



DÉBORA ALMEIDA GALDINO ALVES

**ASSOCIATION OF PREBIOTIC INGESTION (β -GLUCAN OF
SACCAROMYCES CEREVISAIE) AND A RESISTANCE
TRAINING ON THE BONE TISSUE OF OVARIECTOMIZED
FEMALE MICE**

**LAVRAS - MG
2020**

DÉBORA ALMEIDA GALDINO ALVES

**ASSOCIATION OF PREBIOTIC INGESTION (β -GLUCAN OF
SACCAROMYCES CEREVISAIE) AND A RESISTANCE
TRAINING ON THE BONE TISSUE OF OVARIECTOMIZED
FEMALE MICE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, área de
concentração em Fisiologia e Farmacologia, para a
obtenção do título de Doutora.

Dr. Luciano José Pereira
Orientador

Dr. Bruno Del Bianco Borges
Co-orientador

**LAVRAS - MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Alves, Débora Almeida Galdino.

Association of prebiotic ingestion (β -glucan of *Saccharomyces Cerevisiae*) and a resistance training on the bone tissue of ovariectomized female mice / Débora Almeida Galdino Alves. - 2020.

85 p. : il.

Orientador(a): Luciano José Pereira.

Coorientador(a): Bruno Del Bianco Borges.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. osteoporose. 2. exercício resistido. 3. beta glucano. I. Pereira, Luciano José. II. Borges, Bruno Del Bianco. III. Título.

DÉBORA ALMEIDA GALDINO ALVES

**ASSOCIATION OF PREBIOTIC INGESTION (β -GLUCAN OF SACCAROMYCES
CEREVISAIE) AND A RESISTANCE TRAINING ON THE BONE TISSUE OF
OVARIECTOMIZED FEMALE MICE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, área de
concentração em Fisiologia e Farmacologia, para a
obtenção do título de Doutora.

APROVADA em: 14/08/2020
Dr. Bruno Del Bianco Borges UFLA
Dra. Soraia Macari UFMG
Dra. Roberta Carminati Shiamano USP/RP
Dra. Natália de Oliveira Bertolini UNILAVRAS

Dr. Luciano José Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

*À minha amada família, Daniel, meu esposo, minhas filhas
Ana Luísa e Helena por todo o incentivo e propósito da minha vida.
E aos meus pais Vera pelo apoio incondicional e Manoel (in memoriam)
por me acompanhar do lado de lá.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades e pessoas colocadas na minha vida na jornada que estamos percorrendo nessa existência. Agradeço pelos obstáculos colocados em meu caminho que me ensinaram a ser forte e buscar energia para superá-los. Agradeço minha família, meu esposo Daniel, minhas filhas Ana Luísa e Helena, minha mãe e meu irmão por serem meu porto seguro e minha base. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Dr. Luciano José Pereira por me dar a oportunidade não só de fazer o doutorado, mas de crescer como pessoa, como docente e como pesquisadora. Obrigada por ser um exemplo de profissional e por confiar em mim e no meu trabalho. Obrigada pela força e pela certeza que sempre teve que no fim tudo iria dar certo. Apreendi muito com você. São poucos os pesquisadores como você. Minha eterna gratidão.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) em especial ao programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade oferecida na realização do doutorado. Aos professores da pós-graduação pelo conhecimento transmitido e por serem inspiração, em especial ao professor Dr. Bruno Del Bianco Borges por me ensinar a técnica de ovariectomia e por colaborar na confecção do artigo científico e ao professor Rodrigo Moura por me socorrer muitas vezes durante o período experimental.

Minha gratidão eterna à minha amiga e companheira de doutorado Natalia Oliveira Bertolini. Sem você não conseguiria nem metade do que fui capaz. Você não só me ajudou, você praticamente foi meu anjo da guarda durante todo esse período. Sua generosidade e disponibilidade em ajudar nunca será esquecida. Quando nada sabia sobre experimentação animal você e o Gustavo estiveram sempre presentes.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação, Diana Vilela Azzi, Gustavo Pereira, Janina Guadarluci, Tamira, Marina Apocalipse, Roger Dinali, Luciana Lunkes, Erika e Maria Cecília. Sem o companheirismo de vocês e a ajuda braçal (Gustavo, Roger) nada seria possível.

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Willian e Juliana, ao Daniel do Biotério Central da UFLA, a Samantha, veterinária responsável pelo Biotério Central, meu agradecimento por toda ajuda e disponibilidade.

Ao Professor Dr. Shimano e à Dra. Roberta Shimano da USP de Ribeirão Preto meu agradecimento pela ajuda na análise biomecânica e ao Breno, à Profa. Dra. Soraia Macari e Mariana (ajuda imprescindível) da UFMG pela realização da Micro Ct e à Geila do departamento de Ciências do Solo da UFLA por toda colaboração na análise mineral.

Meu agradecimento especial ao UNILAVRAS, minha casa, minha escola de vida, por me incentivar e me dar todo o suporte na realização desse doutorado. Em especial ao curso de Fisioterapia, com todos os professores e funcionários. E todo meu carinho pelas minhas amigas fisioterapeutas Alessandra, Laiz, Luciana, Grazielle, Nívea e Valéria. Obrigada por me ajudarem a deixar esse momento mais leve.

Agradeço à Sra. Maria Fátima Ferreira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela simpatia e empenho em nos auxiliar sempre que preciso.

Aos animais participantes do experimento, todo meu respeito e gratidão. À todos os amigos que contribuíram de alguma forma nesta etapa tão importante da minha vida, meu muito obrigada!

“Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

RESUMO GERAL

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela diminuição da massa e deterioração da micro-arquitetura do tecido ósseo causada principalmente pela falência ovariana na menopausa. Esse processo leva à uma maior fragilidade do osso e ao consequente aumento do risco de fraturas. Trata-se de um grave problema de saúde pública. Em razão de sua elevada prevalência e morbi-mortalidade, o estudo de terapias antiosteoporóticas torna-se fundamental. Os tratamentos disponíveis na atualidade apresentam ainda efeitos adversos que justificam estudos adicionais investigando estratégias alternativas tanto para tratamento como para prevenção da osteoporose. Nesse sentido, os β -Glucanos, fibras solúveis derivadas da parede celular de leveduras, cereais e muitos cogumelos medicinais, tem sido estudados, devido ao seu potencial anti-inflamatório. O exercício físico, especialmente o treinamento resistido (TR), também tem sido pesquisado devido a sua capacidade de induzir a osteogênese. Estudos avaliando a interação destas duas modalidades terapêuticas ainda não foram realizados. Assim, este projeto teve como objetivo avaliar o efeito na saúde óssea da ingestão do prebiótico (β -glucano extraídos da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*) associado ao TR de escalada com carga, em modelo de osteoporose induzido por ovariectomia (OVX) em camundongos. Foram utilizados 48 animais (N= 6 por grupo) distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: grupo SHAM e 5 grupos de animais OVX tratados com: grupo SAL, alendronato (ALE - 0,1 mg/kg), BG (62,5 mg/kg), TR (escalada) e a associação BG e TR. Os tratamentos foram realizados três vezes por semana durante oito semanas. O consumo de BG pelas fêmeas OVX auxiliou na manutenção da massa corporal semelhante aos animais do grupo SHAM. O TR isolado produziu os melhores resultados sobre o osso, com valores de massa e força necessária para fratura dos fêmures semelhante ao grupo ALE. A densitometria óssea do fêmur (DMO_{DEXA}) no grupo TR foi semelhante ao grupo SHAM. Porém, as microtomografias computadorizadas (microCTs) demonstraram efeitos intermediários, inferiores ao do grupo ALE e semelhantes ao do grupo BG + TR para a Densidade Mineral Óssea (DMO_{MCT}), volume ósseo (BV), razão volume ósseo/volume total (BV/TV) e separação das trabéculas (Tb.Sp). A associação BG + TR aumentou a concentração de cálcio avaliado por Espectrometria de Fluorescência de Raios-X. A quantidade de osteócitos no grupo TR foi semelhante ao grupo SHAM. Concluiu-se com o presente estudo, portanto que o TR se mostrou eficaz em minimizar os efeitos da osteoporose induzida por OVX, sendo que a associação com a ingestão BG trouxe benefícios somente para a concentração de cálcio no conteúdo mineral ósseo. O uso de BG reduziu a massa corporal, o que pode ser um benefício cardiovascular, porém um fator limitador para o fortalecimento ósseo, uma vez que a redução da massa corporal diminui a carga mecânica e desfavorece a osteogênese.

Palavras-chave: Osteoporose. Treinamento resistido. β -Glucano. Estrogênio.

GENERAL ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by decreased mass and deterioration of bone tissue micro-architecture caused mainly by ovarian failure in menopause. This process leads bone fragility and the consequent increased risk of fractures. This is a serious public health problem. Due to its high prevalence and morbidity and mortality, the study of antiosteoporotic therapies is essential. The treatments currently available also have adverse effects that justify further studies investigating alternative strategies for both treatment and prevention of osteoporosis. In this sense, β -Glucans, soluble fibers derived from the cell wall of yeasts, cereals and many medicinal mushrooms, have been studied, due to their anti-inflammatory potential. Physical exercise, especially resistance training (RT), has also been researched due to its ability to induce osteogenesis. Studies evaluating the interaction of these two therapeutic modalities have not yet been carried out. Thus, this project aimed to evaluate the effect in bone health of ingestion of the prebiotic (β -glucan extracted from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*) associated with the load-climbing RT, in a model of osteoporosis induced by ovariectomy (OVX) in mice. 48 animals (N = 6 per group) were randomly assigned to 6 groups: SHAM group and 5 groups of OVX animals treated with: SAL group, alendronate (ALE - 0.1 mg / kg), BG (62.5 mg / kg), RT (climbing) and the association BG and RT. Treatments were performed three times a week for eight weeks. The consumption of BG by OVX females helped to maintain body mass similar to animals in the SHAM group. The isolated RT produced the best results on the bone, with values of mass and strength needed for fractures of the femurs similar to the ALE group. Bone densitometry of the femur (DMO_{DEXA}) in the RT group was similar to the SHAM group. However, computed microtomographs (microCTs) demonstrated intermediate effects, inferior to the ALE group and similar to the BG + RT group for Bone Mineral Density (BMD_{MCT}), bone volume (BV), bone volume / total volume ratio (BV /TV) and trabeculae separation (Tb.Sp). The BG + RT association increased the calcium concentration by X-Ray Fluorescence Spectrometry. The amount of osteocytes in the RT group was similar to the SHAM group. It was concluded with the present study, therefore, that RT was effective in minimizing the effects of osteoporosis induced by OVX, and the association with BG intake brought benefits only for the concentration of calcium in the bone mineral content. The use of BG reduced body mass, which can be a cardiovascular benefit but a limiting factor for bone strengthening, since the reduction in body mass decreases the mechanical load and disadvantages osteogenesis.

Keywords: Osteoporosis. Resistance training. β -Glucan. Estrogen.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Fisiologia do tecido ósseo.....	19
Figura 2 - Esquema do controle da reabsorção óssea. Hormônios e substâncias.....	20
Figura 3 - Cadeia 1,3-glicosídica linear de monômeros de -D-glicose ligada por uma ligação 1,6-	28

SEGUNDA PARTE

Figure 1 - Experimental groups and experimental design.....	67
Figure 2 -(A) Representative images of the female mouse uterus without OVX (<i>SHAM</i>) and Saline group (SAL). (B) Relative mass of the uterus (mg/g) of female C57BL/6J mice submitted to <i>SHAM</i> or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β - Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + Resistance Training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant difference with $p < 0.05$	68
Figure 3 - (A) Evolution of normalized load (load in grams/body weight) in female C57BL/6J mice submitted to resistance training (RT) and resistance training + β -Glucan (BG + RT). (B) Body mass (g) variation in female C57BL/6J mice submitted to <i>SHAM</i> procedure or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). (C) Mass gain (difference between final mass - initial mass). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p <$ 0.05).	69
Figure 4 - (A) Femoral mass (g). (B) Bone Mineral Density (BMD _{DEXA}). (C) Maximum fracture strength (N). (D) Bone rigidity. Female C57BL/6J mice submitted to <i>SHAM</i> procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)..	70
Figure 5 - (A) Representative images of the femur. (B) Bone parameters: Bone Mineral Density (BMD _{MCT}), Bone Volume, BV / TV Ratio, Tb Th, Tb.N and Tb.Sp of trabecular bone. Female C57BL/6J mice submitted to <i>SHAM</i> procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution	

(SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)..71

Figure 6 - (A) Representative images of the cortical bone of the right femur. (B) Analysis of the cortical bone of the right femur: Ct.Ar/Tt.Ar, B.Pm, Ct.Th, Ma.Ar. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0,1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62,5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and e β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).....73

Figure 7 - (A) Calcium concentration. (B) Phosphorus concentration in the tibiae. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)..74

Figure 8 - (A) Representative images of the histomorphometry of the bone tissue of the female tibia of mice (B) Number of osteocytes/area. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0,1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62,5 mg/kg), resistance training (RT) (weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)..75

Figure 9 - (A) Histomorphometry muscle tissue gastrochemistry right tibia. (B) Gastrocnemius muscle cross-section area. (C) Numbers of muscle fibers/area. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)..76

LISTA DE ABREVIATURAS

BG	β -Glucano
BMP	Proteína morfogenética óssea
CFU-GM	Progenitores hematopoiéticos iniciais
CSF- 1	Fator estimulador de colônia 1
CTX	Telopectídeo C terminal de colágeno tipo I
DMO	Densidade Mineral Óssea
ER α	Receptor de estrógeno tipo α
ER β	Receptor de estrógeno tipo β
GPER	Receptor de estrógeno acoplado à proteína G
IL-1	Interleucina 1
IL- 2	Interleucina 2
IL- 6	Interleucina 6
M-CSF	Fator estimulante de colônia de monócitos
OPG	Osteoprotegerina
PTH	Paratormônio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa β
RANKL	Ligante do Receptor ativador do fator nuclear Kappa β
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TGH- α	Fator de transformação do crescimento α
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRAP	Fosfatase ácida resistente a tartarato
TRH	Terapia de reposição hormonal

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Osteoporose	15
2.1.1	Caracterização da doença	15
2.1.2	Epidemiologia.....	16
2.1.3	Fisiologia do tecido ósseo	17
2.1.4	Fisiopatologia da osteoporose	20
2.1.5	Biomecânica do tecido ósseo	23
2.2	Modelo experimental de osteoporose: ovariectomia	27
2.3	β-Glucanos.....	27
2.4	Treinamento Resistido.....	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	43
	ANEXO A	77
	ANEXO B	78
	ANEXO C	79
	ANEXO D.....	80
	ANEXO E	81
	ANEXO F	82
	ANEXO G.....	83

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional traz consigo um aumento da proporção de mulheres que estarão sujeitas às doenças relacionadas à ausência dos hormônios ovarianos, dentre elas a osteoporose. A perda de massa óssea após a menopausa aumenta progressivamente com o avançar da idade (ANTHAMATTEN; PARISH, 2019; AZIZIYEH et al., 2019; MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013). A osteoporose é considerada um problema grave de saúde pública, com aproximadamente 200 milhões de pessoas afetadas no mundo. Cerca de 30% das mulheres em estágio pós-menopausa desenvolve osteoporose, sendo as fraturas ósseas as principais consequências (ALEJANDRO; CONSTANTINESCU, 2017; BACCARO et al., 2015; WOOD; STENSON; EMBLETON, 2015).

O modelo experimental de roedores fêmeas ovariectomizadas (OVX) constitui ferramenta importante para a investigação de novas terapias e prevenção para a osteoporose (KOMORI, 2015; MURAI et al., 2015). As terapias atuais envolvem principalmente o emprego de bifosfanatos (ALEJANDRO; CONSTANTINESCU, 2017; WIDRICK et al., 2007), a suplementação oral de cálcio e Vitamina D, bem como o uso dos fármacos denosumabe e teriparitida, além do hormônio paratireoidiano (PTH) e da reposição hormonal com estrógeno (RADOMINSKI et al., 2017). Essas terapias visam principalmente minimizar os efeitos da menopausa sobre os ossos, entretanto, apesar da diminuição nos índices de fraturas, as terapias antiabsortivas e anabólicas vêm sendo questionadas, pois muitos indivíduos apresentam alguns efeitos adversos (IMAM et al., 2019) como fraturas atípicas durante o tratamento (OSAKI et al., 2012). Adicionalmente, a suplementação a longo-prazo com estrógenos vem sendo associada à maior suscetibilidade ao câncer de útero e de mama, além de doenças cardiovasculares. Portanto, mais estudos investigando estratégias alternativas para tratamento e prevenção da osteoporose ainda são necessários (ISEME et al., 2017).

Medidas gerais tais como orientações para prevenção de quedas e a prática de exercícios físicos específicos, podem ser instituídas antes da manifestação da doença e geram benefícios adicionais à saúde. Nos últimos anos, vários estudos têm proposto formas alternativas para estímulo da formação óssea, muitas vezes em substituição à terapia medicamentosa, tais como a

prática de atividade física de alto impacto (ou de força), assim como a suplementação com alimentos funcionais (GHOSHAL et al., 2017; JUNG et al., 2016; STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016).

Entre os alimentos funcionais, destacam-se os prebióticos como as fibras solúveis, que promovem redução da absorção de gorduras e carboidratos no trato gastrointestinal, aumentando a produção de adipocinas pró-inflamatórias que podem estimular a reabsorção óssea (JAKEMAN et al., 2016). Na osteoporose, já foi reportado efeito osteoprotetor em ensaio com camundongos-fêmea ovariectomizadas que consumiram um β -Glucano (BG) proveniente do *Aureobasidium pullulans* (Polycan) (SHIN et al., 2007). Benefícios ao tecido ósseo também foram reportados na associação do consumo de β -Glucanos com um extrato vegetal (*Textoria morbifera*) (CHO et al., 2018; JUNG et al., 2016; SHIN et al., 2007) e com o lactato de cálcio (CHOI et al., 2014). Apesar de estudos prévios reportarem potenciais benefícios isolados do exercício resistido ou da ingestão de BG sobre o tecido ósseo, estudos associando as duas terapias ainda não foram realizados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Osteoporose

2.1.1 Caracterização da doença

A Osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela diminuição da massa e deterioração da micro-arquitetura do tecido ósseo, levando a maior fragilidade do osso e ao consequente aumento do risco de fratura, após traumas (NAIK-PANVELKAR et al., 2020; WOOD; STENSON; EMBLETON, 2015). A osteoporose pós-menopausa é um grave problema de saúde pública associada à morbidade e mortalidade significativas, com redução na qualidade de vida e aumento dos custos com cuidados de saúde (ALEJANDRO; CONSTANTINESCU, 2017).

Os hormônios sexuais têm um importante papel no metabolismo e na manutenção do pico de massa óssea. Existem claras evidências de que a diminuição ou ausência de estrógenos leva a uma progressiva diminuição da massa óssea (MADA et al., 2017; MELTON et al., 2005; MURAI et al., 2015). A evolução da osteoporose é caracterizada pela fragilidade esquelética, tendo como um dos desfechos clínicos mais importantes a ocorrência de fraturas por baixo impacto (RADOMISNKI et al., 2017), sendo as fraturas do quadril em pacientes senis um problema de saúde pública mundial (SHIN et al., 2007). Dados epidemiológicos indicam mais de 200 milhões de pessoas com osteoporose e fraturas em todo o mundo (ISEME et al., 2017; STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016). Estima-se que o risco de fratura de quadril em mulheres acima dos 50 anos de idade seja de 11-18% (ALEJANDRO; CONSTANTINESCU, 2017; ISEME et al., 2017; MELTON et al., 2005).

