,0 ^b	45,3±4,1 ^a	44,8±2,9 ^a
Consumo de Dieta (n=20)	954,7±11,9 ^a	993,3±11,6 ^b	990,3±12,1 ^a	957,7±11,9 ^b	1002,3±10,6 ^a	945,6±10,9 ^b
%CEA (n=20)	2,51±0,43 ^a	4,63±0,47 ^b	5,05±0,38 ^a	2,09±0,39 ^b	3,27±0,53 ^a	3,87±0,49 ^a

Valores em média±EPM. Significância ($P < 0,05$): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+SSC+OSP+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+SEP+OSP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

3.3.4. Composição corporal

Não foi observada interação estatística ($P > 0,05$) entre os fatores para todos os parâmetros de composição da massa magra estudados.

Entre as combinações de grupos, identificou-se que os animais OVX-sedentários elevaram os conteúdos de gordura visceral (OSP: $34,9 \pm 8,9$ vs. SEP: $18,1 \pm 6,6$ e OSC: $30,3 \pm 11,9$ vs. SEC: $23,2 \pm 7,0$ g; $P < 0,05$) e da carcaça (OSP: $14,0 \pm 4,0$ vs. SEP: $8,0 \pm 3,2$ e OSC: $13,4 \pm 3,6$ vs. SEC: $7,8 \pm 2,6$ g; $P < 0,05$) quando comparados aos SHAM-exercitados, tanto para animais placebo quanto para os que consumiram cafeína.

As análises da composição da massa magra dos animais para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína, separadamente, estão apresentados na Tabela 3.3. Não foi observada alteração significativa ($P < 0,05$) na composição da massa magra para o fator Cafeína.

Dentro do fator Ovário, identificou que os animais OVX apresentaram maior peso da carcaça, conteúdo de gordura visceral, conteúdos de água, gordura e proteína na carcaça e percentagens de gordura na carcaça quando comparados aos animais SHAM. Porém, exibiram menores valores nos parâmetros percentagens de água, proteína e cinzas.

Para o fator Exercício, foi observado que os animais sedentários apresentaram maiores valores nos parâmetros conteúdo de gordura visceral, conteúdos de gordura e cinzas e percentagens de gordura e cinzas, quando comparados aos animais exercitados. Contudo, mostraram menores valores nos parâmetros percentagens de água e proteína.

Tabela 3.3. Composição corporal para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Gordura						
Visceral (g)	24,8±1,4 ^a	29,2±1,5 ^b	30,8±1,5 ^a	23,2±1,2 ^b	27,2±1,6 ^a	26,8±1,4 ^a
Peso da						
Carcaça (g)	134,4±1,7 ^a	143,6±1,8 ^b	139,8±1,7 ^a	138,1±2,1 ^a	138,4±1,8 ^a	139,6±2,0 ^a
Conteúdo de						
Água (g)	89,1±1,4 ^a	94,2±1,2 ^b	91,1±1,2 ^a	92,2±1,5 ^a	91,9±1,4 ^a	91,5±1,4 ^a
Água na						
Carcaça (%)	66,3±0,3 ^a	65,6±0,3 ^b	65,1±0,3 ^a	66,8±0,3 ^b	65,8±0,3 ^a	66,1±0,3 ^a
Conteúdo de						
Gordura (g)	9,5±0,5 ^a	12,3±0,5 ^b	12,4±0,5 ^a	9,4±0,5 ^b	11,0±0,5 ^a	10,8±0,6 ^a
Gordura na						
Carcaça (%)	7,1±0,4 ^a	8,6±0,4 ^b	8,9±0,4 ^a	6,8±0,3 ^b	7,7±0,4 ^a	7,9±0,4 ^a
Conteúdo de						
Proteína (g)	27,6±0,4 ^a	28,8±0,4 ^b	27,8±0,4 ^a	28,5±0,5 ^a	27,8±0,4 ^a	28,6±0,4 ^a
Proteína na						
Carcaça (%)	20,5±0,2 ^a	20,0±0,2 ^b	19,9±0,2 ^a	20,7±0,2 ^b	20,5±0,2 ^a	20,1±0,2 ^a
Conteúdo de						
Cinzas (g)	7,30±0,11 ^a	7,47±0,13 ^a	7,65±0,12 ^a	7,11±0,10 ^b	7,44±0,10 ^a	7,33±0,14 ^a
Cinzas na						
Carcaça (%)	5,44±0,07 ^a	5,21±0,08 ^b	5,48±0,06 ^a	5,17±0,08 ^b	5,26±0,07 ^a	5,39±0,08 ^a

Valores em média±DP. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+SSC+OSP+OSC),

Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+SEP+OSP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

3.4. DISCUSSÃO

Este estudo teve por objetivo avaliar o impacto da ovariectomia, do exercício aeróbico e da ingestão de cafeína sobre parâmetros da composição corporal em ratas. Nossos resultados mostraram que a ovariectomia promoveu aumento do peso da carcaça, conteúdo de gordura visceral e percentagem de gordura, porém, reduziu as percentagens de água, proteína e de cinzas. O programa de exercício elevou a percentagem de água e proteína, mas reduziu as percentagens de gorduras e cinzas. Já a ingestão de cafeína não afetou nenhum dos parâmetros analisados da composição corporal.

Inicialmente, deve-se ressaltar que nossos dados sobre concentração de lactato sanguíneo caracterizam o programa de treinamento utilizado como sendo de baixa intensidade, onde a energia utilizada pelos animais durante a execução do exercício originou-se, predominantemente, do metabolismo aeróbico, e que nosso regime de exercício foi efetivo. Os níveis de lactato sanguíneo elevaram do repouso para 15 e 30 minutos de corrida, contudo, não extrapolaram os valores do limiar de lactato (Gobatto, De Mello *et al.*, 2001; Philp, Macdonald *et al.*, 2005). Estes valores são semelhantes aos estudos com humanos (Bircher, Knechtle *et al.*, 2005) onde há predomínio da oxidação de gordura. Carvalho *et al.* (Carvalho, Masuda *et al.*, 2005) mostraram que um programa de corrida em esteira por 4 semanas em ratos Wistar numa velocidade ~15 m/min foi suficiente para melhorar a capacidade aeróbia, sem elevar a concentração de lactato acima do limiar de lactato.

Neste estudo observou que a ovariectomia e o sedentarismo promoveram maior peso final e ganho de peso corporal durante o experimento, tanto nas análises dos grupos individualmente, como para os fatores separadamente (Figuras 3.2a e 3.2b e Tabela 3.2).

Porém, a ingestão de cafeína não interferiu sobre estes parâmetros (Figura 3.2c e Tabela 3.2). Após 3 semanas de recuperação pós-cirurgia e 1 semana de tratamento já observou diferença significativa no peso corporal entre os animais OVX e SHAM (Figura 3.2a), resultados estes similares a estudo anterior (Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006). O aumento do peso corporal em humanos e animais, em virtude da deficiência de estrogênio, está bem documentado na literatura (Shinoda M, Latour Mg *et al.*, 2002; Lemieux, Picard *et al.*, 2003; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006; Zhang Y, Dong X-L *et al.*, 2008). Estudos com animais, ratas adultas Wistar (Han, Kai *et al.*, 2004), Sprague-Dawley (Lemieux, Picard *et al.*, 2003) e camundongos (Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006), relataram que animais OVX exibem maior peso corporal quando comparadas às SHAM. Esta elevação no peso corporal é referida principalmente à disfunção hormonal e ao maior acúmulo de gordura (Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006), devido à ovariectomia elevar a ingestão alimentar (Shinoda, Latour *et al.*, 2002), e por consequência, incrementar a eficiência energética (Lemieux, Picard *et al.*, 2003).

Um dos benefícios do exercício aeróbico sobre a composição corporal é a redução no peso corporal, provavelmente pela redução na massa gorda (Ormsbee, Thyfault *et al.*, 2007; Irving, Davis *et al.*, 2008). No presente estudo o programa de exercício empregado reduziu o peso corporal dos animais (Figura 3.2b). Contudo, estudos com animais (Cortright, Chandler *et al.*, 1997; Ferreira, De Toledo Bergamaschi *et al.*, 2005) e humanos (Irving, Davis *et al.*, 2008) relataram que se a intensidade do exercício for muito baixa, a redução de peso corporal pode não acontecer. Ferreira *et al.* (2005) estudaram ratos machos Wistar correndo a 12 m/min por 1 hora durante 10 semanas, não observaram diferença significativa sobre o peso corporal entre animais exercitados e sedentários. Isto leva-nos inferir que a velocidade de 16 m/min empregada neste experimento foi suficiente para promover o aumento do metabolismo aeróbico, sem extrapolar o limiar anaeróbio, promovendo uma redução no peso corporal.

Além do mais, observou-se que o peso corporal dos animais exercitados foi significativamente menor dos que os sedentários a partir da 3 semana (Figura 3.2b), confirmando que o programa de exercício aeróbico de baixa intensidade pode ser usado para beneficiar indivíduos obesos e pós-menopausa, que desejam reduzir seu peso corporal.

Os animais OVX e sedentários ganharam mais peso do que os SHAM e exercitados. Estes fenômenos poderiam ser afetados pelo consumo alimentar, que se correlacionou positivamente com o ganho de peso. Em virtude disto, calculou-se o coeficiente de eficiência alimentar (CEA%, Tabela 3.2) para minimizar a interferência do consumo alimentar sobre o ganho de peso corporal. Desta forma, os resultados de CEA% nos sugerem que independente ao consumo alimentar os animais OVX e sedentários apresentaram maior ganho de peso corporal quando comparados aos SHAM e exercitados.

As proporções de água, gordura, proteína e cinzas na carcaça vazia dos animais encontradas neste estudo são coerentes com os de outros estudos (Cortright, Chandler *et al.*, 1997; Franco, Natali *et al.*, 2007). Cortright *et al.* (1997) identificaram que ratas Sprague-Dawley exercitando, em corrida voluntária, exibiram as seguintes proporções nas frações: água (64%), gordura (8%), proteína (22%) e cinzas (4%). Franco *et al.* (2007) verificaram uma proporção de água (65%) e proteína (22%) em ratos Wistar sedentários e exercitando anaerobiamente.

Os resultados de composição corporal mostraram que a ovariectomia elevou o conteúdo de gordura visceral, peso da carcaça e sua percentagem de gordura, porém, reduziu as percentagens de água, proteína e cinzas. O estrogênio é bem conhecido como um supressor da gordura corporal, especialmente a visceral (Shinoda M, Latour Mg *et al.*, 2002; Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006). Notomi *et al.* (2003) observaram que ratas adultas Sprague-Dawley OVX com 12 semanas de idade apresentaram ~30% a mais de gordura abdominal do que as SHAM. Han *et al.* (2004) verificaram que ratas Wistar OVX

com 8 semanas de idade exibiram maior conteúdo de tecido adiposo no paramétrio (~28%) do que ratas simulando a cirurgia. Nossos resultados são coerentes aos do estudo anterior, pois apesar de menor magnitude (18,8%), a ovariectomia elevou o conteúdo de gordura visceral. Porém, observamos também que a deficiência de estrogênio eleva não só a gordura visceral, mas também a deposição de gordura intramuscular numa magnitude de 21,1% (Tabela 3.3).

Além da ausência de ação direta hormonal em função da deficiência estrogênica, outra justificativa para este incremento na deposição de gordura corporal seria que a ovariectomia promove maior consumo alimentar (Shinoda M, Latour Mg *et al.*, 2002; Han, Kai *et al.*, 2004), e conseqüentemente, a deposição de gordura. Contudo, nossos achados demonstraram que o CEA% das ratas OVX foi maior significativamente do que das SHAM, sugerindo que o ganho de peso corporal nestes animais independe do volume alimentar ter sido maior entre os animais OVX, o que descarta esta possibilidade. Outro marcador da deposição de gordura corporal é a leptina sérica (Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006). Jansson *et al.* (2006), ao comparar ratas OVX com SHAM, relataram que a ovariectomia induziu um aumento de 3 vezes nos níveis séricos de leptina. No entanto, nosso experimento não analisou este parâmetro.

Neste estudo observou-se redução nas percentagens de água, proteína e cinzas em função da ovariectomia. Apesar de Notomi *et al.* (2003) mostrarem que ratas Sprague-Dawley OVX com 12 meses de idade não alteraram a massa muscular, não se conhece, até o momento, mecanismos que pudessem justificar as reduções na água e proteína corporais.

Já a redução na percentagem de cinzas (minerais) para as ratas OVX, poderia ser justificada em decorrência à ausência de estrogênio estimular menor liberação de vitamina D, reduzindo a eficiência na absorção intestinal de cálcio e promovendo um balanço de cálcio negativo. Por conseqüência, menor retenção de cálcio nos ossos (Zhang, Lai *et al.*, 2006). Além do balanço negativo de cálcio, a ovariectomia também poderia interferir na homeostase

de outros minerais, como magnésio, zinco, fósforo, entre outros. Todavia, a amplitude da redução de minerais na carcaça dos animais OVX foi pequena e acredita-se que não é suficiente para afetar biologicamente indivíduos com deficiência estrogênica.

Por outro lado, as reduções nas percentagens de água, proteína e cinzas poderiam ser explicadas em razão aos dados serem apresentados em percentagem. Assim, quando se aumenta a proporção de uma fração automaticamente reduz os valores das demais frações pertencentes a este todo. Analisando os valores da carcaça, se forem somadas todas as reduções induzidas pela OVX nas percentagens de água, proteína e cinzas, verifica-se que estas são similares ao ganho na gordura observada nestes animais. Tais resultados sugeriram que, em razão da ovariectomia elevar o peso corporal final e peso da carcaça vazia, a magnitude do incremento na gordura visceral e gordura intramuscular (gordura da carcaça) sejam mais significantes biologicamente para a saúde de indivíduos com deficiência de estrogênio do que as reduções das percentagens de água, proteína e cinzas.

O programa de corrida em esteira de baixa intensidade empregado promoveu redução no peso corporal final dos animais exercitados. Isto pode ser explicado pela redução nas gorduras visceral e intramuscular (carcaça vazia: músculos e ossos), como também pelo aumento da fração protéica. Estes resultados são similares ao de Hongu et al. (2000), onde ratos Sprague-Dawler com 7 semanas de idade correndo a 18 m/min por 5 semanas reduziram o peso e a gordura corporal. O programa de exercício aeróbico pode elevar o gasto energético e reduzir os estoques de gordura corporal (Harant, Marion-Latard *et al.*, 2002; Ormsbee, Thyfault *et al.*, 2007), como também elevar a taxa de oxidação de gordura, poupando a utilização de glicogênio muscular (Aoki, Belmonte *et al.*, 2003; Bircher, Knechtle *et al.*, 2005; Ferreira, Rolim *et al.*, 2007). Este aumento na oxidação de gordura ocorre devido o treinamento físico regular a utilização de substratos no ciclo dos citratos e o transporte de elétrons na cadeia respiratória (Achten e Jeukendrup, 2003), onde ácidos graxos são liberados

dos adipócitos para serem utilizados pelo músculo como combustível durante o exercício (Harant, Marion-Latard *et al.*, 2002). Tais mecanismos seriam responsáveis pela redução na gordura corporal promovida pelo exercício.

Irving *et al.* (2008) sugeriram que o exercício aeróbico apresenta efeitos benéficos sobre a composição corporal, sendo ótima estratégia para reduzir a gordura abdominal, principalmente, a visceral. Nossos resultados corroboram esta afirmativa, pois ao comparar animais exercitados versus sedentários, identificou-se que o exercício, além de reduzir os conteúdos de gordura visceral, diminuiu os conteúdos de gordura intramuscular na mesma proporção (32,8% e 31,9%; respectivamente, Tabela 3.3). Contudo, ainda existem dúvidas quanto a melhor intensidade e tempo de duração do exercício para promover uma maior taxa de oxidação de gorduras. Ferreira *et al.* (2005) relataram que a corrida em esteira a 12 m/min por 1 hora durante 10 semanas não modificou a massa magra e a gordura em ratos Wistar. Nosso estudo utilizou o mesmo modelo animal exercitando pela metade do tempo, porém, a uma velocidade de 16 m/min, e encontrou menores conteúdos de gorduras corporais. Isto nos leva a acreditar que a intensidade desenvolvida no nosso estudo seria mais benéfica à oxidação de gordura do que a utilizada pelo estudo anterior. Desta forma, sugere-se que apesar de ser uma atividade de baixa intensidade, exercícios de intensidades mais próximas ao limiar de lactato promoveriam uma maior taxa de oxidação de gordura do que aqueles com intensidades muito baixas, sendo assim, mais benéficos a indivíduos que desejam reduzir o peso e a gordura corporal nos tratamentos da obesidade.

Outro possível mecanismo de redução nos conteúdos de gordura corporal, e conseqüentemente do peso corporal, é a elevação da fração protéica na carcaça pelo exercício. Segundo Censi *et al.* (1998), a taxa metabólica basal é elevada pelo aumento na massa magra corporal, em razão do músculo demandar mais energia mesmo durante o repouso. O exercício aeróbico pode elevar a massa magra por apresentar um estímulo anabólico elevando a síntese

protéica (Short, Vittone *et al.*, 2004; Pikosky, Gaine *et al.*, 2006; Wong, Chia *et al.*, 2008). Conforme visto em nossos resultados, a porcentagem de proteína elevou nos animais exercitados, provavelmente elevando a taxa de metabolismo basal destes animais, que elevaria a utilização de gordura e reduziria sua deposição corporal.

Estudos anteriores descrevem uma desaceleração na taxa de utilização do glicogênio durante a realização do exercício aeróbico de longa duração, por demandar maior consumo de gorduras (Aoki, Belmonte *et al.*, 2003; Bircher, Knechtle *et al.*, 2005; Ferreira, Rolim *et al.*, 2007). O aumento nas porcentagens de água em função do exercício poderia ser justificado pelo programa de exercício promover aumento nos estoques de glicogênio muscular, pois o músculo estoca 2,7g de água para cada grama de glicogênio estocado (Lancha Jr, 2006). Já a redução na porcentagem de cinzas (minerais) acredita-se que pelo exercício envolver diversos minerais em seus processos metabólicos. Além do mais, a sudorese decorrente do exercício físico também poderia contribuir para aumentar a excreção de minerais e, por conseguinte, diminuir a retenção na carcaça.

Os resultados do presente estudo não mostraram qualquer alteração sobre os parâmetros da composição corporal em função da ingestão de cafeína. Apesar deste estudo não ter avaliado marcadores da mobilização e oxidação de lipídios, tem sido sugerido que a cafeína poderia alterar a composição corporal por elevar o gasto de gordura ao inibir a ação da fosfodiesterase. Esta, que tem a função de converter cAMP em AMP, ao ser inibida pela cafeína elevaria as concentrações de cAMP inibindo a lipase hormônio-sensível e ativando a lipólise (Acheson, Gremaud *et al.*, 2004). Outro mecanismo sugerido, é que a cafeína incrementaria a liberação de catecolaminas e assim, estimularia maior mobilização e oxidação de gorduras (Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005; Altimari, Moraes *et al.*, 2006). Nossos resultados são coerentes com os de outros estudos em humanos e animais (Jacobson, Febbraio *et al.*, 2001; Acheson, Gremaud *et al.*, 2004; Franco, 2004).

Jacobson et al. (2001) identificaram que em um teste de ciclismo a 75% do VO₂max, a ingestão de cafeína (6 mg/kg) não alterou a mobilização de substrato durante o exercício. Franco (Franco, 2004) observou em ratos Wistar, que a ingestão de cafeína (15 mg/kg) associada à de creatina não interferiu sobre o peso, a água, a gordura na carcaça e visceral, entretanto, não investigaram a ingestão de cafeína isoladamente. Todavia, outros estudos mostraram efeitos positivos da ingestão de cafeína. Han et al. (2004) estudaram ratas Wistar OVX com 8 semanas de idade consumindo cafeína (89,5 e 177 mg/kg/dia) durante 9 semanas, e verificaram apenas nos grupos com maior ingestão de cafeína uma redução no peso corporal e gordura no paramétrio, além de maior lipólise basal. Kobayashi-Hattori et al. (2005) verificaram que em ratas Sprague-Dawley consumindo alto teor de gordura, a ingestão de 0,05% de cafeína/kg de dieta reduziu a gordura corporal e 5 mg de cafeína/kg elevou as concentrações de catecolaminas e ácidos graxos livres, incrementando a lipólise. No estudo de Han et al. (2004), os efeitos positivos sobre a composição corporal com administração de cafeína só foram vistos efeitos para a dose de 177 mg/kg, porém, não identificados para a dose de 89,5 mg/kg. Estas doses seriam 30x e 15x maiores que as usados pelo nosso estudo, e atingidas apenas sobre prescrição farmacológica. Ademais, os resultados de Han et al. (2004) para a dose de 89,5 mg/kg foram idênticos aos nossos quando analisados os grupos OVX vs. SHAM. Estes resultados contraditórios entre os estudos talvez possam ser justificados em função aos diferentes protocolos, onde variam doses, forma de administração das doses, combinações com outras substâncias, entre outros. Contudo, observam-se efeitos positivos da cafeína sobre os conteúdos de gorduras corporais apenas para doses muito altas, aos quais é bastante inviável de ser alcançado com a ingestão alimentar.

Em relação à percentagem de água, sabe-se que a cafeína poderia reduzi-la, já que exerce ação diurética (Ruxton, 2008). O efeito adverso da cafeína sobre a hidratação corporal tem sido mencionado devido a elevação do fluxo sanguíneo aos rins e inibir a reabsorção de

sódio, cálcio e magnésio, incrementando a perda de água (Birkner, Grucka-Mamczar *et al.*, 2006). No entanto, nossos resultados não observaram alteração no conteúdo e percentagens de água na carcaça em razão do consumo de cafeína. Em estudo anterior realizado em nosso laboratório (Franco, 2004) também não foi observado interferência da administração de cafeína associada à creatina sobre a perda de água na carcaça de ratos Wistar. Desta forma, nossos resultados não exibem evidências de que a cafeína promova efeito diurético, elevando as perdas de água corporal.

Concluiu-se que a osteoporose induzida pela ovariectomia promoveu maior ganho de peso corporal, por elevar a deposição de gordura corporal, independente do maior consumo de dieta. O programa de exercício aeróbico de baixa intensidade melhora a composição corporal, por elevar a proteína e a água, além de reduzir a gordura corporal; e a ingestão de cafeína não interferiu sobre a composição corporal.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acheson, K. J., G. Gremaud, *et al.* Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? American Journal of Clinical Nutrition, v.79, n.1, p.40-6. 2004.

Achten, J. e A. E. Jeukendrup. Effects of pre-exercise ingestion of carbohydrate on glycaemic and insulinaemic responses during subsequent exercise at differing intensities. Eur J Appl Physiol, v.88, n.4-5, Jan, p.466-71. 2003.

Altimari, L. R., A. C. Moraes, *et al.* Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.42, n.1, p.17-27. 2006.

Aoac. Official methods of analysis. . Washington, D.C. 1998

Aoki, M. S., M. A. Belmonte, *et al.* Influência da suplementação lipídica sobre a indução do efeito poupador de glicogênio em ratos submetidos ao exercício de "endurance". Rev. paul. Educ. Fís., v.17, n.2, p.93-103. 2003.

Bell, D. G. e T. M. Mclellan. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. J Appl Physiol, v.93, n.4, Oct, p.1227-34. 2002.

Bircher, S., B. Knechtle, *et al.* Is the intensity of the highest fat oxidation at the lactate concentration of 2 mmol L(-1)? A comparison of two different exercise protocols. Eur J Clin Invest, v.35, n.8, Aug, p.491-8. 2005.

Birkner, E., E. Grucka-Mamczar, *et al.* Influence of sodium fluoride and caffeine on the kidney function and free-radical processes in that organ in adult rats. Biol Trace Elem Res, v.109, n.1, Jan, p.35-48. 2006.

Birnbaum, L. J. e J. D. Herbst. Physiologic effects of caffeine on cross-country runners. J Strength Cond Res, v.18, n.3, Aug, p.463-5. 2004.

Carvalho, J. F., M. O. Masuda, *et al.* Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.140, n.4, Apr, p.409-13. 2005.

Censi, L., E. Toti, *et al.* The basal metabolic rate and energy cost of standardised walking of short and tall men. Eur J Clin Nutr, v.52, n.6, Jun, p.441-6. 1998.

Chapman, R. F. e J. M. Stager. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1080-6. 2008.

Cortright, R. N., M. P. Chandler, *et al.* Daily exercise reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. Physiol Behav, v.62, n.1, Jul, p.105-11. 1997.

Deslandes, A. C., H. Veiga, *et al.* Effects of caffeine on the electrophysiological, cognitive and motor responses of the central nervous system. Braz J Med Biol Res, v.38, n.7, Jul, p.1077-86. 2005.

Doherty, M., P. Smith, *et al.* Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. J Sports Sci, v.22, n.7, Jul, p.637-43. 2004.

Ferreira, J. C., N. P. Rolim, *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.34, n.8, Aug, p.760-5. 2007.

Ferreira, L. G., C. De Toledo Bergamaschi, *et al.* Effects of creatine supplementation on body composition and renal function in rats. Med Sci Sports Exerc, v.37, n.9, Sep, p.1525-9. 2005.

Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.337-50. 2004.

Franco, F. S. C. Efeitos da suplementação de creatina associada ou não à cafeína em ratos submetidos a exercício anaeróbico intermitente. Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2004. 82 p.

Franco, F. S. C., A. J. Natali, *et al.* Efeitos da Suplementação de Creatina e do Treinamento de Potência sobre a Performance e a Massa Corporal Magra de Ratos. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.13, n.5, p.297-302. 2007.

Glaister, M., G. Howatson, *et al.* Caffeine supplementation and multiple sprint running performance. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.10, Oct, p.1835-40. 2008.

Gobatto, C. A., M. A. De Mello, *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.130, n.1, p.21-7. 2001.

Hadjicharalambous, M., E. Georgiades, *et al.* Influence of caffeine on perception of effort, metabolism and exercise performance following a high-fat meal. J Sports Sci, v.24, n.8, Aug, p.875-87. 2006.

Han, L. K., F. Kai, *et al.* [Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats]. Yakugaku Zasshi, v.124, n.11, Nov, p.841-6. 2004.

Harant, I., F. Marion-Latard, *et al.* Effect of a long-duration physical exercise on fat cell lipolytic responsiveness to adrenergic agents and insulin in obese men. Int J Obes Relat Metab Disord, v.26, n.10, Oct, p.1373-8. 2002.

Hartley, T. R., W. R. Lovallo, *et al.* Cardiovascular effects of caffeine in men and women. Am J Cardiol, v.93, n.8, Apr 15, p.1022-6. 2004.

Hespel, P., B. Op't Eijnde, *et al.* Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxation time in humans. J Appl Physiol, v.92, n.2, Feb, p.513-8. 2002.

Hogervorst, E., S. Bandelow, *et al.* Caffeine improves physical and cognitive performance during exhaustive exercise. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.10, Oct, p.1841-51. 2008.

Hongu, N. e D. S. Sachan. Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. J Nutr, v.130, n.2, p.152-7. 2000.

Irving, B. A., C. K. Davis, *et al.* Effect of Exercise Training Intensity on Abdominal Visceral Fat and Body Composition. Med Sci Sports Exerc, Oct 8. 2008.

Iwamoto, J., C. Shimamura, *et al.* Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. J Bone Miner Metab, v.22, n.1, p.26-31. 2004.

Jacobson, T. L., M. A. Febbraio, *et al.* Effect of caffeine co-ingested with carbohydrate or fat on metabolism and performance in endurance-trained men. Exp Physiol, v86 1, 137-44. 2001.

Jansson, J. O., S. Moverare-Skrtic, *et al.* Leukemia inhibitory factor reduces body fat mass in ovariectomized mice. Eur J Endocrinol, v.154, n.2, Feb, p.349-54. 2006.

Kalmar, J. M. e E. Cafarelli. Central fatigue and transcranial magnetic stimulation: effect of caffeine and the confound of peripheral transmission failure. J Neurosci Methods, v.138, n.1-2, Sep 30, p.15-26. 2004.

Kobayashi-Hattori, K., A. Mogi, *et al.* Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet. Biosci Biotechnol Biochem, v.69, n.11, Nov, p.2219-23. 2005.

Lancha Jr, A. H. Obesidade: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro. 2006

Lemieux, C., F. Picard, *et al.* The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. Obes Res, v.11, n.3, Mar, p.477-90. 2003.

Lohman, T. G., K. Ring, *et al.* Relationships among fitness, body composition, and physical activity. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1163-70. 2008.

McLellan, T. M. e D. G. Bell. The impact of prior coffee consumption on the subsequent ergogenic effect of anhydrous caffeine. Int J Sport Nutr Exerc Metab, v.14, n.6, Dec, p.698-708. 2004.

