

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Ana Cristina Falcão Esteves Costa

**EFEITO DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS E TRATADAS COM GLUTAMATO
MONOSSÓDICO NO PERÍODO NEONATAL.**

Recife
2009

Ana Cristina Falcão Esteves Costa

**EFEITO DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS E TRATADAS COM GLUTAMATO
MONOSSÓDICO NO PERÍODO NEONATAL.**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Patologia, área de concentração
Morfologia Aplicada da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em
Patologia.

Orientação:

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Arruda de Moraes.

Co-orientação:

Prof^a. Dr^a. Liriane Baratella Evêncio.

Recife
2009

Costa, Ana Cristina Falcão Esteves

Efeito do treinamento de natação em ratas ovariectomizadas e tratadas com glutamato monossódico no período neonatal / Ana Cristina Falcão Esteves Costa. – Recife : O Autor, 2009.

87 folhas : tab., graf. e quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Crescimento corpóreo. 2. Tecido ósseo. 3. Glutamato monossódico. 4. Ovariectomia.
5 . Natação. I.Título.

591.134
591.2

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-
147

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

D I R E T O R DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

R E C I F E

2009



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



AUTOR: **ANA CRISTINA FALCÃO ESTEVES**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **MORFOLOGIA APLICADA**

NOME DA DISSERTAÇÃO: **"EFEITO DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO EM RATAS OVARIETOMIZADAS E TRATADAS COM GLUTAMATO MONOSSÓDICO NO PERÍODO NEONATAL"**

ORIENTADORA: **PROFA. DRA. SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES**

CO-ORIENTADORA: **PROFA. DRA. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO**

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.

DATA: 10 DE AGOSTO DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

Profa. Dra. ELIZABETH DO NASCIMENTO

Prof. Dr. AMILTON DA CRUZ SANTOS

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais,
Pedro Moacyr e Maria do Carmo, que
são os tesouros da minha vida e estarão
para sempre comigo.

Agradecimentos

- À Deus pela vontade que tenho de ser uma pessoa cada vez melhor. Pela família maravilhosa, pelos amigos eternos. Agradeço por ter me permitido concluir mais uma etapa da minha vida.
- Aos meus amados pais, Pedro Moacyr e Maria do Carmo, que mesmo de longe, estão sempre presentes na minha vida, incentivando-me a não desanimar frente aos desafios da minha vida.
- Aos meus irmãos: Bebel, a qual me espelho pela perseverança, e Djalminha que do seu jeito demonstra todo seu apoio.
- Ao meu marido e amigo Augusto Cezar, que acompanhou esta trajetória desde o início e nos momentos de cansaço estava lá pra me ajudar, mostrando-me a importância de não fraquejar. Te amo muito.
- À minha orientadora, amiga e conselheira Silvia Moraes, que de início era apenas mais uma professora, porém tornou-se uma amiga verdadeira. Obrigada por todo aprendizado, incentivo e confiança.
- À minha co-orientadora Liriane, que tive o prazer de conhecer nesta caminhada, enriqueceu este trabalho com seu grande conhecimento.
- À minha querida e amada Beta, além de uma Tia maravilhosa é uma veterinária de “mão cheia”, sempre estava lá pra me ajudar, bastava uma ligação. Te amo.
- Aos meus estagiários: Marquinhos, Renan, Pati, Fabiana e Tâmara. Obrigada pela paciência e pela dedicação até a última atividade. Cada um do seu jeito sempre mostrava interesse em aprender.
- À Sylvania pela grande ajuda de sempre no processamento histológico. Pensando sempre numa técnica nova a fim de melhorar cada vez mais nosso material. Obrigada.

- Ao Prof. Marcelo, por sempre está disponível para ensinar os enigmas da estatística.
- Às minhas amigas de profissão Milena Moura, Juliana Damasceno, Joanda Moraes, que de alguma forma me ajudaram nesta trajetória.
- Aos meus colegas de Faculdade, de Iniciação Científica e agora de Mestrado: Vitor, Ale e Karina por todas as palavras de incentivo.