A osteoporose é classificada em dois tipos: Osteoporose primária (tipo I ou pós-menopausa) que ocorre nos primeiros 10 anos após a menopausa em consequência da deficiência de estrogênio. Caracteriza-se por uma perda óssea mais acelerada que predomina sobre o osso trabecular. Já a osteoporose secundária (tipo II ou senil), mais comum em pessoas de idade avançada, afeta ossos compactos como o fêmur e quadril (IVANOVA et al., 2015). Apesar deste tipo de osteoporose ser denominada “senil” ela pode ser observada também em jovens como consequência do uso de medicamentos (como glicocorticoides) ou de doenças associadas à

osteoporose. Nesse caso a perda é mais lenta (IVANOVA et al., 2015; MIRZA; CANALIS, 2015).

2.1.2 Epidemiologia

A prevalência da osteoporose no Brasil varia amplamente de acordo com a metodologia utilizada em cada estudo. Alguns estudos baseiam o diagnóstico de osteoporose na densitometria óssea e outros estudos se baseiam em questionários auto aplicáveis para a identificação de prevalência. Além disso, são poucos estudos que avaliaram uma amostra representativa de todo o território brasileiro. A prevalência de osteoporose no Brasil varia entre 15% e 33% (BACCARO et al., 2015). Segundo o Ministério da Saúde no Brasil são mais de 10 milhões de brasileiros afetados pela osteoporose.

Camargo et al. (2005) avaliando a Densidade Mineral Óssea (DMO) de 207 mulheres com mais de 70 anos encontrou uma prevalência de 33,2 % (CAMARGO et al., 2005). Já no estudo de Martini et al. (2009) utilizando uma entrevista por telefone em 54.369 indivíduos encontrou uma prevalência de 8% em mulheres de 45 a 54 anos, 19,2% em mulheres de 55 à 64 anos e 32,7% em mulheres com mais de 65 anos (MARTINI et al., 2009).

Pinheiro et al. (2010) realizaram o maior estudo de prevalência de osteoporose no Brasil através do Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS), que incluía uma amostra representativa de mulheres de todas as regiões do Brasil. Foram entrevistadas 1695 mulheres com mais de 40 anos de idade, sendo que destas aproximadamente 35% estavam na pré-menopausa. A prevalência de osteoporose foi relatada em 15,1% (PINHEIRO et al., 2010).

Nos Estados Unidos, a prevalência de osteoporose em mulheres com mais de 50 anos é de 15,4% e em mulheres com mais de 80 anos 34,9%. A prevalência da osteoporose em 27 países da União Europeia é de 21% entre mulheres de 50 à 84 anos (KANIS et al., 2020). Portanto a prevalência de osteoporose em mulheres brasileiras se mostra similar à estas duas localizações (BACCARO et al., 2015).

No Brasil mais de 121.000 fraturas de quadril são relatadas anualmente no país, com um aumento potencial para 160.000 até 2050, e que mais de 50% daqueles que sobrevivem a uma fratura de quadril não poderão viver independentemente. Além disso, os custos anuais relacionados à osteoporose no Brasil são estimados em 309 milhões de reais, principalmente

relacionados à perda de produtividade (61%) e custos com hospitalização (19%) (AZIZIYEH et al., 2019). Ao redor do mundo estima-se que ocorra uma fratura osteoporótica a cada três segundos (NEUMAN; KENNELLY; TOSI, 2011). A cada três mulheres na pós menopausa, uma é afetada pela doença (ALSWAT, 2017).

2.1.3 Fisiologia do tecido ósseo

Os ossos são estruturas innervadas e irrigadas, que apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração. Como é um tecido vivo e dinâmico, se renova permanentemente durante a vida toda, sendo esse sistema de deposição e reabsorção denominado de remodelação óssea. O tecido ósseo está em constante modificação, basicamente devido a três principais processos: crescimento, modelação e remodelação óssea. Uma mudança contínua acontece em todos os ossos ao longo da vida, em ciclos associados à maior ou menor atividade dos osteoblastos e osteoclastos que constituem os grupos de células responsáveis pela formação e reabsorção óssea respectivamente (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013; WOOD; STENSON; EMBLETON, 2015).

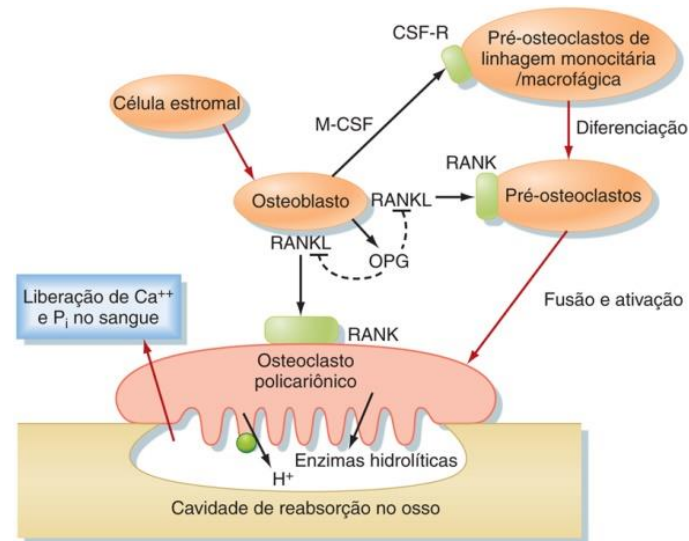
A matriz óssea é composta por células e material extracelular calcificado. Os osteócitos são células localizadas em cavidades ou lacunas no interior da matriz. Os osteoblastos são produtores da parte orgânica da matriz e os osteoclastos são células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo. Juntos, esses tipos celulares realizam o processo de remodelação e manutenção do metabolismo ósseo (JEPSEN et al., 2016).

A homeostase do tecido ósseo é controlada pelo equilíbrio dinâmico entre a formação e a reabsorção óssea. Um desequilíbrio entre estas atividades contribui para o aparecimento de várias doenças metabólicas no osso (LUO et al., 2014). Na infância, adolescência e até os 35 anos de idade, ocorre contínua e acelerada formação da massa óssea, atingindo seu pico máximo. Logo após esse término do crescimento linear do indivíduo, inicia-se uma perda óssea que varia de 0,3% a 0,5% de massa óssea a cada ano. No caso das mulheres, acredita-se que entre 40 anos e a menopausa ocorra perda de aproximadamente 1,5% ao ano. Na menopausa este ritmo pode acelerar para 3 a 4% ao ano, uma vez que os ovários tornam-se inativos (BRASIL et al., 2016; PONZETTI; RUCCI, 2019; TAKAHASHI; JOHNSON, 2015).

O principal mecanismo que regula a formação e reabsorção óssea é a sinalização entre osteoblastos e osteoclastos. As células da linhagem dos osteoblastos expressam fatores que induzem a diferenciação de osteoclastos a partir de progenitores da linhagem monocitária/macrofágica e também promovem a função dos osteoclastos maduros (ZHAO et al., 2019). Os osteoblastos liberam o fator estimulante de colônia de monócitos (M-CSF), estes se expandem e diferenciam os progenitores hematopoiéticos iniciais (CFU-GM) em pré-osteoclastos que por sua vez expressam um receptor de superfície celular chamado RANK (receptor ativador do fator nuclear Kappa B). Os osteoblastos apresentam um ligante de RANK (RANKL) em sua superfície celular. O RANKL liga-se então ao RANK nos pré-osteoclastos e induz a osteoclastogênese. Este processo envolve a fusão de vários precursores de osteoclastos, originando um grande osteoclasto multinucleado. A membrana do osteoclasto voltada para o osso mineralizado adere-se firmemente ao osso e veda a área de contato osteoclasto-osso. A região vedada forma uma membrana com grandes invaginações chamada de borda ondulada, a partir da qual enzimas lisossômicas hidrolíticas são secretadas. O microambiente rico em enzimas ácidas abaixo do osteoclasto dissolve o mineral ósseo, liberando íons Ca^{2+} e P para o sangue, degradando assim a matriz óssea. Além disso, existe outro componente inibidor do sistema RANK/RANKL, as células da linhagem de osteoblastos também produzem um fator solúvel chamado de osteoprotegerina (OPG), que atua como um receptor para o RANKL e inibe a diferenciação e a função dos osteoclastos. Portanto, o equilíbrio entre RANKL e a expressão de OPG por osteoblastos determina a diferenciação de osteoclastos e a reabsorção óssea (LIU et al., 2015; PONZETTI; RUCCI, 2019) (FIGURA 1).

As proteínas acima mencionadas desempenham um papel essencial no desenvolvimento e manutenção de tecidos ósseos. A descoberta do sistema RANK/RANKL/OPG propiciou novas oportunidades terapêuticas para o tratamento da osteoporose (BRASIL et al., 2016).

Figura 1 - Fisiologia do tecido ósseo.



Fonte: Berne et al. (2015).

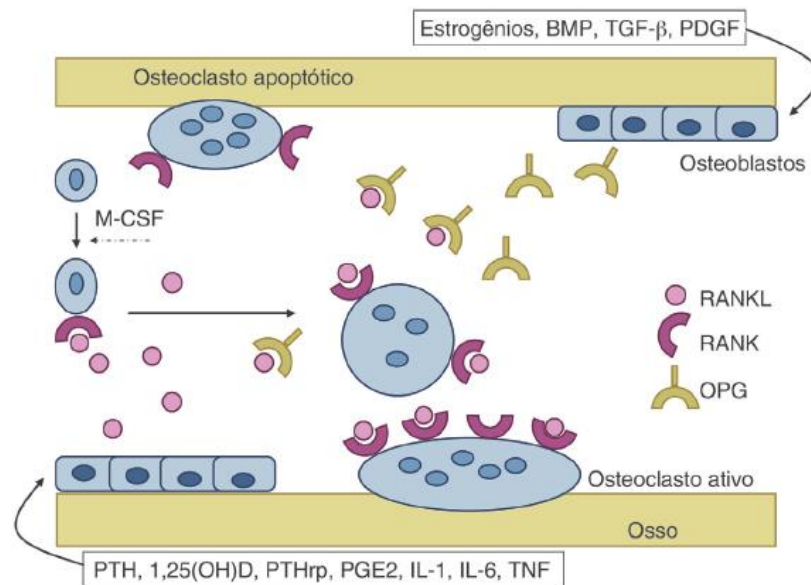
Existem substâncias que sabidamente são indutoras da reabsorção óssea estimulando a expressão do RANKL, enquanto diminuem a síntese de OPG. Estudos em ratos transgênicos que hiperexpressavam OPG mostraram que esses animais desenvolveram osteopetrose, ao passo que ratos *knockout* para OPG desenvolveram osteoporose grave com fraturas, além de calcificações vasculares (SIMONET et al., 1997).

A membrana plasmática das células ósseas é particularmente rica em fosfatase alcalina e tem receptores para o paratormônio (PTH), citocinas e prostaglandinas. Possuem ainda receptores intracelulares para hormônios esteróides, como estrógeno e vitamina D. Expressam citocinas em suas membranas, em particular o fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) e RANKL, que podem ser clivados para ativar a osteoclastogênese, por ação parácrina (PONZETTI; RUCCI, 2019).

Algumas citocinas e fatores de crescimento estimulam diretamente a reabsorção pelos osteoclastos, como IL-1, IL-2, IL-6 (KANESHIRO et al., 2014), o TNF- α (YAO et al., 2006), o TGF- α , o PDGF e o PTH (CALVI et al., 2003) atuando primordialmente aumentando o número de osteoclastos, por induzirem sua diferenciação a partir de seus precursores (KHALID; KRUM, 2016). É muito provável que a ação destes mediadores se faça por meio do balanceamento entre a produção pelos osteoblastos dos fatores RANKL e OPG. Já está demonstrada a ação reabsortiva (induzida por estímulo da síntese de RANKL pelos osteoblastos) pela 1,25-di-hidroxivitamina D, PTH, IL-1, IL-6 e TNF (PONZETTI; RUCCI, 2019). Por outro lado, fatores antirreabsortivos, como estrógenos e algumas proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), estimulam a produção de

OPG, enquanto suprimem a expressão de RANKL pelos osteoblastos. A calcitonina atua diretamente sobre os osteoclastos por receptores específicos de membrana, impedindo a fusão celular prévia à formação dos osteoclastos e inibindo a reabsorção óssea por atuar provavelmente sobre o citoesqueleto destas células (MANGLANI et al., 2019) (FIGURA 2).

Figura 2 - Esquema do controle da reabsorção óssea. Hormônios e substâncias.



Fonte: Aires (2012).

2.1.4 Fisiopatologia da osteoporose

No ano de 1941, Albright descobriu que o processo patogenético da osteoporose acelerava imediatamente após a menopausa natural e não natural, propondo assim a hipótese de que a osteoporose estava relacionada à diminuição da função ovariana (ANTHAMATTEN; PARISH, 2019). Existem claras evidências de que a diminuição ou ausência de estrógenos leva a uma progressiva diminuição da massa óssea (LU; WANG, 2018; MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013).

Os estrógenos exercem influências poderosas no tamanho e forma do esqueleto durante o crescimento, contribuindo para a homeostase esquelética também durante a vida adulta. O declínio nos níveis de estrógeno associado à menopausa causa perda óssea em mulheres, que ocorre no osso trabecular e no osso cortical, estando associada à uma alta taxa de remodelação óssea (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013).

A presença de receptores estrogênicos em osteoblastos ou em células de linhagem osteoblástica foi descrita por Eriksen et al. (1988), que detectaram receptores funcionais de estrógeno em células ósseas humanas, e por Komm et al. (1988), que encontraram diversos locais de ligação do estrógeno em núcleos de células de ratas. Ambos os trabalhos relataram a presença de RNA mensageiro (RNAm) estrogênico em cada população de células óssea estudadas.

Tanto os osteoblastos quanto os osteoclastos têm receptores de estrógeno. Os receptores de estrogênio, ER α (ER1 ou Esr1), ER β (ER2 e Esr2) e receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER), mediam os efeitos de compostos estrogênicos em seus tecidos-alvo. O estrógeno interage com seu receptor através de vias tradicionais e não tradicionais. Na via tradicional, o estrógeno se liga ao receptor homólogo no núcleo, regulando diretamente a transcrição de genes ou combinando com fatores de tradução. Na via não tradicional, o estrógeno se liga aos receptores de membrana e regula principalmente o processo de apoptose de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (IVANOVA et al., 2015; ZUO et al., 2019).

Os receptores de estrógeno não agem da mesma maneira em todos os tecidos alvos, de forma que sua ação depende da predominância do subtipo α ou β no tecido em questão, da natureza do ligante, da transcrição celular e da presença ou ausência de auxiliares ou proteínas reguladoras (KHALID; KRUM, 2016). O estrógeno promove o desenvolvimento de osteoblastos através de células precursoras, aumenta a sua proliferação e síntese proteica, como o pro-colágeno tipo I, TGF- β e proteínas morfogenéticas. Além disso, tem um efeito anabólico e inibitório da apoptose dos osteoblastos e dos osteócitos (SU et al., 2016).

Estudos com terapia de reposição de estrógeno a longo prazo (TRH) demonstraram que ele aumentou a atividade dos osteoblastos. A cultura *in vitro* de osteoblastos de ratos com tratamento com 17- β -estradiol aumentou significativamente a proliferação celular e a expressão do gene do colágeno. O estrógeno regula um processo de diferenciação dupla, promovendo a diferenciação precoce de osteoblastos e inibindo a diferenciação de adipócitos na linha de células estromais da medula óssea de camundongos (ALEJANDRO; CONSTANTINESCU, 2017).

Em relação ao sinal celular, o remodelamento ósseo determinado pelo estrógeno se dá pela sua ligação aos seus receptores presentes nas células osteoblásticas, o que induz ao aumento da produção de osteoprotegerina (OPG) e suprime a síntese de RANKL. Esse processo diminui a ação dos osteoclastos levando à redução da reabsorção óssea, mantendo assim a massa óssea. Além disso, o estrógeno leva à uma queda de citocinas envolvidas na reabsorção óssea como a

IL-1 e TNF- α , produzidos pelos monócitos, IL-6 como também do fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF) sintetizado por células estromais e osteoblastos. Em situações de hipoestrogenismo não há bloqueio completo do sistema RANKL/RANK e das citocinas. Há ainda aumento dos fatores relacionados com o incremento da reabsorção óssea, favorecendo a ação osteoclástica (KALKAN; TULAY, 2018).

O estrógeno age através da regulação do nível de citocinas e fatores de crescimento, modulando a secreção de enzima lisossômica dos osteoclastos, promovendo assim a apoptose nos mesmos e inibindo a apoptose nos osteoblastos e osteócitos (LU; WANG, 2018).

A isoforma α do receptor de estrógeno (ER α), além de suas ações osteogênicas, também está envolvida na resposta adaptativa à tensão mecânica desempenhando função mecanotransdutora nas células ósseas (SAXON et al., 2012; ZAMAN et al., 2010). No período da menopausa há uma redução da atividade dos ER α nas células ósseas com consecutivo declínio da capacidade de resposta do tecido ósseo à carga mecânica, o que determina maior agravamento da qualidade óssea e explica o fato de algumas mulheres na menopausa desenvolverem diminuição de massa óssea semelhante a que é observada no desuso (SAXON et al., 2012). Como mecanismo compensatório da diminuição da concentração de estrógeno, há aumento dos níveis de expressão de RNAm de ER α (ZAMAN et al., 2010).

O 17-beta-estradiol promoveu apoptose em osteoclastos *in vitro* e *in vivo* em ratos (HUGHES et al., 1996). Os osteoclastos se ligam à superfície do osso para formar um compartimento extracelular selado. Um ambiente ácido vai sendo formado através da ação de uma bomba de hidrogênio nos osteoclastos, na qual eles produzem e secretam proteases lisossômicas. Estudos demonstraram que o estrógeno age diretamente no osteoclasto maduro prevenindo a secreção de enzimas lisossômicas e diminuindo a secreção de catepsina B, catepsina L e Fosfatase Ácida Resistente a Tartarato (TRAP). Por outro lado, o estrógeno também diminui a capacidade do osteoclasto em formar cavidades entre a célula e a superfície óssea (ASPRAY; HILL, 2019).

O tratamento *in vivo* de ratas ovariectomizadas com 17- β -estradiol aumentou a apoptose dos osteoclastos e evitou a perda de massa óssea. A cultura *in vitro* de células da medula óssea com 17- β -estradiol aumentou em duas vezes a apoptose dos osteoclastos durante a osteoclastogênese (COOPER et al., 2000).

Além disso, o estrógeno promove a secreção de calcitonina, aumenta a atividade da 25-hidroxilase hepática e 1-alfa-hidroxilase renal, aumenta o nível de expressão de 1,25- (OH) 2D3 e promove a absorção intestinal de cálcio. A calcitonina inibe a atividade dos osteoclastos combinando-se com seu receptor nessas células, reduzindo assim a reabsorção óssea (KALKAN; TULAY, 2018; NIEVES et al., 1998).