Notomi, T., N. Okimoto, *et al.* Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. J Bone Miner Res, v.18, n.1, Jan, p.140-9. 2003.

O'Connor, P. J., R. W. Motl, *et al.* Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. Pain, v.109, n.3, Jun, p.291-8. 2004.

Ormsbee, M. J., J. P. Thyfault, *et al.* Fat metabolism and acute resistance exercise in trained men. J Appl Physiol, v.102, n.5, May, p.1767-72. 2007.

Paluska, S. A. Caffeine and exercise. Curr Sports Med Rep, v.2, n.4, Aug, p.213-9. 2003.

Philp, A., A. L. Macdonald, *et al.* Lactate--a signal coordinating cell and systemic function. J Exp Biol, v.208, n.Pt 24, Dec, p.4561-75. 2005.

Pikosky, M. A., P. C. Gaine, *et al.* Aerobic exercise training increases skeletal muscle protein turnover in healthy adults at rest. J Nutr, v.136, n.2, Feb, p.379-83. 2006.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Ruxton, C. H. S. The impact of caffeine on mood, cognitive function, performance and hydration: a review of benefits and risks. Nutrition Bulletin, v.33, p.15-25. 2008.

Shinoda, M., M. G. Latour, *et al.* Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. International Journal of Obesity, v.26, p.335-343. 2002.

Short, K. R., J. L. Vittone, *et al.* Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.286, n.1, p.E92-101. 2004.

Wang, S., S. K. Noh, *et al.* Epigallocatechin gallate and caffeine differentially inhibit the intestinal absorption of cholesterol and fat in ovariectomized rats. J Nutr, v.136, n.11, Nov, p.2791-6. 2006.

Wong, P. C., M. Y. Chia, *et al.* Effects of a 12-week exercise training programme on aerobic fitness, body composition, blood lipids and C-reactive protein in adolescents with obesity. Ann Acad Med Singapore, v.37, n.4, Apr, p.286-93. 2008.

Zhang Y, Dong X-L, *et al.* Fructus ligustri lucidi extract improves calcium balance and modulates the calciotropic hormone level and vitamin D-dependent gene expression in aged ovariectomized rats. Menopause, v.5, n.3, p.1-8. 2008.

Zhang, Y., W. P. Lai, *et al.* Effects of Fructus Ligustri Lucidi extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. Biol Pharm Bull, v.29, n.2, Feb, p.291-6. 2006.

CAPÍTULO IV:

EFEITOS DA OVARIECTOMIA, EXERCÍCIO AERÓBICO E INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE A COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATAS WISTAR COM 50% DA RECOMENDAÇÃO DE CÁLCIO ALIMENTAR.

4.1. INTRODUÇÃO.

A ingestão de cálcio por mulheres brasileiras, entre 40 e 80 anos de idade, varia entre 240 a 625 mg/dia (Velásquez-Meléndez, Martins *et al.*, 1997; Montilla, Aldrghi *et al.*, 2004; Batista, Priore *et al.*, 2006), representando uma inadequação dietética de 48 a 80% desse mineral, de acordo com as recomendações do *Institute of Medicine* (Iom, 1998). Além da baixa ingestão de cálcio elevar os riscos de osteoporose (Huang, Chang *et al.*, 2008), recentes estudos têm apontado para a ocorrência de disfunção do metabolismo lipídico, em função da regulação dos conteúdos de cálcio intracelular (Shi, Dirienzo *et al.*, 2001; Zemel, Thompson *et al.*, 2004). Shi *et al.* (2001) estudaram camundongos obesos que consumiram dieta com 0,4 e 1,3% de cálcio dietético, e identificaram que animais que ingeriram baixo teor de cálcio recuperaram o peso e a gordura corporal após restrição calórica, o que não ocorreu com animais que consumiram maior teor de cálcio. Tais achados parecem ser decorrentes da ação anti-lipogênica e lipolítica dos altos conteúdos de cálcio dietético. Portanto, outros estudos são necessários para investigar as possíveis alterações sobre a composição corporal advindas da baixa ingestão de cálcio, em razão do seu potencial na gênese da obesidade.

A obesidade é uma das co-morbidades que ocorrem em função das alterações metabólicas e corporais promovidas pela pós-menopausa (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Huang, Chang *et al.*, 2008; Zhang, Dong *et al.*, 2008). A prevalência da obesidade cresce no mundo, estando associada ao maior risco de diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares

(Flier, 2004; Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005). A obesidade na pós-menopausa acontece em função da maior ingestão de alimentos e à disfunção hormonal, elevando o peso e os estoques de gordura corporal (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Lemieux, Picard *et al.*, 2003; Han, Kai *et al.*, 2004; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006). Embora o estrogênio seja conhecido como um supressor da gordura corporal (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Jansson, Moverare-Skrtic *et al.*, 2006), pouco se sabe sobre os efeitos da ausência do estrogênio causada pela ovariectomia e da baixa ingestão de cálcio sobre a composição corporal, especialmente quando associado ao consumo de cafeína.

A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo (Paluska, 2003; Deslandes, Veiga *et al.*, 2005). Sua ingestão em baixas doses poderia estimular o aumento na taxa de metabolismo basal, a liberação de catecolaminas (Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005; Altimari, Moraes *et al.*, 2006) e aumentar o catabolismo de gordura intra e extra-muscular (Hespeel, Op't Eijnde *et al.*, 2002; Mclellan e Bell, 2004), reduzindo o peso e a gordura corporal. A cafeína também pode alterar a composição corporal por reduzir os conteúdos de água corporal, em função da sua ação diurética (Birnbaum e Herbst, 2004; Ruxton, 2008), além de incrementar a massa magra corporal por melhorar indiretamente o desempenho física (Kalmar e Cafarelli, 2004). Todavia, estes efeitos são ainda controversos (Acheson, Gremaud *et al.*, 2004; Franco, 2004), faltando evidências que suportem estas ações da cafeína sobre a composição corporal de mulheres pós-menopausa com inadequação de cálcio alimentar.

A prática de exercício é importante na melhoria do estilo de vida, promovendo adaptações que elevam a capacidade funcional e a qualidade de vida (Lohman, Ring *et al.*, 2008). O exercício de baixa intensidade apresenta benefícios à composição corporal, sendo recomendado para reduzir o peso e a deposição de gordura, constituindo-se, conseqüentemente, uma estratégia no tratamento da obesidade (Iwamoto, Shimamura *et al.*,

2004; Irving, Davis *et al.*, 2008; Nelson, Sammel *et al.*, 2008). Contudo, pouco se sabe da ação anti-obesidade do exercício aeróbico de baixa intensidade sobre a composição corporal em indivíduos pós-menopausa ingerindo baixo teor de cálcio.

Estudos recentes sugerem que o baixo teor de cálcio dietético apresenta efeito lipogênico, elevando o risco de obesidade. Considerando a baixa ingestão de cálcio por mulheres adultas brasileiras, os riscos de obesidade relacionados à deficiência estrogênica pós-menopausa, poderiam impactar drasticamente sobre a composição corporal e qualidade de vida desta população. Por outro lado, o consumo de produtos ricos em cafeína, como café, chá, entre outros, associado ao hábito cotidiano da prática de atividade física, poderia contrapor ou minimizar os efeitos da baixa ingestão de cálcio e da deficiência estrogênica, reduzindo a deposição de gordura corporal e o risco de obesidade. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da ovariectomia, do exercício aeróbico de baixa intensidade e da ingestão de cafeína sobre a composição corporal em ratas Wistar com 50% da recomendação de cálcio alimentar.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Animais experimentais

O estudo foi realizado com 80 ratas Wistar adultas de 160 dias de idade (peso médio: $274,5 \pm 21,4$ g; média \pm DP), submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou laparotomia (SHAM). Os animais foram previamente anestesiados com Ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) intramuscular, recebendo no pós-operatório a administração subcutânea de anti-inflamatório (Ketofen: 2 mg/kg por 3 dias) e antibiótico (Ampicilina sódica: 30 mg/kg por 5 dias). Após 3 semanas de recuperação, os animais foram alocadas em 8 grupos (n=10), num delineamento fatorial 2 x 2 x 2. Os grupos foram, então, assim constituídos: SSP – SHAM

Sedentária Placebo; SSC – SHAM Sedentária Cafeína; SEP – SHAM Exercitada Placebo; SEC – SHAM Exercitada Cafeína; OSP – OVX Sedentária Placebo; OSC – OVX Sedentária Cafeína; OEP – OVX Exercitada Placebo; e OEC – OVX Exercitadas Cafeína.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, por 8 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60% e fotoperíodo de 12 horas. Os animais receberam diariamente de 18 a 20 gramas de dieta AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) com metade da recomendação de cálcio para estes animais (0,25% de cálcio na dieta), além de água deionizada *ad libitum*.

Os animais de experimentação foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – MG, e os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG (Parecer nº 80/2007).

4.2.2. Administração de cafeína

Diariamente, os animais dos grupos SSC, SEC, OSC e OEC receberam suplementação de 6 mg de cafeína/kg de peso corporal/dia, adicionada à dieta dos animais. Os animais dos grupos SSP, SEP, OSP e OEP receberam apenas a dieta. As doses de suplementação de cafeína foram identificadas em estudos recentes como doses moderadas utilizadas em humanos e animais (Doherty, Smith *et al.*, 2004; Hartley, Lovallo *et al.*, 2004; O'connor, Motl *et al.*, 2004; Hadjicharalambous, Georgiades *et al.*, 2006; Chapman e Stager, 2008; Glaister, Howatson *et al.*, 2008).

4.2.3. Protocolo de exercício

Após um período de 2 semanas de recuperação da cirurgia, 40 animais foram submetidos a um processo de adaptação ao exercício de corrida em esteira (8 m/min 10

min/dia por 5 dias). Em seguida, estes animais foram subdivididos em 4 grupos (SEP, SEC, OEP e OEC) e submetidos a um programa de exercício aeróbico de corrida em esteira exercitando numa velocidade de 16 m/min durante 30 minutos diários, 5 sessões por semana, num período de 8 semanas, conforme adaptação de Iwamoto et al. (2004).

4.2.4. Determinação do coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

O peso corporal foi monitorado semanalmente, usando balança eletrônica digital (Marte - Brasil), onde o ganho de peso corporal foi determinado pela diferença entre os pesos no dia do sacrifício e o da 1ª semana. O consumo de dieta alimentar foi monitorado diariamente, para a determinação do coeficiente de eficiência alimentar por percentagem.

$$\text{CEA\%} = (\text{ganho de peso corporal} / \text{Consumo de dieta}) \times 100$$

As análises de consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar por percentagem foram realizados em 5 animais de cada grupo.

4.2.5. Determinação da composição corporal

Ao final da 8ª semana, os animais sofreram eutanásia com CO₂, e toda gordura visceral foi retirada e pesada. A carcaça vazia (músculos e ossos) foi separada e armazenada em freezer (-20°C) para a determinação das frações: água, gordura, proteínas e cinzas. O percentual hídrico foi avaliado pelo método gravimétrico por evaporação de água em estufa (Fanem – Brasil) a 105°C por 24 horas. O percentual de gordura foi determinado pelo método gravimétrico no aparelho de Soxhlet usando solvente éter etílico por 8 h/extração. O percentual de proteína foi calculado em triplicata pelo método indireto de determinação do nitrogênio (Proteína (g) = nitrogênio (g) x 6,25) através da metodologia de Kjeldahl (Aoac, 1998). O percentual de cinzas foi determinado por incineração à 600°C por 6 horas (Aoac, 1998).

4.2.6. Avaliação do desempenho: concentração de lactato sanguíneo

Na última semana de experimento determinou-se a concentração do lactato sanguíneo dos animais exercitados (grupos SEP, SEC, OEP e OEC), durante a realização de uma sessão de treino. As medidas foram realizadas em 3 momentos: repouso e após 15 e 30 minutos de corrida. A extremidade da cauda foi seccionada com tesoura cirúrgica e o sangue foi coletado para que as concentrações de lactato fossem analisadas no equipamento Accusport BM-Lactate [Roche® - Alemanha] por fitas para determinação de lactato sanguíneo da mesma marca. As análises das concentrações de lactato sanguíneo foram realizadas em 5 animais de cada grupo.

4.2.7. Análise estatística

Após submeter os dados ao teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), aplicou-se análise de variância [ANOVA: three-way para as interações e os 3 fatores; além de one-way para grupos independentes e combinações], Teste-*t* Pareado ou ANOVA One-Way Medidas Repetidas para medidas do mesmo indivíduo, e testes de correlação de Pearson para determinar a relação entre variáveis. Para as análises de múltiplas comparações *post hoc* foi utilizado o teste de Tukey em análises paramétricas e Dunn's em análises não-paramétricas. Os cálculos estatísticos foram realizados no software Sigma Stat 3.0 [SPSS], empregando o nível de significância estatística de $P < 0,05$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Desempenho

Os valores das concentrações de lactato sanguíneo em repouso e após 15 e 30 minutos de corrida estão exibidos na Figura 4.1. Verificou-se elevação significativa na concentração lactato sanguíneo entre os 3 momentos.

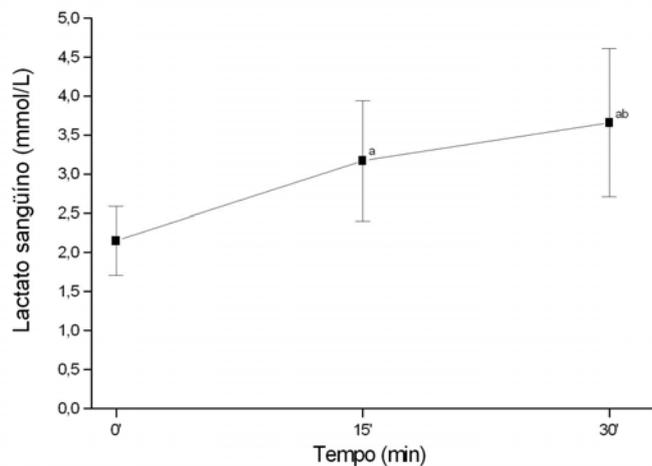


Figura 4.1. Concentrações de lactato sanguíneo nos animais exercitados durante o teste de desempenho. Valores em média±DP. Significância ($P < 0,05$): ^a vs. momento 0', ^b vs. momento 15' (Teste ANOVA Medidas Repetidas).

4.3.2. Peso corporal

Não foi observada diferença ($P > 0,05$; Tabela 4.1) no peso inicial dos animais. Ao final da 8ª semana, não foi identificada interação significativa entre os fatores (Ovário, Exercício e Cafeína) para o peso corporal final e ganho de peso. Porém, verificou-se que os animais dos grupos OVX exibiram maior ganho de peso corporal do que os animais dos grupos SHAM (OSP vs. SSP, OSC vs. SSC, OEP vs. SEP; $P < 0,05$). Constatou-se que nos grupos Placebo e Cafeína, os animais OVX-sedentários ganharam maior peso do que os animais SHAM-exercitados (OSP vs. SEP e OSC vs. SEC; $P < 0,05$). Observou-se ainda que nos grupos Sedentários e Exercitados, os animais OVX-placebo apresentaram maior ganho de peso do que os animais SHAM-cafeína (OSP vs. SSC e OEP vs. SEC; $P < 0,05$; Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Peso corporal inicial e final dos animais.

	SSP	SSC	OSP	OSC	SEP	SEC	OEP	OEC
Peso Inicial	273,8±8,9 ^a	270,4±5,4 ^a	275,9±4,4 ^a	278,3±6,3 ^a	271,1±7,2 ^a	272,5±8,1 ^a	273,7±7,2 ^a	280,2±7,5 ^a
Ganho Peso	25,4±5,7 ^{bcd}	20,2±3,4 ^{bcd}	56,4±3,6 ^a	50,6±5,1 ^a	9,7±7,7 ^b	15,0±6,0 ^{bd}	41,8±6,4 ^{ac}	35,2±3,4 ^{ad}

Valores em média±EPM. Significância (P< 0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SSP (SHAM Sedentário Placebo), SSC (SHAM Sedentário Cafeína), OSP (OVX Sedentário Placebo), OSC (OVX Sedentário Cafeína), SEP (SHAM Exercitado Placebo), SEC (SHAM Exercitado Cafeína), OEP (OVX Exercitado Placebo), OEC (OVX Exercitado Cafeína).

Ao longo do experimento identificou-se que o peso corporal aumentou estatisticamente em todos os animais (Figuras 4.2a, 4.2b e 4.2c). A partir da semana 1, verificou-se que os animais ovariectomizados (OSP+OSC+OEP+OEC) exibiram maior peso corporal ($P < 0,001$) comparado aos SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), conforme ilustrado na Figura 4.2a. Quanto ao exercício, verificou-se que a partir da 6^a semana, os animais exercitados (SEP+SEC+OEP+OEC) apresentaram peso corporal inferior ($P = 0,003$) aos sedentários (SSP+SSC+OSP+OSC; Figura 4.2b). Contudo, não foi identificada alteração significativa no peso corporal ao longo do experimento entre os animais placebo (SSP+SEP+OSP+OEP) e cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC; Figura 4.2c).

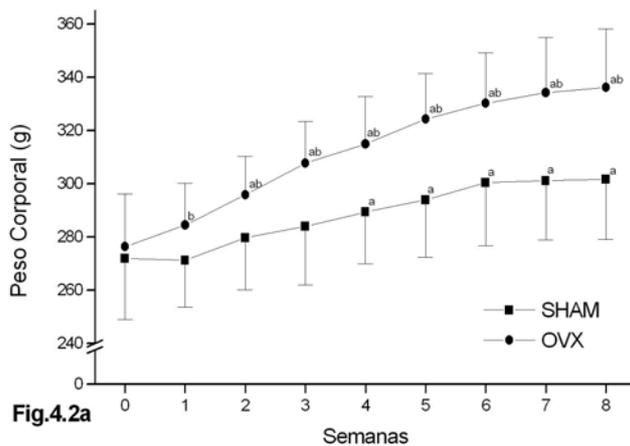


Fig.4.2a

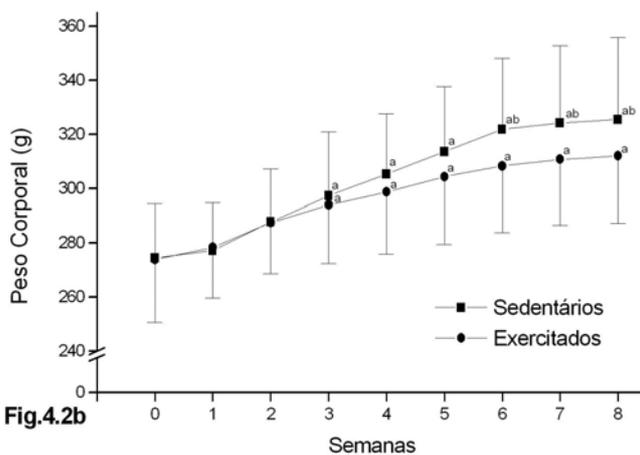
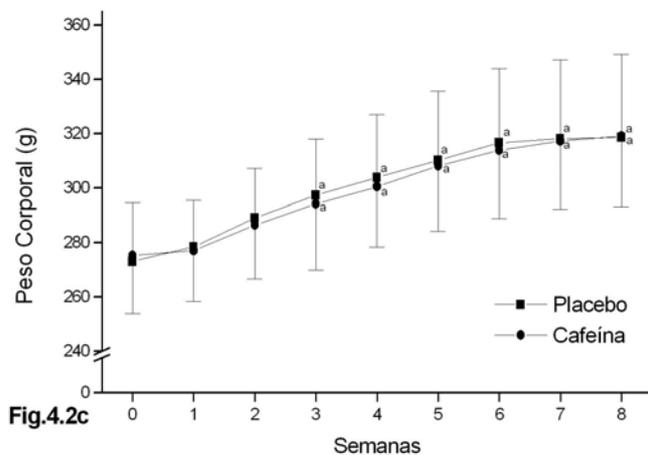


Fig.4.2b



Figuras 4.2a, 4.2b e 4.2c. Peso corporal durante o experimento para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína, respectivamente. Significância ($P < 0,05$): ^a vs. 1^a semana para Teste de ANOVA Medidas Repetidas, ^b vs. SHAM (Figura 4.2a) ou Exercitado (Figura 4.2b) para Teste *t*- Student.

4.3.3. Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

Foi observada correlação positiva (Pearson, $\rho = 0,711$ e $P < 0,001$) entre o ganho de peso corporal ($39,6 \pm 4,0$ g; Média \pm EPM) e o consumo de dieta ($986,5 \pm 8,9$ g) ao longo do experimento. Assim, os dados de ganho de peso corporal foram normalizados pelo consumo de dieta, sendo apresentado como coeficiente de eficiência alimentar em percentagem.

Não foi observada interação significante entre os três fatores para o ganho de peso corporal, consumo de dieta e CEA em percentagem.

O ganho de peso, o consumo de dieta e o CEA foram maiores para os animais OVX-sedentárias comparadas aos SHAM-exerictadas ($P < 0,05$), tanto para nos grupos Placebo quanto Cafeína. Verificou-se, ainda, que nos animais sedentários-placebo esses índices foram

maiores do que nos exercitados-caféina, e que nos animais OVX-placebo foram maiores que nos SHAM-caféina.

Na análise do efeito principal dos fatores observou-se que o ganho de peso, o consumo de dieta e o CEA foram maiores nos animais OVX, sedentários e placebo quando comparados aos animais SHAM, exercitados e caféina, respectivamente (Tabela 4.2), exceto para o ganho de peso corporal no fator Caféina, onde não foi verificada alteração significativa.

Tabela 4.2. Ganho de peso corporal (g), consumo de dieta (g) e coeficiente de eficiência alimentar (%) dos animais.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Caféina	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Caféina
Ganho de Peso Corporal (n=40)	22,2±3,9 ^a	57,0±4,1 ^b	52,2±5,3 ^a	26,9±4,4 ^b	41,3±5,9 ^a	37,8±5,4 ^a
Consumo de Dieta (n=20)	958,2±13,1 ^a	1014,8±8,5 ^b	1013,0±10,4 ^a	960,1±12,1 ^b	1003,2±10,6 ^a	969,8±13,6 ^b
%CEA (n=20)	2,26±0,38 ^a	5,58±0,39 ^b	5,11±0,50 ^a	2,73±0,43 ^b	4,03±0,56 ^a	3,81±0,51 ^b

Valores em média±EPM. Significância (P< 0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+SSC+OSP+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+SEP+OEP+OEC) e Caféina (SSC+SEC+OSC+OEC).

4.3.4. Composição corporal

Foi verificada interação significativa entre os fatores Ovário e Exercício (Tabela 4.3) e entre os fatores Ovário e Caféina (Tabela 4.4), quanto à percentagem de proteína na carcaça. Quanto aos demais fatores, não foram identificadas interações significantes (P > 0,05).

Nos grupos sedentários, os animais OVX apresentaram menores percentagens de proteína do que os animais SHAM, o que não foi identificado entre os animais exercitados. Entre os animais OVX, verificou-se que os exercitados apresentaram maiores percentagens de proteína na carcaça quando comparados aos sedentários, o que não foi visto entre os animais SHAM.

Tabela 4.3. Percentagem de proteína na carcaça vazia dos animais para interação Ovário e Exercício.

		Sedentário	Exercitado
% Proteína (n=20)	SHAM	20,7±0,2 ^{Aa}	20,7±0,2 ^{Aa}
	OVX	19,5±0,2 ^{Ba}	20,5±0,2 ^{Ab}

Valores em média±EPM. Significância (P<0,05): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna para cada fator não diferem entre si pelo teste de Tukey. SHAM-Sedentário (SSP+SSC), SHAM-Exercitado (SEP+SEC), OVX-Sedentário (OSP+OSC), OVX-Exercitado (OEP+OEC). Independente da cafeína.

Nos grupos que receberam cafeína, os animais SHAM apresentaram estatisticamente maiores percentagens de proteína na carcaça do que os animais OVX, efeito não observado entre os grupos placebo. Nos grupos de animais OVX, verificou-se que aqueles que não consumiram cafeína (grupo placebo) exibiram maior percentagem de proteína na carcaça, comparados aos que consumiram cafeína, contudo, essa alteração não foi encontrada nos grupos SHAM (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Percentagem de proteína na carcaça vazia dos animais para interação Ovário e Cafeína.

		Placebo	Cafeína
% Proteína (n=20)	SHAM	20,6±0,1 ^{Aa}	20,8±0,1 ^{Aa}
	OVX	20,4±0,1 ^{Aa}	19,6±0,1 ^{Bb}

Valores em média±EPM. Significância (P<0,05): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey. SHAM-Placebo (SSP+SEP), SHAM-Cafeína (SSC+SEC), OVX-Placebo (OSP+OEP), OVX-Cafeína (OSC+OEC). Independente do exercício.

As análises da composição da massa magra dos animais para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína separadamente estão apresentados na Tabela 4.5. Para o fator Cafeína não foi observada alteração significativa (P > 0,05) nos parâmetros da composição da massa magra.

Quanto ao fator Ovário, identificou-se que os animais OVX apresentaram maiores valores de gordura visceral, peso da carcaça, conteúdos de água e gordura na carcaça e percentagem de gordura na carcaça, quando comparados aos animais SHAM. Todavia, exibiram menores percentagens de água, proteína e de cinzas.

Para o fator Exercício, foi verificado que os animais sedentários apresentaram maior conteúdo de gordura visceral, percentagem e teor de gordura e cinzas, quando comparados aos animais exercitados. No entanto, os resultados mostraram menor percentagem de água e de proteína.

Tabela 4.5. Composição corporal para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Gordura						
Visceral (g)	24,3±8,3 ^a	28,2±7,8 ^b	29,2±9,2 ^a	23,3±5,8 ^b	26,6±9,2 ^a	25,9±7,2 ^a
Peso da						
Carcaça (g)	134,3±9,3 ^a	144,5±11,7 ^b	140,2±11,7 ^a	138,6±11,8 ^a	140,5±11,4 ^a	138,2±12,0 ^a
Conteúdo de						
Água (g)	89,8±5,9 ^a	95,1±9,1 ^b	91,7±8,0 ^a	93,1±8,2 ^a	93,4±7,7 ^a	91,5±8,3 ^a
Água na						
Carcaça (%)	66,9±1,4 ^a	65,7±2,2 ^b	65,4±2,1 ^a	67,2±1,3 ^b	66,5±1,8 ^a	66,2±2,1 ^a
Conteúdo de						
Gordura (g)	8,5±2,6 ^a	12,2±0,2 ^b	12,3±3,8 ^a	8,4±2,4 ^b	10,2±3,6 ^a	10,5±3,9 ^a
Gordura na						
Carcaça (%)	6,4±1,8 ^a	8,5±2,8 ^b	8,7±2,6 ^a	6,1±1,7 ^b	7,2±2,5 ^a	7,6±2,7 ^a
Conteúdo de						
Proteína (g)	27,8±2,3 ^a	28,9±3,2 ^a	28,2±2,6 ^a	28,6±3,0 ^a	28,8±2,6 ^a	27,9±2,9 ^a
Proteína na						
Carcaça (%)	20,7±0,8 ^a	20,0±1,1 ^b	20,1±1,1 ^a	20,6±0,8 ^b	20,5±1,0 ^a	20,2±1,0 ^a
Conteúdo de						
Cinzas (g)	7,07±0,70 ^a	7,20±0,61 ^a	7,31±0,73 ^a	6,95±0,52 ^b	7,20±0,61 ^a	7,07±0,70 ^a
Cinzas na						
Carcaça (%)	5,27±0,35 ^a	5,01±0,44 ^b	5,23±0,43 ^a	5,05±0,38 ^b	5,16±0,41 ^a	5,12±0,42 ^a

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+SSC+OSP+OSC),

Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+SEP+OSP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

4.4- DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da ovariectomia, do exercício aeróbico e da ingestão de cafeína sobre a composição corporal em ratas com inadequação de cálcio dietético. Comparados aos padrões de alterações observadas no capítulo anterior, verificou-se que a baixa ingestão de cálcio (capítulo IV: 50% de cálcio) não promoveu alterações representativas quando comparadas à ingestão adequada de cálcio (capítulo III: 100% Cálcio). Além dos mesmos resultados verificados no capítulo III, observou-se que a percentagem de proteína na carcaça apresentou interações significantes entre os fatores Ovário-Exercício e Ovário-Cafeína. A proteína na carcaça reduziu significativamente em função da ovariectomia e do sedentarismo; como também em função da ovariectomia e do consumo de cafeína.

Os resultados deste experimento mostraram que a concentração de lactato elevou significativamente entre os 3 momentos (Figura 4.1), porém, não extrapolando os valores determinados como limiar de lactato de ~4 mmol/L (Philp, Macdonald *et al.*, 2005), conforme apresentado no capítulo III. A deficiência de cálcio dietético (ingestão de 50% de cálcio) não alterou o padrão de resposta ao lactato sangüíneo durante o exercício realizado aqui, quando comparado às respostas vistas no capítulo anterior.