“Foi o tempo que perdeste com
tua rosa, que a fez tão
importante.”

Antoine Saint-Exupéry

RESUMO

Avaliou-se o efeito da natação sobre o crescimento somático e ósseo de ratas submetidas a dois modelos experimentais a fim de reproduzir déficit hormonal. Utilizou-se 28 ratas *Wistar*, neonatas, fêmeas separadas em dois grupos: Glutamato Monossódico (GluM,n=14) que recebeu uma solução de glutamato monossódico (4.0mg/g), em dias alternados, nos primeiros 14 dias de vida; e Grupo Salina (SAL, n=14) que recebeu solução salina. O peso corpóreo e as mensurações murinométricas (eixos látero-lateral, antero-posterior do crânio - LLC/APC - e comprimento da cauda - CC) foram avaliados do 1º ao 30º dia de vida. Aos 60 dias de vida, o grupo GluM foi ovariectomizado (GluMO) e o grupo SAL apenas passou pelo estresse cirúrgico. Em seguida, metade dos animais de cada grupo iniciou o treinamento de natação (12 semanas, 5 dias/semanas). Resultando nos seguintes grupos experimentais: Salina sedentário (SALsed,n=7), Salina natação (SALnat,n=7), Glutamato ovariectomia sedentário (GluMOsed,n=7) e Glutamato ovariectomia natação (GluMONat,n=7). Ao final do experimento o fêmur direito foi pesado e avaliado seu comprimento. Seis preparações histológicas do fêmur de cada grupo experimental foram confeccionadas a fim de avaliar: diâmetro da cabeça do fêmur, área da cartilagem articular da cabeça do fêmur, espessura da cortical da diáfise deste osso e a proporção volumétrica (PV) da epífise femoral. Nos 30 dias iniciais, o grupo GluM reduziu o peso corpóreo e os eixos LLC, APC e CC comparado ao grupo SAL. Ao final do experimento, o peso corpóreo foi similar entre os grupos SALsed e SALnat e; GLuMOsed e GluMONat. Porém houve redução no peso do GluMOsed comparado ao SALsed. A natação aumentou o peso do fêmur no grupo SALnat em relação ao SALsed e também no grupo SALsed comparado ao GluMOsed, porém não o alterou entre os GluMOsed e GluMONat. No comprimento, o grupo SALnat foi similar ao SALsed e o mesmo ocorreu entre GluMONat e GluMOsed. Porém, o grupo SALsed apresentou comprimento maior que GluMOsed. A área da cartilagem articular do fêmur mostrou-se reduzida no GluMONat comparado ao GluMOsed. A natação aumentou a espessura das corticais no grupo SAL, porém não influenciou no GluMO. Na região lateral da epífise houve redução da PV no Grupo GluMONat comparado ao GluMOsed. Na região medial, a natação aumentou a PV no grupo SAL, porém não influenciou GluMO. Constatou-se que a natação pode ser utilizada como estímulo ósseo em animais saudáveis, porém, no tecido ósseo debilitado pode não exercer nenhum efeito estimulante.

Palavras Chaves: Crescimento Corpóreo, Tecido Ósseo, Glutamato Monossódico, Ovariectomia e Natação.