O estrógeno pode também inibir a secreção do paratormônio (PTH), sendo que deficiência do estrógeno aumenta a sensibilidade óssea a esse hormônio, ativando a reabsorção óssea (BOLOGNESE, 2010; CHO et al., 2018). O estrógeno também modifica as expressões de genes de substâncias como colágeno tipo I, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina, que estimulam a formação óssea. Além disso, este hormônio aumenta a síntese e a mineralização da matriz óssea e mantém os osteócitos viáveis (CHAKI, 2015; JACOME-GALARZA et al., 2019; KALKAN; TULAY, 2018; SHIN et al., 2007).

A descoberta de receptores de estrógeno nos osteoblastos e osteoclastos foi um avanço científico. As mutações nos receptores de estrógeno α (Esr1), levando à osteoporose, bem como os efeitos diretos do estrógeno no osso têm sido extensivamente estudadas através dos camundongos knockout para Esr1. Em animais com ausência do gene para receptores Esr1 específicos para osteoclastos, a perda óssea induzida por ovariectomia não ocorreu (KOMORI, 2015). Sendo assim, o tratamento com o hormônio estrógeno passou a ser utilizado para mulheres pós-menopausa com osteoporose a fim de prevenir a perda de massa óssea. Entretanto, algumas contraindicações, efeitos colaterais e adversos bem como dúvidas sobre seu real papel no metabolismo ósseo estão levando a comunidade científica a buscar novas fontes de tratamento alternativo para prevenção da perda de massa óssea (ALEJANDRO; CONSTANTINESCU, 2017).

2.1.5 Biomecânica do tecido ósseo

Biomecânica é a mecânica aplicada aos sistemas biológicos determinando informações básicas que proporcionam conhecimento necessário para o entendimento das influências mecânicas sobre os processos de reparação óssea. A compreensão da biomecânica, das propriedades estruturais e materiais do osso, assim como dos efeitos que as forças apresentam em

ossos longos se torna importante para melhor conhecimento da osteoporose (DALMOLIN et al., 2013).

O esqueleto humano é formado pelos ossos que cumpre duas funções mecânicas importantes para os seres humanos, sendo a primeira fornecer uma estrutura esquelética rígida que sustenta e protege outros tecidos corporais e formar um sistema de alavancas rígidas que podem ser movidas pela força dos músculos fixados a eles (ACKERMAN; MISRA, 2013).

O tecido ósseo apresenta resistência à tração similar à do aço, além disso, é três vezes mais leve e dez vezes mais flexível. Isso se deve à sua microestrutura heterogênea, anisotrópica e não linear. Está sob permanentes mudanças em resposta à diferentes sinais como, por exemplo, a atividade física e os hormônios (BOUGHTON et al., 2018).

O material e a organização estrutural do osso influenciam as formas com que ele responde à estímulos mecânicos. A composição e a estrutura do osso produzem um material que é forte para seu peso relativamente pequeno, sendo as principais substâncias do osso o carbonato de cálcio, o fosfato de cálcio, o colágeno e a água. O colágeno é uma proteína que fornece ao osso sua flexibilidade e contribui para sua resistência à tração (BENALLA; CARDOSO; COWIN, 2012).

É importante salientar que a resistência final óssea vai estar intimamente ligada a essa deposição mineral no osso formado. A extrema rigidez que caracteriza o tecido ósseo é, portanto, resultado da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz. Na presença da osteoporose o colágeno e os depósitos minerais são desfeitos muito rapidamente e a formação do osso torna-se mais lenta. Com menos colágeno, surgem espaços vazios que culminam por enfraquecer o osso (ASPRAY; HILL, 2019).

O tipo de osso afeta diretamente as características mecânicas do tecido. Com seu alto teor mineral, o osso cortical é mais rígido, de modo que pode suportar forças maiores, mas menos deformação ou distorção, do que o osso trabecular (ERUM; DAM; DEYN, 2019). Como o osso trabecular é mais esponjoso do que o osso cortical, ele pode sofrer mais deformações antes de fraturar. O osso é mais forte na resistência à compressão e mais fraco para resistir ao cisalhamento (HELL, 2012).

Os minerais ósseos normalmente se acumulam ao longo da infância e da adolescência, alcançando um pico por volta da idade de 33 a 40 anos em mulheres e aos 19 a 33 anos em homens (ACKERMAN; MISRA, 2013). Após esse pico, um declínio progressivo na densidade

óssea, relacionado com a idade e na resistência óssea tem início tanto em homens quanto em mulheres. Isso envolve a diminuição progressiva nas propriedades mecânicas e na resistência geral do osso, com perda crescente de substância óssea e aumento de porosidade. O osso trabecular é afetado particularmente, com a progressiva desconexão e desintegração das trabéculas, comprometendo a integridade da estrutura óssea e diminuindo seriamente sua resistência (BERGER et al., 2016).

Além do crescimento ósseo, esse tecido responde dinamicamente à presença ou à ausência de forças diferentes com mudanças em tamanho, formato e densidade. Esse fenômeno foi descrito originalmente pelo cientista alemão Julius Wolff em 1892: “A orientação das direções anisotrópicas se relacionam com sua adaptação às cargas fisiológicas. Quando um osso é submetido a uma carga mecânica, ele modifica sua estrutura por aposição óssea na sua concavidade e por reabsorção na sua convexidade” (BRAND, 2010).

Quando uma força é aplicada a um objeto bloqueado, este se deforma. Se a deformação é de tal ordem que quando removida o objeto reassume posição e conformação original, denomina-se "deformação elástica". Quando a carga é aplicada até o ponto em que o objeto não é mais capaz de reverter sua forma original, têm-se o "ponto de quiescência". A deformação permanente é denominada "deformação plástica" e, finalmente, com a continuidade da aplicação da carga, obtém-se o "ponto de fratura". Dessa maneira, tem-se que fraturas em ossos ocorrem quando a carga aplicada sobre determinada região do tecido ósseo supera sua capacidade de resistência (DALMOLIN et al., 2013).

O estímulo mecânico dinâmico faz com que o osso se deforme ou se sobrecarregue (BRAND, 2010). Os ossos adultos ganham ou perdem massa de acordo com a lei de Wolff. Ao sofrer uma distorção ou carga de flexão, o osso fica sujeito a sobrecarga e um novo osso se estabelece no local, aumentando a massa e a densidade ósseas totais (BENALLA; CARDOSO; COWIN, 2012).

Materiais como o osso, cujas características de tensão-deformação e de resistência dependem da velocidade de deformação aplicada, são considerados viscoelásticos, pois se distende vagarosamente sobre baixa carga, considerando que, quanto maior o tempo de aplicação da carga mais se distende, embora de maneira mais lenta com o passar do tempo (DALMOLIN et al., 2013).

O estímulo mecânico que resulta de fortes impactos produz alta taxa de deformação que empurra melhor o fluido através da matriz óssea. É por esta razão que as atividades que envolvem altos níveis de impacto são melhores para estimular a formação óssea. Em resposta ao movimento de fluido dentro da matriz do osso, os osteócitos disparam a ação dos osteoblastos e dos osteoclastos, as células que, respectivamente, formam e reabsorvem o osso (BERGMANN et al., 2011). A remodelagem óssea envolve equilíbrio entre as ações osteoblástica e osteoclástica ou a predominância da atividade dos osteoclastos, com a manutenção ou a perda de massa óssea associada. As sobrecargas que resultam de uma atividade, como uma caminhada diária de 30 a 60 minutos, são suficientes para provocar a ativação óssea e a formação de novo osso (BENALLA; CARDOSO; COWIN, 2012).

O efeito piezoelétrico é uma resposta biológica ao estímulo mecânico, que permite observar no osso, a produção de carga elétrica negativa em áreas de compressão e carga elétrica positiva nas de tração. Na prática, a hiperpolarização está associada à osteogênese, enquanto a despolarização está associada à reabsorção óssea (VARELA; JOLETTE, 2018).

As forças a que os ossos longos estão submetidos podem ser fisiológicas ou não. As não fisiológicas ocorrem em situações incomuns como acidentes automobilísticos e quedas. Quando excedem a resistência limite do osso, originam fraturas. As fisiológicas são geradas pela sustentação do peso corporal, contração muscular e atividade física. Dificilmente excedem a resistência óssea. Assim, o tamanho, a forma e a resistência do osso são regulados em parte por essas forças mecânicas durante as atividades físicas diárias (DALMOLIN et al., 2013).

Fatores como massa muscular magra, força muscular e realização regular de exercícios de levantamento de pesos exercem influências mais fortes sobre a densidade óssea do que o peso, a altura e a raça (LI et al., 2004). Também parece que, quanto maiores forem as forças ou cargas encontradas habitualmente, mais substancial será o aumento da mineralização do osso. Em geral, a evidência científica sugere que a atividade física que envolve forças de impacto seja necessária para manter ou aumentar a massa óssea. Os músculos do corpo exercem principalmente forças de tração sobre o osso, enquanto a gravidade fornece uma força compressiva (TENFORDE; FREDERICSON, 2011).

Estudos detalhados sobre o osso demonstram cada vez mais que as sutilezas na microarquitetura podem ser mais importantes para determinar a resistência do osso à fratura do que a densidade mineral óssea. Em termos simples, a qualidade óssea pode ser mais importante

do que a quantidade óssea. Entretanto, os fatores que afetam a estrutura óssea dentro e ao redor das trabéculas ainda não estão totalmente elucidados. Até que se compreenda mais sobre a osteoporose, as mulheres jovens devem ser encorajadas a maximizar o pico de massa óssea e a minimizar sua perda com a realização de atividade física regular e evitando os fatores de estilo de vida que afetam negativamente a saúde óssea (RUPPEL; MILLER; BURR, 2008).

2.2 Modelo experimental de osteoporose: ovariectomia

O modelo animal mais utilizado de osteoporose pós-menopausa são em roedores, sendo que a perda de osso trabecular ocorre logo após a ovariectomia (KOMORI, 2015).

A ovariectomia é uma técnica experimental clássica que mimetiza a redução drástica da concentração de estrogênio pós-menopausa, permitindo a exploração dos efeitos e mecanismos das intervenções terapêuticas (MADA et al., 2017; MURAI et al., 2015). Os roedores estão entre um dos modelos animais mais utilizados na pesquisa da osteoporose, sendo que importantes contribuições têm sido alcançadas com seu uso como modelo experimental desde a década de 1950. Os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda da massa óssea tanto na vida adulta normal quanto na osteoporose são os mesmos em humanos. Assim, a utilização do modelo experimental é importante para estudar a eficácia e segurança de técnicas de tratamento e ou prevenção (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005).

A indução de osteoporose utilizando ratos ou camundongos ovariectomizados (OVX) ocorre dentro de 4 a 6 semanas após a cirurgia (LIU et al., 2017). A ovariectomia resulta em perda de massa óssea, alterações histomorfométricas do osso trabecular e espessura do osso cortical, diminuição da densidade mineral e redução da força óssea (SHIN et al., 2007).

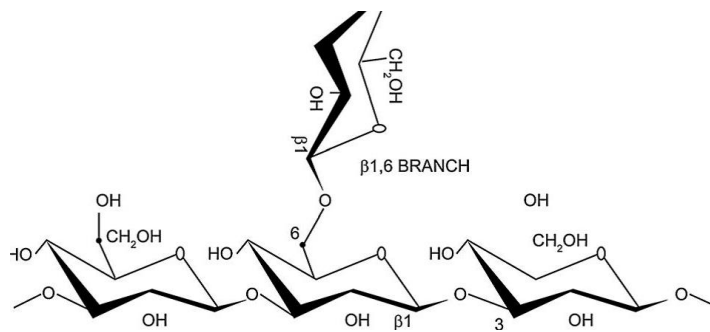
2.3 β -Glucanos

Os β -Glucanos são polissacarídeos do tipo fibra solúvel derivados da parede celular de leveduras, cereais e muitos cogumelos medicinais. Correspondem a um grupo diversificado de moléculas cuja massa molecular, solubilidade, viscosidade e configuração tridimensional são

distintas, atribuindo características biológicas diversas (BALDASSANO; ACCARDI; VASTO, 2017). A estrutura química possui ligações lineares centrais β (1-3), formada por unidades de glicose, que se diferenciam conforme seu comprimento e ramificações. A posição da ramificação geralmente define a atividade biológica do β -glucano (RAHAR et al., 2011).

Os β -Glucanos são derivados principalmente das paredes celulares de fungos, leveduras, algas, bactérias e plantas. Aquelas encontradas em leveduras apresentam ligações do tipo β - (1,3) e β - (1,6) enquanto aquelas constituintes da parede celular de plantas apresentam ligações β - (1,3) e β - (1,4) (JIN; LI; WANG, 2018). Uma importante fonte de β -glucano é a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como levedura de fermentação, que é amplamente empregada nas indústrias de panificação, cervejaria e sucroalcooleira. Em *S. cerevisiae*, a β -glucano é constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3), com cadeias laterais unidas em β (1-6), que ocorrem em diferentes intervalos e têm tamanhos variados (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008) (FIGURA 3).

Figura 3 - Cadeia 1,3-glicosídica linear de monômeros de -D-glicose ligada por uma ligação 1,6-glicosídica.



Fonte: (BASHIR; CHOI, 2017).

Atribui-se aos β -glucanos uma atividade prebiótica devido a sua capacidade de resistência à digestão, fermentabilidade e favorecimento do crescimento e atividade de bactérias benéficas como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp (JAKEMAN et al., 2016).

Nas últimas décadas estes polímeros vem recebendo especial atenção por sua bioatividade, principalmente no que se refere a imunomodulação (BOBADILLA et al., 2013). Além disso, inúmeros efeitos benéficos como antitumoral (BALDASSANO; ACCARDI; VASTO, 2017), antiinflamatório (SILVA et al., 2017), antimutagênico (OLIVEIRA et al., 2006) hipocolesterolêmico (SIMA; VANNUCCI; VETVICKA, 2018) e hipoglicêmico (WOLEVER et al., 2019) têm sido relacionados à β -glucanos.

Entre seus efeitos biológicos favoráveis, os β -glucanos , auxiliam no tratamento das dislipidemias, diabetes, doenças cardiovasculares e até câncer (SILVA et al., 2017; VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008).

Os β -glucanos atuam nos mecanismos de defesa do organismo através da ativação da resposta imune via sistema complemento, diretamente, ou através de anticorpos que produzem substâncias químicas induzindo a migração de leucócitos para o local da infecção. Os mecanismos de ação da resposta desencadeada englobam o estímulo da hematopoiese, ativação de macrófagos, neutrófilos e de células natural killers (NK) (BASHIR; CHOI, 2017).

Ainda são reportados efeitos dos β -glucanos na proliferação, diferenciação e efeito antifibrose em células da musculatura esquelética e efeito positivo na microbiota intestinal (LI et al., 2018); melhora na cicatrização de feridas e efeito antiosteoporótico (CHO et al., 2018; SHIN et al., 2007).

Os efeitos antiosteoporóticos, de melhora da saúde óssea e de regeneração óssea dos β -glucanos tem sido estudados in vitro, bem como em ensaios clínicos baseados em animais e seres humanos. Estudos in vitro demonstraram que os β -glucanos podem aumentar a atividade hematopoética aumentando significativamente o fator de formação de colônias mielóides mononucleares da medula óssea. A proliferação de osteoblastos foi estimulada, o que impediu a diferenciação de osteoclasto induzida por RANKL das células (CHOI et al., 2011).

Estudo prévio relatou um aumento significativo na densidade mineral óssea do fêmur, da tíbia e da vértebra L5, bem como um aumento na biodisponibilidade do cálcio e uma diminuição na secreção de cálcio em modelos de ratas ovariectomizadas tratadas com β -glucano isolado de *Aureobasidium pullulans* (CHOI et al., 2014). Adicionalmente, também foram reportados efeitos protetores do β -Glucano isolado de *A. pullulans* na osteoporose induzida por ovariectomia. O tratamento reduziu a reabsorção óssea de maneira dose-dependente; gerando um aumento significativo nos índices histomorfométricos (mensuração da densidade mineral óssea por DEXA). O β -Glucano preservou a massa e força óssea e aumentou a taxa de formação, apoiando a ideia de que este alimento pode ser usado como um agente antiosteoporótico (JUNG et al., 2016). Os efeitos do β -Glucano em mulheres saudáveis na menopausa após quatro semanas de tratamento mostrou alterações positivas, aumentando os níveis séricos de osteocalcinina e fosfatase alcalina (HONG; KIM, 2018).

2.4 Treinamento Resistido

O exercício físico é um estímulo importante para o tratamento da osteoporose. Contudo, ainda não está clara qual modalidade seria ideal para estimular o metabolismo ósseo e melhorar o desempenho físico de mulheres pós-menopausa (KAWANO et al., 2017). O treinamento resistido (TR) tem como objetivo aumentar a massa magra, melhorando a força e função muscular e a mobilidade física (DALY et al., 2019). Este treinamento pode ser definido como um exercício que envolve contrações dos músculos esqueléticos frente a uma carga de resistência externa (GASIER et al., 2011; JU et al., 2015).

A prática regular de TR inibe a degradação de proteína, acelera a síntese proteica e a diferenciação muscular e ainda promove a proliferação de células satélites (BORBA-PINHEIRO et al., 2016). Dessa forma, o TR pode ser dito como uma contramedida para a sarcopenia e para a osteopenia (GASIER et al., 2011; STRINGHETTA-GARCIA et al., 2017). O TR requer menos gasto de oxigênio e movimentação cardiorrespiratória do que o treinamento aeróbico e se concentra no exercício de grupos musculares específicos. Durante e após o TR, fatores de crescimento e citocinas são liberados, o que pode desempenhar um papel benéfico em processos de regeneração e adaptação (KRÜGER et al., 2016).

Uma vez que o osso é um tecido que possui habilidade de responder à atividade física e exercício, programas de exercício, principalmente TR, têm sido indicados para tratamento de osteoporose, visto que estimula a osteogênese (FERNANDES et al., 2006; GIANREGORIO et al., 2014; MCMILLAN et al., 2017; YUAN et al., 2016). De acordo com o efeito piezoelétrico, a pressão imposta pelo exercício resistido atinge os cristais de hidroxiapatita, que sofrem deformação e geram diferenças de potencial elétrico, atuando como um estímulo no processo de formação óssea, ou seja, o aumento na massa óssea em resposta ao exercício se dá principalmente devido ao aumento na mecanotransdução (WEBER-RAJEK et al., 2015). O TR atua como um indutor de diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos estando este fato associado com o aumento na adipogênese na medula óssea (LOMBARDI et al., 2016; YUAN et al., 2016).

Em pacientes com baixa massa óssea, observou-se que o exercício de resistência diminuiu as concentrações séricas de telopeptídeo C-terminal de colágeno tipo I (CTX), um marcador de reabsorção óssea, (GOMBOS et al., 2016). Adicionalmente, resultados de imunohistoquímica

para osteocalcina, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e esclerostina associados às análises de microarquitetura, densidade mineral e força óssea indicaram que o treinamento de força constitui uma intervenção eficiente na prevenção da osteoporose associada à idade em ratas (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2017).

Uma revisão sistemática que avaliou os efeitos do treinamento físico sobre a densidade mineral óssea de idosos, indicou que o treinamento resistido progressivo como estímulo mecânico indiretamente produzido no osso (BENEDETTI et al., 2018; CIOLAC; RODRIGUES-DA-SILVA, 2016; HINGORJO et al., 2018; XU et al., 2016) atua como estímulo para manutenção da massa óssea durante o envelhecimento. As melhorias na densidade mineral óssea foram obtidas através do treinamento de resistência de alta intensidade, com três sessões por semana e duas a três séries por sessão (CIOLAC; RODRIGUES-DA-SILVA, 2016).