A cirurgia de ovariectomia e o sedentarismo favoreceram um aumento no peso final e ganho de peso corporal durante o experimento (Figuras 4.2a e 4.2b e Tabela 4.2). Contudo, a ingestão de cafeína não afetou estes indicadores (Figura 4.2c e Tabela 4.2). O tratamento dos animais com metade de suas recomendações de cálcio não alterou o padrão de mudanças

sobre o peso corporal em razão dos fatores Ovário, Exercício e Cafeína, pois, estes resultados foram idênticos aos observados no capítulo III.

Estes achados não suportam a hipótese de que a ingestão deficiente de cálcio dietético eleva o peso corporal e a deposição de gordura. Apesar de alguns estudos sugerirem que a suplementação de cálcio pode reduzir o peso corporal de indivíduos obesos (Zemel, Shi *et al.*, 2000; Shi, Dirienzo *et al.*, 2001; Zemel, Thompson *et al.*, 2004), em função do cálcio regular o metabolismo lipídico. Outros estudos com humanos (Koh-Banerjee, Ferreira *et al.*, 2005; Bass, Naughton *et al.*, 2007) e animais (Welch, Turner *et al.*, 2008; Zhang, Dong *et al.*, 2008), fornecendo diferentes teores de cálcio na dieta, não demonstraram alterações significantes sobre o peso corporal em virtude ao maior consumo de cálcio dietético. Zhang *et al.* (2008), estudando ratas Wistar OVX e SHAM consumindo 0,1, 0,6 e 1,2% de cálcio na dieta, observaram que as ratas OVX apresentaram maior ganho de peso corporal comparadas as SHAM, porém, não verificaram diferença sobre o ganho de peso corporal para as diferentes concentrações de cálcio na dieta. Assim, estudos investigando os efeitos de diferentes teores de cálcio alimentar sobre o balanço e absorção de cálcio, conteúdo de cálcio ósseo e marcadores do metabolismo lipídicos, entre outros poderiam ajudar a elucidar as possíveis explicações para estes resultados contraditórios.

O ganho de peso, o consumo de dieta e o coeficiente de eficiência alimentar dos animais SHAM e exercitados foram menores quando comparados aos seus controles (Tabela 4.2). Os valores destes indicadores não variaram em grandes magnitudes em relação aos dados do capítulo anterior, o que não poderia confirmar a suposta ação anti-lipogênica e lipolítica da maior quantidade de cálcio intracelular. Isto evidencia que, independente da adequação ou não de cálcio dietético, a ovariectomia e o sedentarismo seriam aspectos diretamente relacionados com os riscos de obesidade.

Verificou-se ainda que a ingestão de cafeína reduziu o consumo de dieta e CEA, entretanto, a amplitude desta diferença seria muito pequena para extrapolar a efeitos biológicos, principalmente por não observar variações no peso corporal (Figura 4.2c), ganho peso (Tabela 4.2) e peso da carcaça e suas frações (Tabela 4.5) em função ao consumo de cafeína.

Neste estudo a soma das percentagens de água, gordura, proteína e cinzas na carcaça foi ~99,4% (Tabela 4.5), sendo os ~0,6% restantes sugerem à fração de glicogênio muscular, não analisada neste experimento. Tais valores são similares aos encontrados por outros autores (Cortright, Chandler *et al.*, 1997; Franco, Natali *et al.*, 2007).

Nossos resultados apontaram para interações significantes entre Ovário-Exercício e Ovário-Cafeína (Tabelas 4.3 e 4.4). As interações observadas são coerentes aos achados para efeito principal dos fatores, exceto para o fator Cafeína. Estes achados propõem que a perda de massa magra seria maior em indivíduos sedentários deficientes de estrogênio, como também em indivíduos deficientes de estrogênio consumindo cafeína. Desta forma, a prática do exercício aeróbico de baixa intensidade e abstinência ao consumo de produtos ricos em cafeína poderiam prevenir a perda de massa protéica muscular promovida pela deficiência estrogênica, quando estes indivíduos apresentam uma inadequação alimentar de cálcio.

O efeito preventivo da prática do exercício aeróbico sobre a massa magra pode ser justificado devido ao fato do exercício apresentar um estímulo anabólico elevando a síntese protéica (Short, Vittone *et al.*, 2004; Pikosky, Gaine *et al.*, 2006; Wong, Chia *et al.*, 2008). Short *et al.* (2004) demonstraram que o envelhecimento favorece a perda de massa magra, e que o treinamento do exercício aeróbico em cicloergômetro a 70% da taxa cardíaca máxima por 20 minutos 3 vezes por semana foi suficiente para prevenir a perda na massa magra induzida pela idade. A quantidade de massa magra depende do *turnover* protéico e do balanço entre a síntese protéica e sua degradação. Desta forma, em nosso estudo identificou-se que o

balanço protéico foi positivo, porém, não há como afirmar se isto foi decorrente da maior síntese ou da menor degradação protéica.

A perda de proteína promovida pela ovariectomia observada neste estudo poderia ser justificada em função da redução na massa magra induzida pela idade (Short, Vittone *et al.*, 2004). Balagopal *et al.* (1997) verificaram que um declínio na taxa de síntese da miosina de cadeia pesada implicou numa redução da habilidade contrátil muscular contribuindo para uma diminuição na massa muscular e função contrátil em idosos, justificando parcialmente nossos achados. Porém, não é possível concluir com esse estudo se estas alterações na fração protéica foram promovidas pelos processos de envelhecimento ou pela deficiência de estrogênio propriamente dita, e/ou subsequente cadeia de distúrbios hormonais.

Não se tem conhecimento dos possíveis mecanismos pelos quais a ingestão de cafeína prejudica a fração protéica muscular. Além disso, a deficiência de cálcio alimentar não afetou a resposta da administração de cafeína sobre os demais parâmetros da composição corporal (Tabela 4.5). Assim, nestas circunstâncias experimentais, não há evidências dos supostos efeitos da cafeína como inibidor da fosfodiesterase, estimulador da liberação e oxidação de lipídios, e conseqüentemente, um potente agente anti-obesidade (Deslandes, Veiga *et al.*, 2005; Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005; Altimari, Moraes *et al.*, 2006).

Neste estudo, como no capítulo anterior, foi verificado que a gordura visceral e da carcaça representaram as principais modificações observadas sobre a composição corporal em função da ovariectomia e da prática do exercício. A deficiência de estrogênio promove distúrbios hormonais (Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Han, Kai *et al.*, 2004) e a prática do exercício aeróbico por eleva o gasto energético (Harant, Marion-Latard *et al.*, 2002; Ormsbee, Thyfault *et al.*, 2007). Contudo, neste experimento forneceu-se apenas a metade da recomendação de cálcio para as ratas, o que pode afetar o metabolismo de lipídios. Segundo Shi *et al.* (2001), o estado de cálcio intracelular regula um incremento da lipogênese e inibe a

lipólise, daí uma reduzida ingestão de cálcio poderia elevar a deposição de gordura corporal. Entretanto, Koh-Banerjee et al. (2005) avaliaram a suplementação de piruvato de cálcio (2500 mg de cálcio) durante o treinamento sobre a composição corporal em mulheres com moderado sobrepeso (33 anos de idade e IMC 27) durante 30 dias. Os autores não verificaram alteração do peso corporal, massa gorda e magra e % de gordura em razão da suplementação de piruvato de cálcio. Como os valores das frações água, gordura, proteína e cinzas da composição corporal não modificaram no presente experimento, acredita-se que a ação da maior ingestão de cálcio em promover uma redução no peso e deposição de gordura seria mediada por outros mecanismos.

Extrapolando nossos resultados para a realidade da população brasileira poderíamos inferir que indivíduos ingerindo 50% da recomendação de cálcio dietético e deficiência de estrogênio apresentariam maiores riscos de perda de massa magra corporal, podendo ser o quadro atenuado pela prática do exercício aeróbico e a abstinência ao consumo de cafeína. Independente de a maior ingestão alimentar, a osteoporose induzida pela ovariectomia estimulou a obesidade, e o treinamento físico aeróbico favoreceu a perda de peso e gordura corporal. Todavia, a administração de cafeína não promoveu ação anti-obesidade.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acheson, K. J., G. Gremaud, *et al.* Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? American Journal of Clinical Nutrition, v.79, n.1, p.40-6. 2004.

Altimari, L. R., A. C. Moraes, *et al.* Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.42, n.1, p.17-27. 2006.

Aoac. Official methods of analysis. Washington, D.C. 1998

Balagopal, P., O. E. Rooyackers, *et al.* Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. Am J Physiol, v.273, n.4 Pt 1, Oct, p.E790-800. 1997.

Bass, S. L., G. Naughton, *et al.* Exercise and calcium combined results in a greater osteogenic effect than either factor alone: a blinded randomized placebo-controlled trial in boys. J Bone Miner Res, v.22, n.3, Mar, p.458-64. 2007.

Batista, M. C. R., S. E. Priore, *et al.* Avaliação Dietética dos Pacientes Detectados Com Hiperglicemia na “Campanha de Detecção de Casos Suspeitos de Diabetes” no Município de Viçosa, MG. Arq Bras Endocrinol Metab, v.50, n.6, p.1041-9. 2006.

Birnbaum, L. J. e J. D. Herbst. Physiologic effects of caffeine on cross-country runners. J Strength Cond Res, v.18, n.3, Aug, p.463-5. 2004.

Chapman, R. F. e J. M. Stager. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1080-6. 2008.

Cortright, R. N., M. P. Chandler, *et al.* Daily exercise reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. Physiol Behav, v.62, n.1, Jul, p.105-11. 1997.

Deslandes, A. C., H. Veiga, *et al.* Effects of caffeine on the electrophysiological, cognitive and motor responses of the central nervous system. Braz J Med Biol Res, v.38, n.7, Jul, p.1077-86. 2005.

Doherty, M., P. Smith, *et al.* Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. J Sports Sci, v.22, n.7, Jul, p.637-43. 2004.

Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.337-50. 2004.

Franco, F. S. C. Efeitos da suplementação de creatina associada ou não à cafeína em ratos submetidos a exercício anaeróbico intermitente. Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2004. 82 p.

Franco, F. S. C., A. J. Natali, *et al.* Efeitos da Suplementação de Creatina e do Treinamento de Potência sobre a Performance e a Massa Corporal Magra de Ratos. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.13, n.5, p.297-302. 2007.

Glaister, M., G. Howatson, *et al.* Caffeine supplementation and multiple sprint running performance. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.10, Oct, p.1835-40. 2008.

Hadjicharalambous, M., E. Georgiades, *et al.* Influence of caffeine on perception of effort, metabolism and exercise performance following a high-fat meal. J Sports Sci, v.24, n.8, Aug, p.875-87. 2006.

Han, L. K., F. Kai, *et al.* [Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats]. Yakugaku Zasshi, v.124, n.11, Nov, p.841-6. 2004.

Harant, I., F. Marion-Latard, *et al.* Effect of a long-duration physical exercise on fat cell lipolytic responsiveness to adrenergic agents and insulin in obese men. Int J Obes Relat Metab Disord, v.26, n.10, Oct, p.1373-8. 2002.

Hartley, T. R., W. R. Lovallo, *et al.* Cardiovascular effects of caffeine in men and women. Am J Cardiol, v.93, n.8, Apr 15, p.1022-6. 2004.

Hespeel, P., B. Op't Eijnde, *et al.* Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxation time in humans. J Appl Physiol, v.92, n.2, Feb, p.513-8. 2002.

Huang, T.-H., F.-L. Chang, *et al.* Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone growing male Wistar rats. J Bone Miner Metab, v.26, p.350-357. 2008.

IOM. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamine D and Fluoride. Washington, D.C.: The National Academic Press. 1998. 489 p. (Dietary Reference Intakes)

Irving, B. A., C. K. Davis, *et al.* Effect of Exercise Training Intensity on Abdominal Visceral Fat and Body Composition. Med Sci Sports Exerc, Oct 8. 2008.

Iwamoto, J., C. Shimamura, *et al.* Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. J Bone Miner Metab, v.22, n.1, 26-31. 2004.

Jansson, J. O., S. Moverare-Skrtic, *et al.* Leukemia inhibitory factor reduces body fat mass in ovariectomized mice. Eur J Endocrinol, v.154, n.2, Feb, p.349-54. 2006.

Kalmar, J. M. e E. Cafarelli. Central fatigue and transcranial magnetic stimulation: effect of caffeine and the confound of peripheral transmission failure. J Neurosci Methods, v.138, n.1-2, Sep 30, p.15-26. 2004.

Kobayashi-Hattori, K., A. Mogi, *et al.* Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet. Biosci Biotechnol Biochem, v.69, n.11, Nov, p.2219-23. 2005.

Koh-Banerjee, P. K., M. P. Ferreira, *et al.* Effects of calcium pyruvate supplementation during training on body composition, exercise capacity, and metabolic responses to exercise. Nutrition, v.21, n.3, Mar, p.312-9. 2005.

Lemieux, C., F. Picard, *et al.* The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. Obes Res, v.11, n.3, Mar, p.477-90. 2003.

Lohman, T. G., K. Ring, *et al.* Relationships among fitness, body composition, and physical activity. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1163-70. 2008.

McLellan, T. M. e D. G. Bell. The impact of prior coffee consumption on the subsequent ergogenic effect of anhydrous caffeine. Int J Sport Nutr Exerc Metab, v.14, n6, 698-708. 2004.

Montilla, R. N. G., J. M. A. Aldrghi, *et al.* Relação cálcio/proteína da dieta de mulheres no climatério. Rev Assoc Med Bras, v.50, n.1, p.52-4. 2004.

Nelson, D. B., M. D. Sammel, *et al.* Effect of Physical Activity on Menopausal Symptoms among Urban Women. Med. Sci. Sports Exerc., v.40, n.1, p.50-58. 2008.

Notomi, T., N. Okimoto, *et al.* Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. J Bone Miner Res, v.18, n.1, Jan, p.140-9. 2003.

O'connor, P. J., R. W. Motl, *et al.* Dose-dependent effect caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. Pain, v.109, n.3, p.291-8. 2004.

Ormsbee, M. J., J. P. Thyfault, *et al.* Fat metabolism and acute resistance exercise in trained men. J Appl Physiol, v.102, n.5, May, p.1767-72. 2007.

Paluska, S. A. Caffeine and exercise. Curr Sports Med Rep, v.2, n.4, Aug, p.213-9. 2003.

Philp, A., A. L. Macdonald, *et al.* Lactate--a signal coordinating cell and systemic function. J Exp Biol, v.208, n.Pt 24, Dec, p.4561-75. 2005.

Pikosky, M. A., P. C. Gaine, *et al.* Aerobic exercise training increases skeletal muscle protein turnover in healthy adults at rest. J Nutr, v.136, n.2, Feb, p.379-83. 2006.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Ruxton, C. H. S. The impact of caffeine on mood, cognitive function, performance and hydration: a review of benefits and risks. Nutrition Bulletin, v.33, p.15-25. 2008.

Shi, H., D. Dirienzo, *et al.* Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. Faseb J, 15, 2, 291-3. 2001.

Shinoda, M., M. G. Latour, *et al.* Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. International Journal of Obesity, v.26, p.335-343. 2002.

Short, K. R., J. L. Vittone, *et al.* Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.286, n.1, Jan, p.E92-101. 2004.

Velásquez-Meléndez, G., I. S. Martins, *et al.* Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública, v.31, n.2, p.157-162. 1997.

Welch, J. M., C. H. Turner, *et al.* High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. Bone, v.42, n.4, p.660-8. 2008.

Wong, P. C., M. Y. Chia, *et al.* Effects of a 12-week exercise training programme on aerobic fitness, body composition, blood lipids and C-reactive protein in adolescents with obesity. Ann Acad Med Singapore, v.37, n.4, Apr, p.286-93. 2008.

Zemel, M. B., H. Shi, *et al.* Regulation of adiposity by dietary calcium. FASEB J, v.14, p.1132-8. 2000.

Zemel, M. B., W. Thompson, *et al.* Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. Obes Res, v.12, n.4, Apr, p.582-90. 2004.

Zhang, Y., X.-L. Dong, *et al.* Fructus ligustri lucidi extract improves calcium balance and modulates the calciotropic hormone level and vitamin D-dependent gene expression in aged ovariectomized rats. Menopause, v.5, n.3, p.1-8. 2008.

CAPÍTULO V:

A INFLUÊNCIA DA OVARIETOMIA E DA INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS WISTAR EXERCITADAS OU NÃO.

5.1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença complexa atribuída à idade, deficiência estrogênica pós-menopausa e desordens clínicas, tendo grande impacto sócio-econômico e de saúde pública (Flier, 2004; Kobayashi-Hattori, Mogi *et al.*, 2005). É caracterizada pela perda de massa óssea (Honda, Sogo *et al.*, 2003; O'loughlin e Morris, 2003; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007), resultando no incremento da fragilidade e suscetibilidade à fratura (Hara, Kobayashi *et al.*, 2007; Dai, Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008). A deficiência de estrogênio pós-menopausa causa aumento no *turnover* ósseo (Rapuri, Kinyamu *et al.*, 2002; Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008), promovendo o desequilíbrio no remodelamento ósseo, onde a reabsorção sobressai à formação óssea (Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; D'amelio, Grimaldi *et al.*, 2008). Suas conseqüências sobre o tecido ósseo em mulheres pós-menopausa e ratas ovariectomizadas (OVX) tem sido largamente estudadas (Chubak, Ulrich *et al.*, 2006; Dai, Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Kim *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008), porém, ainda pouco investigadas quando combinada à ingestão de cafeína, que tem sido associada à perda de massa óssea.

A cafeína, principal componente do café e chá, é a substância psicoativa mais consumida no mundo (Paluska, 2003; Deslandes, Veiga *et al.*, 2005; Altimari, Moraes *et al.*, 2006). Seu consumo tem sido associado com a perda de massa óssea (Jasminka, Brownbill *et al.*, 2002; Massey e Sutton, 2004; Tsuang, Sun *et al.*, 2006), em função da maior excreção de cálcio urinário (Chen e Whitford, 1999; Heaney e Rafferty, 2001). Também é mencionado que a cafeína poderia inibir a mineralização óssea, diferenciação de osteoblastos e formação da matriz extracelular (Massey e Sutton, 2004), podendo agravar o risco de osteoporose

devido às alterações na microestrutura, redução na densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo de mineral ósseo (CMO) (Chen e Whitford, 1999; Dew, Day *et al.*, 2007), resultando numa maior suscetibilidade à fratura (Rapuri, Gallagher *et al.*, 2001; Heaney, 2002; Tsuang, Sun *et al.*, 2006). Todavia, outros estudos não identificaram efeitos deletérios da cafeína sobre o tecido ósseo (Lloyd, Johnson-Rollings *et al.*, 2000; Rico, Canal *et al.*, 2002). Portanto, os resultados dos estudos com cafeína sobre o tecido ósseo são controversos e não conclusivos, especialmente quando associada à deficiência estrogênica.

O exercício promove adaptações positivas ao osso, especialmente para a prevenção e tratamento da osteoporose (Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Park, Kim *et al.*, 2008). O estresse mecânico gerado pelo exercício constitui um dos mais importantes estímulos para a formação óssea (Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Rittweger, Frost *et al.*, 2005; Turner e Robling, 2005; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007), tendo um papel decisivo na prevenção da perda óssea em mulheres pós-menopausa e em ratas OVX (Barengolts, Kouznetsova *et al.*, 1996; Honda, Sogo *et al.*, 2003; Fuchs, Shea *et al.*, 2007). Nesta população, diferentes tipos de exercício como o exercício de força (Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Figard, Mougín *et al.*, 2007), caminhada (Tosun, Bolukbasi *et al.*, 2006), corrida (Iwamoto, Yeh *et al.*, 2000; Huang, Lin *et al.*, 2003; Fuchs, Shea *et al.*, 2007), natação (Hart, Shaw *et al.*, 2001) e saltos verticais (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007) promovem benefícios sobre o tecido ósseo. Benefícios estes que ocorrem sobre o peso (Iwamoto, Yeh *et al.*, 2000; Huang, Lin *et al.*, 2003), densidade e conteúdo mineral (Fuchs, Shea *et al.*, 2007; Nordstrom, Hogstrom *et al.*, 2008; Park, Kim *et al.*, 2008), resistência (Barengolts, Kouznetsova *et al.*, 1996; Honda, Sogo *et al.*, 2003; Huang, Lin *et al.*, 2003) e marcadores de remodelamento ósseos (Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004; Tosun, Bolukbasi *et al.*, 2006; Figard, Mougín *et al.*, 2007; Park, Kim *et al.*, 2008). Contudo, outros estudos não verificaram

alguns destes benefícios (Maimoun, Simar *et al.*, 2005; Chubak, Ulrich *et al.*, 2006; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Huang, Chang *et al.*, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a prática de exercício aeróbico (caminhar, pedalar, correr, etc.) de baixa intensidade, pelo menos 5 sessões de 30 minutos por semana como forma de melhorar a qualidade de vida. O efeito do exercício sobre o tecido ósseo varia conforme o tipo, intensidade, duração e frequência do exercício (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007). Estudos relatam que ratas treinadas em esteira exibiram aumento na força de fratura óssea quando exercitavam a 24 m/min por 60 min/dia (Fuchs, Shea *et al.*, 2007), porém, não verificaram tais benefícios se treinadas a 13 m/min por 60 min/dia (Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007). No entanto, ainda não se conhece o efeito do programa de exercício em baixa intensidade (16 m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana) sobre o tecido ósseo, como também seus efeitos em indivíduos deficientes de estrogênio consumindo cafeína. Assim, este estudo investigou o efeito da ovariectomia e ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo em ratas treinadas aerobicamente conforme recomendação da OMS para a melhoria da qualidade de vida.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Animais experimentais

O estudo foi realizado com 80 ratas Wistar adultas de 160 dias de idade (peso médio: $275,4 \pm 22,8$ g; média \pm DP), submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou laparotomia (SHAM). Os animais foram previamente anestesiados com Ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) intramuscular, recebendo no pós-operatório administração subcutânea de anti-inflamatório (Ketofen: 2 mg/kg por 3 dias) e antibiótico (Ampicilina sódica: 30 mg/kg por 5 dias). Após 3 semanas de recuperação, os animais foram alocadas em 8 grupos (n=10), num

delineamento fatorial 2 x 2 x 2. Os grupos foram, então, assim constituídos: SSP – SHAM Sedentária Placebo; SSC – SHAM Sedentária Cafeína; SEP – SHAM Exercitada Placebo; SEC – SHAM Exercitada Cafeína; OSP – OVX Sedentária Placebo; OSC – OVX Sedentária Cafeína; OEP – OVX Exercitada Placebo; e OEC – OVX Exercitadas Cafeína.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, por 8 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de 22±2°C, umidade relativa de cerca de 60% e fotoperíodo de 12 horas, além de receberem diariamente de 18 a 20 gramas de dieta AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) e água deionizada *ad libitum*.

Os animais foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – MG (Brasil), e os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG (Parecer nº 80/2007).

5.2.2. Administração de cafeína

Diariamente, os animais dos grupos SSC, OSC, SEC e OEC receberam suplementação de 6 mg de cafeína/kg de peso corporal/dia, adicionada à dieta dos animais. Os animais dos grupos SSP, OSP, SEP e OEP receberam apenas a dieta (placebo). As doses de suplementação de cafeína foram identificadas em estudos recentes como doses moderadas utilizadas em humanos e animais (Doherty, Smith *et al.*, 2004; Hartley, Lovallo *et al.*, 2004; O'connor, Motl *et al.*, 2004; Hadjicharalambous, Georgiades *et al.*, 2006; Chapman e Stager, 2008; Glaister, Howatson *et al.*, 2008).

5.2.3. Protocolo de exercício

Após um período de 2 semanas de recuperação da cirurgia, 40 animais foram submetidos a um processo de adaptação ao exercício de corrida em esteira (8 m/min 10

min/dia por 5 dias). Em seguida, foram subdivididos em 4 grupos (SEP, OEP, SEC e OEC) e submetidos a um programa de exercício aeróbico de corrida em esteira exercitando numa velocidade de 16 m/min durante 30 minutos diários, 5 sessões por semana, num período de 8 semanas, conforme adaptação de Iwamoto et al. (2004).

5.2.4. Avaliação da resistência óssea

Após a eutanásia com CO₂, o fêmur direito foi imediatamente dissecado para análises seguintes. O comprimento e a espessura do fêmur foram avaliados utilizando-se paquímetro. O peso ósseo foi aferido em balança de precisão em miligrama.

Para a análise da resistência à fratura óssea utilizou-se o teste de fratura por três pontos no aparelho texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc. – USA). Cada extremidade óssea ficou apoiada sobre hastes inoxidáveis separadas por 2,0 cm de distância, onde uma terceira haste, apoiada sobre o ponto intermédio ósseo, realizou uma força necessária para se alcançar a fratura (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Shiga, Hara *et al.*, 2003; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007).

5.2.5. Determinação do conteúdo mineral ósseo

Após a eutanásia, a tíbia direita foi retirada, pesada e digerida em ácido nítrico concentrado por 24 horas, em seguida, transferido para um balão volumétrico de 50 mL contendo 0,5 mL de coreto de estrôncio ao qual foi completado com água deionizada para posterior determinação de cálcio, zinco e magnésio por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA) (Silva, 1990; Huang, Yang *et al.*, 2002). As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada por Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 1998).

5.2.6. Determinação do cálcio urinário

A urina dos animais foi coletada por 1 dia na 8ª semana experimental num período de 24 horas utilizando-se gaiolas metabólicas individuais. O volume de urina coletado foi completado para 10 mL com água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2.865 gravidades (Excelsa-Fanem-Brasil). Após a centrifugação foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20 µL/mL) para a conservação da amostra.

Uma alíquota do sobrenadante da urina centrifugada foi digerida em ácido nítrico concentrado por 24 horas e, em seguida, transferido para um balão volumétrico de 50 mL contendo 0,5 mL de coreto de estrôncio e completado com água deionizada para posterior determinação de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA) (Silva, 1990). As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada por Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 1998).

Outra alíquota de 50 µL foi pipetada numa cubeta diluída por 500 µL de água deionizada para a determinação da creatinina urinária pelo método automatizado de espectrometria de UV/VIS, segundo Henry et al. (Henry, Cannon *et al.*, 1974). As análises foram realizadas utilizando kits da marca Bioclin[®] no equipamento ALIZÉ[®] (Biomérieux-França) do Laboratório Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa.

5.2.7. Determinação de marcadores bioquímicos ósseos

Após a eutanásia, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para a obtenção do soro e posterior determinação do conteúdo de fosfatase alcalina óssea (Ostase[®], Beckman Coulter – USA) por imunoensaio (Access[®] - USA), pela técnica de quimioluminescência indireta, a partir da curva padrão de 6 pontos. Os resultados da fosfatase alcalina óssea foram obtidos em picograma / mililitro (pg/mL).

Uma alíquota da urina de 24 horas, coletada e armazenada à -80°C, foi analisada quanto ao teor do teleopeptídeo N-terminal do colágeno tipo I (NTx) por meio de teste ELISA usando kit Osteomark[®] (EIA, USA). Os valores do NTx foram apresentados como nanomol de equivalente de colágeno ósseo / milimol de creatinina (nM BCE/ mM Creatinina). O conteúdo de creatinina urinária para este cálculo foi determinado conforme referido no item 2.6.

5.2.8. Análise estatística

Após submeter os dados ao teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), aplicou-se análise de variância (ANOVA: three-way para as interações e os 3 fatores; além de one-way para grupos independentes e combinações) e testes de correlação de Pearson para determinar a relação entre variáveis. Para as análises de múltiplas comparações *post hoc* foi utilizado o teste de Tukey em análises paramétricas e Dunn's em análises não-paramétricas. Os cálculos estatísticos foram realizados no software Sigma Stat 3.0 [SPSS], empregando o nível de significância estatística de $P < 0,05$.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Peso Corporal

Não foi observada diferença ($P > 0,05$; Tabela 5.1) no peso inicial dos animais. Ao final da 8ª semana, não foi identificada interação significativa entre os fatores (Ovário, Exercício e Cafeína) para o peso corporal final e ganho de peso. Porém, verificou-se nos animais que consumiram cafeína ou não, que a combinação de OVX e sedentarismo resultaram em maior ganho de peso corporal que o SHAM e exercício (OSP vs. SEP e OSC vs. SEC, Tabela 5.1; $P < 0,05$). Verificou-se ainda que em animais sedentários, a combinação

OVX-Cafeína elevou o peso corporal quando comparado ao SHAM-Placebo (OSC vs. SSP; $P < 0,05$), e que entre os animais Sedentários-Placebo, os OVX exibiram maiores ganhos de peso do que os SHAM (OSP vs. SSP; $P < 0,05$).