ABSTRACT

The effect of swimming on the somatic growth and on bones of rats subjected to two experimental models to reproduce hormone deficiency was analyzed and observed. Twenty-eight Wistar, neonate, females rats separated into two groups were used in this analysis: Monosodium Glutamate (GluM, n = 14) received a solution of monosodium glutamate (4.0mg / g) on alternate days during their first 14 days of life, and Group Saline (SAL, n = 14) received a solution saline. The body weight and measurements of somatic development (latero-lateral axis of the skull, anterior-posterior axis of the skull - LLC / APC - and length of the tail - CC) were evaluated from the 1st to the 30th day of life. After 60 days of life, the GluM group was ovariectomized and Sal just went through surgical stress. Then, half of the animals in each group started the swimming training (12 weeks, 5 days/week). Resulting in the following experimental groups: Sedentary saline (Sedsal, n = 7), Swimming saline (Swisal, n = 7), Sedentary glutamate ovariectomy (SedGluMO, n = 7) and Swimming glutamate ovariectomy (SwiGluMO, n = 7). At the end of the experiment the right femur was weighed and measured in its length. Six histological preparations of the femur in each group were made to assess: the diameter of the head, area of the articular cartilage of the femoral head, thickness of cortical bone of diaphysis of volume and proportion of femoral epiphysis. During the first 30 days, the GluM group reduced its body weight and the LLC, APC and CC compared to SAL. The end of the experiment the body weight was similar between the and S Swisal and Sedsal groups; SedGLuMO and SwiGluMO. However, there was a reduction in weight of SedGluMO compared to Sedsal. The swimming increased the weight of the femur in the SAL group and in the Sedsal group compared to SedGluMO, but didn't alter it between SedGluMO and SwiGluMO,. In length, the group Swisal was similar to Sedsal and the same occurred between SwiGluMO and SedGluMO. However, the group Sedsal presented greater length than SedGluMO. The area of the articular cartilage of the femur proved to be reduced in SwiGluMO compared to SedGluMO. The swimming increased the cortical thickness of the SAL group, but did not influence the GluMO. In the region of the lateral epiphysis, the PV was reduced in the SwiGluMO group compared to SedGluMO. On the medial region, it was observed that swimming increased the PV in the SAL, although it did not influence GluM. It was evidenced that swimming that can be used as stimuli in healthy bone although on weakened bone it may not happen.

Keywords: Body growth, bone, monosodium glutamate, ovariectomy and swimming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Administração do glutamato monossódico.	29
Figura 02	Preparação do animal para o procedimento cirúrgico.	29
Figura 03	Procedimento cirúrgico para a retirada dos ovários.	30
Figura 04	Animais realizando a natação.	31
Figura 05	Câmara de aquecimento.	33
Figura 06	Mensurações dos eixos látero-lateral e ântero-posterior do crânio.	33
Figura 07	Mensuração do comprimento da cauda.	34
Figura 08	Incisão da região abdominal inferior até o joelho.	34
Figura 09	Fêmur dissecado.	34
Figura 10	Comprimento do fêmur	35

ARTIGO 01

Figura 01	Efeito da administração do glutamato monossódico no período neonatal sobre a evolução ponderal de ratas fêmeas.	54
Figura 02	Efeito da administração do glutamato monossódico no período neonatal sobre o desenvolvimento do eixo latero-lateral do crânio de ratas fêmeas.	55
Figura 03	Efeito da administração do glutamato monossódico no período neonatal sobre o desenvolvimento do eixo antero-posterior do crânio de ratas fêmeas.	56
Figura 04	Efeito da administração do glutamato monossódico no período neonatal sobre o desenvolvimento da cauda de ratas fêmeas.	57

LISTA DE TABELAS

Quadro 01	Protocolo do treinamento de natação.	32
------------------	--------------------------------------	----

ARTIGO 01

Quadro 01	Protocolo do treinamento de natação.	58
------------------	--------------------------------------	----

Tabela 01	Valores médios do peso corpóreo, do peso do fêmur e do comprimento do fêmur nos grupos experimentais.	59
------------------	---	----

ARTIGO 02

Tabela 01	Valores do diâmetro da cabeça do fêmur e da área da cartilagem articular do fêmur nos grupos experimentais.	74
------------------	---	----

Tabela 02	Valores médios da espessura da cortical da diáfise do fêmur nos grupos experimentais.	75
------------------	---	----

Tabela 03	Valores médios da proporção volumétrica da epífise do fêmur nos grupos experimentais.	76
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