O exercício de resistência determina uma força de reação conjunta e fortalecimento muscular, produzindo um importante benefício clínico (KELLEY; KELLEY; KOHRT, 2012). Entre os tipos de exercício destaca-se o agachamento, *leg press*, subida de degraus, descida de degraus, remo sentado e supino (BENEDETTI et al., 2018).

Desde que Hornberger e Farrar propuseram a escalada em escada como modelo de treinamento resistido (TR) em roedores, vários estudos vem utilizando o modelo de subida em escada para estudar os efeitos do TR em diferentes condições de saúde e doença em roedores. A maioria dos estudos que utilizam a escada como modelo de TR em roedores utiliza o treinamento com alta carga, como proposto inicialmente por Hornberger e Farrar (2004) combinadas com um baixo número de repetições, para promover o recrutamento de fibras musculares de contração rápida e estímulos metabólicos, aumentando a força muscular (PADILHA et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito na saúde óssea da associação de ingestão de prebiótico (β -glucano de *Saccaromyces Cerevisiae*) e treinamento resistido em escada, em modelo de osteoporose induzido por ovariectomia em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos que constituem este experimento foram:

- Verificar a influência da ovariectomia na perda de massa óssea no modelo experimental de osteoporose
- Verificar alterações nos parâmetros do conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea, observadas através de raio-x de dupla energia (DMO_{DEXA}) em animais tratados com BG, treinamento resistido e associação de ambos em relação a terapia com alendronato e solução salina.
- Verificar o efeito dos tratamentos na microarquitetura óssea (fêmures) do osso trabecular e cortical através da técnica de microtomografia computadorizada (MicroCT).
- Verificar os parâmetros biomecânicos nas tíbias frente aos tratamentos testados.
- Verificar a quantidade de osteócitos no tecido ósseo das tíbias dos animais do experimento.
- Verificar o grau de hipertrofia e hiperplasia das células musculares através da avaliação histomorfométrica associadas aos tratamentos propostos.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando que a osteoporose é um problema sério de saúde pública mundial afetando principalmente as mulheres na pós-menopausa e tendo em vista alguns efeitos adversos de determinados tratamentos medicamentosos, hoje mais do que nunca se tornam necessários mais estudos com alternativas terapêuticas que promovam efeitos benéficos com o mínimo de efeitos adversos, além de atuar de forma preventiva para aqueles indivíduos com pré-disposição para o desenvolvimento da doença.

O treinamento resistido é considerado benéfico para a saúde óssea, promovendo uma maior taxa de formação óssea e diminuição da reabsorção desse tecido. Os alimentos funcionais como os prebióticos aparecem como promissores na prevenção da osteoporose ou da evolução dela. Os β -Glucanos em razão de seus efeitos imunológicos e metabólicos são alimentos funcionais muito promissores e sua aplicação em diversas doenças crônicas não-transmissíveis deve ser incentivado, com possibilidade de emprego rotineiro pela população, com baixo custo e segurança.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, K. E.; MISRA, M. Bone health and the female athlete triad in adolescent athletes. **The Physician and Sportsmedicine**, London, v. 39, n. 1, p. 131–141, Feb. 2013.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1335 p.
- ALEJANDRO, P.; CONSTANTINESCU, F. A review of osteoporosis in the older adult. **Clinics in Geriatric Medicine**, United States, v. 33, n. 1, p. 27–40, Feb. 2017.
- ALSWAT, K. A. Gender disparities in osteoporosis. **Journal of Clinical Medicine Research**, Canada, v. 9, n. 5, p. 382–387, Apr. 2017.
- ANTHAMATTEN, A.; PARISH, A. Clinical update on osteoporosis. **Journal of Midwifery and Women's Health**, United States, v. 64, n. 9, p. 265–275, Mar. 2019.
- ASPRAY, T. J.; HILL, T. R. Osteoporosis and the ageing skeleton. **Subcellular Biochemistry**, Switzerland, v. 91, p. 453–476, Jan. 2019.
- AZIZIYEH, R. et al. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. **Journal of Medical Economics**, United States, v. 22, n. 7, p. 638–644, July 2019.
- BACCARO, L. F. et al. Clinical interventions in aging do depress the epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, New Zealand, v. 10, p. 583–591, Mar. 2015.
- BALDASSANO, S.; ACCARDI, G.; VASTO, S. Beta-glucans and cancer: The influence of inflammation and gut peptide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 142, p. 486–492, Sept. 2017.
- BASHIR, K. M. I.; CHOI, J. S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: The past, present, and future. **International Journal of Molecular Sciences**, United States, v. 18, n. 9, p. 1–48, Sept. 2017.
- BENALLA, M.; CARDOSO, L.; COWIN, S. C. Analytical basis for the determination of the lacunar-canalicular permeability of bone using cyclic loading. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, Germany, v. 11, n. 6, p. 767–780, Sept. 2012.
- BENEDETTI, M. G. et al. The effectiveness of physical exercise on bone density in osteoporotic patients. **BioMed Research International**, United States, v. 2018, n. 4, p. 1–10, Dec. 2018.
- BERGER, C. et al. Peak bone mass from longitudinal data: Implications for the prevalence, pathophysiology, and diagnosis of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, United States, v. 25, n. 9, p. 1948–1957, Sept. 2016.

BERGMANN, P. et al. Loading and skeletal development and maintenance. **Journal of Osteoporosis**, London, v. 2011, n. 1, p. 1–15, Dec. 2011.

BERNE, R. M. et al. **Fisiologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 880 p.

BOBADILLA, F. et al. Soluble β -1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. **Carbohydrate Polymers**, England, v. 92, n. 1, p. 241–248, Jan. 2013.

BOLOGNESE, M. A. SERMs and SERMs with estrogen for postmenopausal osteoporosis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, Switzerland, v. 11, n. 4, p. 253–259, Dec. 2010.

BORBA-PINHEIRO, C. J. et al. Resistance training programs on bone related variables and functional independence of postmenopausal women in pharmacological treatment: A randomized controlled trial. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Ireland, v. 65, n. 40, p. 36–44, Mar. 2016.

BOUGHTON, O. et al. Measuring bone stiffness using spherical indentation. **PLoS ONE**, United States, v. 13, n. 7, p. 1–18, July 2018.

BRAND, R. A. Biographical sketch: julius wolff, 1836-1902. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, United States, v. 468, n. 4, p. 1047–1049, Feb. 2010.

BRASIL, S. C. et al. Influence of oestrogen deficiency on the development of apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, England, v. 50, n. 6, p. 161–166, Feb. 2016.

CALVI, L. M. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, England, v. 425, n. 6960, p. 841–846, Nov. 2003.

CAMARGO, M. B. et al. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of São Paulo, Brazil. **Osteoporosis International**, England, v. 16, n. 11, p. 1451–1460, Dec. 2005.

CHAKI, O. Selective estrogen receptor modulators (SERMs). **Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**, Japan, v. 73, n. 10, p. 1673–1681, Jan. 2015.

CHO, C. S. et al. Anti-osteoporotic effects of mixed compositions of extracellular polymers isolated from aureobasidium pullulans and textoria morbifera in ovariectomized mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, England, v. 18, n. 1, p. 1–15, Nov. 2018.

CHOI, J-S. et al. In vitro activities of polycalcium, a mixture of polycan and calcium lactate-gluconate, on osteoclasts and osteoblasts. **Journal of Life Science**, Netherlands, v. 21, n. 8, p. 1199–1203, Aug. 2011.

- CHOI, J-S. et al. Antiosteoporotic effects of Polycan in combination with calcium lactate-gluconate in ovariectomized rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Greece, v. 8, n. 3, p. 957–967, Sept. 2014.
- CIOLAC, E. G.; RODRIGUES-DA-SILVA, J. M. Resistance training as a tool for preventing and treating musculoskeletal disorders. **Sports Medicine**, New Zealand, v. 46, n. 9, p. 1239–1248, Sept. 2016.
- COOPER, L. F. et al. Estrogen-induced resistance to osteoblast apoptosis is associated with increased hsp27 expression. **Journal of Cellular Physiology**, United States, v. 185, n. 3, p. 401–407, Dec. 2000.
- DALMOLIN, F. et al. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - Fundamentos teóricos. **Ciencia Rural**, Brazil, v. 43, n. 9, p. 1675–1682, Sept. 2013.
- DALY, R. M. et al. Exercise for the prevention of osteoporosis in postmenopausal women: an evidence-based guide to the optimal prescription. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, Brazil, v. 23, n. 2, p. 170–180, Nov. 2019.
- EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporosis International**, England, v. 16, p. 129–138, Apr. 2005.
- ERIKSEN, E. F. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, United States, v. 241, n. 4861, p. 84–86, July 1988.
- ERUM, J. V.; DAM, D. V.; DEYN, P. P. Alzheimer's disease: Neurotransmitters of the sleep-wake cycle. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, United Kingdom, v. 105, p. 72–80, Oct. 2019.
- FERNANDES, D. et al. Hydrotherapy and conventional physiotherapy improve total sleep time and quality of life of fibromyalgia patients: Randomized clinical trial. **Sleep Medicine**, Netherlands, v. 7, n. 3, p. 293–296, Apr. 2006.
- GASIER, H. G. et al. Cumulative responses of muscle protein synthesis are augmented with chronic resistance exercise training. **Acta Physiologica**, England, v. 201, n. 3, p. 381–389, Mar. 2011.
- GHOSHAL, U. C. et al. The role of the microbiome and the use of probiotics in gastrointestinal disorders in adults in the Asia-Pacific region. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Australia, v. 33, n. 1, p. 57–69, Jan. 2017.
- GIANGREGORIO, L. M. et al. Too fit to fracture: Exercise recommendations for individuals with osteoporosis or osteoporotic vertebral fracture. **Osteoporosis International**, England, v. 25, n. 3, p. 821–835, Mar. 2014.

GOMBOS, G. C. et al. Direct effects of physical training on markers of bone metabolism and serum sclerostin concentrations in older adults with low bone mass. **BMC Musculoskeletal Disorders**, England, v. 17, n. 1, p. 1–8, June 2016.

HELL, R. C. R. et al. Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Acta Physiologica**, England, v. 205, n. 2, p. 292–301, June 2012.

HINGORJO, M. R. et al. Serum Interleukin-15 and its relationship with adiposity Indices before and after short-term endurance exercise. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, Pakistan, v. 34, n. 5, p. 1125–1131, Oct. 2018.

HONG, A. R.; KIM, S. W. Effects of resistance exercise on bone health. **Endocrinology and Metabolism**, Korea, v. 33, n. 4, p. 435–444, Dec. 2018.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, Canada, v. 29, n. 1, p. 16–31, Mar. 2004.

HUGHES, D. E. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-. **Nature Medicine**, United States, v. 2, n. 10, p. 1132–1135, Oct. 1996.

IMAM, B. et al. Role of bisphosphonates in postmenopausal women with osteoporosis to prevent future fractures: A literature review. **Cureus**, United States, v. 11, n. 8, e5328, Aug. 2019.

ISEME, R. A. et al. Is osteoporosis an autoimmune mediated disorder? **Bone Reports**, Boston, v. 7, p. 121–131, Oct. 2017.

IVANOVA, S. et al. Osteoporosis: Therapeutic options. **Folia medica**, Bulgaria, v. 57, n. 3–4, p. 181–190, Dec. 2015.

JACOME-GALARZA, C. E. et al. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. **Nature**, England, v. 568, n. 7753, p. 541–545, Apr. 2019.

JAKEMAN, S. A. et al. Soluble corn fiber increases bone calcium retention in postmenopausal women in a dose-dependent manner: A randomized crossover trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, United States, v. 104, n. 3, p. 837–843, Sept. 2016.

JEPSEN, K. J. et al. Moving toward a prevention strategy for osteoporosis by giving a voice to a silent disease. **Women's Midlife Health**, United States, v. 2, n. 3, p. 1–5, Mar. 2016.

JIN, Y.; LI, P.; WANG, F. β -glucans as potential immunoadjuvants: A review on the adjuvanticity, structure-activity relationship and receptor recognition properties. **Vaccine**, England, v. 36, n. 35, p. 5235–5244, July 2018.

- JU, Y.-I. et al. Effect of swimming exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in ovariectomized rats. **Journal of Applied Physiology**, United States, v. 119, n. 9, p. 990–997, Nov. 2015.
- JUNG, M. Y. et al. Polycan, a β -glucan from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Greece, v. 12, n. 3, p. 1251–1262, June 2016.
- KALKAN, R.; TULAY, P. The Interactions between Bone Remodelling, Estrogen Hormone and EPH Family Genes. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, United States, v. 28, n. 2, p. 135–138, Jan. 2018.
- KHALID, A. B.; KRUM, S. A. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Bone. **Bone**, United States, v. 87, p. 130-135, June 2016.
- KANESHIRO, S. et al. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Japan, v. 32, n. 4, p. 378–392, Oct. 2014.
- KANIS, J. A. et al. Correction to: European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, England, v. 31, n. 4, Oct. 2020. doi: 10.1007/s00198-020-05303-5
- KAWANO, M. et al. Effects of combined treatment with fermented soybean (natto) intake and exercise on bone metabolism in ovariectomized rats. **SAGE Open Medicine**, United States, v. 5, p. 1-7, Aug. 2017.
- KELLY, G. A.; KELLY, K. S.; KOHRT, W. M. Exercise and bone mineral density in men: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Bone**, United States, v. 53, p. 103-111, Dec. 2013.
- KOMM, B. S. et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. **Science**, United States, v. 241, n. 4861, p. 81–84, July 1988.
- KOMORI, T. Animal models for osteoporosis. **European Journal of Pharmacology**, Netherlands, v. 759, p. 287–294, July 2015.
- KRÜGER, K. et al. Different effects of strength and endurance exercise training on COX-2 and mPGES expression in mouse brain are independent of peripheral inflammation. **Journal of Applied Physiology**, United States, v. 121, n. 1, p. 248–254, July 2016.
- LI, S. et al. Relationship between soft tissue body composition and bone mass in perimenopausal women. **Maturitas**, Netherlands, v. 47, n. 2, p. 99–105, Feb. 2004.
- LI, Y. et al. Effects of functional β -glucan on proliferation, differentiation, metabolism and its anti-fibrosis properties in muscle cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Netherlands, v. 117, p. 287-293, May 2018.

- LIU, X. et al. The beneficial effect of praeuptorin C on osteoporotic bone in ovariectomized mice via suppression of osteoclast formation and bone resorption. **Frontiers in Pharmacology**, Switzerland, v. 8, p. 1–12, Sept. 2017.
- LIU, Z. et al. Effects of estrogen deficiency on microstructural changes in rat alveolar bone proper and periodontal ligament. **Molecular Medicine Reports**, Greece, v. 12, n. 3, p. 3508–3514, June 2015.
- LOMBARDI, G. et al. Implications of exercise-induced adipo-myokines in bone metabolism. **Endocrine**, United States, v. 54, n. 2, p. 284–305, Dec. 2016.
- LU, M.; WANG, Z. Aging and aging-related diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1st ed. Springer: London, 2018. 294 p.
- LUO, K. et al. Association between Postmenopausal Osteoporosis and Experimental Periodontitis. **BioMed Research International**, United States, v. 2014, n. 5, p. 1–7, Feb. 2014.
- MADA, S. B. et al. Antioxidative peptide from milk exhibits antiosteopenic effects through inhibition of oxidative damage and bone-resorbing cytokines in ovariectomized rats. **Nutrition**, United States, v. 43–44, n. 21–31, p. 21–31, Nov./Dec. 2017.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 631–650, Jul./Set. 2008.
- MANGLANI, K. et al. Development and characterization of supramolecular calcitonin assembly and assessment of its interactions with the bone remodelling process. **Bone**, United States, v. 122, p. 123–135, Feb. 2019.
- MANOLAGAS, S. C.; O'BRIEN, C. A.; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, United Kingdom, v. 9, n. 12, p. 699–712, Dec. 2013.
- MARTINI, L. A. et al. Prevalência de diagnóstico auto-referido de osteoporose, Brasil, 2006. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 107–116, jul. 2009.
- MCMILLAN, L. et al. Prescribing physical activity for the prevention and treatment of osteoporosis in older adults. **Healthcare**, Switzerland, v. 5, n. 4, p. 1–15, Dec. 2017.
- MELTON, L. J. et al. How many women have osteoporosis? **Journal of Bone and Mineral Research**, United States, v. 20, n. 5, p. 886–892, Dec. 2005.
- MIRZA, F.; CANALIS, E. Management of endocrine disease: Secondary osteoporosis: pathophysiology and management. **European Journal of Endocrinology**, United Kingdom, v. 173, n. 3, p. R131–R151, Sept. 2015.

- MURAI, I. H. et al. Exercise training, creatine supplementation, and bone health in ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, England, v. 26, n. 4, p. 1395–1404, Jan. 2015.
- NAIK-PANVELKAR, P. et al. Osteoporosis management in Australian general practice: An analysis of current osteoporosis treatment patterns and gaps in practice. **BMC Family Practice**, England, v. 21, n. 1, p. 1–13, Feb. 2020.
- NEUMAN, M. D.; KENNELLY, A. M.; TOSI, L. L. Breakout session: Sex/gender and racial/ethnic disparities in the care of osteoporosis and fragility fractures. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, United States, v. 469, n. 7, p. 1936–1940, July 2011.
- NIEVES, J. W. et al. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: Review and analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, United States, v. 67, n. 1, p. 18–24, Feb. 1998.
- OLIVEIRA, R. J. et al. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of -glucan from barley , in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, England, v. 20, p. 1225-1233, Jan. 2006.
- OSAKI, M. et al. Beneficial effect of risedronate for preventing recurrent hip fracture in the elderly Japanese women. **Osteoporosis International**, England, v. 23, n. 2, p. 695–703, Mar. 2012.
- PADILHA, C. S. et al. Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats. **Life Sciences**, England, June 2019. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116964.
- PINHEIRO, M. M. et al. The burden of osteoporosis in Brazil: Regional data from fractures in adult men and women - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Revista Brasileira de Reumatologia**, Brasil, v. 50, n. 2, p. 120–127, Jan. 2010.
- PONZETTI, M.; RUCCI, N. Updates on osteoimmunology: What's new on the cross-talk between bone and immune system. **Frontiers in Endocrinology**, United States, v. 10, p. 1–13, Apr. 2019.
- RADOMINSKI, S. C. et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Brasil, v. 57, n. S 2, p. 452–466, June 2017.
- RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, India, v. 2, n. 2, p. 94–103, Apr. 2011.
- RUPPEL, M. E.; MILLER, L. M.; BURR, D. B. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. **Osteoporosis International**, England, v. 19, n. 9, p. 1251–1265, Apr. 2008.

SAXON, L. K. et al. Estrogen receptors α and β have different gender-dependent effects on the adaptive responses to load bearing in cancellous and cortical bone. **Endocrinology**, United States, v. 153, n. 5, p. 2254–2266, Mar. 2012.

SHIN, H. D. et al. Antiosteoporotic effect of Polycan, β -glucan from *Aureobasidium*, in ovariectomized osteoporotic mice. **Nutrition**, United States, v. 23, n. 11–12, p. 853–860, Nov. 2007.