5.3.2. Resistência óssea

Os dados de resistência óssea foram normalizados pelos pesos corporal e do fêmur, sendo apresentados de forma absoluta e relativa. Os valores do peso do fêmur foram divididos pelos valores do peso corporal e apresentados na forma de peso ósseo relativo. Os valores de espessura, comprimento e força de fratura foram divididos pelos valores do peso do fêmur apresentados na forma de espessura, comprimento e força de fratura óssea relativa.

Não foram observadas interações significantes ($P > 0,05$) nos indicadores de resistência óssea entre os fatores. Assim, as análises da resistência óssea dos animais para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína separadamente estão apresentados na Tabela 5.2. Não foi observada alteração significativa ($P > 0,05$) na resistência óssea para o fator Cafeína.

Quanto ao fator Ovário, os animais OVX apresentaram maior ($P < 0,05$) espessura e comprimento ósseo relativo quando comparados aos animais SHAM. Porém, exibiram menor peso absoluto e relativo, além de menor força de fratura óssea absoluta e relativa.

Tabela 5.1. Peso corporal inicial e final dos animais.

	SSP	SSC	SEP	SEC	OSP	OSC	OEP	OEC
Peso Inicial	273,4±5,2 ^a	272,6±5,5 ^a	270,7±8,0 ^a	270,7±7,6 ^a	279,2±6,9 ^a	279,0±6,0 ^a	278,9±8,3 ^a	278,7±10,6 ^a
Ganho Peso	35,5±3,6 ^{bc}	42,1±3,5 ^{ac}	26,8±8,8 ^{bc}	33,0±5,4 ^{bc}	64,7±4,7 ^a	63,6±2,6 ^a	54,3±8,9 ^{ac}	40,7±6,3 ^{ac}

Valores em média±EPM. Significância (P< 0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SSP (SHAM Sedentário Placebo), SSC (SHAM Sedentário Cafeína), SEP (SHAM Exercitado Placebo), SEC (SHAM Exercitado Cafeína), OSP (OVX Sedentário Placebo), OSC (OVX Sedentário Cafeína), OEP (OVX Exercitado Placebo), OEC (OVX Exercitado Cafeína).

No que se refere ao Exercício, os animais exercitados apresentaram maior peso ósseo relativo e forças de fratura óssea absoluta e relativa quando comparados aos animais sedentários.

Tabela 5.2. Resistência óssea do fêmur para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Peso Absoluto (g)	0,51±0,01 ^a	0,49±0,01 ^b	0,50±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a
Peso Relativo (g/g)	1,75±0,02 ^a	1,52±0,02 ^b	1,61±0,03 ^a	1,66±0,03 ^b	1,63±0,02 ^a	1,65±0,03 ^a
Espessura Absoluta (mm)	4,14±0,01 ^a	4,13±0,01 ^a	4,13±0,01 ^a	4,14±0,01 ^a	4,12±0,01 ^a	4,15±0,01 ^a
Espessura Relativa (mm/g)	8,08±0,07 ^a	8,54±0,09 ^b	8,22±0,08 ^a	8,39±0,09 ^a	8,35±0,08 ^a	8,27±0,09 ^a
Comprimento Absoluto (mm)	33,4±0,1 ^a	33,3±0,1 ^a	33,5±0,1 ^a	33,3±0,1 ^a	33,3±0,1 ^a	33,5±0,1 ^a
Comprimento Relativo (mm/g)	65,3±0,6 ^a	68,8±0,7 ^b	66,6±0,7 ^a	67,4±0,7 ^a	67,6±0,7 ^a	66,5±0,7 ^a
Força de Fratura Absoluta (N)	142,2±2,4 ^a	108,7±3,8 ^b	116,6±4,5 ^a	134,4±3,2 ^b	124,6±4,4 ^a	126,4±3,9 ^a
Força de Fratura Relativa (N/g)	277,9±4,8 ^a	223,3±7,5 ^b	229,9±7,9 ^a	271,3±5,8 ^b	250,7±8,1 ^a	250,5±7,3 ^a

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+OSP+SSC+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+OSP+SEP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

5.3.3. Conteúdo mineral ósseo

Os dados do conteúdo mineral ósseo foram normalizados pelos valores do peso da tíbia, sendo apresentados de forma absoluta e em percentagem do peso da tíbia.

Não foi observada interação significativa ($P > 0,05$) entre os fatores para todos os indicadores de conteúdo mineral ósseo investigados. Os resultados do conteúdo mineral ósseo dos animais para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína separadamente está apresentada na Tabela 5.3.

Quanto ao fator Ovário, os animais OVX apresentaram menor ($P < 0,05$) conteúdo e percentagem de cálcio ósseo quando comparados aos animais SHAM.

Para o fator Exercício, foi observado que os animais exercitados apresentaram maior conteúdo e percentagem de cálcio ósseo quando comparados aos animais exercitados, porém, exibiram menor conteúdo e percentagem de zinco.

Para o fator Cafeína, foi verificado que os animais consumindo cafeína apresentaram maiores percentagens de cálcio e magnésio, como também no conteúdo de magnésio quando comparados aos animais dos grupos placebo.

Tabela 5.3. Conteúdo mineral na tíbia para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Peso ósseo (mg)	380,2±3,7 ^a	372,1±4,4 ^a	376,2±3,4 ^a	376,1±4,7 ^a	374,7±4,0 ^a	377,7±4,2 ^a
Conteúdo de Cálcio (mg)	47,0±1,0 ^a	43,5±0,6 ^b	43,5±0,9 ^a	47,0±0,7 ^b	44,7±0,9 ^a	45,8±0,9 ^a
Cálcio Ósseo (%)	12,5±0,1 ^a	11,8±0,2 ^b	11,6±0,2 ^a	12,6±0,1 ^b	11,8±0,2 ^a	12,4±0,2 ^b
Conteúdo de Magnésio (mg)	0,98±0,03 ^a	0,95±0,02 ^a	0,95±0,02 ^a	0,98±0,03 ^a	0,92±0,02 ^a	1,01±0,03 ^b
Magnésio Ósseo (%)	0,26±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,25±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,25±0,01 ^a	0,27±0,01 ^b
Conteúdo de Zinco (mg)	0,16±0,03 ^a	0,20±0,03 ^a	0,19±0,03 ^a	0,14±0,02 ^b	0,18±0,03 ^a	0,22±0,03 ^a
Zinco Ósseo (%)	0,06±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a	0,04±0,01 ^b	0,05±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+OSP+SSC+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+OSP+SEP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

5.3.4. Biomarcadores ósseos e excreção de cálcio urinário

Não foi observada interação estatística (P > 0,05) entre os fatores quanto à excreção de cálcio urinário e biomarcadores ósseos. Os resultados da excreção urinária

de cálcio e biomarcadores ósseos para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína, separadamente, estão apresentados na Tabela 5.4.

Quanto ao fator Ovário, os animais OVX apresentaram menores ($P < 0,05$) valores de cálcio urinário, taxa cálcio/creatinina e ostase quando comparados aos animais SHAM, porém, exibiram maiores teores de NTx.

O efeito do fator Exercício foi oposto ao apresentado pelo fator Ovário, qual seja, os animais exercitados apresentaram maiores ($P < 0,05$) valores de cálcio urinário, taxa de cálcio/creatinina e ostase, quando comparados aos animais sedentários, no entanto, exibiram menores teores de NTx.

Para o fator Cafeína, foi constatado que os animais que consumiram cafeína exibiram maiores conteúdos de cálcio urinário e de NTx do que os animais dos grupos placebo.

Tabela 5.4. Excreção urinária de cálcio e biomarcadores ósseos para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Cálcio (mg/dL/24H)	0,38±0,05 ^a	0,28±0,03 ^b	0,25±0,02 ^a	0,41±0,03 ^b	0,30±0,03 ^a	0,37±0,03 ^b
Razão Cálcio /Creatinina	0,75±0,07 ^a	0,50±0,04 ^b	0,60±0,07 ^a	0,67±0,05 ^a	0,58±0,06 ^a	0,67±0,05 ^a
NTx (nM BCE/ mM Creatinina)	48,3±0,8 ^a	62,7±0,8 ^b	60,2±0,8 ^a	50,7±0,8 ^b	51,7±0,8 ^a	59,3±0,8 ^b
Ostase (pg/mL)	103,5±1,1 ^a	99,4±3,0 ^b	99,5±2,9 ^a	103,4±1,8 ^b	100,5±2,0 ^a	102,4±2,9 ^a

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+OSP+SSC+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+OSP+SEP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

Neste estudo foram observadas correlações significantes entre os parâmetros analisados. O peso femoral absoluto apresentou correlação “positiva” com a força de fratura óssea ($\rho = 0,458$ e $p < 0,0001$), peso da tíbia ($\rho = 0,790$ e $p < 0,0001$), conteúdos de cálcio ($\rho = 0,291$ e $p < 0,0001$) e magnésio na tíbia ($\rho = 0,425$ e $p < 0,0001$). A força de fratura óssea mostrou correlação “positiva” com peso da tíbia ($\rho = 0,351$ e $p < 0,001$), conteúdos de cálcio ($\rho = 0,423$ e $p < 0,0001$) e magnésio na tíbia ($\rho = 0,304$ e $p < 0,01$). O conteúdo de cálcio da tíbia exibiu correlação “positiva” com o conteúdo de

magnésio ($\rho = 0,613$ e $p < 0,0001$). Já o conteúdo de NTx exibiu correlação “negativa” com o peso femoral absoluto ($\rho = -0,241$ e $p = 0,03$), força de fratura absoluta ($\rho = -0,523$ e $p < 0,0001$) e conteúdo de cálcio na tíbia ($\rho = -0,330$ e $p < 0,01$).

5.4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou a ação da ovariectomia e ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo em ratas treinadas aerobicamente. Nossos resultados mostraram que a ovariectomia reduziu o peso e a força capaz de promover a fratura óssea, os níveis de cálcio ósseo e urinário, a taxa cálcio/creatinina e a Ostase sangüínea, e elevou o NTx urinário. O programa de exercício aeróbico aumentou o peso e a força capaz de promover a fratura óssea, os cálcios ósseos e urinários, e a Ostase sangüínea, contudo, diminuiu o zinco ósseo e o NTx urinário. Já a ingestão de cafeína elevou os valores de cálcio ósseo e urinário, magnésio ósseo e NTx urinário. Contudo, não foi observada interação entre os fatores estudados, sugerindo que o programa de exercício não minimizou os efeitos deletérios da ovariectomia sobre o tecido ósseo, e nem a ingestão de cafeína potencializou estes prejuízos promovidos pela deficiência de estrogênio.

No presente estudo verificou-se que a ovariectomia reduziu o conteúdo de cálcio tibial e o peso e a força de fratura femoral (Tabelas 5.2 e 5.3), demonstrando resultados similares aos expostos acima. Estes resultados confirmam achados anteriores de que a deficiência de estrogênio acelera a perda de massa e a fragilidade óssea, podendo elevar o risco de fraturas decorrentes da osteoporose (Chan e Swaminathan, 1998; Hara, Kobayashi *et al.*, 2007; Dai, Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008). Por exemplo, Chan *et al.* (1998) demonstraram em ratas Sprague-Dawley que a ovariectomia reduziu o peso e o conteúdo de cálcio do fêmur de ratas adultas após 12

semanas. Hara et al. (2007) identificaram que ratas Fisher 344 OVX apresentavam menores CMO na diáfise. Outros autores, investigando ratas Sprague-Dawley (Dai, Ma et al., 2008) e Wistar (Huang, Chang et al., 2008), observaram que a OVX reduziu a resistência óssea comparada às SHAM após 6 meses de cirurgia. Portanto, os achados deste estudo confirmam que indivíduos pós-menopausa exibem maiores risco de fratura óssea por promover um desequilíbrio no remodelamento ósseo.

O incremento no *turnover* ósseo em virtude da deficiência de estrogênio (Rapuri, Kinyamu et al., 2002; Hubal, Ingalls et al., 2005; Park, Omi et al., 2008) acelera o remodelamento ósseo por elevar a mobilização e reduzir sua formação (Bonnet, Beaupied et al., 2007; Fuchs, Shea et al., 2007; D'amelio, Grimaldi et al., 2008). Nossos resultados ratificam esta suposição, pois a ovariectomia promoveu aumento no marcador de mobilização (NTx urinário) e reduziu o marcador de formação óssea (Ostase sanguínea, Tabela 5.4). Estes resultados são similares a estudos anteriores (D'amelio, Grimaldi et al., 2008; Park, Omi et al., 2008). Por exemplo, D'Amelio et al. (2008) relataram que a deficiência de estrogênio em mulheres osteoporóticas apresentou relevante papel sobre a reabsorção e perda de massa óssea, pois estimularam as células T a aumentar a produção de citocinas (TNF- α e RANKL) e precursores de osteoclastos. Este incremento na mobilização óssea, desequilibrando o processo de remodelamento e fragilizando o osso, foi aqui constatado pela correlação negativa do conteúdo de NTx com o cálcio na tíbia e a força de fratura femoral, sugerindo que quanto maior a mobilização óssea menor teor de cálcio se encontra nos ossos, reduzindo sua resistência.

Por outro lado, Park et al. (2008) verificaram que a OVX elevou um outro marcador de mobilização óssea (TRAP), contudo, aumentou a Ostase em ratas Sprague-Dawley. Os autores sugeriram que este aumento na Ostase poderia ocorrer devido ao acoplamento de ações entre a mobilização e formação óssea no processo de

remodelamento, onde osteoclastos iniciariam o processo mobilizando cálcio e estimulariam a ativação dos osteoblastos para formar um novo osso. Contudo, nossos resultados (Tabela 5.4) não mostraram este acoplamento do processo mobilização-formação, pois, independente da mobilização óssea ter sido elevada, a formação óssea foi reduzida em função da deficiência de estrogênio.

A excreção urinária de cálcio tem sido associada à redução de massa óssea e possível aumento de sua fragilidade (Massey e Sutton, 2004). Estudos anteriores relatam incremento na perda de cálcio urinário de 24 horas e da taxa cálcio/creatinina em ratas jovens (Islam, Chanda *et al.*, 1998), 3 semanas após a cirurgia de OVX (O'loughlin e Morris, 2003) e 12 semanas após a cirurgia (Park, Omi *et al.*, 2008). Entretanto, um achado intrigante do presente estudo, foi verificar que após 8 semanas de estudo, a excreção de cálcio urinário e a taxa cálcio/creatinina foram reduzidas nas ratas OVX, quando comparadas às SHAM (Tabela 5.4). Resultado semelhante foi mostrado por Chan *et al.* (1998), que avaliando ratas idosas 10 dias após a cirurgia de ovariectomia, constataram que a excreção de cálcio urinário elevou drasticamente nos animais OVX, porém, após 2 e 4 semanas da cirurgia, estas perdas urinárias de cálcio diminuíram. Isto levou os autores a concluírem que maiores perdas de cálcio urinário em ratas OVX aconteceriam imediatamente após a cirurgia, e estas perdas reduziriam com o passar do tempo. Tais achados são contraditórios aos nossos, mostrando que o impacto da deficiência de estrogênio sobre a excreção urinária de cálcio ainda é controverso.

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar se um programa de exercício de baixa intensidade, realizado por 30 minutos diários, seria capaz de promover benefícios ao tecido ósseo em ratas OVX. Fuchs *et al.* (2007) constataram aumento no CMO e força de fratura óssea em ratas correndo em esteira a 24 m/min por 60 min/dia sob uma

inclinação de 5%. Porém, Bonnet et al. (2007) não verificaram alterações na força de fratura quando ratas corriam a 13 m/min por 60 min/dia. Os resultados do presente estudo mostraram que o programa de corrida a 16 m/min por 30 min/dia promoveu aumento no peso relativo e força de fratura do fêmur e no conteúdo de cálcio na tíbia (Tabelas 5.2 e 5.3). Comparados aos do estudo de Bonnet et al. (2007), estes resultados sugerem que o impacto promovido pela maior intensidade da corrida neste estudo (16 m/min) foi determinante sobre a resposta óssea do que a menor duração do exercício. A maior importância do impacto do exercício sobre o osso em comparação à sua duração também é mencionado por outros autores (Notomi, Lee *et al.*, 2000; Honda, Sogo *et al.*, 2003). Estes resultados evidenciam que o programa de exercício empregado no presente estudo é capaz de melhorar a massa e resistência óssea de ratas.

Um dos possíveis mecanismos para o aumento no CMO e resistência à fratura é a maior taxa de deformação da matriz óssea em resposta ao exercício de maior impacto. Tal efeito aumenta o fluido no sistema de rede lacunar-canalicular que, por sua vez, estimula os osteócitos a desencadear uma cascata de eventos celulares, como elevação do cálcio intracelular, expressão de fatores de crescimento e incremento na produção da matriz óssea, potencializando o efeito osteogênico (Turner e Robling, 2005). O presente estudo mostrou que o processo de formação óssea foi incrementado, como também o conteúdo de cálcio ósseo, sugerindo que este mecanismo de ação poderia ser uma das formas pelas quais o programa de exercício promoveu melhoras à resistência óssea.

Outra possibilidade é que a maior capacidade contrátil muscular, em resposta ao exercício, poderia elevar o estímulo osteogênico por aumentar a força de tração sobre o osso. Na unidade funcional músculo-esquelética, a massa, o tamanho e a força óssea são alterados em função da maior força produzida sobre o osso pela contração muscular (Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Daly, 2007; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007). No

experimento do capítulo III observou-se que o programa do exercício elevou o teor de proteína muscular, o que provavelmente elevaria a capacidade de contração muscular, e subseqüentemente, a força de tração sobre o osso nos animais exercitados, podendo, pelo menos em parte, justificar os benefícios aqui observados do programa de exercício sobre o tecido ósseo.

O programa de corrida em esteira empregado aqui promoveu um positivo remodelamento ósseo, uma vez que suprimiu a reabsorção (NTx urinário) e estimulou a formação óssea (Ostase sangüínea, Tabela 5.4). Estes resultados foram similares aos de Iwamoto (Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004) e Creighton (Creighton, Morgan *et al.*, 2001). Iwamoto (2004) verificou em ratas Wistar jovens correndo a 25 m/min por 60 min/dia que a corrida elevou a Ostase e osteocalcina, além de reduzir o TRAP e deoxipiridinolina. Creighton *et al.* (2001) relataram que mulheres exercitando em alto e moderado impacto, comparadas às exercitadas sem impacto, apresentaram maior conteúdo de osteocalcina, sem afetar o NTx urinário, porém, estas alterações foram suficientes para elevar a DMO. O incremento da carga mecânica durante o exercício de suportar peso tem sido associado com o aumento inicial, seguido por uma redução na reabsorção óssea, enquanto a formação óssea ativa é sustentada (Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004). Os resultados do presente estudo sugerem que os aumentos na massa e resistência óssea podem ser alcançados ao combinar os benefícios promovidos pela carga mecânica local com os dos hormônios calcitrópicos.

Um resultado intrigante deste estudo foi identificar que o conteúdo de zinco na tíbia reduziu em decorrência do programa de exercício. Estudos mencionam a importância do zinco como uma enzima empregada em diversas funções, como na transcrição genética, vias metabólicas energéticas, processo de crescimento e cicatrização (Williams, 2002; Wolinsky e Jhickson Jr., 2002; Lukaski, 2005; Chinevere,

Kenefick *et al.*, 2008). Contudo, não encontra relatos de mobilização do zinco ósseo em virtude da prática do exercício físico, apesar de autores afirmarem que o catabolismo muscular é acompanhado pela liberação de zinco no plasma (Wolinsky e Jhickson Jr., 2002), e que o exercício extenuante pode reduzir sua perda no suor (Chinevere, Kenefick *et al.*, 2008) e afetar a cinética do zinco (Volpe, Lowe *et al.*, 2007). Seco *et al.* (1998) investigaram os efeitos da corrida extenuante em ratos Wistar por 11 semanas, e verificaram que o comprimento, peso, DMO e CMO diminuíram com a prática do exercício, além de constatar que a suplementação de zinco (20% da recomendação) preveniu tais prejuízos aos ósseos. Porém, estes autores não analisaram os conteúdos de cada mineral ósseo, não podendo afirmar que o menor CMO tenha ocorrido em função a redução do conteúdo de zinco no osso. Todavia, no presente estudo, a redução no conteúdo de zinco ósseo devido ao programa de corrida aeróbia não foi o suficiente para interferir sobre as melhorias desencadeadas no tecido ósseo pelo exercício. Este assunto deve ser motivo de maior atenção em futuros estudos.

O programa de exercício aeróbico de baixa intensidade por 30 minutos diários contrapôs os efeitos deletérios da deficiência de estrogênio sobre o tecido ósseo. Isto sugere que a prática deste tipo de exercício é benéfica na prevenção e tratamento da osteoporose decorrente da deficiência estrogênica.

A ingestão de cafeína não modificou os parâmetros avaliados para resistência óssea (Tabela 5.2), porém, verificou-se que a ingestão de cafeína elevou ligeiramente os teores de magnésio e a percentagem de cálcio na tíbia (Tabela 5.3). Apesar da ingestão crônica de cafeína poder reduzir o CMO e DMO (Chen e Whitford, 1999; Dew, Day *et al.*, 2007) e resistência óssea (Rapuri, Gallagher *et al.*, 2001; Heaney, 2002; Tsuang, Sun *et al.*, 2006), nossos resultados não suportam tal afirmação. O efeito da ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo não foi encontrado em mulheres jovens de 14-40 anos

(Wetmore, Ichikawa *et al.*, 2008) e pós-menopausa (Lloyd, Johnson-Rollings *et al.*, 2000; Rico, Canal *et al.*, 2002). Em contrapartida, Chen *et al.* (1999) estudaram por 6 semanas o efeito da ingestão de cafeína (3, 25 e 100 mg/kg) sobre o tecido ósseo em ratas Sprague-Dawley, e observaram que apenas a ingestão de 100 mg de cafeína/kg reduziu o CMO. No presente estudo, utilizou-se a dose de cafeína de 6 mg/kg, considerada como o consumo habitual para indivíduos de 70 kg de peso corporal. Esta dose não afetou negativamente os parâmetros do tecido ósseo avaliados, sugerindo que em doses corriqueiras a cafeína não prejudicaria o tecido ósseo. Por outro lado, no capítulo VII, observou-se que a cafeína elevou a absorção intestinal de cálcio, o que poderia justificar o ligeiro aumento na percentagem de cálcio da tíbia e a manutenção da resistência óssea, apesar de aumentar a excreção urinária de cálcio e o processo de mobilização óssea.

Quanto ao efeito da ingestão de cafeína sobre a homeostase de cálcio, nossos resultados mostraram que a cafeína elevou o conteúdo de cálcio urinário (Tabela 5.4). Resultados similares foram reportados por outros estudos (Chen e Whitford, 1999; Heaney e Rafferty, 2001; Massey e Sutton, 2004). Apesar de não ser significativa, a taxa cálcio/creatinina foi maior nos animais que consumiram cafeína, sugerindo que o aumento da excreção de cálcio urinário foi independente de uma maior função renal. A hipercalcúria induzida pela cafeína é no mínimo em parte mediada pelos receptores de adenosina, que agem como estimulador da reabsorção de cálcio nos túbulos renais. A cafeína, desta forma, bloquearia os receptores de adenosina A1 reduzindo a reabsorção de cálcio nos túbulos distais, e conseqüentemente, elevando suas perdas urinárias (Massey e Sutton, 2004; Daly, 2007). Este poderia ser um mecanismo ao qual levou a cafeína a aumentar a excreção de cálcio na urina.

Um resultado inédito do presente estudo, foi identificar que a ingestão de cafeína aumentou o conteúdo de NTx urinário, sugerindo que esta substância elevaria o processo de mobilização óssea, o que poderia moldar para um aumento na excreção urinária de cálcio, diminuição na massa óssea e incremento no risco de fratura. Um estudo anterior observou a possível redução no processo de formação óssea, devido ao aumento na taxa de apoptose dos osteoblastos (Tsuang, Sun *et al.*, 2006), porém, não foram encontrados relatos da ação da cafeína sobre a mobilização óssea. Sakamoto et al. (2001) estudaram ratos Wistar por 20 semanas consumindo 6,8 mg de cafeína/kg (por meio de café) e não observaram alteração nos marcadores de mobilização (deoxipiridinolina) e de formação óssea (osteocalcina), nem na excreção de cálcio urinário. Os efeitos da ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo são controversos e não conclusivos, pois em nossos resultados, apesar do aumento na excreção de cálcio e no processo de mobilização óssea, além de constatar um ligeiro aumento nos teores de cálcio e magnésio na tíbia, estas modificações promovidas pela administração de cafeína não foram suficientes para interferir na resistência óssea.

Concluiu-se que animais com deficiência de estrogênio apresentam conteúdos de minerais e resistência óssea reduzidos, devido ao incremento no processo de reabsorção e supressão no processo de formação óssea. A corrida de baixa intensidade, por 30 minutos, contrapôs os efeitos da ovariectomia, apesar de não inibir seus efeitos deletérios sobre o tecido ósseo. Contudo, o exercício também aumentou a perda de zinco ósseo. Já a ingestão de cafeína, apesar de elevar as perdas urinárias de cálcio e o NTx urinário, elevou os teores de cálcio e magnésio ósseo, mas não interferiu na resistência óssea. Todavia, não potencializou os efeitos deletérios da ovariectomia sobre o tecido ósseo.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altimari, L. R., A. C. Moraes, *et al.* Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.42, n.1, p.17-27. 2006.

Aoac. Official methods of analysis. . Washington, D.C. 1998

Barengolts, E. I., T. Kouznetsova, *et al.* Effects of progesterone on serum levels of IGF-1 and on femur IGF-1 mRNA in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.11, n.10, Oct, p.1406-12. 1996.

Bonnet, N., H. Beaupied, *et al.* Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.22, n.4, Apr, p.578-88. 2007.

Chan, E. L. e R. Swaminathan. Calcium metabolism and bone calcium content in normal and oophorectomized rats consuming various levels of saline for 12 months. J Nutr, v.128, n.3, Mar, p.633-9. 1998.

Chapman, R. F. e J. M. Stager. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1080-6. 2008.

Chen, X. e G. M. Whitford. Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. Arch Oral Biol, v.44, n.1, Jan, p.33-9. 1999.

Chinevere, T. D., R. W. Kenefick, *et al.* Effect of heat acclimation on sweat minerals. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.5, May, p.886-91. 2008.

Chubak, J., C. M. Ulrich, *et al.* Effect of exercise on bone mineral density and lean mass in postmenopausal women. Med Sci Sports Exerc, v.38, n.7, Jul, p.1236-44. 2006.

Creighton, D. L., A. L. Morgan, *et al.* Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. J Appl Physiol, v.90, n.2, Feb, p.565-70. 2001.

D'amelio, P., A. Grimaldi, *et al.* Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. Bone, v43 1, 92-100. 2008.

Dai, R., Y. Ma, *et al.* Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.4, p.342-9. 2008.

Daly, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. Cell Mol Life Sci, v.64, n.16, Aug, p.2153-69. 2007.

Deslandes, A. C., H. Veiga, *et al.* Effects of caffeine on the electrophysiological, cognitive and motor responses of the central nervous system. Braz J Med Biol Res, v.38, n.7, Jul, p.1077-86. 2005.

Dew, T. P., A. J. Day, *et al.* Bone mineral density, polyphenols and caffeine: a reassessment. Nutr Res Rev, v.20, n.1, Jun, p.89-105. 2007.

Doherty, M., P. Smith, *et al.* Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. J Sports Sci, v.22, n.7, Jul, p.637-43. 2004.

Figard, H., F. Mougin, *et al.* Effects of isometric strength training followed by no exercise and Humulus lupulus L-enriched diet on bone metabolism in old female rats. Metabolism, v.56, n.12, Dec, p.1673-81. 2007.

Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.337-50. 2004.

Fuchs, R. K., M. Shea, *et al.* Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. Bone, v.41, n.2, Aug, p.290-6. 2007.

Glaister, M., G. Howatson, *et al.* Caffeine supplementation and multiple sprint running performance. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.10, Oct, p.1835-40. 2008.

Hadjicharalambous, M., E. Georgiades, *et al.* Influence of caffeine on perception of effort, metabolism and exercise performance following a high-fat meal. J Sports Sci, v.24, n.8, Aug, p.875-87. 2006.

Hara, K., M. Kobayashi, *et al.* Influence of bone osteocalcin levels on bone loss induced by ovariectomy in rats. J Bone Miner Metab, v.25, n.6, p.345-53. 2007.

Hart, K. J., J. M. Shaw, *et al.* Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. J Appl Physiol, v.91, n.4, Oct, p.1663-8. 2001.

Hartley, T. R., W. R. Lovallo, *et al.* Cardiovascular effects of caffeine in men and women. Am J Cardiol, v.93, n.8, Apr 15, p.1022-6. 2004.