GluM	Glutamato monossódico
SAL	Salina
LLC	Eixo látero-lateral do crânio
APC	Eixo ântero-posterior do crânio
CC	Comprimento da cauda
PV	Proporção volumétrica
GluMO	Grupo de animais que receberam a administração de glutamato monossódico e foram ovariectomizados.
GluMOsed	Grupo de animais que receberam a administração de glutamato monossódico, foram ovariectomizados e não realizaram a natação.
GluMOnat	Grupo de animais que receberam a administração de glutamato monossódico, foram ovariectomizados e realizaram a natação.
SALsed	Grupo de animais que receberam a administração de solução salina e não realizaram a natação.
SALnat	Grupo de animais que receberam a administração de solução salina e realizaram a natação.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
HIPÓTESE	17
OBJETIVOS	19
Geral	20
Específicos	20
REVISÃO DE LITERATURA	21
Tecido Ósseo	22
Tecido Ósseo e Envelhecimento	23
O Glutamato e o Glutamato Monossódico	24
Tecido Ósseo e o Exercício Físico	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
Local do Estudo	28
Animais	28
Modelo Experimental	28
Procedimento Cirúrgico	29
Treinamento dos Animais	31
Procedimentos	33
Análise Histomorfométrica	36
Análise Estatística	36
RESULTADOS	37
Artigo 01	38
Artigo 02	60
CONCLUSÃO	78
PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	89
Parecer do Comitê de Ética em pesquisa animal.	

Neste estudo, inicialmente, investigou-se as repercussões da administração do glutamato monossódico no período neonatal de ratas sobre o desenvolvimento somático destes animais. Em seguida avaliou-se a interferência desta substância associada à ovariectomia na idade adulta e as implicações do exercício de natação sobre o tecido ósseo destes animais.

O glutamato monossódico, substância utilizada no estudo, é um aminoácido, que em quantidades excessivas, apresenta uma ação neurotóxica no sistema nervoso central (OLNEY, 1969). Ele ultrapassa a barreira hemato-cefálica em neonatos e se acumula em regiões específicas do cérebro como a área hipotalâmica (NEMEROFF; LIPTON; KIZER, 1978). Inicialmente as lesões se manifestam no núcleo arqueado, a região primária na produção do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH) (MEITES, 1988). Diversos estudos utilizaram essa substância para verificar sua repercussão no desenvolvimento do organismo de animais (BADGER et al, 1982; MILLARD et al, 1982; MAITER et al, 1991).

A ovariectomia tem sido um modelo bastante utilizado para mimetizar os efeitos da osteoporose pós-menopausa. No momento considerado de início do amadurecimento sexual (aproximadamente 60 dias de idade) os animais foram submetidos a este procedimento cirúrgico para a retirada bilateral dos ovários. É um modelo experimental utilizado desde 1969 para induzir a perda de massa óssea em animais (SAVILLE, 1969). Após este procedimento, um protocolo de exercício de natação foi iniciado a fim de verificar se esta atividade provoca estímulos ao tecido ósseo destes animais.

No início desta dissertação realizou-se uma Revisão de Literatura onde foram expostos de forma sucinta, os conhecimentos existentes sobre os assuntos abordados. A seguir, a inquietação que originou esta pesquisa foi relatada na hipótese. Os objetivos geral e específicos foram listados de forma seqüencial. Na metodologia, os procedimentos realizados foram descritos de maneira explicativa e ilustrativa mostrando todo o processo para a obtenção dos resultados.

No capítulo de Resultados foram anexados os dois artigos frutos deste trabalho. O primeiro intitulado: **“A natação minimiza o retardo no crescimento somático e ósseo de ratos?”** que foi submetido a publicação na Revista Brasileira de Medicina do Esporte (RBME). Observou-se neste trabalho que o glutamato monossódico atrasou precocemente o desenvolvimento somático dos animais. E que quando adicionado a ovariectomia reduziu o peso corpóreo, o peso do fêmur e o seu comprimento, além de a natação não ter influenciado nestes parâmetros. No segundo

artigo: **“O efeito da natação na estrutura óssea de animais que receberam glutamato monossódico e foram ovariectomizadas.”** Buscou-se neste estudo mimetizar situações que ocorrem com o tecido ósseo durante o envelhecimento, através da utilização de animais jovens submetidos à administração glutamato monossódico e à ovariectomia. Concluiu-se com este estudo que os efeitos do glutamato monossódico e da ovariectomia na morfologia óssea do fêmur, prejudicou tanto parâmetros articulares, como reduziu o conteúdo ósseo trabecular e cortical. Também foi reforçada a idéia que a natação pode ser utilizada como estímulo à remodelação óssea de animais saudáveis, porém, em situações de debilidade óssea pode não ser tão eficaz. Este artigo será submetido à publicação na Revista: *Experimental Animal*, e no momento está sendo traduzido para a língua inglesa.