SILVA, V. O. et al. Effects of β -glucans ingestion on alveolar bone loss, intestinal morphology, systemic inflammatory profile, and pancreatic β -cell function in rats with periodontitis and diabetes. **Nutrients**, Switzerland, v. 9, n. 9, p. 1–13, Sept. 2017.

SILVA, V. O. et al. Promising effects of beta-glucans on metabolism and on the immune responses: Review article. **American Journal of Immunology**, United States, v. 13, n. 1, p. 62–72, Jan. 2017.

SIMA, P.; VANNUCCI, L.; VETVICKA, V. β -glucans and cholesterol (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, United States, v. 41, p. 1799–1808, Jan. 2018.

SIMONET, W. S. et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, United States, v. 89, n. 2, p. 309–319, Apr. 1997.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T. et al. Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats. **Scientific Reports**, England, v. 7, n. 1, p. 1–12, Oct. 2017.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T. et al. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. **Bone**, United States, v. 85, p. 45–54, Jan. 2016.

SU, X. et al. **Estrogen Receptors**. Methods and Protocols. Springer: New York, 2016. 576 p.

TAKAHASHI, T. A.; JOHNSON, K. M. Menopause. **Medical Clinics of North America**, United States, v. 99, p. 521–534, Jan. 2015.

TENFORDE, A. S.; FREDERICSON, M. Influence of Sports Participation on Bone Health in the Young Athlete: A Review of the Literature. **PM&R**, United States, v. 3, n. 9, p. 861–867, Sept. 2011.

VARELA, A.; JOLETTE, J. Bone Toolbox: Biomarkers, Imaging Tools, Biomechanics, and Histomorphometry. **Toxicologic Pathology**, United States, v. 46, n. 5, p. 511–529, 2018.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -Glucans. **Physiology and Behavior**, Netherlands, v. 94, n. 2, p. 276–284, June 2008.

XU, J. et al. Effects of exercise on bone status in female subjects, from young girls to postmenopausal women: an overview of systematic reviews and meta-analyses. **Sports Medicine**, New Zealand, v. 46, n. 8, p. 1165–1182, Feb. 2016.

WEBER-RAJEK, M. et al. Whole-body vibration exercise in postmenopausal osteoporosis. **Przegląd Menopauzalny**, Poland, v. 14, n. 1, p. 41–47, Mar. 2015.

WIDRICK, J. J. et al. Relative effects of exercise training and alendronate treatment on skeletal muscle function of ovariectomized rats. **Menopause**, United States, v. 14, n. 3, p. 528–534, May 2007.

WOLEVER, T. M. S. et al. Increasing oat β -glucan viscosity in a breakfast meal slows gastric emptying and reduces glycemic and insulinemic responses but has no effect on appetite, food intake, or plasma ghrelin and PYY responses in healthy humans: a randomized, placebo-controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, United States, v. 111, n. 2, p. 1–10, Dec. 2019.

WOOD, L. C.; STENSON, C.; EMBLETON, N. The developmental origins of osteoporosis. **Current Genomics**, Netherlands, v. 16, n. 6, p. 411–418, Dec. 2015.

YAO, Z. et al. Tumor necrosis factor- α increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 281, n. 17, p. 11846–11855, May 2006.

YUAN, Y. et al. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, United Kingdom, v. 122, n. 2, p. 122–130, Nov. 2016.

ZAMAN, G. et al. Loading-related regulation of gene expression in bone in the contexts of estrogen deficiency, lack of estrogen receptor α and disuse. **Bone**, United States, v. 46, n. 3, p. 628–642, Mar. 2010.

ZHAO, J. et al. MiR-146a deletion protects from bone loss in OVX mice by suppressing RANKL/OPG and M-CSF in bone microenvironment. **Journal of Bone and Mineral Research**, United States, v. 34, n. 11, p. 2149–2161, July 2019.

ZUO, H. et al. Effect of menopausal hormone therapy on bone mineral density in Chinese women: A 2-year, prospective, open-label, randomized-controlled trial. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 819–826, Jan. 2019.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO 1 - ASSOCIATION OF PREBIOTIC INGESTION (β -GLUCAN OF SACCAROMYCES CEREVISAIE) AND A RESISTANCE TRAINING ON THE BONE TISSUE OF OVARIECTOMIZED FEMALE MICE**

Normas da Revista Científica: Bone
ISSN: 8756-3282
(versão preliminar)

Debora A. Galdino Alves,¹ degaldino@hotmail.com, ORCID 0000-0002-9088-385X
Gustavo José de Sá Pereira,¹ ggustavo_11@hotmail.com, ORCID0000-0003-3941-5126
Roger Dinali Ferreira,¹ rogerdinalif@yahoo.com.br, ORCID0000-0003-1629-4077
Mariana S. Santos,² marianadesouzaz@gmail.com, ORCID0000-0003-3969-1331
Breno Rocha Barrioni,² brenobarrionibh@hotmail.com, ORCID0000-0002-8681-6451
Marivalda M. Pereira,² mpereira@demet.ufmg.br, ORCID 0000-0001-8867-682X
Natália de O. Bertolini,¹ natioliveira.ef@gmail.com, ORCID 0000-0002-5120-6776
Bruno Del Bianco Borges,¹ bruno.borges@dsa.ufla.br, ORCID 0000-0002-2620-0081
Luciano José Pereira,¹ lucianopereiraufla@gmail.com, ORCID 0000-0002-0502-2554

¹ Universidade Federal de Lavras – UFLA – Lavras, Brazil

² Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte, Brasil

Correspondence:

Prof. Luciano J. Pereira

Departamento de Ciências da Saúde - DSA

Universidade Federal de Lavras - UFLA

Mail Box 3037 – Zip Code 37200-000

e-mail: lucianojosepereira@ufla.br

Phone: (+55) 35 3829-5211

Abstract

Osteoporosis denotes reduction in bone mass, often caused by decreased synthesis and secretion of female sex hormones due to menopause. We evaluate the effects of prebiotic β -glucan (BG) ingestion (isolated from *Sacharomyces cerevisiae*) in association with Resistance Training (RT) in ovariectomized (OVX) female mice. Forty-eight female C57BL/6J mice were divided into 6 treatments: *SHAM* surgery and five OVX groups treated with: saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), BG (62.5 mg/kg), RT (climbing a ladder with load) and the association BG and RT. All treatments were performed three times a week, for 8 weeks. There was a significant reduction in uterine mass and an increase in body mass after OVX ($p < 0.05$). The consumption of BG by OVX females maintained body mass similar to animals in the *SHAM* group ($p > 0.05$). The isolated RT produced the best results on the bone, with values bone mass and strength necessary for fracture the femurs similar to the ALE group ($p > 0.05$). Bone mineral density of the femur (BMD_{DEXA}) in the RT group was also similar to the *SHAM* group ($p > 0.05$). However, bone microarchitecture (microCTs) demonstrated intermediate effects, inferior to ALE and similar to the BG + RT group for Bone Mineral Density (BMD_{MCT}), trabecular bone volume (BV) and bone volume/total volume ratio (BV/TV) and trabecular separation (Tb.Sp). The association BG + RT increased the concentration of Calcium (Ca^{2+}) by X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF). The number of osteocytes/mm² in the RT group in femurs was similar to the *SHAM* group ($p > 0.05$). There was no difference among groups in terms of the number of muscle fibers/mm² or cross-section area in *gastrocnemius* muscle. In conclusion, RT was effective in minimizing the effects of osteoporosis induced by OVX, with benefits of BG intake only for the concentration of calcium in bone. The use of BG reduced body mass, which in menopause is a benefit for general health. However, for bone tissues, body mass decrease reduces mechanical overload and favors bone loss.

Keywords: Osteoporosis, Resistance training, β -Glucan, Estrogen

1. Introduction

The increase in life expectancy promotes an increase in the proportion of women susceptible to estrogen-deficiency related diseases, including osteoporosis [1]. After ovarian failure, the loss of bone mass progressively increases with age [2–4]. Estrogen paucity reduces the stimulation of osteoprotegerin (OPG) expression by osteoblasts, and increases the synthesis of RANK-L. This process promotes greater activity of osteoclasts, thus reducing bone mass [5,6]. The reduction in the release of estrogen by the gonads is also associated with an increase of cytokines involved in bone resorption such as IL-1 and TNF- α by monocytes. IL-6 and the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) are also released by stromal cells and osteoblasts [4] inducing a pro-inflammatory bone resorption condition. It is estimated that 200 million people worldwide suffer from osteoporosis. About 30% of postmenopausal women develop this condition, with bone fractures being the main consequences [1,7,8].

Due to its high prevalence and high morbidity and mortality, the study of antiosteoporotic therapies is essential. The use of female ovariectomized rodents (OVX) is an important tool for investigating new treatments and preventive measures [9,10]. Current therapies mainly involve the use of bisphosphonates [11], oral calcium and vitamin D supplementation, as well as the use of drugs such as denosumab and teriparatide, in addition to parathyroid hormone (PTH) and estrogen hormone therapy [12]. These therapies minimize the effects of menopause on bones. However, despite effectively reducing fracture rates, anti-absorptive and anabolic therapies have been questioned, as many individuals experience adverse effects [13]. The main concerns are atypical fractures during treatment [14] and greater susceptibility to uterine and breast cancer due to long-term replacement with estrogens, and also increased cardiovascular risk. Therefore, additional studies investigating alternative strategies for treatment and prevention of osteoporosis are still needed [15].

General measures, such as guidelines for the prevention of falls and the practice of specific physical exercises [16], can be instituted before the onset of the disease, generating additional health benefits [17]. In recent years, several studies have proposed non-pharmacological ways to stimulate bone formation, such as the practice of high-impact physical activity (or resistance exercise), as well as supplementation with functional foods [18–20]. Functional foods include prebiotics (soluble fibers), which promote reduced absorption of fats and carbohydrates in the gastrointestinal tract, reducing body mass and the synthesis and release of pro-inflammatory adipokines (IL-6 and TNF- α) associated with bone resorption [21]. A study with female OVX mice demonstrated osteoprotective effects by ingesting *Aureobasidium pullulans* (Polycan) β -glucan (BG) [22]. Benefits to bone tissue have also been reported for the association of β -Glucans consumption with plant extracts (*Textoria morbifera*) [20,22,23].

Although previous studies have reported potential isolated benefits of resistance training or ingestion of prebiotics on bone tissues, the association of two therapies has not yet been investigated. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of the association of soluble fibers originating from the yeast cell wall (*Sacharomyces cerevisiae*) and of resistance training in rodents induced to osteoporosis by ovariectomy.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

This study was approved by the Animal Ethics Committee of Federal University of Lavras (CEUA/UFLA) under protocol 039/18. The sample comprised 48 female C57BL/6J mice, weighing an average 23 ± 1.6 g (8 weeks).

Initially the animals were kept in collective polyethylene cages with 4 animals/each. The environment temperature remained at 22 ± 2 ° C, with standard humidity $45 \pm 15\%$ and light/dark cycles of 12/12 hours. The animals received commercial feed and water *ad libitum* throughout the experiment. We weighted the animals once a week. All experimental procedures occurred in the morning, between 7 am and 10 am. The experiment followed a completely randomized design. Mice were randomly divided into 6 groups according to Figure 1.

All mice underwent a surgical procedure (*SHAM* or ovariectomy - OVX) after anesthesia with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). In OVX groups both ovaries were removed. For the *SHAM* group, we adopted the same procedures to conduct OVX. However, the ovaries were just exposed and repositioned.

2.2 β -glucan and Alendronate Administration

We used a commercial veterinary product rich in β -glucans (BG) extracted from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (composition: β -glucans Min. 60%; Crude Protein - Max. 8.0%; Ashes - Max - 10.0 g/100g). We stored the product under refrigeration at 4 ° C and protected from light. At the time of use, we diluted the product in distilled water and administered by gavage using a 1 mL syringe. The dose was 62.5 mg/kg [22] as previously reported. β -glucan was administered three times a week (on alternate days) for 8 weeks always in the morning, starting 38 days after ovariectomy (same period as the beginning of resistance

training described below). We tested an additional group receiving 0.1 mg/kg alendronate [22] in order to compare the experimental protocols against conventional therapy .

2.3 Resistance Training (RT)

Animals were submitted to climbing sessions, on a ladder with the following dimensions: 90 × 14 cm, 1 cm grid, 80 ° angle, with a resting area at the top [24]. Adaptation to training started at the sixth week (thirty-eight days after ovariectomy) (Figure 1). Mice were placed at the bottom of the ladder. Then they were encouraged climbing the ladder by applying manual pressure to their tails. At the top of the ladder, the animals found a cage with dimensions of 20 x 20 x 20 cm, where they rested for 120 seconds. The procedure was repeated until the animals climbed voluntarily three consecutive times without stimulus to the tail [18,24].

The maximum initial load was determined in the first training session (second week). We started using an initial load of 75% of body weight. Then, we progressively added additional loads after each climb until the animal could no longer reach the top of the ladder or completed nine climbs (maximum number of climbs per session). The largest load successfully loaded was considered the maximum load [25,26].

In the following training sessions, in the first four climbs, the animals carried 65%, 85%, 95% and 100% of the maximum load determined in the previous session, respectively. In the following climbs, 2g were added to each climb until they could not continue or completed nine predetermined climbs (with the last full climb becoming the new maximum load for the next training session) [26].

Body mass was assessed before surgery, after four weeks of recovery and once a week throughout the experimental period, until the day of euthanasia. At the end of the experimental period, the animals were killed according to the recommendations of the Brazilian Guide to Good

Practices for Animal Euthanasia [27]. The procedure was performed by cardiac puncture with the animals under anesthesia (50 mg / kg of sodium thiopental via intraperitoneal). After euthanasia, femurs, tibia, *gastrocnemius* muscle and uterus were removed. The uterus and femurs were weighed on a precision scale to confirm the effectiveness of the ovariectomy.

2.4 Bone Densitometry

We performed bone mineral density (BMD_{DEXA}) analysis using a dual X-ray emission device (DEXA) and performed with the Lunar DPX-IQ densitometer (Lunar; software version 4.7e, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom), by the biphotonic X-ray absorptiometry method. The bones were scanned along the entire length.

The analysis was performed in the distal metaphysis of the right femurs (ROI 0.40 cm²), immediately proximal to the distal growth cartilage. The values of BMD_{DEXA} (bone mineral density) and BMC (bone mineral content) were analyzed [28].

2.5 Computed Microtomography Analyses (Micro CT)

We obtained computed microtomography (MicroCT) images using the SkyScanTM microtomograph (1174 X-Ray; Skyscan, Aartselaar, Belgium). The equipment consisted of a microfocus X-ray tube with a high voltage source (100kV), a sample holder and a 11Mp CCD camera connected to a computer. The images were obtained by means of high resolution scans with an isotropic voxel size of 14.49 μm (50 kv aluminum filter, 0.5 mm, 0.7 ° rotation angle) [29,30].

The trabecular tissue of the distal metaphysis of the right femur was analyzed for a 3.0 mm extension, proximal from the distal femur growth cartilage [30]. The parameters analyzed were: we determined bone mineral density (BMD_{MCT} g/cm³), bone volume (BV mm³), bone

volume/total volume ratio (BV/TV %), trabecular thickness (Tb.Th mm), trabecular number (Tb.n mm^{-1}), trabecular separation (Tb.sp mm), structure model index (SMI) and intersection surface (I.S μm^2). The higher the values of BV, BV/TV, Tb-N, Tb-Th, I.S the better the quality of the bone tissue structure. On the other hand, the higher the Tb-Sp value and SMI the worse the bone quality.

The cortical microarchitecture was also analyzed in the femurs using the variables M.Ar (medullary area). B.Pm (total perimeter of the medullary + cortical bone), Ct. Th (cortical thickness) and B.Ar/ T.Ar (relationship between total cortical bone and cortical bone volume). All analyzes were performed using the CT Analyzer software (Skyscan Bruker) [29–31].

2.6 Biomechanical testing

The mechanical tests were performed in a universal testing machine (Emic®, model DL 10000 Equipment and Testing Systems LTDA, São José dos Pinhais- PR). The load application speed was 1mm/min, with 1N preload, 500N load cell, 30s accommodation time and a 10mm distance between the points. Bone strength was determined using the failure load test (TESC software, version 13.4). The point of failure femur was detected in Newtons [32].

2.7 Bone Mineral Content

The left tibia were dissected and dried. Subsequently, they were analyzed using X-Ray Fluorescence Spectrometry (FRX), which is an analytical technique for determining the elemental composition of the minerals calcium and phosphorus [33,34].

2.8 Histological Analyses

Histomorphometric analyses were performed on the animals' right tibia and right *gastrocnemius* muscle. Bones were fixed in 10% buffered formalin for 48 hours. Then, they were dissected, washed and placed in 18% ethylenediamino tetraacetic acid (EDTA) demineralizing solution until complete descaling. The bones remained in this process for 30 days, renewing the solution every two days. After descaling, processing was performed according to the histological protocol and inclusion in paraffin.

Serial sections of approximately 5 μm were performed. Subsequently, cuts were stained with hematoxylin and eosin for analysis by light microscopy. The images of the histological sections were captured by a camera (SC30 CMOS Color Camera for Light Microscopy, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil) attached to the Olympus CX31 binocular microscope (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil). All images were captured in the 40X objective. The measurements were performed using Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). For histomorphometric analysis, three sections of each sample were selected. The digitized images were transferred to a microcomputer and subjected to histometric analysis. To calculate the number of osteocytes/area, images were examined using a field grid. The mean number of osteocytes in each sample was then calculated [30].

The *gastrocnemius* muscles were fixed in 10% buffered formalin solution for 24 hours at 22°C. Then, the samples were embedded in paraffin. The images of the histological sections were captured by the same camera and microscope, also using a 40X objective. The number of muscle fibers/ mm^2 was determined, in addition to the cross-sectional area of the muscle fibers also using Image J Software. 15 fibers were examined per field, three fields per cut, for a total of five cuts per animal. A grid was also used to identify selected fiber [35,36].

2.9 Statistical Analyses

Data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test. We used Analysis of Variance (ANOVA) and when there was a significant difference among groups, the Tukey post hoc test was applied. The GraphPadPrism software was used for all analyses (version 5.01, GraphPad Software, San Diego, USA). The level of significance was adjusted to $p < 0.05$.

3. Results

3.1 OVX, RT performance and Body mass

The effectiveness of OVX was confirmed by comparing the mass of the uterus among the studied groups. There was a reduction in the size (Figure 2A) and in the mass of the uterus (Figure 2B; $p < 0.05$) in relation to the *SHAM* group, confirming the gonads had been totally removed.

Regarding performance in resistance training (RT), both trained groups increased their loading capacity gradually (RT and BG + RT), no difference between the groups. Performance (load) was normalized by body weight, that is, for each animal the load was divided by animals' body weight (Figure 3 A).

At the beginning of the experimental period (before OVX), all groups enclosed animals with similar body weight ($p > 0.05$). All groups gained mass throughout the experimental period, with the exception of the BG group (Figure 3B). The OVX groups (except BG) showed greater mass when compared to *SHAM*, indicating that the removal of the gonads promoted a greater increase in body mass of these animals ($p < 0.05$). At the end of the experimental period, the body mass gain in the SAL group was significantly greater than in the *SHAM* and BG groups ($p < 0.05$) (Figure 3C).