Heaney, R. P. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. Food Chem Toxicol, v.40, n.9, Sep, p.1263-70. 2002.

Heaney, R. P. e K. Rafferty. Carbonated beverages and urinary calcium excretion. Am J Clin Nutr, v.74, n.3, Sep, p.343-7. 2001.

Henry, R. J., D. C. Cannon, *et al.* Clinical chemistry and technics. . New York, . 1974

Honda, A., N. Sogo, *et al.* High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. J Appl Physiol, v.95, n.3, Sep, p.1032-7. 2003.

Huang, T.-H., F.-L. Chang, *et al.* Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. J Bone Miner Metab, v.26, p.350-357. 2008.

Huang, T. H., S. C. Lin, *et al.* Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol, v.95, p.300-307. 2003.

Huang, T. H., R. S. Yang, *et al.* Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. Bone, v.30, n.1, Jan, p.293-9. 2002.

Hubal, M. J., C. P. Ingalls, *et al.* Effects of eccentric exercise training on cortical bone and muscle strength in the estrogen-deficient mouse. J Appl Physiol, v.98, n.5, May, p.1674-81. 2005.

Islam, N., S. Chanda, *et al.* Cold stress facilitates calcium mobilization from bone in an ovariectomized rat model of osteoporosis. Jpn J Physiol, v.48, n.1, Feb, p.49-55. 1998.

Iwamoto, J., C. Shimamura, *et al.* Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. J Bone Miner Metab, v.22, n.1, p.26-31. 2004.

Iwamoto, J., J. K. Yeh, *et al.* Effect of deconditioning on cortical and cancellous bone growth in the exercise trained young rats. J Bone Miner Res, v.15, n.9, p.1842-9. 2000.

Jasminka, Z. I., R. A. Brownbill, *et al.* To Drink or Not to Drink: How Are Alcohol, Caffeine and Past Smoking Related to Bone Mineral Density in Elderly Women? Journal of the American College of Nutrition, v.21, n.6, p.536-44. 2002.

Kobayashi-Hattori, K., A. Mogi, *et al.* Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet. Biosci Biotechnol Biochem, v.69, n.11, Nov, p.2219-23. 2005.

Lloyd, T., N. Johnson-Rollings, *et al.* Bone status among postmenopausal women with different habitual caffeine intakes: a longitudinal investigation. J Am Coll Nutr, v.19, n.2, Apr, p.256-61. 2000.

Lukaski, H. C. Low dietary zinc decreases erythrocyte carbonic anhydrase activities and impairs cardiorespiratory function in men during exercise. Am J Clin Nutr, v.81, n.5, May, p.1045-51. 2005.

Maimoun, L., D. Simar, *et al.* Response of bone metabolism related hormones to a single session of strenuous exercise in active elderly subjects. Br J Sports Med, v.39, n.8, Aug, p.497-502. 2005.

Massey, L. K. e R. A. Sutton. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. J Urol, v.172, n.2, Aug, p.555-8. 2004.

Nordstrom, A., M. Hogstrom, *et al.* Effects of different types of weight-bearing loading on bone mass and size in young males: a longitudinal study. Bone, v.42, n.3, Mar, p.565-71. 2008.

Notomi, T., S. J. Lee, *et al.* Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. Eur J Appl Physiol, v.82, n.4, Jul, p.268-74. 2000.

Notomi, T., N. Okimoto, *et al.* Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. J Bone Miner Res, v.18, n.1, Jan, p.140-9. 2003.

O'connor, P. J., R. W. Motl, *et al.* Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. Pain, v.109, n.3, Jun, p.291-8. 2004.

O'loughlin, P. D. e H. A. Morris. Oophorectomy acutely increases calcium excretion in adult rats. J Nutr, v.133, n.7, Jul, p.2277-80. 2003.

Paluska, S. A. Caffeine and exercise. Curr Sports Med Rep, v.2, n.4, p.213-9. 2003.

Park, H., K. J. Kim, *et al.* Effect of combined exercise training on bone, body balance, and gait ability: a randomized controlled study in community-dwelling elderly women. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.254-9. 2008.

Park, J. H., N. Omi, *et al.* Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.218-25. 2008.

Rapuri, P. B., J. C. Gallagher, *et al.* Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. Am J Clin Nutr, v.74, n.5, Nov, p.694-700. 2001.

Rapuri, P. B., H. K. Kinyamu, *et al.* Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women. J Clin Endocrinol Metab, v.87, n.5, May, p.2024-32. 2002.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Renno, A. C., A. R. Silveira Gomes, *et al.* Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. Exp Gerontol, v.42, n.6, Jun, p.517-22. 2007.

Rico, H., M. L. Canal, *et al.* Effects of caffeine, vitamin D, and other nutrients on quantitative phalangeal bone ultrasound in postmenopausal women. Nutrition, v.18, n.2, Feb, p.189-93. 2002.

Rittweger, J., H. M. Frost, *et al.* Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. Bone, v.36, n.6, Jun, p.1019-29. 2005.

Sakamoto, W., J. Nishihira, *et al.* Effect of coffee consumption on bone metabolism. Bone, v.28, n.3, Mar, p.332-6. 2001.

Seco, C., M. Revilla, *et al.* Effects of zinc supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. J Bone Miner Res, v.13, n.3, Mar, p.508-12. 1998.

Shiga, K., H. Hara, *et al.* Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. J Nutr, v.133, n.12, p.4207-11. 2003.

Silva, J. D. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. . Viçosa: Imprensa Universitária. 1990. 165 p.

Tosun, A., N. Bolukbasi, *et al.* Acute effects of a single session of aerobic exercise with or without weight-lifting on bone turnover in healthy young women. Mod Rheumatol, v.16, n.5, p.300-4. 2006.

Tsuang, Y. H., J. S. Sun, *et al.* Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. J Orthop Surg Res, v.1, p.7. 2006.

Turner, C. H. e A. G. Robling. Exercises for improving bone strength. Br J Sports Med, v.39, n.4, Apr, p.188-9. 2005.

Volpe, S. L., N. M. Lowe, *et al.* Effect of maximal exercise on the short-term kinetics of zinc metabolism in sedentary men. Br J Sports Med, v.41, n.3, Mar, p.156-61. 2007.

Wetmore, C. M., L. Ichikawa, *et al.* Association between caffeine intake and bone mass among young women: potential effect modification by depot medroxyprogesterone acetate use. Osteoporos Int, v.19, n.4, Apr, p.519-27. 2008.

Williams, M. H. Nutrição para saúde condicionamento física e desempenho esportivo. São Paulo: Manole. 2002. 499 p.

Wolinsky, I. e J. G. Jhickson Jr. Nutrição no exercício e no esporte. São Paulo: ROCA. 2002. 646 p.

CAPÍTULO VI:

IMPACTO DA OVARIECTOMIA, INGESTÃO DE CAFEÍNA E EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS WISTAR COM 50% DA RECOMENDAÇÃO DE CÁLCIO DIETÉTICO.

6.1. INTRODUÇÃO

A baixa ingestão de cálcio é um comportamento alimentar entre as mulheres brasileiras (Velásquez-Meléndez, Martins *et al.*, 1997; Montilla, Aldrghi *et al.*, 2004; Batista, Priore *et al.*, 2006), que pode elevar o risco de osteoporose (Huang, Chang *et al.*, 2008), por afetar o seu metabolismo e a homeostase óssea (Lanzillotti, Lanzillotti *et al.*, 2003; Wetmore, Ichikawa *et al.*, 2008). A deficiência do cálcio dietético pode reduzir a sua quantidade absorvida no intestino, levando a menores níveis sanguíneos (Hitz, Eskildsen *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008; Zhang, Dong *et al.*, 2008). O reduzido nível de cálcio circulante estimula a liberação de hormônio da paratireóide (PTH) para restaurar seus níveis no sangue. Por sua vez, o PTH atua diminuindo a excreção urinária de cálcio, além de elevar sua absorção intestinal e mobilização óssea (Costa e Peluzio, 2008; Mcmanus, Davey *et al.*, 2008). Contudo, poucos estudos têm investigado se o baixo consumo de cálcio associado à deficiência estrogênica afeta o tecido ósseo de indivíduos pós-menopausa.

A deficiência do estrogênio pós-menopausa promove aumento no *turnover* ósseo (Rapuri, Kinyamu *et al.*, 2002; Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008), produzindo um desequilíbrio no remodelamento ósseo, onde a mobilização sobrepõe à formação óssea (Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; D'amelio, Grimaldi *et al.*, 2008), acarretando maior fragilidade (Hara, Kobayashi *et al.*, 2007; Dai,

Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008). As conseqüências da deficiência de estrogênio sobre o tecido ósseo em indivíduos recebendo suplementação de cálcio têm sido reportadas (Gala, Diaz-Curiel *et al.*, 2001; Stear, Prentice *et al.*, 2003; Bischoff-Ferrari, Rees *et al.*, 2008; Lambert, Eastell *et al.*, 2008), no entanto, pouco tem sido estudado quando associado ao baixo consumo de cálcio (Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998). Além disso, o consumo de cafeína pode promover a perda óssea, agravando as conseqüências da deficiência estrogênica e do baixo consumo de cálcio sobre o tecido ósseo.

A ingestão de cafeína tem sido associada com a perda de massa óssea (Jasminka, Brownbill *et al.*, 2002; Massey e Sutton, 2004; Tsuang, Sun *et al.*, 2006), em função de o seu efeito diurético elevar a excreção urinária de cálcio (Chen e Whitford, 1999; Heaney, 2002), reduzindo a densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO)(Chen e Whitford, 1999; Dew, Day *et al.*, 2007). Apesar de autores sugerirem que o impacto da ingestão de cafeína sobre os metabolismos de cálcio e ósseo serem mais graves em indivíduos com inadequação do cálcio alimentar (Wetmore, Ichikawa *et al.*, 2008), não são encontrados estudos sobre o efeito da ingestão de cafeína e baixo teor de cálcio alimentar em mulheres pós-menopausa.

A prática do exercício é recomendada para prevenir e tratar a osteoporose (Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Park, Omi *et al.*, 2008), em virtude de o estresse mecânico promover um estímulo osteogênico (Hubal, Ingalls *et al.*, 2005; Rittweger, Frost *et al.*, 2005; Turner e Robling, 2005; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007). O efeito do exercício sobre o tecido ósseo varia conforme o tipo, intensidade, duração e frequência do exercício (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Renno, Silveira Gomes *et al.*, 2007). Estudos relatam inconsistência nos resultados de programas de corrida em esteira (12 m/min por 60'; 12 m/min por 120' ou 18 m/min por 60') sobre a DMO e força de fratura óssea

(Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998). Desta forma, este estudo objetivou avaliar os efeitos da deficiência de estrogênio, ingestão de cafeína e do exercício aeróbico sobre o tecido ósseo em ratas Wistar com 50% da recomendação de cálcio dietético.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Animais Experimentais

O estudo foi realizado com 80 ratas Wistar adultas de 160 dias de idade (peso médio: $274,5 \pm 21,4$ g; média \pm DP), submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou laparotomia (SHAM). Os animais foram previamente anestesiados com Ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) intramuscular, recebendo no pós-operatório a administração subcutânea de anti-inflamatório (Ketofen: 2 mg/kg por 3 dias) e antibiótico (Ampicilina sódica: 30 mg/kg por 5 dias). Após 3 semanas de recuperação, os animais foram alocadas em 8 grupos (n=10), num delineamento fatorial 2 x 2 x 2. Os grupos foram, então, assim constituídos: SSP – SHAM Sedentária Placebo; SSC – SHAM Sedentária Cafeína; SEP – SHAM Exercitada Placebo; SEC – SHAM Exercitada Cafeína; OSP – OVX Sedentária Placebo; OSC – OVX Sedentária Cafeína; OEP – OVX Exercitada Placebo; e OEC – OVX Exercitadas Cafeína.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, por 8 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60% e fotoperíodo de 12 horas. As ratas receberam diariamente de 18 a 20 gramas de dieta AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) com metade da recomendação de cálcio para estes animais (0,25% de cálcio na dieta), além de água deionizada *ad libitum*.

Os animais foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – MG (Brasil), e os procedimentos

experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG (Parecer nº 80/2007).

6.2.2. Administração de Cafeína

Diariamente, os animais dos grupos SSC, OSC, SEC e OEC receberam suplementação de 6 mg de cafeína/kg de peso corporal/dia, adicionada à dieta dos animais. Os animais dos grupos SSP, OSP, SEP e OEP receberam apenas a dieta. As doses de suplementação de cafeína foram identificadas em estudos recentes como doses moderadas utilizadas em humanos e animais (Doherty, Smith *et al.*, 2004; Hartley, Lovallo *et al.*, 2004; O'connor, Motl *et al.*, 2004).

6.2.3. Protocolo de Exercício

Após um período de 2 semanas de recuperação da cirurgia, 40 animais foram submetidos a um processo de adaptação ao exercício de corrida em esteira (8 m/min 10 min/dia por 5 dias). Em seguida, estes animais foram subdivididos em 4 grupos (SEP, OEP, SEC e OEC) e submetidos a um programa de exercício aeróbico de corrida em esteira exercitando numa velocidade de 16 m/min durante 30 minutos diários, 5 sessões por semana, num período de 8 semanas, conforme adaptação de Iwamoto et al. (2004).

6.2.4. Avaliação da Resistência Óssea

Após a eutanásia com CO₂, o fêmur direito foi imediatamente dissecado para análises seguintes. O comprimento e a espessura do fêmur foram avaliados utilizando-se paquímetro. O peso ósseo foi aferido em balança analítica com precisão de 0,0001 g.

Para a análise da resistência à fratura óssea utilizou-se o teste de fratura por três-pontos no aparelho texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc –

USA). Cada extremidade óssea foi apoiada sobre hastes inoxidáveis separadas por 2,5 cm de distância, onde uma terceira haste, apoiada sobre o ponto intermédio ósseo, realizou uma força necessária para se alcançar a fratura (Honda, Sogo *et al.*, 2003; Shiga, Hara *et al.*, 2003).

6.2.5. Determinação do Conteúdo Mineral Ósseo

Após a eutanásia, a tíbia direita foi retirada, pesada e em seguida digerida em ácido nítrico concentrado por 24 horas. Logo após, foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL contendo 0,5 mL de coreto de estrôncio ao qual foi completado com água deionizada para posterior determinação de cálcio, zinco e magnésio por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA) (Silva, 1990; Huang, Yang *et al.*, 2002). As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada pela Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 1998).

6.2.6. Determinação do Cálcio Urinário

A urina dos animais foi coletada por 1 dia na 8ª semana experimental num período de 24 horas utilizando-se gaiolas metabólicas individuais. O volume de urina coletado foi completado para 10 mL com água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2.865 gravidades (Excelsa-Fanem-Brasil). Ao sobrenadante foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20 µL/mL) para a conservação da amostra.

Uma alíquota do sobrenadante da urina centrifugada foi digerida em ácido nítrico concentrado por 24 horas. Em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL contendo 0,5 mL de coreto de estrôncio e completado com água deionizada para posterior determinação de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, em

aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA) (Silva, 1990). As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada pela Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 1998).

Outra alíquota de 50 μ L foi pipetada numa cubeta diluída por 500 μ L de água deionizada para a determinação da creatinina urinária pelo método automatizado de espectrometria de UV/VIS, segundo Henry et al. (Henry, Cannon *et al.*, 1974). As análises foram realizadas utilizando kits da marca Bioclin[®] no equipamento ALIZÉ[®] (Biomérieux-França) do Laboratório Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa.

6.2.7. Determinação de Marcadores Bioquímicos Ósseos

Após a eutanásia, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para a obtenção do soro e posterior determinação do conteúdo de fosfatase alcalina óssea (Ostase[®], Beckman Coulter) por imunoensaio (Access[®] - USA), pela técnica de quimioluminescência indireta, a partir da curva padrão de 6 pontos. Os resultados da fosfatase alcalina óssea foram obtidos em picograma / mililitro (pg/mL).

Uma alíquota da urina de 24 horas, coletada e armazenada à -80°C, foi analisada quanto ao teor do teleopeptídeo N-terminal do colágeno tipo I (NTx) por meio de teste ELISA usando kit Osteomark[®] (EIA – USA). Os valores do NTx foram apresentados como nanomol de equivalente de colágeno ósseo / milimol de creatinina (nM BCE/ mM creatinina). O conteúdo de creatinina urinária para este cálculo foi determinado conforme referido no item 2.6.

6.2.8. Análise Estatística

Após submeter os dados ao teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), aplicou-se análise de variância (ANOVA: three-way para as interações e os 3

fatores; além de one-way para grupos independentes e combinações) e testes de correlação de Pearson para determinar a relação entre variáveis. Para as análises de múltiplas comparações *post hoc* foi utilizado o teste de Tukey em análises paramétricas e Dunn's em análises não-paramétricas. Os cálculos estatísticos foram realizados no software Sigma Stat 3.0 (SPSS), empregando o nível de significância estatística de $P < 0,05$.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Peso Corporal

Não foi observada diferença ($P > 0,05$; Tabela 6.1) no peso inicial dos animais. Ao final da 8ª semana, não houve interação significativa entre os fatores (Ovário, Exercício e Cafeína) para o peso corporal final e ganho de peso. Porém, verificou-se que os animais dos grupos OVX exibiram maior ganho de peso corporal do que os animais dos grupos SHAM (OSP *vs.* SSP, OSC *vs.* SSC, OEP *vs.* SEP; $P < 0,05$). Constatou-se que nos grupos Placebo e Cafeína, os animais OVX-sedentários exibiram maior ganho de peso do que os animais SHAM-exercitados (OSP *vs.* SEP e OSC *vs.* SEC; $P < 0,05$). Observou-se ainda que nos grupos Sedentários e Exercitados, os animais OVX-placebo apresentaram maior ganho de peso do que os animais SHAM-cafeína (OSP *vs.* SSC e OEP *vs.* SEC; $P < 0,05$; Tabela 6.1).

Tabela 6.1. Peso corporal inicial e final dos animais.

	SSP	OSP	SSC	OSC	SEP	OEP	SEC	OEC
Peso Inicial	273,8±8,9 ^a	275,9±4,4 ^a	270,4±5,4 ^a	278,3±6,3 ^a	271,1±7,2 ^a	273,7±7,2 ^a	272,5±8,1 ^a	280,2±7,5 ^a
Ganho Peso	25,4±5,7 ^{bcd}	56,4±3,6 ^a	20,2±3,4 ^{bcd}	50,6±5,1 ^a	9,7±7,7 ^b	41,8±6,4 ^{ac}	15,0±6,0 ^{bd}	35,2±3,4 ^{ad}

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P< 0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SSP (SHAM Sedentário Placebo), OSP (OVX Sedentário Placebo), SSC (SHAM Sedentário Cafeína), OSC (OVX Sedentário Cafeína), SEP (SHAM Exercitado Placebo), OEP (OVX Exercitado Placebo), SEC (SHAM Exercitado Cafeína), OEC (OVX Exercitado Cafeína).

6.3.2. Resistência Óssea

Os dados de resistência óssea foram normalizados pelos valores de peso corporal e peso do fêmur, sendo apresentados de forma absoluta e relativa. Os valores do peso do fêmur foram divididos pelos valores do peso corporal e apresentados na forma de peso ósseo relativo, já os valores de espessura, comprimento e força de fratura foram divididos pelos valores do peso do fêmur, e apresentados na forma de espessura, comprimento e força de fratura óssea relativa.

Foram verificadas interações significantes entre os fatores Ovário e Cafeína para espessura relativa e força de fratura óssea absoluta (Tabela 6.2). Nos demais parâmetros não foram observadas interações ($P > 0,05$) entre os fatores.

Verificou-se nos grupos Placebo, que os animais OVX apresentaram menor força de fratura óssea absoluta e maior espessura relativa do que os animais SHAM. Nos grupos Cafeína, os animais OVX exibiram menor força de fratura absoluta do que os placebos. Nos grupos SHAM e OVX, constatou-se que os animais que consumiram cafeína reduziram a força de fratura óssea absoluta quando comparadas aos placebo. Nos grupos OVX identificou-se que os animais que consumiram cafeína exibiram menores valores que de espessura relativa do que os animais placebo.

Tabela 6.2. Resistência óssea do fêmur para interação Ovário e Cafeína.

		Placebo	Cafeína
Espessura Relativa (mm/g)	SHAM	8,04±0,1 ^{Aa}	8,17±0,1 ^{Aa}
	OVX	8,83±0,1 ^{Ba}	8,45±0,1 ^{Ab}
Força Absoluta (N)	SHAM	144,4±2,1 ^{Aa}	127,3±2,1 ^{Ab}
	OVX	120,9±2,1 ^{Ba}	113,9±2,1 ^{Bb}

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey. SHAM-Placebo (SSP+SEP), SHAM-Cafeína (SSC+SEC), OVX-Placebo (OSP+OEP), OVX-Cafeína (OSC+OEC). Independente do exercício.

As análises de força de fratura óssea dos animais para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína separadamente estão apresentados na Tabela 6.3.

Para o fator Ovário, identificou-se que os animais OVX apresentaram maior espessura e comprimento ósseo relativo quando comparados aos animais SHAM. Porém, exibiram menor peso absoluto e relativo, além de força de fratura óssea absoluta e relativa.

Quanto ao fator Exercício, os animais exercitados apresentaram maior peso ósseo relativo e força de fratura óssea absoluta e relativa quando comparados aos animais não exercitados. No que se refere ao fator Cafeína, os animais que consumiram cafeína apresentaram menor força de fratura óssea absoluta e relativa quando comparados aos animais placebos.

Tabela 6.3. Resistência óssea do fêmur para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Peso Absoluto (g)	0,51±0,01 ^a	0,49±0,01 ^b	0,50±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a
Peso Relativo (mg/g)	1,77±0,02 ^a	1,51±0,02 ^b	1,61±0,03 ^a	1,66±0,02 ^b	1,63±0,03 ^a	1,64±0,03 ^a
Espessura Absoluta (mm)	4,12±0,03 ^a	4,18±0,03 ^a	4,20±0,03 ^a	4,10±0,03 ^a	4,17±0,03 ^a	4,12±0,03 ^a
Espessura Relativa (mm/g)	8,11±0,08 ^a	8,64±0,09 ^b	8,44±0,10 ^a	8,30±0,09 ^a	8,43±0,10 ^a	8,31±0,08 ^a
Comprimento Absoluto (mm)	33,3±0,1 ^a	33,6±0,1 ^a	33,4±0,2 ^a	33,5±0,1 ^a	33,6±0,1 ^a	33,4±0,1 ^a
Comprimento Relativo (mm/g)	65,6±0,6 ^a	69,6±0,5 ^b	67,3±0,7 ^a	67,9±0,5 ^a	67,9±0,7 ^a	67,3±0,6 ^a
Força de Fratura Absoluta (N)	135,8±2,0 ^a	117,4±1,5 ^b	124,6±2,7 ^a	128,6±1,8 ^b	132,6±2,3 ^a	120,6±1,8 ^b
Força de Fratura Relativa (N/g)	267,6±4,4 ^a	242,9±3,7 ^b	250,0±3,8 ^a	260,5±3,1 ^b	267,1±3,8 ^a	243,4±4,5 ^b

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+OSP+SSC+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+OSP+SEP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

6.3.3. Conteúdo Mineral Ósseo

Os dados do conteúdo mineral ósseo foram normalizados pelos valores de peso da tíbia, sendo apresentados de forma absoluta e em percentagem do peso da tíbia.

Não foi observada interação significativa ($P > 0,05$) entre os fatores para todos os parâmetros avaliados de conteúdo mineral ósseo. As análises dos parâmetros de conteúdo mineral ósseo dos animais para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína, separadamente, estão apresentados na Tabela 6.4.

Quanto ao fator Ovário, os animais OVX apresentaram significativamente menor conteúdo e percentagem de cálcio ósseo quando comparados aos animais SHAM.

Para o fator Exercício, foi observado que os animais exercitados apresentaram maior conteúdo e percentagem de cálcio ósseo quando comparados aos animais não exercitados, porém, exibiram menor conteúdo e percentagem de zinco.

Para o fator Cafeína, foi verificado que os animais que consumiram cafeína apresentaram menor conteúdo e percentagem de cálcio quando comparados aos animais placebo.

Tabela 6.4. Conteúdo mineral ósseo na tíbia para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Peso ósseo (mg)	381,0±4,4 ^a	369,9±3,9 ^a	375,4±4,7 ^a	375,6±3,7 ^a	374,5±4,1 ^a	377,5±4,4 ^a
Conteúdo de Cálcio (mg)	47,1±0,6 ^a	42,2±0,6 ^b	43,5±0,6 ^a	45,8±0,7 ^b	45,8±0,5 ^a	43,5±0,8 ^b
Cálcio Ósseo (%)	12,4±0,2 ^a	11,5±0,2 ^b	11,6±0,2 ^a	12,2±0,2 ^b	12,3±0,1 ^a	11,5±0,2 ^b
Conteúdo de Magnésio (mg)	0,98±0,03 ^a	0,94±0,03 ^a	0,91±0,03 ^a	1,00±0,04 ^a	0,99±0,04 ^a	0,93±0,03 ^a
Magnésio Ósseo (%)	0,25±0,01 ^a	0,25±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,24±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,25±0,01 ^a
Conteúdo de Zinco (mg)	0,22±0,03 ^a	0,17±0,02 ^a	0,30±0,03 ^a	0,09±0,01 ^b	0,20±0,03 ^a	0,19±0,03 ^a
Zinco Ósseo (%)	0,06±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a	0,02±0,01 ^b	0,05±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+OSP+SSC+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+OSP+SEP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

6.3.4. Biomarcadores Ósseos e Excreção de Cálcio Urinário

Não foi observada interação estatística ($P > 0,05$) entre os fatores Ovário, Cafeína e Exercício para os parâmetros de excreção de cálcio urinário e biomarcadores ósseos. Os resultados para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína separadamente estão apresentados na Tabela 6.5.

Quanto ao fator Ovário, observou-se que os animais OVX apresentaram menor valor de ostase quando comparados aos animais SHAM, porém, exibiram maior NTx.

Quanto ao fator Exercício, foi identificado que os animais exercitados apresentaram menor NTx quando comparados aos animais sedentários.

Para o fator Cafeína, foi constatado que os animais que consumiram cafeína mostraram maior conteúdo de cálcio urinário, taxa cálcio/creatinina e NTx quando comparados aos animais placebos.

Tabela 6.5. Excreção Urinária de Cálcio e Biomarcadores Ósseos para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Exercício		Cafeína	
	SHAM	OVX	Sedentário	Exercitado	Placebo	Cafeína
Cálcio (mg/dL/24H)	0,24±0,04 ^a	0,20±0,02 ^a	0,20±0,02 ^a	0,23±0,02 ^a	0,18±0,01 ^a	0,26±0,02 ^b
Taxa Cálcio /Creatinina	0,43±0,04 ^a	0,35±0,04 ^a	0,36±0,04 ^a	0,43±0,04 ^a	0,32±0,04 ^a	0,47±0,04 ^b
NTx (nM						
BCE/ mM Creatinina)	48,9±1,5 ^a	55,1±1,8 ^b	55,2±2,0 ^a	49,8±1,2 ^b	49,8±2,1 ^a	54,3±1,2 ^b
Ostase (pg/mL)	137,1±9,6 ^a	102,6±1,3 ^b	126,5±9,9 ^a	113,8±1,7 ^a	116,0±3,2 ^a	123,7±9,9 ^a

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (SSP+SSC+SEP+SEC), OVX (OSP+OSC+OEP+OEC), Sedentário (SSP+OSP+SSC+OSC), Exercitado (SEP+SEC+OEP+OEC), Placebo (SSP+OSP+SEP+OEP) e Cafeína (SSC+SEC+OSC+OEC).

Neste estudo foram observadas correlações significantes entre os parâmetros analisados. O peso femoral absoluto apresentou correlação “positiva” com a força de fratura óssea ($\rho = 0,310$ e $p < 0,001$), peso da tíbia ($\rho = 0,793$ e $p < 0,0001$), conteúdos de cálcio ($\rho = 0,364$ e $p < 0,001$) e magnésio ($\rho = 0,303$ e $p < 0,001$) na tíbia. A força de fratura absoluta óssea mostrou correlação “positiva” com o conteúdo de cálcio na tíbia ($\rho =$

0,471 e $p < 0,0001$). O conteúdo de cálcio da tíbia exibiu correlação “positiva” com o conteúdo de magnésio ($\rho = 0,381$ e $p < 0,0001$). Já o conteúdo de NTx exibiu correlação “negativa” com a força de fratura absoluta ($\rho = -0,437$ e $p < 0,0001$) e conteúdo de cálcio na tíbia ($\rho = -0,364$ e $p < 0,001$).