Hipótese

O treinamento de natação realizado por animais submetidos à administração do Glutamato Monossódico durante o período neonatal e a ovariectomia na fase adulta jovem pode minimizar os efeitos deletérios do desequilíbrio observado no crescimento somático durante os trinta primeiros dias de vida e do tecido ósseo promovidos por estas intervenções.

Geral

Analisar o efeito do treinamento de natação no desenvolvimento corpóreo e na estrutura óssea do fêmur de animais que receberam glutamato monossódico no período neonatal e foram ovariectomizadas aos 60 dias de vida.

Específicos

- Avaliar a evolução ponderal dos animais tratados com glutamato monossódico durante os primeiros 30 dias após o nascimento.
- Observar o crescimento somático dos animais através das mensurações dos parâmetros murinométricos: eixos látero-lateral e antero-posterior do crânio (LLC e APC) e do comprimento da cauda (CC) dos animais.
- Avaliar morfométricamente o fêmur dos animais por meio da aferição do peso e do comprimento deste osso.
- Avaliar histométricamente a estrutura óssea do fêmur através da análise da proporção volumétrica (PV) do osso trabecular na epífise proximal, do diâmetro da cabeça femoral, da espessura da cortical da diáfise e da área da cartilagem articular deste osso.

Tecido Ósseo

O osso é um tecido especializado cuja função básica inclui locomoção, proteção e homeostase mineral. Possui células especializadas, além de componentes orgânicos e inorgânicos em sua matriz (DOWNEY; SIEGEL, 2006). Histologicamente distingue-se um tecido ósseo compacto e esponjoso, que apesar de possuírem a mesma composição são estruturalmente diferentes, o que lhes fornecem distintas propriedades mecânicas (BUCKWALTER et al, 1996).

O tecido ósseo compacto, presente nas diáfises de ossos longos, devido a seu arranjo denso possui uma maior resistência à torção e grande flexibilidade em situações de força. Já o tecido ósseo esponjoso oferece uma grande resistência na absorção de choques. Este último possui uma intensa taxa metabólica e responde mais rápido a diferentes situações de imposição ou não de cargas mecânicas (BUCKWALTER et al, 1996).

O osso por ser um tecido dinâmico está constantemente se modelando durante seu crescimento e se remodelando após o término de sua formação (HILL; ORTH, 1998). Inicialmente na modelação óssea ocorre ganho na massa do esqueleto pela adição de tecido novo, enquanto que, na remodelação há uma junção de eventos como reabsorção, formação e reorganização de tecido (RAISZ, 1999; SKEDROS; MASON; BLOEBAUM, 2001). A complexidade deste processo de remodelação é justificada pela necessidade da interação de diferentes tipos celulares, que são regulados tanto pelo sistema hormonal, como por fatores locais (CANALIS, 1983; SOYKA; FAIRFIELD; KLIBANSKI, 2000), além da importância dos fatores mecânicos e biomecânicos (PARFITT, 1982).

A massa óssea aumenta crescentemente durante a infância tendo seu pico em meados dos 20 a 30 anos de idade e subseqüentemente, por um processo normal, ocorre um decréscimo desse ganho que se acelera com o envelhecimento (OLNEY, 2003). Em adultos saudáveis, há um balanço entre reabsorção e formação óssea, porém quando este equilíbrio se torna negativo, de forma que a quantidade de reabsorção excede a de deposição (OLNEY, 2003), o resultado é a perda óssea. Isto é visto comumente em mulheres pós-menopausa (HILL; ORTH, 1998).