3.2 Bone Parameters (DEXA, microCT analysis and Biomechanical analysis)

Regarding the mass of the femur, we observed a significant reduction for the SAL, BG and BG + RT groups when compared with the *SHAM* group ($p < 0.05$), while the ALE and RT groups presented intermediate values (Figure 4A). OVX promoted a significant drop in BMD_{DEXA} of the femur for all groups (in relation to the *SHAM* group), except for the TR group, which presented similar results to the group without OVX ($p > 0.05$; Figure 4B). OVX also reduced the maximum force required to fracture the animals' femur ($p < 0.05$). However, the RT group and the ALE group promoted a partial increase in this parameter, with intermediate results between the *SHAM* group and the other groups ($p > 0.05$; Figure 4C). Bone stiffness was similar in all groups, except in the SAL and ALE groups, which presented extreme results (lower and higher, respectively) (Figure 4D).

Bone mineral density (BMD_{MCT}), bone volume (BV), bone volume/total volume (BV/TV) and trabecular separation (Tb.Sp) from the trabecular bone of the femurs evaluated in the MicroCT images indicated partial effect RT and BG + RT in reducing the effects of OVX in relation to the *SHAM* and SAL groups. The use of BG had no beneficial effect, being similar to the SAL group ($p > 0.05$; Figure 5 A-B). The other variables of the trabecular bone, as well as the cortical bone (Figure 6 A-B) did not show significant variations among tested treatments ($p > 0.05$).

3.3 Bone mineral content

The BG + RT group showed a higher concentration of Calcium (Ca^{2+}) compared to the SAL group. The other treatments showed intermediate concentrations (Figure 7A). The concentrations of phosphorus (P) did not differ among groups ($p > 0.05$) (Figure 7B).

3.4 Histomorphometric parameters

The number of osteocytes in the TR group was similar to the *SHAM* group ($p > 0.05$), while animals receiving BG showed a reduction in these bone cells ($p < 0.05$) in relation to former groups (Figure 8 A and B). There was no difference among groups for fibers cross-section area (muscle hypertrophy; Figure 9 A and B) or in relation to the number of muscle fibers/mm² (muscle hyperplasia; Figure 9C) ($p > 0.05$).

4. Discussion

The present study demonstrated that the association of the consumption of the prebiotic (BG *Saccaromyces cerevisiae*) with the resistance training reduced the benefits of the latter on the evaluated bone parameters. Except for the calcium concentration in the bone mineral content, which increased with the association.

Overloaded physical activities, as well as resistance training, are known to cause osteogenic stimuli due to increased mechanical stress [17,37]. These stimuli are able to reduce bone mass loss, favor osteoblastogenesis and assist in the maintenance of BMD both in animals [24,38] and in post-menopausal women [39,40].

The experimental model of OVX used in the present study simulates the pathological mechanism of postmenopausal osteoporosis. The decrease in uterine weight, bone mineral density, bone microarchitecture and the reduction of bone biomechanical parameters found in the present study confirm the effectiveness of osteoporosis induction [9,22,41]. Using this model, previous research has shown favorable effects of physical resistance training on bone tissue after 60 days of training three times a week [38], and also after 120 days [18]. The mechanisms involve an increase in the bone turnover rate associated with significant muscle stimulation [9,40]. Mechanical stimulation of bone generated by RT is able to induce the differentiation of mechanosensitive mesenchymal stem cells into osteoblasts [42,43], which in turn activate transcription factors for osteogenic expression, osteoblast maturation and consequent bone formation [44]. Some transcription factors involved are Runx2 and Osterix, which are related to increases in mesenchymal stem cells under mechanical stress. Runx2 is a positive regulator of osteoblast differentiation, which can also positively regulate the expression of bone matrix protein genes, such as collagen type I, alpha 1, osteopontin, bone sialoprotein and osteocalcin [45]. Other factors, such as myocins and hormones, have also been reported as sources of

stimulation for osteogenesis during exercise, especially in models of osteoporosis, with emphasis on IGF-1 [46] and irisin [47].

Osteocytes play a fundamental role in the remodeling process, detecting mechanical loads and transmitting information to osteoblasts and osteoclasts, which then maintain skeletal homeostasis. The Wnt/ β -catenin signaling pathway increases the activity of osteoprogenitor cells and decreases the apoptosis of mature osteoblasts. The mechanical load imposed by resistance training reduces the expression of sclerostin by osteocytes, which acts as an antagonist of the Wnt/ β -catenin pathway [48].

The results obtained with RT in the present study corroborate previous research in relation to the behavior of femurs in biomechanical tests, with increased bone strength in trained groups [40,49]. The effect observed with the use of bisphosphonates is also well documented in the literature [50,51] with well-defined doses and side effects [52]. Bisphosphonates are able to inhibit the activation of osteoclasts [50,51] and inhibit hydroxyapatite crystals breakage suppressing bone resorption [50,53].

Resistance training in the present research proved to be efficient inducing muscular strength increase, in view of the increase in loading capacity along time. However, the eight weeks regimen apparently was not able to induce muscle hypertrophy. Similar results were observed after 10 weeks of resistance training [54]. Muscle hypertrophy is easier in fast-twitch fibers. Previous research with rodents found muscle hypertrophy on the *flexor hallucis longus* muscle but not on the soleus [55]. Since the *soleus* fibers (and the *gastrocnemius* as well) present mixed distribution (types I and II) with a large proportion of slow-twitch fibers, the appearance of hypertrophy might have been hindered.

In relation to the use of BG and the absence of benefits on bone tissue in the present study, some parameters need clarification. Firstly, the justification for its use as an anti-

osteoporotic agent is justified by the existence of previous studies pointing out positive effects of the prebiotics administration in improving bone health. Four studies using β -glucans (associated or not with other compounds) found that it increased BMD [22], calcium bioavailability [20,23], increased bone formation indexes and levels of serum alkaline phosphatase expression, in addition to preserving bone mass and strength by increasing the rate of bone formation [20,56].

OVX promotes estrogen deficiency, which increases the production of interleukin IL-1, IL-6, IL-7, TNF- α and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) by immune cells that lead osteoclastogenesis and bone resorption [10]. Since BGs have a recognized effect on the immune system and on bone [57,58] it was expected that they could have a synergistic effect to RT in an osteoporosis model. However, in the present study, BGs were introduced into the animals' diet 30 days after OVX (period in which the animals were able to start physical training). At that time, osteoporosis was already installed, and the inflammatory process that induced bone resorption could not be prevented anymore. In the four previous studies investigating BG, animals started receiving the fibers on first week [20,56] or four weeks following OVX [22,23]. The anti-inflammatory effects of BG may justify antiresorptive effects but not bone healing in accordance to our results. Differences among studies may also be due to animal age, strain and type of BG.

It should also be noted that BG were able to reduce body mass gain during the experimental period, keeping BG group animals with similar mass to the *SHAM* group, (even in a situation where estrogen deficiency predisposes to mass gain) [6]. Despite weight control during menopause might be a benefit, for bone tissues the increase in body mass increases mechanical overload and prevents bone loss [59]. Thus, lighter animals because of BG ingestion presented poorer bone mass. Soluble fibers decrease the absorption of nutrients by forming a viscous layer in the gastrointestinal tract contributing to less weight gain [60]. The reduction in the absorption

of these nutrients may also be associated with a reduction in muscle mass in these animals, an important factor in bone remodeling [17,37,61]. The dose used in the present study was defined by the lowest effective dose on bone reported previously [22] since BG doses varies widely (10 to 1250 mg/kg) for rodents [20,23,56]. Further studies administrating different doses of this β -glucan and starting right after OVX may elucidate a preventive effect on against bone loss.

The increase in calcium concentrations in the bone mineral content observed for the BG + RT group (in relation to the SAL group) might be associated with fibers when fermentation in the intestine and generation of short chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate). These compounds leads to a reduction in intestinal pH and the more acidic medium facilitates the absorption of calcium [62], increasing serum concentration of this component which is stored in bones.

In summary, the present study demonstrated that the inclusion of BG after consolidation of osteoporosis did not produce significant beneficial effects to RT, despite contributing to an increase in calcium concentration in bone. The use of BG reduced body mass, which in menopause is a benefit for general health. However, for bone tissues, body mass decrease reduces mechanical overload and favors bone loss.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support granted by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), to the Higher Educational Personnel Improvement Coordination (CAPES) and to the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG). Authors also thank Antônio Carlos Shimano, Roberta Carminati Shimano of Department of Biomechanics, Medicine and Rehabilitation of the Locomotor System, School of Medicine, USP/RP-SP, Brazil and Geila Santos Carvalho of Department of Soil Science, Federal University of Lavras – UFLA for their assistance during the experiment.

References

- [1] R. Aziziyeh, M. Amin, M. Habib, J. Garcia Perlaza, K. Szafranski, R.K. McTavish, T. Disher, A. Lüdke, C. Cameron, The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina, *Journal of Medical Economics*. 22 (2019) 638–644.
<https://doi.org/10.1080/13696998.2019.1590843>.
- [2] S.C. Manolagas, C.A. O’Brien, M. Almeida, The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease, *Nature Reviews Endocrinology*. 9 (2013) 699–712.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.179>.
- [3] A. Anthamatten, A. Parish, Clinical Update on Osteoporosis, *Journal of Midwifery and Women’s Health*. 64 (2019) 265–275. <https://doi.org/10.1111/jmwh.12954>.
- [4] R. Kalkan, P. Tulay, The Interactions between Bone Remodelling, Estrogen Hormone and EPH Family Genes, *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression*. 28 (2018) 135–138.
<https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018021275>.
- [5] S. Ivanova, L. Vasileva, S. Ivanova, L. Peikova, D. Obreshkova, Osteoporosis: therapeutic options, *Folia Medica*. 57 (2015) 181–190. <https://doi.org/10.1515/folmed-2015-0037>.
- [6] H. Zuo, A. Sun, L. Gao, W. Xue, Y. Deng, Y. Wang, S. Zhu, X. Ma, H. Xin, Effect of menopausal hormone therapy on bone mineral density in chinese women: A 2-year, prospective, open-label, randomized-controlled trial, *Medical Science Monitor*. 25 (2019) 819–826.
<https://doi.org/10.12659/MSM.912166>.
- [7] L. F Baccaro, D. M Conde, L. Costa-Paiva, A. Mendes Pinto-Neto, Clinical interventions in aging do depress the epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil, *Clinical Interventions in Aging*. 10 (2015) 583–591. <https://doi.org/10.2147/CIA.S54614>.
- [8] C. L Wood, C. Stenson, N. Embleton, The developmental origins of osteoporosis, *Current Genomics*. 16 (2015) 411–418. <https://doi.org/10.2174/1389202916666150817202217>.
- [9] I.H. Murai, H. Roschel, L.V.S. Pabis, L. Takayama, R.B. de Oliveira, R.T. dos Santos Pereira, W.S. Dantas, R.M.R. Pereira, V. Jorgetti, R.Y. Ballester, B. Gualano, Exercise training, creatine supplementation, and bone health in ovariectomized rats, *Osteoporosis International*. 26 (2015) 1395–1404. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-3017-6>.
- [10] T. Komori, Animal models for osteoporosis, *European Journal of Pharmacology*. 759 (2015) 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.028>.
- [11] J.J. Widrick, R. Fuchs, G.F. Maddalozzo, K. Marley, C. Snow, Relative effects of exercise training and alendronate treatment on skeletal muscle function of ovariectomized rats, *Menopause*. 14 (2007) 528–534. <https://doi.org/10.1097/01.gme.0000227861.35226.fa>.
- [12] S.C. Radominski, W. Bernardo, A.P. de Paula, B.H. Albergaria, C. Moreira, C.E. Fernandes,

- C.H.M. Castro, C.A. de F. Zerbini, D.S. Domiciano, L.M.C. Mendonça, L. de M. Pompei, M.C. Bezerra, M.A.R. Loures, M.C.O. Wender, M. Lazaretti-Castro, R.M.R. Pereira, S.S. Maeda, V.L. Szejnfeld, V.Z.C. Borba, Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, *Revista Brasileira de Reumatologia*. 57 (2017) 452–466.
<https://doi.org/10.1016/j.rbr.2017.06.001>.
- [13] B. Imam, K. Aziz, M. Khan, T. Zubair, A. Iqbal, Role of bisphosphonates in postmenopausal women with osteoporosis to prevent future fractures: a literature review, *Cureus*. 11 (2019).
<https://doi.org/10.7759/cureus.5328>.
- [14] M. Osaki, K. Tatsuki, T. Hashikawa, T. Norimatsu, K. Chiba, S. Motokawa, I. Furuichi, Y. Doiguchi, K. Aoyagi, H. Shindo, Beneficial effect of risedronate for preventing recurrent hip fracture in the elderly Japanese women, *Osteoporosis International*. 23 (2012) 695–703.
<https://doi.org/10.1007/s00198-011-1556-7>.
- [15] R.A. Iseme, M. Mcevoy, B. Kelly, L. Agnew, F.R. Walker, J. Attia, Is osteoporosis an autoimmune mediated disorder?, *Bone Reports*. 7 (2017) 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.10.003>.
- [16] L.M. Giangregorio, A. Papaioannou, N.J. MacIntyre, M.C. Ashe, A. Heinonen, K. Shipp, J. Wark, S. McGill, H. Keller, R. Jain, J. Laprade, A.M. Cheung, Too Fit to Fracture: exercise recommendations for individuals with osteoporosis or osteoporotic vertebral fracture, *Osteoporosis International*. 25 (2014) 821–835. <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2523-2>.
- [17] O.O. Babatunde, A.L. Bourton, K. Hind, Z. Paskins, J.J. Forsyth, Exercise interventions for preventing and treating low bone mass in the forearm : A systematic review and meta-analysis, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.apmr.2019.07.007>.
- [18] C.T. Stringhetta-Garcia, M.P. Singulani, L.F. Santos, M.J.Q. Louzada, A.C.S. Nakamune, A.H. Chaves-Neto, A.C. Rossi, E. Ervolino, R.C.M. Dornelles, The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats, *Bone*. 85 (2016) 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.023>.
- [19] U.C. Ghoshal, K.-A. Gwee, G. Holtmann, Y. Li, S.J. Park, M. Simadibrata, K. Sugano, K. Wu, E.M.M. Quigley, H. Cohen, The role of the microbiome and the use of probiotics in gastrointestinal disorders in adults in the Asia-Pacific region, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. (2017). <https://doi.org/10.1111/jgh.13840>.
- [20] M.Y. Jung, J.W. Kim, K.Y. Kim, S.H. Choi, S.K. Ku, Polycan, a β -glucan from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats, *Experimental and Therapeutic Medicine*. 12 (2016) 1251–1262. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3485>.
- [21] S.A. Jakeman, C.N. Henry, B.R. Martin, G.P. McCabe, L.D. McCabe, G.S. Jackson, M. Peacock,

- C.M. Weaver, Soluble corn fiber increases bone calcium retention in postmenopausal women in a dose-dependent manner: A randomized crossover trial, *American Journal of Clinical Nutrition*. 104 (2016) 837–843. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.132761>.
- [22] H.D. Shin, K.J. Yang, B.R. Park, C.W. Son, H.J. Jang, S.K. Ku, Antiosteoporotic effect of Polycan, β -glucan from *Aureobasidium*, in ovariectomized osteoporotic mice, *Nutrition*. 23 (2007) 853–860. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.08.011>.
- [23] C.S. Cho, H.S. Jeong, I.Y. Kim, G.W. Jung, B.H. Ku, D.C. Park, S.B. Moon, H.R. Cho, K.M.I. Bashir, S.K. Ku, J.S. Choi, Anti-osteoporotic effects of mixed compositions of extracellular polymers isolated from *Aureobasidium pullulans* and *Textoria morbifera* in ovariectomized mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2362-y>.
- [24] C.T. Stringhetta-Garcia, S.R.L. Morais, F. Fernandes, M.J. Perez-Ueno, R.D.P. Almeida, M.J.Q. Louzada, A.H. Chaves-Neto, E. Ervolino, R.C.M. Dornelles, Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats, *Scientific Reports*. 7 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13098-5>.
- [25] U.S. Stotzer, M.F.C. Rodrigues, M.M. Domingos, G.H.G. Silva, F.O. Duarte, C.V.G. Gatto, A.C.G.O. Duarte, G.E. Shiguemoto, S.E.A. Perez, H.S. Selistre-De-Araujo, Resistance training suppresses intra-abdominal fatty acid synthesis in ovariectomized rats, *International Journal of Sports Medicine*. 36 (2015) 226–233. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1390494>.
- [26] T.A. Hornberger, R.P. Farrar, Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat, *Canadian Journal of Applied Physiology*. 29 (2004) 16–31. <https://doi.org/10.1139/h04-002>.
- [27] C. Comissão de Ética Bioética Bem-Estar, Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia de animais, 66 (2012) 37–39.
- [28] F.A.T. de Figueiredo, R.C. Shimano, E. Ervolino, D.L. Pitol, R.F. Gerlach, J.P.M. Issa, Doxycycline reduces osteopenia in female rats, *Scientific Reports*. 9 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51702-y>.
- [29] M.L. Buxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Mu, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro – computed tomography, 25 (2010) 1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>.
- [30] L.J. Pereira, S. Macari, C.C. Coimbra, T. dos S.F. Pereira, B.R. Barrioni, R.S. Gomez, T.A. Silva, S.M. Paiva, Aerobic and resistance training improve alveolar bone quality and interferes with bone-remodeling during orthodontic tooth movement in mice, *Bone*. 138 (2020) 115496. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115496>.

- [31] T. Rödiger, C. Koberg, S. Baxter, F. Konietzschke, A. Wiegand, M. Rizk, Micro-CT evaluation of sonically and ultrasonically activated irrigation on the removal of hard-tissue debris from isthmus-containing mesial root canal systems of mandibular molars, *International Endodontic Journal*. 52 (2019) 1173–1181. <https://doi.org/10.1111/iej.13100>.
- [32] G.R. Yanagihara, A.G. Paiva, G.A. Gasparini, A.P. Macedo, P.D. Frighetto, J.B. Volpon, High-impact exercise in rats prior to and during suspension can prevent bone loss, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 49 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20155086>.
- [33] A.J. Specht, M. Weisskopf, L.H. Nie, Portable XRF technology to quantify Pb in bone in vivo, *Journal of Biomarkers*. 2014 (2014) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/398032>.
- [34] A.M. Christensen, M.A. Smith, R.M. Thomas, Validation of X-Ray Fluorescence Spectrometry for determining osseous or dental origin of unknown material, *Journal of Forensic Sciences*. 57 (2012) 47–51. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01941.x>.
- [35] M.F. J. P Louboutin, V. Fichter-Gagnepain, C. Pastoret, E. Thaon, J. Noireaud, A. Sébille, Morphological and functional study of extensor digitorum longus muscle regeneration after interactive crush lesions in MDX mouse, in: 1995: pp. 489–500.
- [36] I.M.W. Moura, F. Farias Dos Santos, J.A.A. Moura, R. Curi, L.C. Fernandes, Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional area in skeletal muscle fibers of Wistar rats after swimming training, *Journal of Sports Science and Medicine*. 1 (2002) 87–95.
- [37] J. Xu, G. Lombardi, W. Jiao, G. Banfi, Effects of exercise on bone status in female subjects, from young girls to postmenopausal women: an overview of systematic reviews and meta-analyses, *Sports Medicine*. 46 (2016) 1165–1182. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0494-0>.
- [38] R.M. Gomes, M.D.F. Junior, F.A. Francisco, V.M. Moreira, D.L. de Almeida, L.P.J. Saavedra, J.C. de Oliveira, C.C. da Silva Franco, G.R. Pedrino, P.C. de Freitas Mathias, M.R.M. Natali, M.J. Dias, I.J. de Moraes, S.M.F. de Moraes, Strength training reverses ovariectomy-induced bone loss and improve metabolic parameters in female Wistar rats, *Life Sciences*. 213 (2018) 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.032>.
- [39] R. Zhao, M. Zhao, Z. Xu, The effects of differing resistance training modes on the preservation of bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis, *Osteoporosis International*. 26 (2015) 1605–1618. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3034-0>.
- [40] C.J. Borba-Pinheiro, E.H.M. Dantas, R.G. de S. Vale, A.J. Drigo, M.C.G. de A. Carvalho, T. Tonini, E.I.A. Meza, N.M.A. de Figueiredo, Resistance training programs on bone related variables and functional independence of postmenopausal women in pharmacological treatment: A randomized controlled trial, *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 65 (2016) 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2016.02.010>.