6.4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da ovariectomia, da ingestão de cafeína e do exercício aeróbico sobre o tecido ósseo em ratas com inadequação alimentar de cálcio. Confrontados aos resultados constatados no capítulo anterior (capítulo V, com 100% das necessidades de cálcio), observou-se que a baixa ingestão de cálcio, ou seja, 50% das necessidades diárias, desencadeou alterações representativas sobre o tecido ósseo. Neste estudo verificou-se que a ovariectomia não afetou os teores urinários de cálcio, que o exercício não interferiu na excreção de cálcio urinário e Ostease sanguínea, e que a ingestão de cafeína reduziu a força de fratura e o conteúdo de cálcio ósseo, além de elevar a taxa cálcio/creatinina. Contudo, o principal achado foi observar uma interação entre a ovariectomia e a ingestão de cafeína, potencializando a redução da resistência óssea em animais que ingeriram 50% do cálcio recomendado.

Neste estudo foram verificadas correlações “positivas” da força capaz de promover a fratura óssea com o peso do fêmur e o conteúdo de cálcio da tíbia, como também correlações “negativas” do conteúdo de NTx urinário com a força de fratura do fêmur e o conteúdo de cálcio da tíbia. Tais resultados evidenciam que a massa óssea é diretamente relacionada à resistência óssea, e ambas são inversamente relacionadas ao processo de

mobilização óssea, apresentando indícios de que a elevação da massa óssea previamente pode ser um importante passo na prevenção de futuras fraturas decorrentes da osteoporose.

A deficiência de estrogênio pode afetar negativamente o CMO e a resistência óssea devido ao desequilíbrio no remodelamento ósseo (Hara, Kobayashi *et al.*, 2007; Dai, Ma *et al.*, 2008; Huang, Chang *et al.*, 2008; Park, Omi *et al.*, 2008), por elevar a mobilização e reduzir a formação óssea (Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; D'amelio, Grimaldi *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que esta hipótese acima também é verdadeira quando animais ingerem baixos teores de cálcio, uma vez que, em animais que consumiram metade da recomendação de cálcio, a ausência do hormônio estrogênio reduziu o peso e força de fratura no fêmur, os teores de cálcio na tíbia e o conteúdo de Ostase sangüínea, além de elevar o conteúdo de NTx urinário (Tabelas 6.3, 6.4 e 6.5). Tais resultados foram similares aos observados no capítulo V, onde as ratas consumiram 100% do cálcio recomendado.

Não foi encontrado estudo com ratas adultas OVX ou mulheres pós-menopausa sobre os efeitos da ingestão de baixos teores de cálcio sobre o CMO, a resistência e os marcadores ósseos. No entanto, nossos resultados são, em parte, similares aos de Park et al. (2008), que estudando ratas OVX jovens que consumiram 0,1% de cálcio na dieta, constataram que além de reduzir a DMO, animais OVX com ingestão de baixos teores de cálcio aumentaram os níveis de TRAP. Os achados do presente estudo confirmam a proposição de que a deficiência de estrogênio em indivíduos que consomem baixos teores de cálcio promove desordem no metabolismo de cálcio afetando negativamente o tecido ósseo.

Os níveis de excreção urinária de cálcio e a taxa cálcio/creatinina observados deste estudo foram menores que os identificados em animais que consumiram quantidades de

cálcio adequadas (Capítulo V). Isto sugere que a menor oferta de cálcio alimentar leva a uma menor concentração de cálcio circulante, e conseqüentemente, estimula o aumento dos níveis de PTH sangüíneo, que inibe as perdas urinárias de cálcio para manter seus níveis sangüíneos mais próximos do adequado (Costa e Peluzio, 2008; Mcmanus, Davey *et al.*, 2008). Este comportamento na perda de cálcio urinário foi observado para os três fatores aqui estudados (Ovário, Exercício e Cafeína; Tabela 6.5), quando comparados aos dados de excreção urinária do capítulo anterior.

A excreção urinária de cálcio tem sido associada à redução de massa óssea devido à osteoporose (Massey e Sutton, 2004). No presente estudo, a ovariectomia não afetou a perda de cálcio urinário em ratas que ingeriram baixo teor de cálcio (Tabela 6.5). Contudo, os níveis de cálcio urinário em animais que ingeriram 50% de cálcio (capítulo VI) foram abaixo dos observados em animais que ingeriram 100% de cálcio (capítulo V). Isto sugere que, em animais OVX, a menor ingestão de cálcio minimizou suas perdas urinárias em razão de sua menor biodisponibilidade, a fim de manter maiores níveis de cálcio circulante.

A ingestão de cafeína tem sido associada com a perda de massa óssea (Jasminka, Brownbill *et al.*, 2002; Massey e Sutton, 2004; Tsuang, Sun *et al.*, 2006), em função ao aumento na excreção de cálcio urinário (Chen e Whitford, 1999; Heaney, 2002), resultando numa maior suscetibilidade à fratura (Rapuri, Gallagher *et al.*, 2001; Heaney, 2002; Tsuang, Sun *et al.*, 2006). Esta suposição foi confirmada por este estudo em animais que ingeriram baixos teores de cálcio dietético, onde a ingestão de cafeína reduziu o conteúdo de cálcio na tíbia e a força de fratura do fêmur, por elevar a excreção de cálcio e o marcador de reabsorção óssea na urina (Tabela 6.3, 6.4 e 6.5). Todavia, estes resultados sobre a massa e resistência óssea não haviam sido verificados no capítulo anterior (100% de

cálcio), sugerindo que a baixa ingestão de cálcio tenha potencializado a ação da cafeína sobre o tecido ósseo.

Um possível mecanismo para esta ação da cafeína sobre o tecido ósseo em ratas que ingeriram baixo conteúdo de cálcio seria que o aumento na excreção de cálcio urinário induzido pela cafeína, poderia diminuir ainda mais a concentração de cálcio circulante, que deveria estar baixa em função de sua inadequada ingestão dietética, uma vez que esta reduziria quantitativamente a absorção intestinal. O inadequado conteúdo de cálcio circulante estimula a liberação de PTH sangüíneo para restaurar seus níveis circulantes. O PTH, por sua vez, promove o aumento na absorção intestinal e mobilização do cálcio ósseo, além de diminuir a excreção de cálcio urinário (Costa e Peluzio, 2008; Mcmanus, Davey *et al.*, 2008). Uma evidência em favor deste mecanismo é que no experimento do capítulo VII constatou-se que absorção intestinal de cálcio elevou em razão do consumo de cafeína, e que neste estudo, os conteúdos de cálcio e resistência óssea diminuíram em virtude da ingestão desta substância.

Apesar de estudos anteriores sugerirem que a administração de cafeína ofereceria maior risco à perda de massa óssea por elevar a diferenciação dos osteoblastos (Massey e Sutton, 2004) e aumentar sua taxa de apoptose (Tsuang, Sun *et al.*, 2006), nos resultados deste estudo, não foi observada alteração significativa do marcador de formação óssea (Ostase) em função do consumo de cafeína. Entretanto, verificou-se que o marcador de mobilização óssea (NTx urinário) elevou após 8 semanas do consumo de 6 mg/kg de cafeína, sugerindo que a cafeína acelera o processo de remodelamento ósseo por estimular o processo de mobilização, mas não o de formação óssea. A inconsistência de resultados do impacto da cafeína sobre o tecido ósseo ainda é grande, porém, os resultados deste estudo

apontam que a ação deletéria da cafeína sobre o tecido ósseo é mais eminente em indivíduos com inadequação de cálcio dietético.

Um dos mais importantes resultados deste estudo foi identificar uma interação significativa entre os fatores Ovário e Cafeína sobre a resistência óssea. Observou-se que tanto a deficiência de estrogênio quanto a ingestão de cafeína reduziram a força necessária para promover a fratura óssea, sendo que estes efeitos se potencializaram reduzindo ainda mais a resistência óssea (Tabela 6.2). Estes resultados foram constatados apenas em animais que ingeriram metade da recomendação de cálcio alimentar (capítulo VI), mas não nas ratas que consumiram 100% do cálcio recomendado (capítulo V). Isto evidencia que mulheres pós-menopausa com padrão dietético de baixa ingestão de cálcio, associado ao consumo de alimentos ricos em cafeína, poderão apresentar riscos de fraturas ósseas aumentados. Esta é a situação típica das mulheres adultas e idosas brasileiras, que apresentam ingestão de cálcio entre 240 a 625 mg/dia, o que representa 20,0 a 52,1 % da sua recomendação diária (Velásquez-Meléndez, Martins *et al.*, 1997; Montilla, Aldrghi *et al.*, 2004; Batista, Priore *et al.*, 2006), e exibem um aumento no consumo de produtos cafeinados.

Este estudo também avaliou se o programa de exercício aeróbico de baixa intensidade promoveria benefícios aos animais que ingeriram baixo teor de cálcio alimentar. O programa de exercício aplicado aos animais com deficiência de cálcio dietético provocou aumentos no peso e força de fratura do fêmur e conteúdo de cálcio na tíbia, além de reduzir o conteúdo de zinco na tíbia e o conteúdo de NTx urinário (Tabelas 6.3, 6.4 e 6.5). Estes achados foram também observados em animais que consumiram 100% da recomendação de cálcio (capítulo V). Entretanto, o programa aplicado não afetou a excreção de cálcio urinária e a Ostase sangüínea nos animais que ingeriram baixo teor de

cálcio, o que havia sido observado em ratas consumido 100% de cálcio alimentar (capítulo V).

O estresse mecânico gerado pelo exercício de suportar peso tem sido o fator mais eficaz na formação e crescimento ósseo (Rittweger, Frost *et al.*, 2005; Turner e Robling, 2005; Bonnet, Beaupied *et al.*, 2007; Welch, Turner *et al.*, 2008), tendo um papel decisivo na prevenção e tratamento da osteoporose (Notomi, Okimoto *et al.*, 2003; Fuchs, Shea *et al.*, 2007; Park, Omi *et al.*, 2008), porém, existem poucos relatos do exercício de corrida em ratas OVX com baixa ingestão de cálcio dietético (Iwamoto, Takeda *et al.*, 1998). Iwamoto *et al.* (1998) estudaram ratas Wistar OVX, com osteopenia induzida pela baixa ingestão de cálcio, correndo em esteira (12 m/min por 60 min), e verificaram que o exercício elevou a DMO e força de fratura da tíbia. Estes resultados corroboram os observados no presente estudo, que mostrou que a intensidade e duração do exercício empregado foram suficientes para promover benefícios ao tecido ósseo em animais deficientes de cálcio dietético. Além do mais, no presente estudo, ratas exercitadas e com ingestão de 50% de cálcio mostraram reduzir o marcador de reabsorção, mas, não afetou o de formação óssea. No capítulo anterior, verificou-se que ratas consumiram 100% da recomendação de cálcio elevaram o conteúdo da Ostase, de forma similar a um estudo anterior (Gala, Diaz-Curiel *et al.*, 2001). Tais achados nos indicam que a deficiência de cálcio alimentar teria inibido a elevação do processo de formação óssea promovido pelo exercício de baixa intensidade. Porém, ainda não se conhece o mecanismo desta ação.

Como visto anteriormente, os níveis da excreção de cálcio urinário nos animais que consumiram baixos teores de cálcio apresentaram-se menores quando comparados aos resultados do capítulo anterior (100% de cálcio). A baixa ingestão de cálcio promovendo uma reduzida absorção intestinal, e subsequente, menores níveis de cálcio circulante pode

ter sido o motivo pelo o qual a perda urinária de cálcio em função ao programa de exercício, foi minimizada neste estudo quando comparada ao capítulo V. Esta menor perda de cálcio poderia ser um mecanismo protetor do organismo, a fim de poupar os níveis de cálcio séricos para suas funções fisiológicas, no entanto, este mecanismo ainda precisa ser esclarecido.

Como no capítulo anterior (Cálcio 100 %), neste estudo constatou-se que o treinamento físico reduziu o conteúdo de zinco na tíbia. Comparando os resultados do capítulo V (Cálcio 100 %) com os do atual estudo (Cálcio 50 %), verifica-se que os valores da percentagem de zinco óssea não exibem grandes modificações que pudessem sugerir que a deficiência de cálcio afetaria seus estoques ósseos. Desta forma, os resultados aqui verificados são atribuídos especificamente à realização do exercício. Não foram encontrados relatos de mobilização do zinco ósseo em virtude da prática de exercício, apesar de alguns autores mencionarem que o exercício extenuante pode reduziu o CMO (Seco, Revilla *et al.*, 1998) e o zinco no suor (Chinevere, Kenefick *et al.*, 2008). Isto sugere que o mecanismo da ação do exercício sobre o conteúdo do zinco ósseo precisa ser investigado futuramente.

Em conclusão, no presente estudo observou-se que animais que ingeriram a metade da recomendação de cálcio dietético, que a deficiência de estrogênio e a ingestão de cafeína reduziram a massa e a resistência óssea. A ovariectomia afetou o remodelamento ósseo por estimular a mobilização e reduzir a formação óssea, já a ingestão de cafeína elevou a excreção urinária de cálcio e a mobilização óssea. Estes efeitos se potencializaram diminuindo ainda mais a resistência óssea, sugerindo que a ingestão de baixo teor de cálcio, associado ao consumo de produtos cafeinados potencializa os riscos de fraturas ósseas na deficiência estrogênica. A intensidade e duração do programa de exercício aqui empregado foram suficientes para beneficiar o tecido ósseo em animais com deficiência de cálcio alimentar.

6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aoac. Official methods of analysis. Washington, D.C. 1998

Batista, M. C. R., S. E. Priore, *et al.* Avaliação Dietética dos Pacientes Detectados Com Hiperglicemia na “Campanha de Detecção de Casos Suspeitos de Diabetes” no Município de Viçosa, MG. Arq Bras Endocrinol Metab, v.50, n.6, p.1041-9. 2006.

Bischoff-Ferrari, H. A., J. R. Rees, *et al.* Effect of calcium supplementation on fracture risk: a double-blind randomized controlled trial. Am J Clin Nutr, v.87, n.6, Jun, p.1945-51. 2008.

Bonnet, N., H. Beaupied, *et al.* Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, v.22, n.4, Apr, p.578-88. 2007.

Chen, X. e G. M. Whitford. Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. Arch Oral Biol, v.44, n.1, Jan, p.33-9. 1999.

Chinevere, T. D., R. W. Kenefick, *et al.* Effect of heat acclimation on sweat minerals. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.5, May, p.886-91. 2008.

Costa, N. M. B. e M. C. Peluzio. Nutrição básica e metabolismo. Viçosa: Editora UFV. 2008. 400 p.

D'amelio, P., A. Grimaldi, *et al.* Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. Bone, v.43, n1, p92-100. 2008.

Dai, R., Y. Ma, *et al.* Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.4, p.342-9. 2008.

Dew, T. P., A. J. Day, *et al.* Bone mineral density, polyphenols and caffeine: a reassessment. Nutr Res Rev, v.20, n.1, Jun, p.89-105. 2007.

Doherty, M., P. Smith, *et al.* Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. J Sports Sci, v.22, n.7, Jul, p.637-43. 2004.

Fuchs, R. K., M. Shea, *et al.* Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. Bone, v.41, n.2, Aug, p.290-6. 2007.

Gala, J., M. Diaz-Curiel, *et al.* Short- and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. Br J Nutr, v.86, n.4, Oct, p.521-7. 2001.

Hara, K., M. Kobayashi, *et al.* Influence of bone osteocalcin levels on bone loss induced by ovariectomy in rats. J Bone Miner Metab, v.25, n.6, p.345-53. 2007.

Hartley, T. R., W. R. Lovallo, *et al.* Cardiovascular effects of caffeine in men and women. Am J Cardiol, v.93, n.8, Apr 15, p.1022-6. 2004.

Heaney, R. P. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. Food Chem Toxicol, v.40, n.9, Sep, p.1263-70. 2002.

Henry, R. J., D. C. Cannon, *et al.* Clinical chemistry and technics. . New York, . 1974

Hitz, M. F., P. C. Eskildsen, *et al.* Bioavailability of calcium: comparison of calcium carbonate and milk and the effect of vitamin D, age, and sex using 24-hour urine calcium as a method. Calcif Tissue Int, v.77, n.6, Dec, p.361-6. 2005.

Honda, A., N. Sogo, *et al.* High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. J Appl Physiol, v.95, n.3, Sep, p.1032-7. 2003.

Huang, T.-H., F.-L. Chang, *et al.* Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. J Bone Miner Metab, v.26, p.350-357. 2008.

Huang, T. H., R. S. Yang, *et al.* Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. Bone, v.30, n.1, Jan, p.293-9. 2002.

Hubal, M. J., C. P. Ingalls, *et al.* Effects of eccentric exercise training on cortical bone and muscle strength in the estrogen-deficient mouse. J Appl Physiol, v.98, n.5, May, p.1674-81. 2005.

Iwamoto, J., T. Takeda, *et al.* Effect of exercise on tibial and lumbar vertebral bone mass in mature osteopenic rats: bone histomorphometry study. J Orthop Sci, v3, n5, p.257-63. 1998.

Iwamoto, J., J. K. Yeh, *et al.* Effects of vitamin D supplementation on calcium balance and bone growth in young rats fed normal or low calcium diet. Horm Res, v61, 6, p293-9. 2004.

Jasminka, Z. I., R. A. Brownbill, *et al.* To Drink or Not to Drink: How Are Alcohol, Caffeine and Past Smoking Related to Bone Mineral Density in Elderly Women? Journal of the American College of Nutrition, v.21, n.6, p.536-44. 2002.

Lambert, H. L., R. Eastell, *et al.* Calcium supplementation and bone mineral accretion in adolescent girls: an 18-mo randomized controlled trial with 2-y follow-up. Am J Clin Nutr, v.87, n.2, Feb, p.455-62. 2008.

Lanzillotti, H. S., R. S. Lanzillotti, *et al.* Osteoporosis in postmenopausal women, dietary calcium and other risk factors. Rev. Nutr., v.16, n.2, p.181-93. 2003.

Massey, L. K. e R. A. Sutton. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. J Urol, v.172, n.2, Aug, p.555-8. 2004.

Mcmanus, J. F., R. A. Davey, *et al.* Intermittent Fugu parathyroid hormone 1 (1-34) is an anabolic bone agent in young male rats and osteopenic ovariectomized rats. Bone, v.42, n.6, Jun, p.1164-74. 2008.

Montilla, R. N. G., J. M. A. Aldrghi, *et al.* Relação cálcio/proteína da dieta de mulheres no climatério. Rev Assoc Med Bras, v.50, n.1, p.52-4. 2004.

Notomi, T., N. Okimoto, *et al.* Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. J Bone Miner Res, v.18, n.1, Jan, p.140-9. 2003.

O'connor, P. J., R. W. Motl, *et al.* Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. Pain, v.109, n.3, Jun, p.291-8. 2004.

Park, J. H., N. Omi, *et al.* Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.218-25. 2008.

Rapuri, P. B., J. C. Gallagher, *et al.* Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. Am J Clin Nutr, v.74, n.5, Nov, p.694-700. 2001.

Rapuri, P. B., H. K. Kinyamu, *et al.* Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women. J Clin Endocrinol Metab, v.87, n.5, May, p.2024-32. 2002.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Renno, A. C., A. R. Silveira Gomes, *et al.* Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. Exp Gerontol, v.42, n.6, Jun, p.517-22. 2007.

Rittweger, J., H. M. Frost, *et al.* Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. Bone, v.36, n.6, Jun, p.1019-29. 2005.

Seco, C., M. Revilla, *et al.* Effects of zinc supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. J Bone Miner Res, v.13, n.3, Mar, p.508-12. 1998.

Shiga, K., H. Hara, *et al.* Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. J Nutr, v.133, n.12, Dec, p.4207-11. 2003.

Silva, J. D. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. . Viçosa: Imprensa Universitária. 1990. 165 p.

Stear, S. J., A. Prentice, *et al.* Effect of a calcium and exercise intervention on the bone mineral status of 16-18-y-old adolescent girls. Am J Clin Nutr, v.77, n.4, p.985-92. 2003.

Tsuang, Y. H., J. S. Sun, *et al.* Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. J Orthop Surg Res, v.1, p.7. 2006.

Turner, C. H. e A. G. Robling. Exercises for improving bone strength. Br J Sports Med, v.39, n.4, Apr, p.188-9. 2005.

Velásquez-Meléndez, G., I. S. Martins, *et al.* Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública, v.31, n.2, p.157-162. 1997.

Welch, J. M., C. H. Turner, *et al.* High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. Bone, v42, n4, p660-8. 2008.

Wetmore, C. M., L. Ichikawa, *et al.* Association between caffeine intake and bone mass among young women: potential effect modification by depot medroxyprogesterone acetate use. Osteoporos Int, v.19, n.4, Apr, p.519-27. 2008.

Zhang, Y., X.-L. Dong, *et al.* Fructus ligustri lucidi extract improves calcium balance and modulates the calciotropic hormone level and vitamin D-dependent gene expression in aged ovariectomized rats. Menopause, v.5, n.3, p.1-8. 2008.

CAPÍTULO VII:

IMPACTO DA OVARIECTOMIA E DA INGESTÃO DE CAFEÍNA E CÁLCIO SOBRE O BALANÇO DE CÁLCIO EM RATAS WISTAR.

7.1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é o principal problema de saúde pública em mulheres pós-menopausa, as quais freqüentemente apresentam má absorção intestinal e balanço negativo de cálcio devido à redução no hormônio estrogênio (Kobayashi, Hara *et al.*, 2002; Zhang, Dong *et al.*, 2008). O balanço negativo de cálcio promove perdas de massa óssea e redução no conteúdo e na densidade de mineral óssea, elevando os riscos de fraturas (Kobayashi, Hara *et al.*, 2002; O'loughlin e Morris, 2003; Park, Omi *et al.*, 2008).

O cálcio é o principal mineral ósseo (Mitamura, Hara *et al.*, 2002; Costa e Peluzio, 2008), cuja absorção líquida apresenta função linear à sua ingestão dietética (Bronner, Salle *et al.*, 1992). Estudos sugerem que a baixa ingestão de cálcio, apesar de elevar a eficiência na absorção de cálcio, reduz o balanço de cálcio e a massa óssea, agravando a osteoporose (Hitz, Eskildsen *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008; Zhang, Dong *et al.*, 2008). Velásquez-Meléndez *et al.* (1997) mostraram que mulheres brasileiras exibem ingestão de cálcio próximo à metade de suas recomendações diárias, o que expõe estas mulheres a maiores riscos de balanço negativo de cálcio e desordens metabólicas ósseas. Desta forma, embora a influência da ovariectomia sobre a excreção de cálcio urinária e metabolismo ósseo tenha sido extensivamente estudada (O'loughlin e Morris, 2003; Dick, Devine *et al.*, 2005; Park, Omi *et al.*, 2008), o impacto da deficiência de estrogênio combinada à baixa ingestão de

cálcio dietética sobre o balanço de cálcio demanda mais investigações, especialmente quando associada ao consumo de cafeína.

O efeito da ingestão de cafeína ao longo prazo sobre o metabolismo de cálcio é complexo, podendo afetar inclusive sua absorção intestinal (Jasminka e Kerstetter, 2000; Heaney, 2002). Heaney (2002) relataram perda de 5 mg de cálcio por xícara de café consumida, induzindo o balanço de cálcio negativo. Além do mais, a ingestão de altas doses de cafeína (Ashizawa, Ouchi *et al.*, 1998; Sekiguchi, Kawata *et al.*, 2003) podem elevar a excreção de cálcio urinário, interferindo negativamente nos estoques corporais de cálcio (Huang, Yang *et al.*, 2002), principalmente em mulheres pós-menopausa. O efeito deletério da cafeína torna-se mais pronunciado quando o cálcio dietético é inadequado (Heaney, 2002), onde a perda urinária não é compensada após 24 horas do consumo de cafeína (Jasminka e Kerstetter, 2000; Massey e Sutton, 2004). Isto indica que mulheres brasileiras, as quais exibem inadequação de cálcio dietético, estariam sujeitas a maiores riscos de desordens metabólicas ósseas, especialmente se não praticantes de atividade física regular.

O exercício é conhecido como meio importante para reduzir os riscos de fraturas osteoporóticas, por elevar a massa óssea (Huang, Lin *et al.*, 2003; Iwamoto, Shimamura *et al.*, 2004) e o balanço de cálcio (Leblanc, Evans *et al.*, 1983; Lutz, Chen *et al.*, 1987; Yeh e Aloia, 1990). LeBlanc *et al.* (1983) relataram redução no balanço de cálcio em animais após pararem de exercitar. Lutz *et al.* (1987) mostraram que a corrida forçada restabeleceu o balanço de cálcio positivo após 28 dias de sedentarismo. Isto sugere que o treinamento físico poderia promover adaptações positivas sobre o balanço de cálcio, resultando na melhoria da qualidade de vida. Contudo, ainda não se conhece o impacto de programas de

corrida aeróbica sobre o balanço de cálcio em mulheres deficientes de estrogênio ingerindo cafeína e recebendo baixos teores de cálcio dietético.

A osteoporose pós-menopausa é associada com balanço de cálcio negativo em função de sua ingestão dietética insuficiente e deficiência estrogênica diminuir a absorção intestinal de cálcio. O baixo consumo de cálcio, constatado na população de mulheres brasileiras, poderia reduzir o balanço de cálcio, conseqüentemente, prejudicar mais ainda a homeostase óssea. Adicionalmente, o aumento na ingestão de cafeína tem mostrado incrementar as perdas de cálcio urinário, podendo afetar negativamente o seu balanço. Em contrapartida, o exercício aeróbico parece ser uma estratégia eficaz para a prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopausa. Porém, existem poucas evidências de seus benefícios sobre o balanço de cálcio nesta população. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da ovariectomia e da ingestão de cafeína, associada ao baixo consumo de cálcio sobre o balanço de cálcio em ratas Wistar treinadas aerobiamente em esteira.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1. Animais Experimentais

Foram utilizadas 80 ratas Wistar adultas de 160 dias de idade (peso médio: $275,5 \pm 22,8$ g; média \pm DP). Os animais foram alojados em gaiolas individuais, por 8 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de cerca de 60% e foto-período de 12 horas.

Os animais foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – MG 7, e os procedimentos experimentais foram

aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG (Parecer nº 80/2007).

7.2.1.1. Experimento I – Animais sedentários

Após 3 semanas de recuperação das cirurgias, 40 ratas foram alocadas em 8 grupos (n=5): SPCa100 – SHAM Placebo Cálcio 100%; OPCa100 – OVX Placebo Cálcio 100%; SCCa100 – SHAM Cafeína Cálcio 100%; OCCa100 – OVX Cafeína Cálcio 100%; SPCa50 – SHAM Placebo Cálcio 50%; OPCa50 – OVX Placebo Cálcio 50%; SCCa50 – SHAM Cafeína Cálcio 50%; e OCCa50 – OVX Cafeína Cálcio 50%. O peso corporal foi monitorado semanalmente, usando balança eletrônica digital (Marte - Brasil). O consumo de dieta alimentar foi monitorado diariamente.

7.2.1.2. Experimento II – Animais exercitados

Outras 40 ratas, após 3 semanas de recuperação das cirurgias, foram alocadas em 8 grupos (n=5): ESPCa100 – Exercitado SHAM Placebo Cálcio 100%; EOPCa100 – Exercitado OVX Placebo Cálcio 100%; ESCCa100 – Exercitado SHAM Cafeína Cálcio 100%; EOCCa100 – Exercitado OVX Cafeína Cálcio 100%; ESPCa50 – Exercitado SHAM Placebo Cálcio 50%; EOPCa50 – Exercitado OVX Placebo Cálcio 50%; ESCCa50 – Exercitado SHAM Cafeína Cálcio 50%; e EOCCa50 – Exercitado OVX Cafeína Cálcio 50%. O consumo de dieta foi monitorado diariamente e o peso corporal monitorado semanalmente.

Duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos a um processo de adaptação ao exercício de corrida em esteira (8 m/min, 10 min/dia por 5 dias). Em seguida, foram submetidos a um programa progressivo de corrida aeróbica em esteira exercitando

numa velocidade de 16 m/min durante 30 minutos diários, 5 sessões por semana, num período de 8 semanas, conforme adaptação de Iwamoto et al. (2004).

7.2.2. Cirurgia de Ovariectomia

As ratas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou laparotomia (SHAM), após anestesia com Ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) intramuscular, recebendo no pós-operatório a administração subcutânea de anti-inflamatório (Ketofen: 2 mg/kg por 3 dias) e antibiótico (Ampicilina sódica: 30 mg/kg por 5 dias), conforme estudos anteriores (Kobayashi, Hara *et al.*, 2002; Shinoda, Latour *et al.*, 2002; Mcmanus, Davey *et al.*, 2008).

7.2.3. Administração de Cafeína e Ingestão de Cálcio

Diariamente, os animais dos grupos SCCa100, SCCa50, OCCa100, OCCa50, ESCCa100, ESCCa50, EOCCa100 e EOCCa50 receberam suplementação de 6 mg de cafeína/kg de peso corporal, adicionada à dieta dos animais. Os animais dos grupos SPCa100, SPCa50, OPCa100, OPCa50, ESPCa100, ESPCa50, EOPCa100 e EOPCa50 receberam apenas a dieta (placebo). As doses de suplementação de cafeína foram identificadas em estudos recentes como doses moderadas utilizadas em humanos e animais (Doherty, Smith *et al.*, 2004; Hartley, Lovallo *et al.*, 2004; O'connor, Motl *et al.*, 2004; Hadjicharalambous, Georgiades *et al.*, 2006; Chapman e Stager, 2008; Glaister, Howatson *et al.*, 2008). Todos os animais receberam água deionizada *ad libitum*.

Os animais dos grupos SPCa100, OPCa100, SCCa100, OCCa100, ESPCa100, EOPCa100, ESCCa100 e EOCCa100 receberam diariamente de 18 a 20g de dieta AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) contendo 100% da recomendação de cálcio para ratos

(0,5% de cálcio da dieta). Os animais dos grupos SPCa50, OPCa50, SCCa50, OCCa50, ESPCa50, EOPCa50, ESCCa50 e EOCCa50 receberam diariamente de 18 a 20 gramas de dieta AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) contendo 50% da recomendação de cálcio para ratos (0,25% de cálcio da dieta).

7.2.4. Determinação do Balanço de Cálcio

Na 8ª semana de experimento, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para a coleta de fezes e urina, a fim de se determinar o balanço (Balanço = Ca Ingerido – Ca Fecal – Ca Urinário) e as percentagens de retenção (% Retenção = Balanço / Ca Ingerido) e de absorção (% Absorção = Ca Ingerido – Ca Fecal / Ca Ingerido) de cálcio.

O conteúdo de cálcio ingerido foi determinado pela média do consumo de dieta dos animais no período de avaliação multiplicado pelo teor de cálcio de cada dieta (0,5% para dieta com 100% de cálcio e 0,25% para 50% de cálcio).

O conteúdo de dieta foi controlado diariamente por quatro dias, e calculou-se a média diária de dieta consumida pelos animais para ser utilizada no cálculo do balanço de cálcio. Uma dieta adicionada de carmim (200 mg/ 100 g de dieta) foi fornecida com o objetivo de marcar as fezes com coloração de azul escuro, facilitando identificar as fezes provenientes da dieta do dia de análise. No primeiro dia de experimento foi colocada dieta marcada com carmim. Nos dois dias seguintes foram oferecidas as dietas sem marcação e, no quarto dia retornou-se com a dieta marcada com carmim no (Quadro 7.1).

As fezes foram coletadas com pinça individualmente durante 4 dias. No 2º dia coletaram-se as fezes marcadas com carmim, nos 2 dias seguintes coletaram-se todas as fezes, e no 5º dia coletaram-se apenas as fezes não marcadas com carmim (Quadro 7.1). O conteúdo total de fezes foi quantificado, seco em estufa a 105°C por 24 horas e novamente

quantificado. Os valores do conteúdo de fezes foram divididos por 4 para se obter a média diária. Em seguida, as fezes foram trituradas para se analisar o conteúdo de cálcio da mesma.

Quadro 7.1 – Cronograma da oferta de dieta e coleta de fezes e urina.

	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Dieta	Dieta com carmim	Dieta normal	Dieta normal	Dieta com carmim	
Fezes		Coletar fezes marcadas.	Coletar fezes totais.	Coletar fezes totais.	Coletar fezes não marcadas
Urina			Início da coleta de urina	Final da coleta de urina	

O volume de urina coletado foi completado para 10 mL com água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2.865 gravidades (Excelsa-Fanem-Brasil). Após a centrifugação foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20 µL/mL) para a conservação da amostra.

Aliquotas das fezes e do sobrenadante da urina centrifugada foram digeridas em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluídas em água deionizada para posterior determinação de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA (Perkin Elmer - USA) (Silva, 1990; Huang, Yang *et al.*, 2002). As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada pela Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 1998).

7.2.5. Análise Estatística

Após os dados serem submetidos ao teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), aplicou-se análise de variância (ANOVA: three-way para as interações e os 3 fatores) e testes de correlação de Pearson para determinar a relação entre variáveis. Para as análises de múltiplas comparações *post hoc* foram utilizados o teste de Tukey em análises paramétricas e Dunn's em análises não-paramétricas. Os cálculos estatísticos foram realizados no software Sigma Stat 3.0 [SPSS], empregando o nível de significância estatística de $P < 0,05$.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Experimento I– Animais sedentários

Para os fatores Ovário e Cálcio foram observadas interações estatísticas nos parâmetros conteúdo de cálcio fecal, balanço de cálcio, % retenção, % absorção e razão cálcio/fezes (Tabela 7.1). Constatou-se que tanto nos grupos SHAM e OVX, os animais que consumiram 100% apresentaram maior ($P < 0,05$) conteúdo de cálcio fecal, balanço de cálcio e razão cálcio/fezes do que os animais que consumiram 50%, entretanto, os animais dos grupos OVX com 100% de cálcio exibiram menores percentuais de retenção e de absorção, comparados aos que receberam 50% de cálcio na dieta. Nos grupos 100% de cálcio, os animais OVX mostraram maior conteúdo de cálcio fecal e razão cálcio/fezes, além de menor balanço, % retenção e % absorção do que os SHAM.

Tabela 7.1. Balanço de cálcio para interação Ovário e Cálcio.

		100%	50%
Cálcio Fecal (mg/dia)	SHAM	45,8±1,7 ^{Aa}	23,3±1,7 ^{Ab}
	OVX	57,5±1,7 ^{Ba}	25,4±1,7 ^{Ab}
Balanço de Cálcio (mg/dia)	SHAM	35,8±1,9 ^{Aa}	16,7±1,9 ^{Ab}
	OVX	23,6±1,9 ^{Ba}	17,4±1,9 ^{Ab}
% Retenção de Cálcio	SHAM	43,3±2,5 ^{Aa}	41,5±2,5 ^{Aa}
	OVX	28,8±2,5 ^{Ba}	40,1±2,5 ^{Ab}
% Absorção de Cálcio	SHAM	44,1±2,4 ^{Aa}	42,0±2,4 ^{Aa}
	OVX	29,2±2,4 ^{Ba}	40,6±2,4 ^{Ab}
Razão Cálcio/Fezes (mg/g)	SHAM	13,0±0,6 ^{Aa}	8,7±0,6 ^{Ab}
	OVX	15,8±0,6 ^{Ba}	8,3±0,6 ^{Ab}

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey. SHAM-Cálcio100% (SPCa100+SCCa100), SHAM-Cálcio50% (SPCa50+SCCa50), OVX-Cálcio100% (OPCa100+OCCa100), OVX-Cálcio50% (OPCa50+OCCa50). Independente da Cafeína.

Para os fatores Cálcio e Cafeína foi constatada interação estatística no balanço de cálcio (Tabela 7.2). Identificou-se que tanto nos grupos Placebo como nos que consumiram Cafeína, os animais que consumiram 100% de cálcio exibiram maior balanço de cálcio (P<0,05) do que os animais que consumiram 50% de cálcio. Nos grupos 100% de cálcio, os animais que ingeriram cafeína mostraram maior balanço de cálcio do que o placebo.

Tabela 7.2. Balanço de cálcio para interação Cálcio e Cafeína.

		100%	50%
Balanço de Cálcio (mg/dia)	Placebo	24,8±2,1 ^{Aa}	16,7±2,1 ^{Ab}
	Cafeína	34,6±2,1 ^{Ba}	17,4±2,1 ^{Ab}

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey. Placebo-Cálcio100% (SPCa100+OPCa100), Placebo-Cálcio50% (SPCa50+OPCa50), Cafeína-Cálcio100% (SCCa100+OCCa100), Cafeína-Cálcio50% (SCCa50+OCCa50). Independente do Ovário.

Quanto aos demais parâmetros das análises de balanço de cálcio não foram identificados interações estatísticas (P > 0,05) entre os fatores. Os resultados de balanço de cálcio para os fatores Ovário, Cálcio e Cafeína separadamente estão mostrados na Tabela 7.3.

Quanto ao fator Ovário, foi observado que os animais OVX apresentaram maior (P<0,5) conteúdo de cálcio fecal e razão cálcio/fezes quando comparados aos animais SHAM, no entanto, exibiram menor conteúdo urinário, balanço, % retenção e % absorção de cálcio.

Para o fator Cálcio, os animais que consumiram 100% da recomendação dietética mostraram maiores (P<0,5) conteúdos de cálcio ingerido, fecal, urinário e fezes, razão cálcio/fezes e balanço quando comparados aos animais consumindo 50%, contudo, apresentaram menor percentual de retenção e de absorção de cálcio.

Para o fator Cafeína, identificou-se que os animais que consumiram cafeína exibiram maiores valores (P<0,5) de balanço de cálcio, percentual de retenção e de

absorção quando comparados aos animais placebos, todavia, demonstraram menor conteúdo de cálcio fecal e razão cálcio/fezes.

Tabela 7.3. Balanço de cálcio para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Cálcio		Cafeína	
	SHAM	OVX	100%	50%	Placebo	Cafeína
Cálcio						
Ingerido (mg/dia)	61,2±5,0 ^a	62,2±4,6 ^a	81,8±1,6 ^a	41,6±0,9 ^b	60,9±4,6 ^a	62,5±5,0 ^a
Cálcio Fecal (mg/dia)	34,5±2,8 ^a	41,4±3,9 ^b	51,6±2,0 ^a	24,4±0,7 ^b	39,8±3,8 ^a	36,2±3,0 ^b
Cálcio Urinário (mg)	0,42±0,06 ^a	0,25±0,03 ^b	0,47±0,06 ^a	0,20±0,01 ^b	0,36±0,06 ^a	0,31±0,05 ^a
Balanço de Cálcio (mg/dia)	26,3±2,5 ^a	20,5±1,6 ^b	29,7±2,2 ^a	17,1±0,8 ^b	20,8±1,7 ^a	26,0±2,5 ^b
% Retenção de Cálcio	42,4±1,5 ^a	34,5±2,3 ^b	36,1±2,4 ^a	40,8±1,6 ^b	35,5±2,3 ^a	41,4±1,7 ^b
% Absorção de Cálcio	43,0±1,5 ^a	34,9±2,3 ^b	36,6±2,4 ^a	41,3±1,6 ^b	36,0±2,3 ^a	41,9±1,7 ^b
Conteúdo de Fezes (g/dia)	3,2±0,1 ^a	3,4±0,1 ^a	3,6±0,1 ^a	2,9±0,1 ^b	3,2±0,1 ^a	3,3±0,1 ^a
Razão Cálcio /Fezes (mg/g)	10,8±0,7 ^a	12,1±0,9 ^b	14,4±0,5 ^a	8,5±0,4 ^b	12,0±0,9 ^a	10,9±0,7 ^b

Valores em média±EPM. n = 20. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM

(SPCa100+SPCa50+SCCa100+SCCa50), OVX (OPCa100+OPCa50+OCCa100+OCCa50), Cálcio 100% (SPCa100+OPCa100+SCCa100+OCCa100), Cálcio 50% (SPCa50+OPCa50+SCCa50+OCCa50), Placebo (SPCa100+SPCa50+OPCa100+OPCa50) e Cafeína (SCCa100+SCCa50+OCCa100+OCCa50).

7.3.2. Experimento II– Animais exercitados

Os animais do experimento II realizaram uma sessão de corrida em esteira no dia em que se coletaram fezes e urina para a determinação do balanço de cálcio. Animais de experimentação, normalmente, ao serem manipulados ficam estressados e muitas vezes defecam e urinam. Assim, neste experimento, antes de retirar os animais das gaiolas, eles foram manipulados dentro de suas gaiolas metabólicas, de forma que estes defecassem e urinassem dentro das mesmas. Contudo, durante a sessão de corrida, houve perda fecal, o que inviabilizou a determinação do balanço e dos percentuais de retenção e de absorção de cálcio destes animais.

Para os fatores Cálcio e Cafeína foi observada interação significativa na razão cálcio/fezes (Tabela 7.4). Tanto nos grupos Placebo quanto Cafeína, os animais que consumiram 100% de cálcio apresentaram maior ($P<0,05$) razão cálcio/fezes do que os animais que consumiram 50%. Nos grupos que consumiram 100% de cálcio, os animais ingerindo cafeína mostraram menor razão cálcio/fezes do que o placebo.

Tabela 7.4. Balanço de cálcio para interação Cálcio e Cafeína.

		100%	50%
Razão Cálcio/Fezes (mg/g)	Placebo	13,6±0,5 ^{Aa}	4,7±0,5 ^{Ab}
	Cafeína	8,4±0,5 ^{Ba}	4,2±0,5 ^{Ab}

Valores em média±EPM. n = 10. Significância (P<0,05): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey. Placebo-Cálcio 100% (ESPCa100+EOPCa100), Placebo-Cálcio 50% (ESPCa50+EOPCa50), Cafeína-Cálcio 100% (ESCCa100+EOCCa100), Cafeína-Cálcio 50% (ESCCa50+EOCCa50). Independente do Ovário.

Quanto aos demais parâmetros das análises de balanço de cálcio, não foram identificados interações estatísticas (P > 0,05) entre os fatores. Os resultados do balanço de cálcio para os fatores Ovário, Exercício e Cafeína, separadamente, estão mostrados na Tabela 7.5. Ao fator Ovário não se observou alteração estatística nos parâmetros analisados.

Para o fator Cálcio, identificou-se que os animais que consumiram 100% de cálcio mostraram significativamente maior conteúdo de cálcio ingerido e razão cálcio/fezes quando comparados aos animais que consumiram 50%.

Para o fator Cafeína, verificou-se que os animais que consumiram cafeína mostraram menor razão cálcio/fezes quando comparados aos animais placebos.

Tabela 7.5. Balanço de cálcio para efeito principal dos fatores.

	Efeito Principal dos Fatores					
	Ovário		Cálcio		Cafeína	
	SHAM	OVX	100%	50%	Placebo	Cafeína
Cálcio						
Ingerido (mg/dia)	60,7±5,2 ^a	57,9±4,3 ^a	79,3±1,8 ^a	39,4±0,8 ^b	58,4±4,4 ^a	60,2±5,1 ^a
Razão Cálcio /Fezes (mg/g)	7,6±0,9 ^a	7,8±0,9 ^a	11,0±0,7 ^a	4,4±0,2 ^b	9,1±1,1 ^a	6,3±0,6 ^b

Valores em média±EPM. n = 20. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. SHAM (ESPCa100 + ESPCa50 + ESCCa100 + ESCCa50), OVX (EOPCa100 + EOPCa50 + EOCCa100 + EOCCa50), Cálcio 100% (ESPCa100 + EOPCa100 + ESCCa100 + EOCCa100), Cálcio 50% (ESPCa50 + EOPCa50 + ESCCa50 + EOCCa50), Placebo (ESPCa100 + ESPCa50 + EOPCa100 + EOPCa50) e Cafeína (ESCCa100 + ESCCa50 + EOCCa100 + EOCCa50).

7.3.3. Experimento I vs. Experimento II

Ao analisar o balanço de cálcio para o fator Exercício (Experimento I vs. Experimento II) constatou-se que os animais exercitados apresentaram menor conteúdo de cálcio fecal e de fezes, como também menor razão cálcio/fezes quando comparados aos animais sedentários, independente dos fatores Ovário, Cálcio e Cafeína (Tabela 7.6).

Tabela 7.6. Balanço de cálcio para o fator Exercício.

Fator	Cálcio Ingerido	Cálcio Fecal	Cálcio Urinário	Conteúdo de Fezes	Razão Cálcio/Fezes
Exercício	(mg/dia)	(mg/dia)	(mg/dia)	(g/dia)	(mg/g)
Sedentários	61,7±3,3 ^a	38,0±2,4 ^a	0,33±0,04 ^a	3,3±0,1 ^a	11,5±0,6 ^a
Exercitados	59,3±3,3 ^a	20,9±2,1 ^b	0,36±0,4 ^a	2,6±0,1 ^b	7,7±0,6 ^b

Valores em média±EPM. n = 40. Significância (P<0,05): médias seguidas pela mesma letra na coluna para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste F. Sedentários (SPCa100 + SPCa50 + SCCa100 + SCCa50 + OPCa100 + OPCa50 + OCCa100 + OCCa50), Exercitados (ESPCa100 + ESPCa50 + ESCCa100 + ESCCa50 + EOPCa100 + EOPCa50 + EOCCa100 + EOCCa50). Independentes dos fatores Ovário, Cálcio e Cafeína.

No experimento I (animais sedentários), o balanço de cálcio apresentou correlações estatísticas “positivas” com o conteúdo de cálcio ingerido ($\rho = 0,735$ e $p < 0,001$), cálcio fecal ($\rho = 0,370$ e $p = 0,02$), cálcio urinário ($\rho = 0,531$ e $p < 0,001$) e de fezes ($\rho = 0,532$ e $p < 0,001$), bem como com o percentual de retenção ($\rho = 0,518$ e $p < 0,001$) e de absorção ($\rho = 0,514$ e $p < 0,001$) de cálcio. Por outro lado, o percentual de absorção de cálcio exibiu correlações “negativas” com o conteúdo de cálcio fecal ($\rho = -0,560$ e $p < 0,001$) e razão cálcio/fezes ($\rho = -0,622$ e $p < 0,001$).

No experimento II (animais exercitados), o conteúdo de cálcio ingerido mostrou correlações significantes “positivas” com o conteúdo de cálcio fecal ($\rho = 0,781$ e $p < 0,001$), cálcio urinário ($\rho = 0,541$ e $p < 0,001$) e de fezes ($\rho = 0,603$ e $p < 0,001$), além da razão cálcio/fezes ($\rho = 0,740$ e $p < 0,001$). Verificou-se ainda correlação “positiva” entre a razão cálcio/fezes e os conteúdo de cálcio fecal ($\rho = 0,934$ e $p < 0,001$) e de fezes ($\rho = 0,340$ e $p = 0,03$).

7.4. DISCUSSÃO

No presente estudo investigou-se o impacto da ovariectomia e da ingestão de cálcio e de cafeína sobre o balanço de cálcio em ratas exercitadas ou não. Os resultados apontam que, em animais sedentários, a deficiência de estrogênio reduziu o balanço e o percentual de absorção de cálcio; a inadequação no consumo de cálcio diminuiu o balanço, porém, elevou o percentual de absorção de cálcio; e, que a administração de cafeína aumentou o balanço e o percentual de absorção de cálcio. Verificou-se ainda que a ovariectomia e a abstinência de cafeína reduziram o balanço de cálcio em animais que ingeriram 100% de cálcio, contudo, isto não foi verificado em ratas que consumiram 50%. Quanto aos animais exercitados, constatou-se que a ovariectomia não afetou a razão cálcio/fezes, todavia, a baixa ingestão de cálcio e o consumo de cafeína reduziram a razão cálcio/fezes. Observou-se ainda que a ingestão de cafeína reduziu a razão cálcio/fezes nos animais que consumiram 100% de cálcio, entretanto, esta redução não foi verificada nos animais que consumiram 50%. Além disso, identificou-se que a razão cálcio/fezes foi menor nos animais exercitados, quando comparados aos sedentários.

A ovariectomia promoveu um desequilíbrio no metabolismo de cálcio como relatado anteriormente (Kobayashi, Hara *et al.*, 2002; Mitamura, Hara *et al.*, 2002; Zhang, Lai *et al.*, 2006; Park, Omi *et al.*, 2008). Nossos resultados mostram que, em animais sedentários, a deficiência de estrogênio desencadeou balanço e % de absorção de cálcio menores em virtude da maior excreção de cálcio fecal, apesar da perda de cálcio urinário ter sido menor nas OVX comparada as SHAM (Tabela 7.3). Estes achados foram similares a de outros estudos (Kobayashi, Hara *et al.*, 2002; Zhang, Lai *et al.*, 2006). Por exemplo, Zhang *et al.* (2006) estudaram ratas Sprague-Dawley após 4 semanas da cirurgia de OVX ou SHAM. Os autores observaram que a OVX reduziu a % de absorção (40 vs. 60%) e o

balanço de cálcio (68 vs. 92 mg/dia) comparado ao SHAM, por terem elevado a excreção de cálcio fecal (87 vs. 56 mg/dia). Kobayashi et al. (2002) relataram que ratas Fisher fêmeas com 20 semanas de idade após 8 semanas da cirurgia de ovariectomia exibiram menor balanço de cálcio em ratas OVX comparadas às SHAM, devido ao menor transporte de cálcio intestinal. Assim, nossos resultados confirmam relatos anteriores de que a deficiência de estrogênio promove menor eficiência na absorção de cálcio. Isto sugere que o aumento nas perdas de cálcio fecal tenha sido determinante para o balanço negativo e menor percentual de absorção de cálcio, por reduzir a capacidade de absorção intestinal de cálcio no duodeno, como referido por outros autores (Mitamura, Hara *et al.*, 2002).

Uma das possíveis explicações para esta baixa capacidade na absorção de cálcio decorrente da ovariectomia seria que na deficiência de estrogênio, baixos níveis de estrogênio seriam acompanhados pela elevada taxa de *turnover* ósseo, decorrente da baixa atividade osteoblástica. A deficiência estrogênica incrementa a atividade osteoclástica e a mobilização óssea, aumentando o cálcio ionizado circulante. Com isso, a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é reduzida e, por conseguinte, o estímulo ao transporte intestinal ativo de cálcio diminui (Fnb-Iom, 1997). Mitamura et al. (2002) ainda relataram que a ovariectomia afeta a capacidade da absorção de cálcio intestinal por prejudicar mais o transporte passivo de cálcio do que o ativo.

Os resultados do experimento I para balanço de cálcio em virtude da ingestão de diferentes teores de cálcio na dieta corroboram os achados anteriores em humanos e animais (Mitamura, Hara *et al.*, 2002; Iwamoto, Yeh *et al.*, 2004; Coudray, Feillet-Coudray *et al.*, 2005; Hitz, Eskildsen *et al.*, 2005; Braun, Martin *et al.*, 2006; Zhang, Dong *et al.*, 2008). A ingestão de 50% de cálcio (0,25% da dieta), neste estudo, reduziu os conteúdos de cálcio fecal e urinário, balanço de cálcio e a razão cálcio/fezes quando comparados à

ingestão de 100% (Tabela 7.3). Nossos resultados exibiram valores similares aos achados por Iwamoto et al. (2004), que investigaram ratas Sprague-Dawley ingerindo 0,5% de cálcio na dieta por 10 semanas. Num estudo com ingestão de cálcio idêntica ao nosso, Coudray et al. (2005) constataram resultados similares aos observados neste estudo para os conteúdos de cálcio fecal e urinário e balanço de cálcio. Zhang et al. (2008) estudaram ratas Sprague-Dawley adultas com restrição mais severa de cálcio na dieta (0,1 e 0,6% de cálcio) por 12 semanas, e verificaram que o baixo consumo de cálcio reduziu os conteúdos de cálcio fecal e urinário, além do balanço de cálcio. Assim, os achados do nosso estudo, de que a reduzida ingestão de cálcio declina o balanço de cálcio, sustentam os conhecimentos científicos estabelecidos até o presente momento.

Em geral, a eficiência na absorção de cálcio varia inversamente ao seu consumo, mas, a quantidade absoluta absorvida aumenta proporcionalmente à sua ingestão (Costa e Peluzio, 2008). Nossos resultados confirmam tal afirmativa, onde a baixa ingestão de cálcio reduziu o balanço de cálcio, contudo, elevou a % absorção de cálcio (Tabela 7.3). Também foi identificada correlação “positiva” entre o conteúdo de cálcio ingerido e o balanço de cálcio, e “negativa” entre a % absorção de cálcio e a razão cálcio/fezes, evidenciando esta hipótese. Estes achados são similares aos de estudos anteriores (Bronner, Salle *et al.*, 1992; Mitamura, Hara *et al.*, 2002; Coudray, Feillet-Coudray *et al.*, 2005). Nossos resultados sugerem que indivíduos que consomem uma dieta com inadequação de cálcio dietético, apesar de elevar a proporção da absorção de cálcio, apresentariam balanço de cálcio negativo, elevando o desequilíbrio do metabolismo de cálcio, que poderia aumentar o risco de futuras fraturas ósseas, hiperparatiroidismo secundário, entre outras patologias.

O experimento II (animais exercitados) demonstra resultados similares aos do experimento I (animais sedentários), porém, apenas não foi observada nos animais

exercitados alteração significativa no conteúdo de cálcio urinário em função do consumo de cálcio (Tabela 7.6), verificado em animais sedentários (Tabela 7.3). Isto poderia ser devido ao fato do exercício provocar maior demanda de cálcio, e conseqüentemente, preservar os conteúdos deste mineral.

No experimento I houve interação entre os fatores Ovário e Cálcio. Observou-se que em animais que consumiram 100% de cálcio, a ovariectomia elevou a perda de cálcio fecal e a razão cálcio/fezes, reduzindo o balanço e a % absorção de cálcio, no entanto, este efeito da deficiência de estrogênio não foi identificado em animais que consumiram 50% de cálcio (Tabela 7.1). Mitamura et al. (2002) estudaram ratas Sprague-Dawley OVX e SHAM com ingestão de diferentes teores de cálcio na dieta por 4 semanas. Seus resultados foram similares aos nossos, onde a OVX reduziu o balanço de cálcio em animais que consumiram 0,4% de cálcio, por terem elevado a excreção fecal de cálcio, porém, estas diferenças não foram exibidas entre os animais que consumiram 0,2% de cálcio. Os autores sugeriram que estes achados em ratas OVX ocorreram em função da redução nos níveis de estradiol sanguíneo e o declínio na capacidade de absorção de cálcio.

A deficiência crônica de cálcio proveniente da ingestão inadequada ou absorção intestinal reduzida resultaria em níveis baixos de cálcio circulantes, que incrementaria a síntese e liberação do hormônio da paratireóide (PTH). A principal ação do PTH é regular a homeostase do cálcio, pois eleva sua absorção intestinal ao estimular a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, reduz a excreção renal nos túbulos distais, e aumenta a mobilização óssea para restaurar as concentrações sanguíneas de cálcio (Fnb-Iom, 1997; Costa e Peluzio, 2008; Mcmanus, Davey *et al.*, 2008). Isto indica que, nos animais consumindo 50% de cálcio, a concentração sanguínea de PTH estaria aumentada, o que estimularia maior eficiência na absorção de cálcio, minimizando assim sua deficiente absorção promovida

pela ovariectomia. Este pode ser uma das razões pelas quais não se verificou diferença no balanço de cálcio entre ratas OVX e SHAM, quando ingeriram 50% de cálcio. Contudo, os níveis do balanço de cálcio para estes animais que consumiram baixo teor de cálcio permaneceram bem abaixo dos exibidos pelos animais que ingeriram 100% de cálcio (Tabela 7.1).

Outra possível explicação poderia ser atribuída ao tipo de transporte na absorção intestinal de cálcio. A quantidade de cálcio absorvida no intestino depende de sua ingestão habitual. Quando a ingestão de cálcio é baixa, seu transporte transcelular ativo no duodeno é estimulado e uma proporção maior de cálcio é absorvida pelo processo ativo do que pelo processo paracelular passivo, que predomina no jejuno e íleo (Bronner e Pansu, 1999). Por outro lado, a deficiência de estrogênio causada pela cirurgia de ovariectomia prejudica o sistema de transporte passivo de cálcio (Mitamura, Hara *et al.*, 2002). Assim, os animais com baixa ingestão de cálcio poderiam ter elevado sua absorção pelo transporte ativo de cálcio no duodeno, sobrepondo o declínio na absorção de cálcio intestinal por meio do transporte passivo desencadeada pela deficiência do hormônio estrogênio. Todavia, neste estudo não foram realizadas análises dos tipos de transportes de cálcio, não podendo confirmar estes mecanismos.

Nossos resultados mostram que, apesar da possível melhora na % de absorção de cálcio nos animais deficientes de estrógeno (ingestão de 50% de cálcio), verificou-se que o balanço de cálcio nestes grupos apresenta valores menores do que os exibidos por aqueles que ingeriram 100% de cálcio (Tabela 7.1). Desta forma, estas evidências nos sugerem afirmar que indivíduos deficientes de estrogênio que consomem suas recomendações de cálcio apresentariam maior balanço de cálcio e poderiam apresentar menores riscos de

desordens na homeostase de cálcio, e conseqüentemente, reduzidos riscos de perda de massa óssea e futuras fraturas de origem osteoporóticas.