- [41] N. Mathavan, M. Turumen, M. Tagil, H. Isaksson, Characterising bone material composition and structure in the ovariectomized (OVX) rat model of osteoporosis, *Calcified Tissue International*. (2015). <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9991-7>.
- [42] R.C.R. Hell, N.M. Ocarino, J.N. Boeloni, J.F. Silva, A.M. Goes, R.L. Santos, R. Serakides, Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Acta Physiologica*. 205 (2012) 292–301. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02397.x>.
- [43] M.P. Singulani, C.T. Stringhetta-Garcia, L.F. Santos, S.R.L. Morais, M.J.Q. Louzada, S.H.P. Oliveira, A.H. Chaves Neto, R.C.M. Dornelles, Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats, *Scientific Reports*. 7 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep42878>.
- [44] R.M. Delaine-Smith, G.C. Reilly, Mesenchymal stem cell responses to mechanical stimuli, *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. 2 (2012) 169–180.
- [45] R.T. Franceschi, G. Xiao, Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways, *Journal of Cellular Biochemistry*. 88 (2003) 446–454. <https://doi.org/10.1002/jcb.10369>.
- [46] J.L. Fowlkes, K.M. Thrailkill, L. Liu, E.C. Wahl, R.C. Bunn, G.E. Cockrell, D.S. Perrien, J. Aronson, C.K. Lumpkin, Effects of systemic and local administration of recombinant human IGF-I (rhIGF-I) on de novo bone formation in an aged mouse model, *Journal of Bone and Mineral Research*. 21 (2006) 1359–1366. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060618>.
- [47] G. Colaianni, T. Mongelli, C. Cuscito, P. Pignataro, L. Lippo, G. Spiro, A. Notarnicola, I. Severi, G. Passeri, G. Mori, G. Brunetti, B. Moretti, U. Tarantino, S.C. Colucci, J.E. Reseland, R. Vettor, S. Cinti, M. Grano, Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice, *Scientific Reports*. 7 (2017) 2811. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02557-8>.
- [48] A.R. Hong, S.W. Kim, Review article effects of resistance exercise on bone health, *Endocrinology and Metabolism*. 33 (2018) 435–444. <https://doi.org/https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.4.435>.
- [49] K. Luo, M. Souzhi, J. Guo, Y. Huang, F. Yan, Y. Xiao, Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis, *BioMed Research International*. 2014 (2014). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/316134>.
- [50] M. Hauser, M. Siegrist, I. Keller, W. Hofstetter, Healing of fractures in osteoporotic bones in mice treated with bisphosphonates – a transcriptome analysis, *Bone*. 112 (2018) 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.04.017>.
- [51] S. Kawada, A. Harada, N. Hashimoto, Impairment of cold injury-induced muscle regeneration in mice receiving a combination of bone fracture and alendronate treatment, *Plos One*. (2017) 1–14.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181457>.

- [52] S. Chen, H. Yu, J. Kao, C. Yang, S. Chiang, D.O. Mishchuk, J. Mau, C.M. Slupsky, An NMR metabolomic study on the effect of alendronate in ovariectomized mice, *Plos One*. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106559>.
- [53] N. Ding, C. Liu, L. Yao, Y. Bai, P. Cheng, Z. Li, K. Luo, T. Mei, J. Li, J. Xing, X. Gao, Q. Ma, J. Xu, F. Luo, C. Dou, Alendronate induces osteoclast precursor apoptosis via peroxisomal dysfunction mediated ER stress, *Journal of Cellular Physiology*. 233 (2018) 7415–7423. <https://doi.org/10.1002/jcp.26587>.
- [54] M. Souza, R. Vanerson, P. Neves, T. Santos, M. Antônio, S. Costa, A. Arias, C. Kazue, R. Frank, P. Bacurau, N. Olsen, S. Câmara, M. Rocha, Resistance training attenuates inflammation and the progression of renal fibrosis in chronic renal disease, *Motriz*. 206 (2018) 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.034>.
- [55] C.S. Padilha, P.S. Cella, A.S. Ribeiro, F.A. Voltarelli, M.T.J. Testa, P.C. Marinello, K.C. Iarosz, P.B. Guirro, R. Deminice, Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats, *Life Sciences*. (2019) 116964. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116964>.
- [56] J.S. Choi, J.W. Kim, Y.K. Kim, H.R. Cho, I.S. Choi, S.K. Ku, Antiosteoporotic effects of Polycan in combination with calcium lactate-gluconate in ovariectomized rats, *Experimental and Therapeutic Medicine*. 8 (2014) 957–967. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1793>.
- [57] V. de O. Silva, R.V. Lobato, E.F. Andrade, C.G. De Macedo, J.T.C. Napimoga, M.H. Napimoga, M.R. Messoria, R.M. Murata, L.J. Pereira, β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) reduce glucose levels and attenuate alveolar bone loss in diabetic rats with periodontal disease, *PLoS One*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134742>.
- [58] V. de O. Silva, R.V. Lobato, E.F. Andrade, D.R. Orlando, B.D.B. Borges, M.G. Zangeronimo, R.V. De Sousa, L.J. Pereira, Effects of β -glucans ingestion on alveolar bone loss, intestinal morphology, systemic inflammatory profile, and pancreatic β -cell function in rats with periodontitis and diabetes, *Nutrients*. 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/nu9091016>.
- [59] G.R. Hunter, E.P. Plaisance, G. Fisher, Weight loss and bone mineral density, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 23 (2008) 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [60] V. de O. Silva, N.O. de Moura, L.J.R. de Oliveira, A.P. Peconick, L. José Pereira, Promising effects of beta-glucans on metabolism and on the immune responses: Review article, *American Journal of Immunology*. 13 (2017) 62–72. <https://doi.org/10.3844/ajisp.2017.62.72>.
- [61] J.L. Silveira, M. Albers, D.M. Vargas, E.T.S. Helena, C.M. Cordova, A. Hannemann, H. Wallaschofski, P. Meisel, C. Pink, S. Samietz, C.O. Schmidt, B. Holtfreter, H. Völzke, M. Dörr, T. Kocher, Reduced bone stiffness in women is associated with clinical attachment and tooth loss : the

study of health in Pomerania, *Journal of Dental Research*. (2016).

<https://doi.org/10.1177/0022034516666491>.

- [62] D.C. Ribeiro, A.D.A. Pereira, P. Cristina, A. De Sousa, F.C. De Santana, C. Boueri, C.R. Pessanha, M.D. Coutinho, D. Abreu, J. Mancini-filho, E. Moreira, C. Cristina, A. Nascimento-saba, C. Alberto, G. Teles, C. Boueri, C.R. Pessanha, M. Duque, C. De Abreu, J. Mancini-, E. Moreira, C. Cristina, C. Alberto, Flaxseed flour (*Linum usitatissimum*) consumption improves bone quality and decreases the adipocyte area of lactating rats in the post- weaning period, *International Journal of Food Scieces and Nutrition*. 7486 (2015) 0–6. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1121471>.

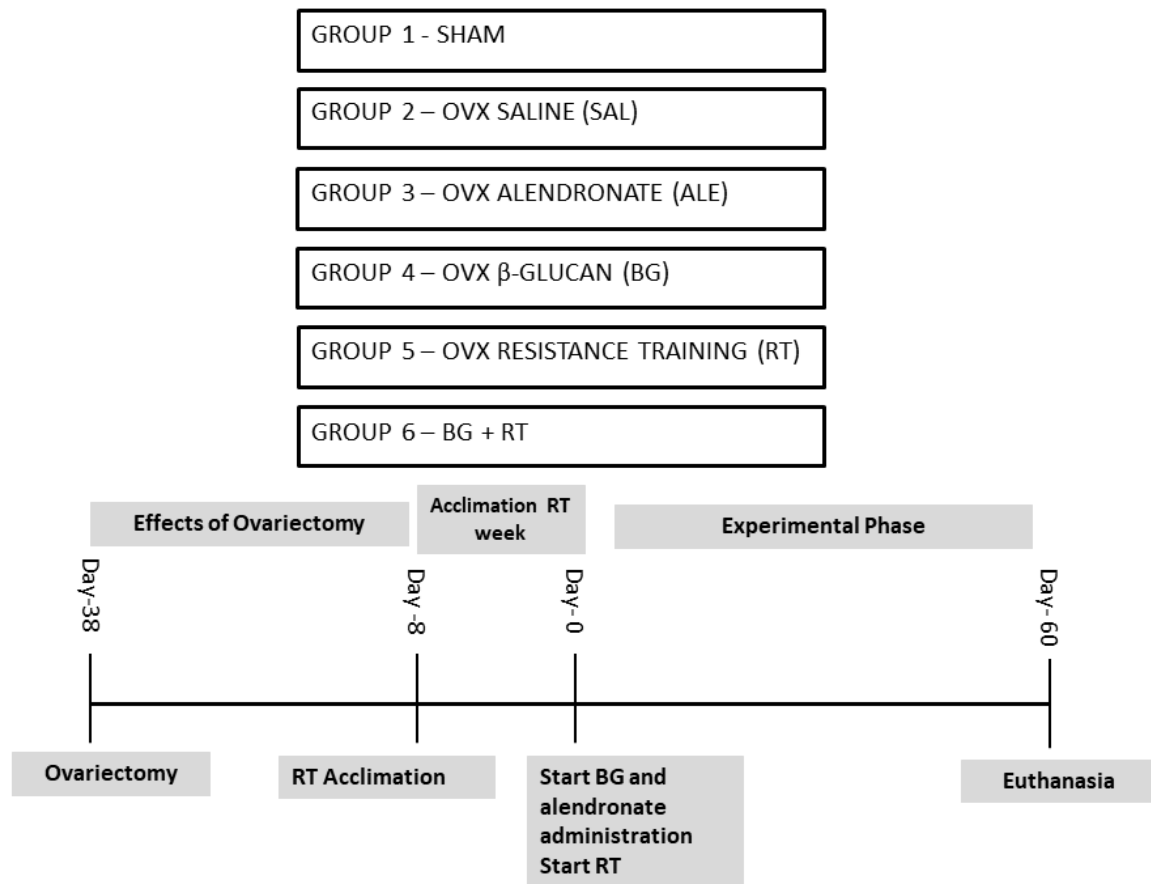


Figure 1: Experimental groups and experimental design.

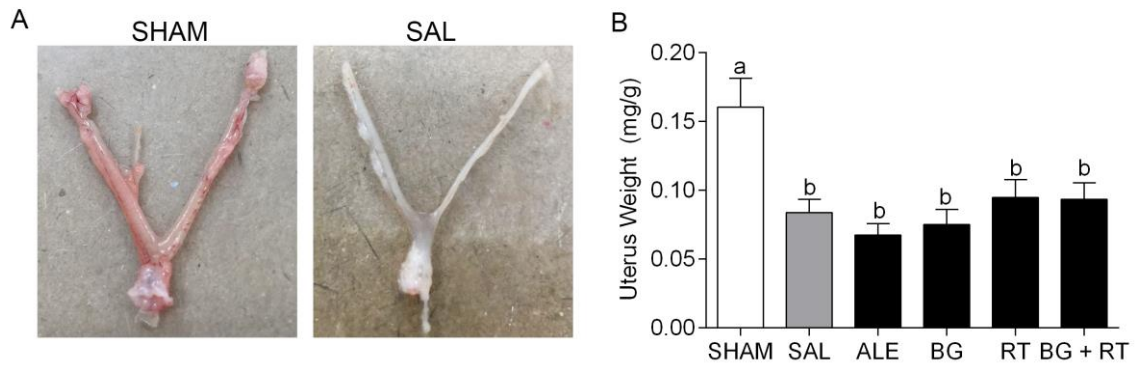


Figure 2: (A) Representative images of the female mouse uterus without OVX (SHAM) and Saline group (SAL). (B) Relative mass of the uterus (mg/g) of female C57BL/6J mice submitted to SHAM or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendrona (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + Resistance Training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant difference with $p < 0.05$.

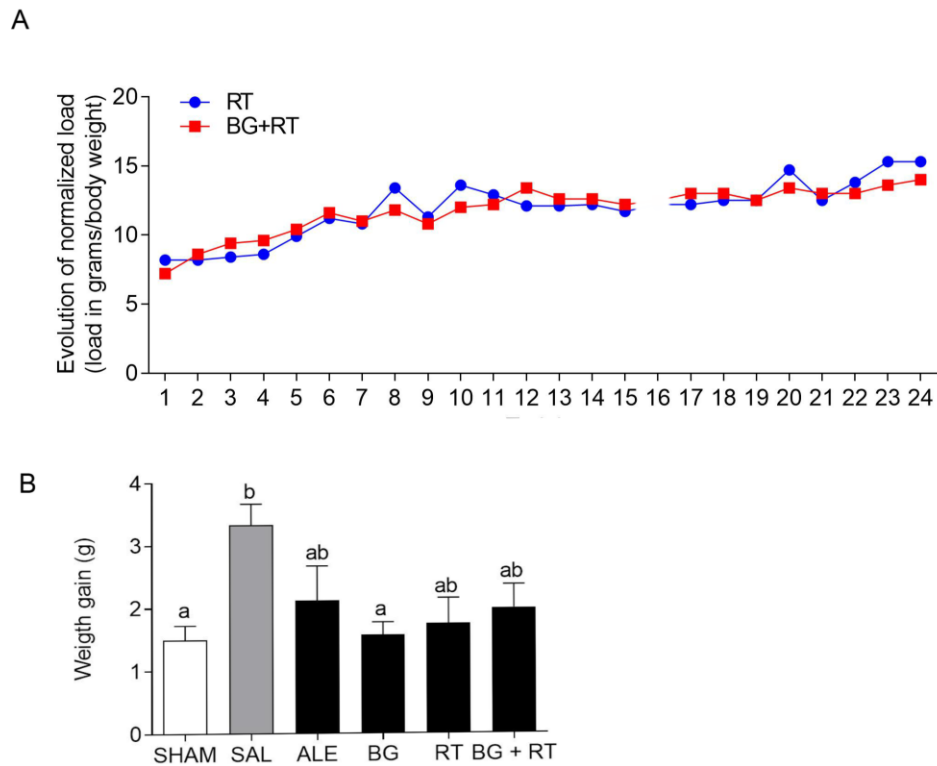


Figure 3: (A) Evolution of normalized load (load in grams/body weight) in female C57BL/6J mice submitted to resistance training (RT) and resistance training + β -Glucan (BG + RT). (B) Body mass (g) variation in female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). (C) Mass gain (difference between final mass - initial mass). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

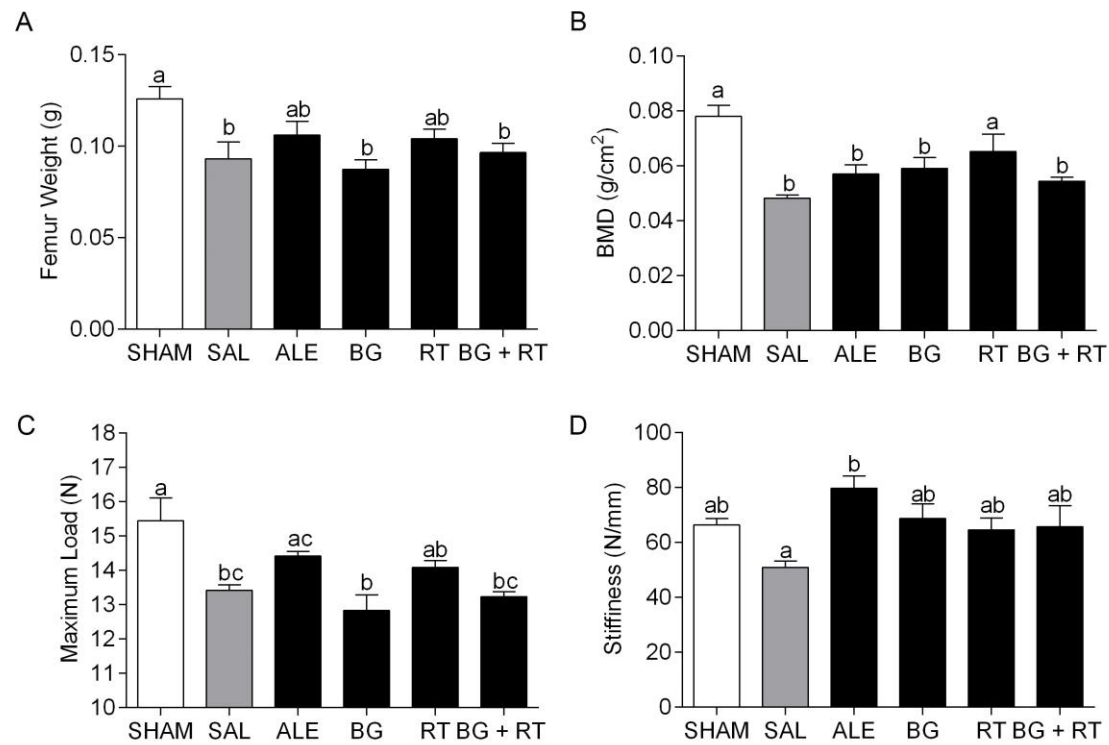


Figure 4: (A) Femoral mass (g). (B) Bone Mineral Density (BMD_{DEXA}). (C) Maximum fracture strength (N). (D) Bone rigidity. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

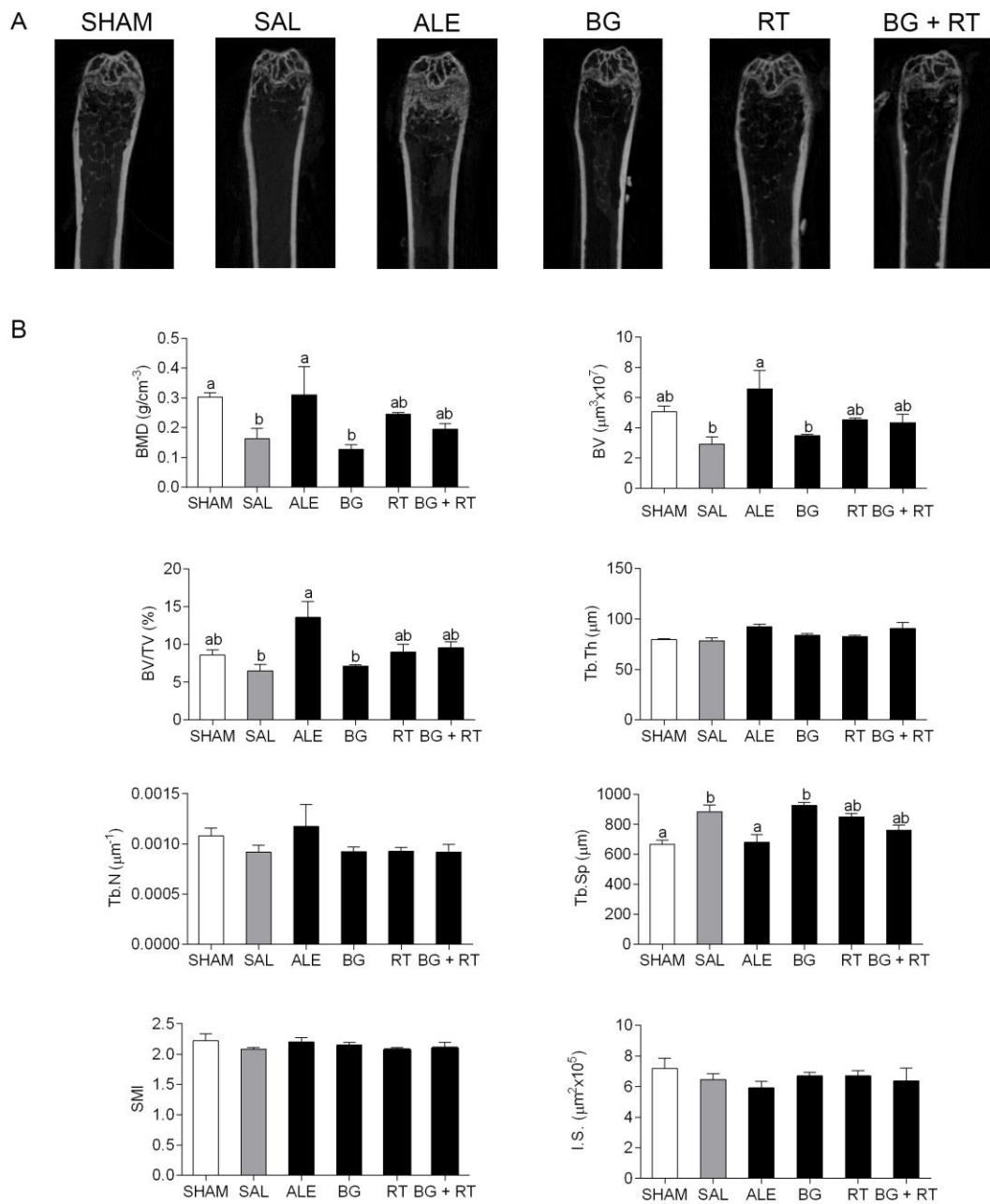


Figure 5: (A) Representative images of the femur. (B) Bone parameters: Bone Mineral Density (BMD_{MCT}), Bone Volume, BV / TV Ratio, Tb Th, Tb.N and Tb.Sp, SMI and I.S of trabecular bone. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG +

RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

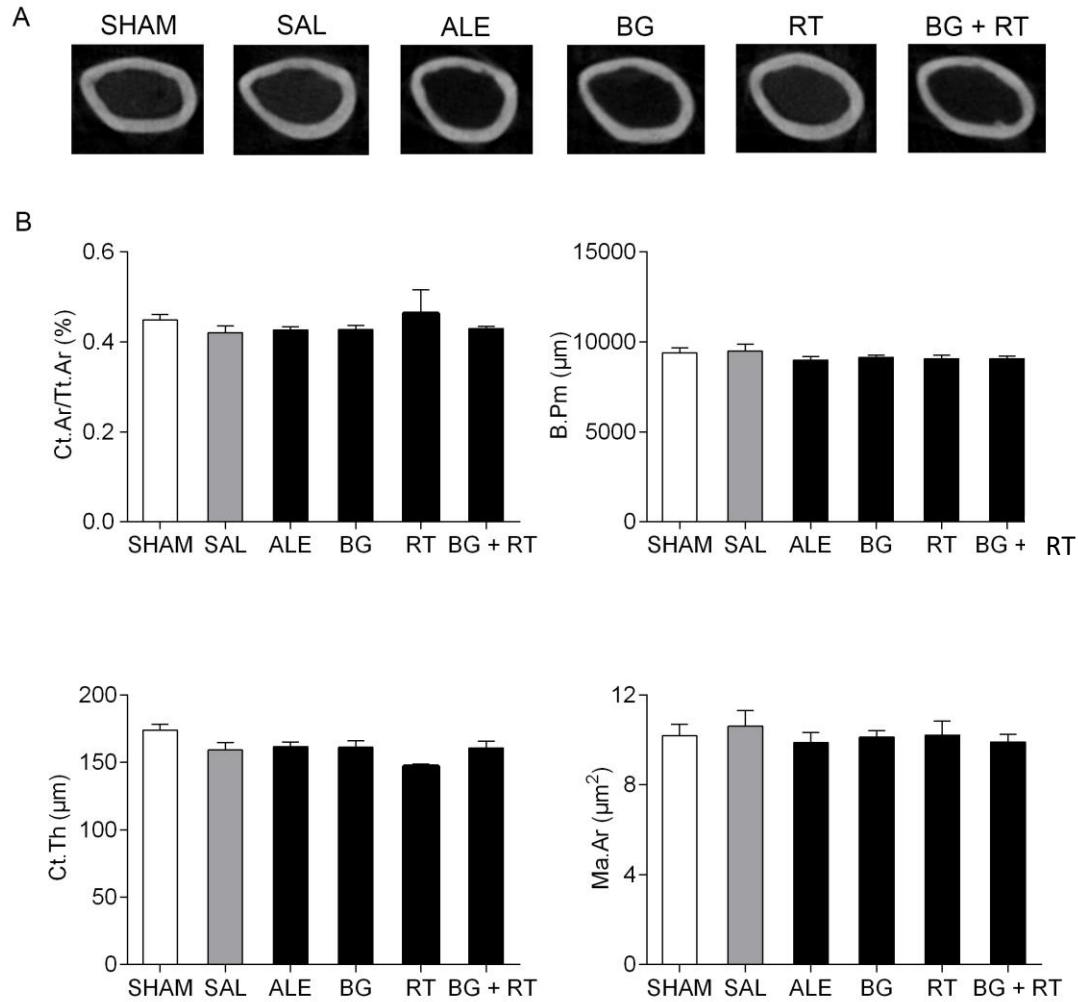


Figure 6: (A) Representative images of the cortical bone of the right femur. (B) Analysis of the cortical bone of the right femur: Ct.Th, M. Ar, Ct.Ar/Tt.Ar, B.Pm. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

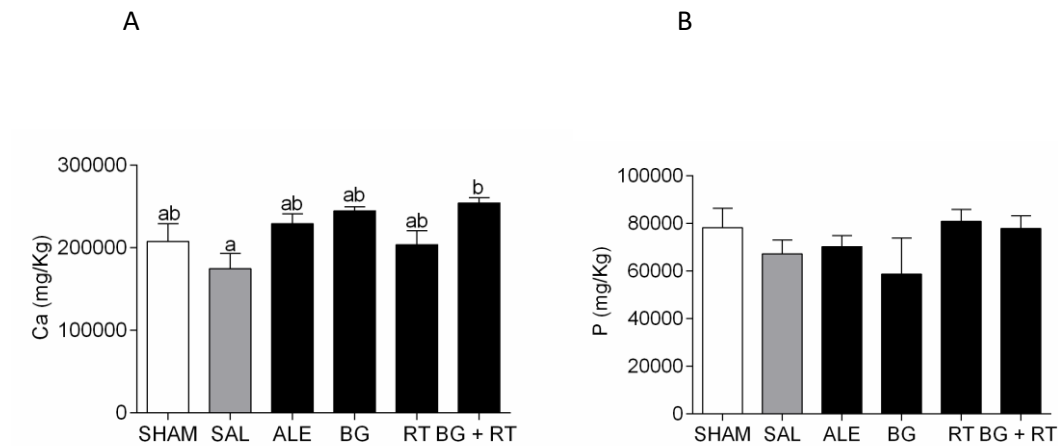


Figure 7: (A) Calcium concentration. (B) Phosphorus concentration in the tibiae. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

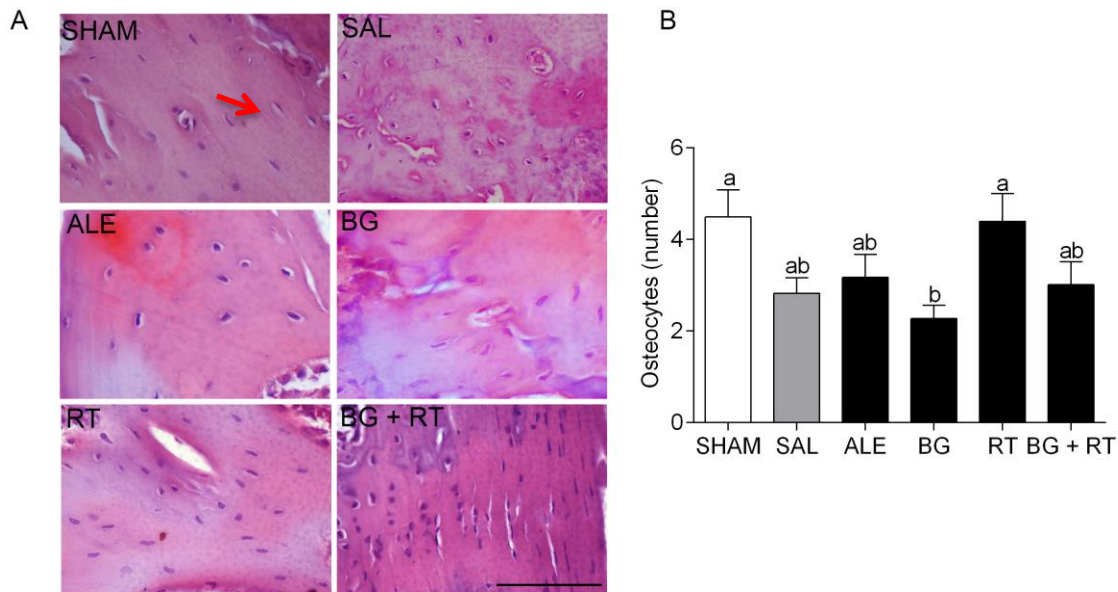


Figure 8: (A) Representative images of the histomorphometry of the bone tissue of the female tibia of mice (B) Number of osteocytes/area. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

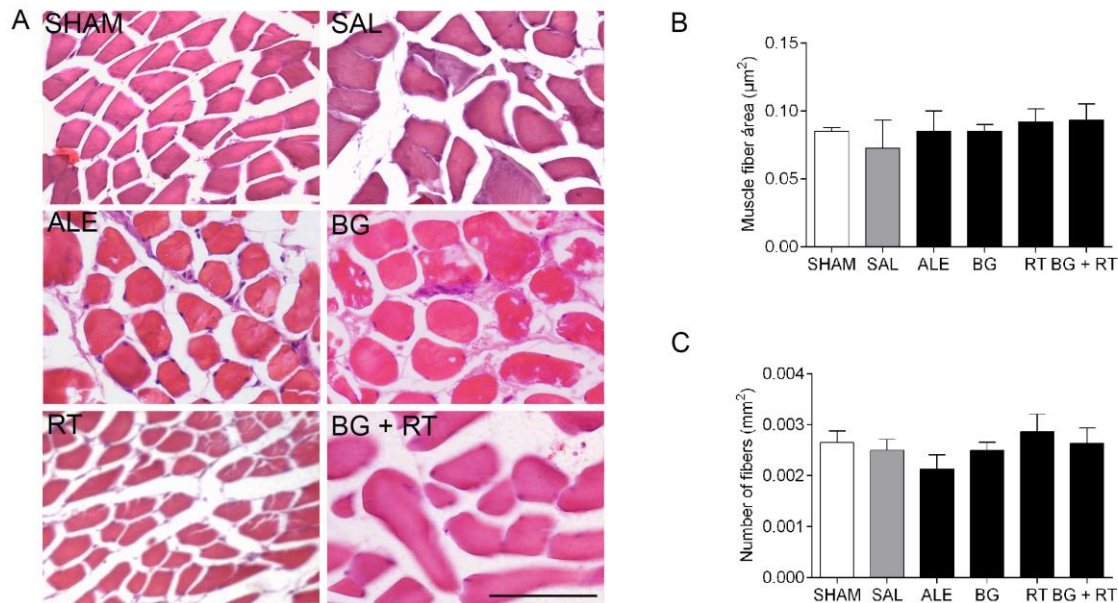
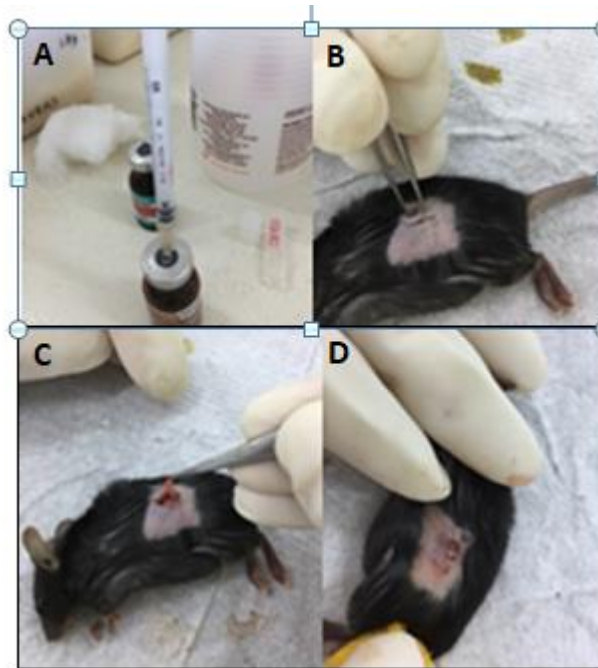


Figure 9: (A) Histomorphometry muscle tissue gastrochemistry right tibia. (B) Gastrocnemius muscle cross-section area. (C) Numbers of muscle fibers/area. Female C57BL/6J mice submitted to *SHAM* procedure; or ovariectomy (OVX) treated with: Saline solution (SAL), Alendronate (ALE) (0.1 mg/kg), β -Glucan (BG) (62.5 mg/kg), resistance training (RT) (8 weeks climbing with load) and β -Glucan + resistance training (BG + RT). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

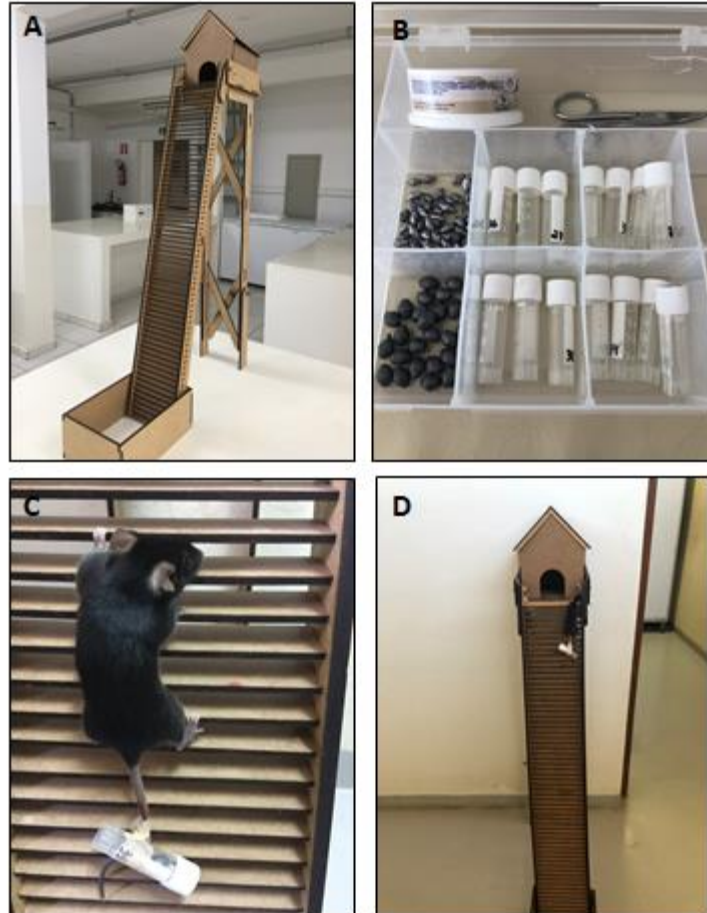
ANEXOS

ANEXO A - Etapas do procedimento de Ovariectomia (A) Anestésicos utilizados: Ketamina e Xilazina (B) Incisão bilateral (C) Remoção dos ovários (D) Sutura da incisão

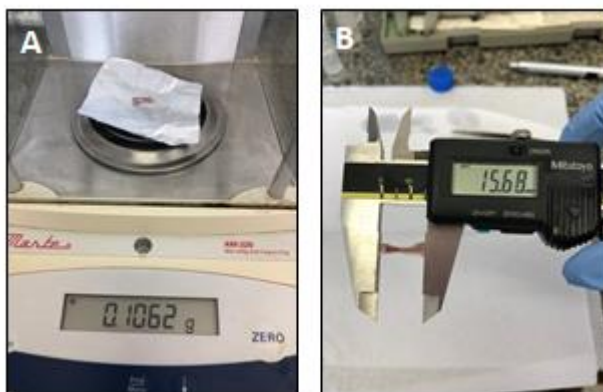


Fonte: Do autor (2020).

ANEXO B - Treinamento Resistido. (A) Escada (B) Aparatos utilizados para colocação de cargas (C) animais utilizados e colocação da carga na cauda do animal (D) escalada até o topo da escada



Fonte: Do autor (2020).

ANEXO C - Massa (A) e comprimento do fêmur (B)

Fonte: Do autor (2020).

ANEXO E - Máquina de Ensaio Universal EMIC (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão de três pontos



Fonte: Do autor (2020).

ANEXO F - Aparelho de Fluorescência portátil de Raio X



Fonte: Do autor (2020).

ANEXO G - Certificado Comissão de ética em uso de animais da UFLA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

ATESTADO DE APROVAÇÃO PROVISÓRIO

(o certificado definitivo será concedido após o cumprimento de todos os critérios exigidos pela Orientação Técnica nº 5, de 27 de abril de 2015, do CONCEA/MCTI)

Atestamos que a proposta intitulada "Efeito antiosteoporótico da associação do β -glucano (*Saccaromyces cerevisiae*) e do treinamento de força em camundongos ovariectomizados", protocolo nº 039/18, sob a responsabilidade de Luciano José Pereira, Débora Almeida Galdino Alves, Marina Apocalypse Nogueira Pereira e Vivian de Oliveira Silva, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 23/05/2018, podendo ser iniciada a realização da sua parte experimental.

Vigência da autorização: de 01/07/2018 a 01/07/2019

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Camundongo heterogênico / C57Bl/6 black

Número de animais aprovados: 48

Peso/Idade: 25 g / 8 semanas

Sexo: fêmea

Origem dos animais: aguardando documentação

Lavras, 23 de maio de 2018.



Prof. Julianio Vogas Peixoto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br