Um achado intrigante deste estudo foi no balanço de cálcio para o fator Cafeína (Tabelas 7.3 e 7.5). Em animais sedentários, observou-se que a ingestão de cafeína elevou o balanço e a % de absorção de cálcio, por ter reduzido o seu conteúdo fecal e a razão cálcio/fezes (Tabela 7.3). Chen et al. (1999) relatam que a ingestão de altas doses de cafeína (25 e 100 mg/kg/dia) em ratos Sprague-Dawley de 6 semanas de idade não exibiu alteração significativa sobre o conteúdo de fecal, balanço e % absorção de cálcio, apesar de mostrarem tendência de resultados similares aos nossos. Heaney et al. (1982), num estudo epidemiológico investigando mulheres de meia idade, não verificaram alteração no balanço e % de absorção de cálcio em função ao consumo de cafeína. Porém, identificaram uma correlação negativa entre a ingestão de cafeína e o balanço de cálcio, exibindo perdas de 6 mg/dia de cálcio para cada 175 mg/dia de cafeína, que poderia induzir um balanço negativo de cálcio. O impacto do consumo de cafeína sobre o metabolismo de cálcio é muito complexo, onde a ausência de estudos e a inconsistência nos resultados evidenciam que os mecanismos de sua ação ainda são desconhecidos.

Em animais exercitados (experimento II), foram verificados resultados semelhantes aos dos sedentários para o conteúdo de cálcio fecal e a razão cálcio/fezes, confirmando a possível ação da cafeína em elevar o balanço e a % de absorção de cálcio, entretanto, o conteúdo de cálcio urinário elevou-se devido à ingestão de cafeína (Tabela 7.5). Diversos estudos relatam que a cafeína aumenta a excreção de cálcio urinário (Chen e Whitford, 1999; Heaney, 2002; Massey e Sutton, 2004), devido à cafeína agir diretamente reduzindo a reabsorção renal de cálcio e secreção do hormônio da PTH (Ashizawa, Ouchi *et al.*, 1998; Heaney, 2002; Massey e Sutton, 2004). Segundo Massey & Sutton (2004) e Daly (2007), a

adenosina, um mensageiro extracelular que age sobre os receptores de membrana estimulando a reabsorção de cálcio nos túbulos renais, poderia ser bloqueada pela ingestão de cafeína, e assim, elevar a excreção renal de cálcio. Porém, não se sabe se este aumento na excreção urinária de cálcio promovida pela administração de cafeína por 8 semanas poderia ter aumentado a absorção de cálcio intestinal por reduzir os níveis circulantes de cálcio e, conseqüentemente, ter desencadeado a menor perda de cálcio fecal observada, como mecanismo compensatório protetor.

Em nossos achados verificou-se interação significativa entre os fatores Cálcio e Cafeína (Tabelas 7.2 e 7.4). Nos grupos que consumiram 100% de cálcio, os animais sedentários ingerindo cafeína elevaram o balanço de cálcio (experimento I), enquanto os exercitados reduziram o conteúdo de cálcio fecal e a razão cálcio/fezes (experimento II). No entanto, estes resultados não foram observados nos grupos que consumiram 50% de cálcio. Como visto acima, a inadequação de cálcio dietético promoveria uma baixa concentração de cálcio circulante, que estimularia a liberação de PTH para restaurar seus níveis sanguíneos, podendo assim, melhorar a eficiência na absorção intestinal de cálcio. Isto poderia justificar porque ratas que consumiram 50% de cálcio não apresentaram diferença no balanço de cálcio entre os grupos que consumiram cafeína e placebo, mas exibidas em ratas que consumiram 100% de cálcio. Contudo, é importante ressaltar que o balanço de cálcio nos animais que ingeriram 50% de cálcio foi, aproximadamente, a metade do expresso por aqueles que ingeriram 100% de cálcio, o que os tornariam mais suscetíveis às patologias provenientes das desordens metabólicas causadas pelo balanço de cálcio negativo.

O possível aumento no balanço e % de absorção de cálcio (Tabelas 7.2 e 7.3) decorrentes da ingestão de cafeína como resposta compensatória à maior perda de cálcio

urinário (Tabela 7.5) sugerida acima, talvez não seja o mecanismo mais propício para justificar estes resultados. Nas análises de interação Cálcio-Cafeína verificou-se significância na perda fecal e balanço de cálcio e na razão cálcio/fezes (Tabelas 7.2 e 7.4), mas, não foi identificada nenhuma alteração sobre a perda urinária, tampouco uma correlação positiva entre as perdas urinárias e % de absorção de cálcio. Então, o incremento promovido pela administração de cafeína sobre o balanço de cálcio deveria ser atribuído exclusivamente à ação direta da cafeína, e não como resposta compensatória à maior perda urinária de cálcio. Isto sugere que novos estudos sejam desenvolvidos para esclarecer os mecanismos pelos quais a ingestão de cafeína melhorou a eficiência no balanço de cálcio. Porém, faz-se necessário destacar que a administração de cafeína elevou o balanço de cálcio durante a ingestão adequada de cálcio, no entanto, não preveniu o balanço negativo de cálcio desencadeado pelo baixo consumo de cálcio, tornando estes animais mais vulneráveis a desordens ósseas futuras.

Em virtude de não ter controlado as perdas de fezes durante a sessão de corrida no dia de sua coleta para a determinação do balanço de cálcio, tornou-se impossível calcular o balanço, a % de retenção e % de absorção de cálcio no experimento II. Todavia, o parâmetro razão cálcio/fezes, que normaliza os valores de cálcio fecal pela quantidade de fezes, pode retratar as perdas de cálcio fecal, e inversamente evidenciar a capacidade de absorção de cálcio intestinal. No presente estudo observou-se uma correlação “negativa” entre a razão cálcio/fezes e a % absorção de cálcio ($\rho = -0,626$ e $p < 0,001$). Desta forma, a razão cálcio/fezes possibilitou comparar a capacidade de absorção intestinal de cálcio entre os experimentos I e II, ou seja, entre animais sedentários e exercitados.

Em nossos resultados da razão cálcio/fezes, constatou-se que os animais exercitados exibiram menores valores da razão cálcio/fezes do que os sedentários (Tabelas 7.6),

diferenças também observadas para os fatores Ovário, Cálcio e Cafeína (Tabelas 7.3 vs. 7.5). Yeh et al. (1990) relatam que o exercício poderia elevar a demanda de minerais devido ao incremento nos níveis de vitamina D ativa, e subsequente, aumento na absorção intestinal de cálcio. Ademias, os autores ainda mencionaram que este aumento na absorção intestinal de cálcio ocorre em níveis superiores aos da produção de PTH. Os resultados do presente estudo confirmam que independente da ovariectomia, do consumo de cálcio e da ingestão de cafeína, a prática de exercício aeróbico reduz a perda de cálcio fecal, melhorando a capacidade de absorção de cálcio intestinal, e possibilitando um balanço positivo de cálcio. Tais efeitos são importantes na prevenção e tratamento da osteoporose.

Além do mais, verificou-se nas ratas exercitadas deste estudo, que a ovariectomia reduziu os conteúdos de cálcio fecal, pelo fato de terem diminuído o conteúdo de fezes e, devido a isso, não houve diferença significativa na razão cálcio/fezes entre os animais OVX e SHAM (Tabela 7.5). Em contrapartida, nos animais sedentários, a ovariectomia elevou a razão cálcio/fezes e reduziu o balanço e a % absorção de cálcio (Tabela 7.3). Estes achados sugerem que o exercício aeróbico pode prevenir a menor absorção de cálcio intestinal desencadeada pela deficiência dos hormônios estrogênicos, o que pode prevenir desordens metabólicas ósseas.

Os resultados deste estudo nos possibilitam concluir que a inadequação dietética de cálcio, apesar de elevar sua eficiência na absorção intestinal, promove balanço negativo de cálcio, aumentando o risco de futuras desordens ósseas. A deficiência de estrogênio desencadeia uma série de eventos que causam menor balanço e absorção de cálcio, elevando o risco de perdas de massa óssea e futuras fraturas de origem osteoporóticas. Por outro lado, contradizendo os achados da literatura até o momento, a ingestão de 6 mg de cafeína /kg de peso corporal elevou o balanço e a absorção de cálcio intestinal. A prática do

exercício de corrida aeróbica de baixa intensidade pode aumentar a capacidade de absorção de cálcio por ter reduzido as perdas de cálcio fecal. Contudo, o impacto da baixa ingestão de cálcio foi mais severo sobre o balanço de cálcio do que os demais fatores.

7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aoac. Official methods of analysis. Washington, D.C. 1998

Ashizawa, N., G. Ouchi, *et al.* Effects of a single bout of resistance exercise on calcium and bone metabolism in untrained young males. Calcif Tissue Int, v.62, n.2, Feb, p.104-8. 1998.

Braun, M., B. R. Martin, *et al.* Calcium retention in adolescent boys on a range of controlled calcium intakes. Am J Clin Nutr, v.84, n.2, Aug, p.414-8. 2006.

Bronner, F. e D. Pansu. Nutritional aspects of calcium absorption. J Nutr, v.129, n.1, Jan, p.9-12. 1999.

Bronner, F., B. L. Salle, *et al.* Net calcium absorption in premature infants: results of 103 metabolic balance studies. Am J Clin Nutr, v.56, n.6, Dec, p.1037-44. 1992.

Chapman, R. F. e J. M. Stager. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.6, Jun, p.1080-6. 2008.

Chen, X. e G. M. Whitford. Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. Arch Oral Biol, v.44, n.1, Jan, p.33-9. 1999.

Costa, N. M. B. e M. C. Peluzio. Nutrição básica e metabolismo. Viçosa: Editora UFV. 2008. 400 p.

Coudray, C., C. Feillet-Coudray, *et al.* Stimulatory effect of inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium in rats is modulated by dietary calcium intakes short- and long-term balance studies. Eur J Nutr, v.44, n.5, Aug, p.293-302. 2005.

Daly, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. Cell Mol Life Sci, v.64, n.16, Aug, p.2153-69. 2007.

Dick, I. M., A. Devine, *et al.* Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, p.E430-E345. 2005.

Doherty, M., P. Smith, *et al.* Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. J Sports Sci, v.22, n.7, Jul, p.637-43. 2004.

Fnb-Iom. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamine D and Fluoride. Washington, D.C.: The National Academic Press. 1997. 489 p. (Dietary References Intakes)

Glaister, M., G. Howatson, *et al.* Caffeine supplementation and multiple sprint running performance. Med Sci Sports Exerc, v.40, n.10, Oct, p.1835-40. 2008.

Hadjicharalambous, M., E. Georgiades, *et al.* Influence of caffeine on perception of effort, metabolism and exercise performance following a high-fat meal. J Sports Sci, v.24, n.8, Aug, p.875-87. 2006.

Hartley, T. R., W. R. Lovallo, *et al.* Cardiovascular effects of caffeine in men and women. Am J Cardiol, v.93, n.8, Apr 15, p.1022-6. 2004.

Heaney, R. P. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. Food Chem Toxicol, v.40, n.9, Sep, p.1263-70. 2002.

Heaney, R. P. e R. R. Recker. Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. J Lab Clin Med, v.99, n.1, Jan, p.46-55. 1982.

Hitz, M. F., P. C. Eskildsen, *et al.* Bioavailability of calcium: comparison of calcium carbonate and milk and the effect of vitamin D, age, and sex using 24-hour urine calcium as a method. Calcif Tissue Int, v.77, n.6, Dec, p.361-6. 2005.

Huang, T. H., C. Lin, *et al.* Effects of different exercise modes on mineralization structure and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol, v95, p300-307. 2003.

Huang, T. H., R. S. Yang, *et al.* Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. Bone, v.30, n.1, Jan, p.293-9. 2002.

Iwamoto, J., C. Shimamura, *et al.* Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. J Bone Miner Metab, v.22, n.1, p.26-31. 2004.

Iwamoto, J., J. K. Yeh, *et al.* Effects of vitamin D supplementation on calcium balance and bone growth in young rats fed normal or low calcium diet. Horm Res, v61 6, p293-9. 2004.

Jasminka, Z. I. e J. E. Kerstetter. Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium. Journal of the American College of Nutrition, v.19, n.6, p.715-737. 2000.

Kobayashi, M., K. Hara, *et al.* Effects of vitamin K2 (menatetrenone) on calcium balance in ovariectomized rats. Jpn J Pharmacol, v.88, n.1, Jan, p.55-61. 2002.

Leblanc, A. D., H. J. Evans, *et al.* Changes in total body calcium balance with exercise in the rat. J Appl Physiol, v.55, n.1 Pt 1, Jul, p.201-4. 1983.

Lutz, J., F. Chen, *et al.* Hypokinesia-induced negative net calcium balance reversed by weight-bearing exercise. Aviat Space Environ Med, v.58, n.4, Apr, p.308-14. 1987.

Massey, L. K. e R. A. Sutton. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. J Urol, v.172, n.2, Aug, p.555-8. 2004.

Mcmanus, J. F., R. A. Davey, *et al.* Intermittent Fugu parathyroid hormone 1 (1-34) is an anabolic bone agent in young male rats and osteopenic ovariectomized rats. Bone, v.42, n.6, Jun, p.1164-74. 2008.

Mitamura, R., H. Hara, *et al.* Supplemental feeding of difructose anhydride III restores calcium absorption impaired by ovariectomy in rats. J Nutr, v.132, n.11, p.3387-93. 2002.

O'connor, P. J., R. W. Motl, *et al.* Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. Pain, v.109, n.3, Jun, p.291-8. 2004.

O'loughlin, P. D. e H. A. Morris. Oophorectomy acutely increases calcium excretion in adult rats. J Nutr, v.133, n.7, Jul, p.2277-80. 2003.

Park, J. H., N. Omi, *et al.* Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.3, p.218-25. 2008.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Sekiguchi, F., K. Kawata, *et al.* Reduced effect of caffeine on twitch contraction of oesophageal striated muscle from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.30, n.4, Apr, p.223-31. 2003.

Shinoda, M., M. G. Latour, *et al.* Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. International Journal of Obesity, v.26, p.335-343. 2002.

Silva, J. D. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. . Viçosa: Imprensa Universitária. 1990. 165 p.

Velásquez-Meléndez, G., I. S. Martins, *et al.* Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública, v.31, n.2, p.157-162. 1997.

Yeh, J. K. e J. F. Aloia. Effect of physical activity on calciotropic hormones and calcium balance in rats. Am J Physiol, v.258, n.2 Pt 1, Feb, p.E263-8. 1990.

Zhang, Y., X.-L. Dong, *et al.* Fructus ligustri lucidi extract improves calcium balance and modulates the calciotropic hormone level and vitamin D-dependent gene expression in aged ovariectomized rats. Menopause, v.5, n.3, p.1-8. 2008.

Zhang, Y., W. P. Lai, *et al.* Effects of Fructus Ligustri Lucidi extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. Biol Pharm Bull, v.29, n.2, Feb, p.291-6. 2006.

Capítulo VIII:

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1. Conclusão do Capítulo III

A deficiência de estrogênio induzida pela ovariectomia promoveu maior ganho de peso corporal, por elevar a deposição de gordura corporal, independente do maior consumo de dieta. O programa de exercício aeróbico de baixa intensidade melhora a composição corporal, por elevar a proteína e a água, além de reduzir a gordura corporal; e a ingestão de cafeína não interferiu sobre a composição corporal, pois não apresentou benefícios sobre a degradação de gordura, tampouco malefícios sobre a desidratação, assim, não confirmando sua suposta ação como agente anti-obesidade.

8.2. Conclusão do Capítulo IV

Ao extrapolar nossos resultados para a realidade da população brasileira poderíamos inferir que indivíduos com inadequação de cálcio dietético e deficiência de estrogênio apresentariam maiores riscos de perda de massa magra corporal, podendo ser o quadro mitigado pela prática do exercício aeróbico e a abstinência ao consumo de cafeína. Independente de a maior ingestão alimentar, a deficiência de estrogênio induzida pela ovariectomia estimulou a obesidade, e o treinamento físico aeróbico favoreceu a perda de peso e gordura corporal. Todavia, a administração de cafeína não promoveu ação anti-obesidade.

8.3. Conclusão do Capítulo V

Constatou-se que animais com deficiência de estrogênio apresentam conteúdos de minerais e resistência óssea reduzidos, devido ao incremento no processo de reabsorção e supressão no processo de formação óssea. A corrida de baixa intensidade, por 30 minutos, contrapôs os efeitos da ovariectomia, apesar de não inibir seus efeitos deletérios sobre o tecido ósseo. Contudo, o exercício também aumentou a perda de zinco ósseo. Já a ingestão de cafeína, apesar de elevar as perdas urinárias de cálcio e o NTx urinário, elevou os teores de cálcio e magnésio ósseo, mas não interferiu na resistência óssea. Todavia, não potencializou os efeitos deletérios da ovariectomia sobre o tecido ósseo.

8.4. Conclusão do Capítulo VI

Observou-se que animais ingerindo a metade da recomendação de cálcio dietético, que a deficiência do hormônio estrogênio e a ingestão de cafeína reduziram a massa e a resistência óssea. A ovariectomia afetou o remodelamento ósseo por estimular a mobilização e reduzir a formação óssea, já a ingestão de cafeína elevou a excreção urinária de cálcio e a mobilização óssea. Estes efeitos se potencializaram diminuindo ainda mais a resistência óssea, sugerindo que a ingestão de baixo teor de cálcio, associado ao consumo de produtos cafeinados potencializa os riscos de fraturas ósseas na deficiência estrogênica. A intensidade e duração do programa de exercício aqui empregado foram suficientes para beneficiar o tecido ósseo em animais com deficiência de cálcio alimentar.

8.5. Conclusão do Capítulo VII

Os resultados deste estudo nos possibilitam concluir que a inadequação dietética de cálcio, apesar de elevar sua eficiência na absorção intestinal, promove balanço negativo de

cálcio, aumentando o risco de futuras desordens ósseas. A deficiência de estrogênio desencadeia uma série de eventos que causam menor balanço e absorção de cálcio, elevando o risco de perdas de massa óssea e futuras fraturas de origem osteoporóticas. Por outro lado, contradizendo os achados da literatura até o momento, a ingestão de 6 mg de cafeína /kg de peso corporal elevou o balanço e a absorção de cálcio intestinal. A prática do exercício de corrida aeróbica de baixa intensidade pode aumentar a capacidade de absorção de cálcio por ter reduzido as perdas de cálcio fecal. Contudo, o impacto da baixa ingestão de cálcio foi mais severo sobre o balanço de cálcio do que os demais fatores.

8.6. Considerações Finais:

Os resultados destes estudos evidenciam que a ovariectomia em ratas adultas foi capaz de promover características patológicas similares às observadas em mulheres pós-menopausa. Em tais achados se destacam a tendência à obesidade, prejuízo sobre a qualidade do tecido ósseo e ineficiência na absorção intestinal de cálcio em virtude da deficiência do hormônio estrogênio.

Nossos resultados mostraram que a ovariectomia promoveu aumento no peso corporal por incrementar o acúmulo de gorduras visceral e na carcaça, e que esta cirurgia afetou negativamente o tecido ósseo, pois reduziu a força de fratura e o conteúdo de cálcio ósseo, e elevou o marcador da reabsorção óssea. Recentemente, estudos têm demonstrado uma correlação direta entre o peso corporal e a resistência óssea, devido o maior peso corporal elevar a carga mecânica suportada pelo esqueleto. Isto indica que quanto maior o peso corporal maior seria a força sobre o solo que o corpo necessitaria fazer para seus deslocamentos, sendo que esta maior força corporal promoveria um aumento na pressão sobre os ossos e, conseqüentemente, aumento do estímulo osteogênico em função ao maior

peso corporal. Desta forma, os resultados do presente estudo indicam que os efeitos deletérios da deficiência de estrogênio induzida pela ovariectomia sobre o tecido ósseo sobrepuseram ao possível aumento da resistência óssea decorrente ao maior peso corporal dos animais submetidos a esta cirurgia. Tais resultados sugerem que mulheres pós-menopausa estariam expostas a maior risco de fraturas osteoporóticas em função ao decréscimo da qualidade do tecido ósseo, apesar do maior peso corporal.

No capítulo VII identificou-se que o balanço e a percentagem de absorção de cálcio foram menores em animais submetidos à ovariectomia do que aos animais SHAM. Esta menor absorção de cálcio, e subsequente, baixo conteúdo de cálcio circulante, poderia estimular a mobilização do cálcio ósseo por meio da ação do PTH. Apesar de não termos analisado as concentrações de cálcio e PTH sanguíneos, este mecanismo poderia ser uma das explicações para o menor conteúdo de cálcio ósseo observados nos experimentos dos capítulos V e VI, acarretando, assim, menor resistência óssea nestes animais deficientes de estrogênio. Contudo, este decréscimo no conteúdo de cálcio nos ossos, e subsequente, redução de sua resistência à fratura, não podem ser atribuídos à perda de cálcio urinário, pois o cálcio urinário reduziu com a ovariectomia. Tal resultado sugere então, que a menor disponibilidade de cálcio sanguíneo decorrente da sua menor absorção intestinal deveria ser a responsável pelo decréscimo no conteúdo de cálcio ósseo.

A inconsistência dos resultados dos estudos sobre o impacto da cafeína na composição corporal ainda é grande, porém, os resultados deste estudo apontam que a ação deletéria da cafeína sobre o tecido ósseo é mais eminente em indivíduos com inadequação de cálcio dietético. A ingestão de cafeína (6 mg/kg) não promoveu efeito anti-obesidade, como apresentado por diversos estudos, nem ação diurética (Capítulos III e IV). Sobre o tecido ósseo, a administração de cafeína mostrou-se prejudicial por elevar as perdas de

cálcio urinário, conteúdo de cálcio ósseo e o marcador de mobilização óssea (Capítulos V e VI). Contudo, a cafeína apresentou efeito benéfico sobre o balanço de cálcio elevando sua absorção por reduzir a perda nas fezes (Capítulo VII). Ademais, nossos resultados também não são suficientes para afirmar que o aumento na absorção intestinal de cálcio é uma ação direta da cafeína, e/ou um efeito indireto, como consequência do aumento na excreção de cálcio urinário promovido pela ingestão de cafeína.

Um dos resultados mais importantes deste estudo foi verificar interação entre administração de cafeína e ovariectomia, o que potencializou a redução da resistência óssea em animais com inadequação de cálcio alimentar. Isto sugere que em mulheres pós-menopausa que ingerem baixos teores de cálcio, o consumo de cafeína (ex. 4 a 6 xícaras de café) apresentaria um risco de fratura óssea elevado. Como o baixo consumo de cálcio e a ingestão de café são costumes das mulheres pós-menopausa brasileiras estes fatores de risco as colocam em um grupo de risco de fratura osteoporótica.

Nossos resultados constataram que mesmo em animais consumindo 50 e 100% da recomendação de cálcio, o programa de exercício reduziu o peso e melhorou a composição corporal, elevou o conteúdo de cálcio e a resistência óssea, e reduziu a mobilização do cálcio ósseo, além de reduzir a razão cálcio/fezes, o que sugere uma maior absorção de cálcio intestinal. A menor perda de cálcio nas fezes, e possível maior oferta de cálcio circulante, associada ao maior estímulo à formação óssea pelo incremento da Osteose sanguínea, poderia ser uma justificativa para o maior conteúdo de cálcio ósseo, e conseqüente, incremento na resistência óssea.

Os efeitos do programa de exercício mostraram contrapor os efeitos da ovariectomia sobre a composição corporal, tecido ósseo e balanço de cálcio. A redução no peso corporal em função ao exercício, que poderia diminuir a carga mecânica sobre o esqueleto, não foi

suficiente para inibir o incremento na resistência óssea, a qual seria proveniente dos aumentos no conteúdo de cálcio ósseo, formação óssea e, possivelmente, maior absorção de cálcio intestinal. Por outro lado, não se pode deixar de mencionar que o exercício de corrida, mesmo que de baixa intensidade, é um exercício de impacto, que causa efeitos benéficos ao tecido ósseo em função da sua carga mecânica promovida pela ação gravitacional sobre o esqueleto ósseo.

Em contrapartida, neste estudo verificou-se que o exercício desencadeou uma redução no conteúdo de zinco ósseo, tanto em animais que consumiram 100% quanto 50% de sua recomendação de cálcio. Estudos relatam a importância do zinco em diversas funções, como na transcrição genética, vias metabólicas energéticas, processo de crescimento e cicatrização. Porém, as alterações até o momento verificadas estão relacionadas à redução nas concentrações de zinco no plasma e eritrócitos, sugerindo que os seus conteúdos ósseos não são mobilizados pela deficiência de zinco plasmática, apesar do relato de que o catabolismo muscular é acompanhado pela liberação de zinco no plasma, e o exercício extenuante reduziria o CMO. Todavia, o decréscimo no conteúdo de zinco ósseo observado neste estudo não foi o suficiente para interferir nos benefícios para o tecido ósseo promovidos pelo exercício, porém, merece maior atenção em estudos futuros.

Apesar deste estudo não ter analisado estatisticamente a ingestão de cálcio (100 % vs. 50 %), exceto no capítulo VII, nas comparações entre os estudos de composição corporal (Capítulo III e IV) não foram observadas grandes alterações nos resultados entre o consumo de 100 e 50 % de cálcio dietético. No entanto, quando se analisou o consumo diferentes quantidades de cálcio sobre o tecido ósseo (Capítulos V e VI) e sobre o balanço de cálcio (Capítulo VII), verificou-se que a baixa ingestão de cálcio afetou negativamente os padrões de resultados em vários parâmetros avaliados. Isto sugere que a deficiência de

cálcio poderia prejudicar mais o tecido ósseo e o balanço de cálcio do que a composição corporal.

Há evidências de que apenas a suplementação de cálcio por si só não é suficiente para prevenir as perdas ósseas promovidas pela menopausa em humanos e animais, sendo necessária a combinação com outros tipos de tratamentos como terapia de reposição hormonal, programas de exercício, entre outros para que se alcance este objetivo. Além disso, os resultados deste estudo mostraram que a deficiência de cálcio alimentar pode agravar os efeitos deletérios da deficiência de estrogênio sobre o tecido ósseo em ratas, principalmente, quando associada à administração de cafeína.

A baixa ingestão de cálcio mostrou-se responsável pelos efeitos deletérios da cafeína sobre o tecido ósseo (Capítulo VI), o que não foi observado quando se consumia cálcio como recomendado (Capítulo V). A baixa ingestão de cálcio inibiu o maior balanço de cálcio promovido pela administração de cafeína em animais sedentários, e a menor razão cálcio/fezes encontrada em animais exercitados (Capítulo VII). No entanto, esta associação não foi verificada para as análises de composição corporal (Capítulo III vs. Capítulo IV). Tais achados sugerem que os efeitos prejudiciais da ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo e o balanço de cálcio são mais evidentes quando associados ao baixo consumo de cálcio. Desta forma, tornam-se necessária maior atenção aos padrões alimentares de mulheres pós-menopausa, estimulando cada vez mais o consumo de cálcio dietético recomendado e evitando o excesso de produtos ricos em cafeína, além de incrementar a prática de atividade física, a fim de que esta população possa ter melhor qualidade de vida, principalmente sobre o aspecto da saúde óssea, ao envelhecer.

ANEXOS

Anexo I

Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária sob o Parecer nº 80/2007

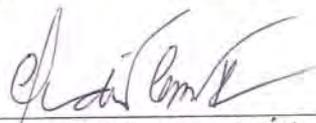
CERTIFICADO

A Comissão de Ética do DVT / UFV certifica que o processo n.º 80 / 2007, intitulado “**Efeitos da ingestão de cafeína associada à adequação ou não de cálcio alimentar em ratas ovariectomizadas ou inteiras exercitadas ou não**” está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em reunião de 27/09/2007.

CERTIFICATE

The Ethic Committee of DVT / UFV certify that the process number 80/ 2007, named “Effects of caffeine ingestion associated or not with adequate calcium intake in ovariectomized or intact rats, exercised or not” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on September 27, 2007 approved this process.

Viçosa, 27 de setembro de 2007



Presidente da Comissão de Ética
Depto. de Veterinária / UFV

Anexo II

Agradecimentos aos Coordenadores dos Laboratórios utilizados para as Análises

Ao coordenador do Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária, pelas cirurgias de ovariectomia e laparotomia;

À coordenadora do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição, pelas as análises de composição corporal, conteúdo mineral ósseo, cálcio urinário, marcadores bioquímicos ósseos e balanço de cálcio;

Ao coordenador do Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Educação Física, pela realização do programa de exercício e análises de coeficiente de eficiência alimentar, desempenho do exercício e balanço de cálcio;

Ao coordenador do Laboratório de Análises de Carne do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelas análises de resistência óssea;

Ao coordenador do Laboratório de Espectrofotometria Atômica do Departamento de Solos, pelas análises de conteúdo mineral ósseo, cálcio urinário e balanço de cálcio;

À coordenadora do Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelas as análises de creatinina urinária, marcadores bioquímicos ósseos e balanço de cálcio.