Tecido ósseo e Deficiência de Estrógeno

Muitos hormônios, citocinas e fatores de crescimento estão associados à regulação da formação óssea (SEEMAN, 2002; VAN DER EERDEN, 2003). O estrógeno, hormônio sistêmico secretado pelos ovários, possui funções importantes durante o crescimento e envelhecimento, tais como, o controle no estirão de crescimento na puberdade em mulheres, a fusão da placa de crescimento em ambos os sexos, além da importante função na remodelação óssea. É também responsável pelo equilíbrio entre formação e reabsorção deste tecido (DEMPSTER; LINDASAY, 1993; LINDBERG et al, 2001; GRUMBACH, 2000; RODD; JOURDAIN; ALINI, 2004).

Em circunstâncias normais, o pico de massa óssea nas mulheres é menor que nos homens, portanto, no período da menopausa e com o avanço da idade a redução do nível do estrógeno acelera o processo degenerativo ósseo nas mulheres (XIANG-YAN et al, 2008) favorecendo a elas o risco para fraturas relacionadas à osteoporose (MELTON III LJ, 1993; JILKA, 1998; RIGGS; MELTO, 1995).

Com o aumento dramático da população idosa e da incidência de fraturas, a osteoporose tornou-se um problema de saúde pública (RIGGS; MELTO, 1995; HAWKER, 1996). Caracterizada por uma redução na massa óssea e deterioração estrutural (WHO Study Group, 1994), pode ser classificada em primária ou secundária. A Osteoporose Secundária é usualmente associada a uma doença reconhecível ou a uma terapia medicamentosa. Já na Osteoporose Primária está incluída a osteoporose idiopática comum em crianças e adultos jovens, e as formas involutivas tipo I ou pós-menopausa e tipo II ou senil (MELTON; RIGGS, 1988).

Nesta condição patológica, as fraturas ósseas podem ocorrer na presença ou não de trauma (RITTWEGGER, 2006). As fraturas osteoporóticas originam sérios problemas à saúde com freqüentes hospitalizações, perda da independência e aumentam o risco de morte (CHRISCHILLES et al, 1991; MELTON III LJ, 1993). As regiões do corpo mais comumente afetadas são: o punho, as vértebras lombares e o quadril. Sendo as duas últimas as que causam mais danos à saúde e incapacidade física (RIGGS; MELTO, 1995).

A deficiência do estrógeno que ocorre nas mulheres seja pelo processo natural da menopausa ou pela ovariectomia está associada a rápida perda óssea, particularmente no osso trabecular (RIGGS, 2002). O que ocorre no déficit de estrógeno é que há um aumento na vida útil dos osteoclastos enquanto que os osteoblastos têm sua produção reduzida (HUGHES et al, 1996; MANOLAGAS, 2000)

Experimentalmente, ratas ovariectomizadas tem sido um modelo bastante utilizado para mimetizar os efeitos da osteoporose pós-menopausa. Neste modelo, os efeitos da retirada destes órgãos podem ser detectáveis em um período muito curto de tempo e também reproduz as alterações observadas em situações humanas, como o aumento do *turnover* ósseo e uma fase inicial de rápida perda óssea (KALU, 1991; OMI; EZAWA, 1995; DIAZ-CURIEL; GALA, 1994). A faixa etária inicial dos animais utilizados neste modelo é variável, estendendo-se de três semanas a dois anos de idade. Com três semanas de idade a remodelação óssea e o crescimento estão em intensa atividade, já em animais muito velhos a incidência a doenças é bem elevada, portanto é apropriado que a idade escolhida para o início da indução da perda óssea pela ovariectomia seja entre estes dois extremos etários (KALU, 1991).

O Glutamato Monossódico

O Glutamato é um aminoácido neurotransmissor que exerce um papel importante na formação de sinapses e circuitos neuronais (GOLDSMITH, 2000). Porém, o glutamato monossódico em quantidades excessivas exerce uma função neurotóxica no sistema nervoso central (OLNEY, 1969), pois ultrapassa a barreira hemato-encefálica e se acumula em áreas específicas do cérebro levando a destruição de neurônios (OLNEY, 1976; NEMEROFF; LIPTON; KIZER, 1978). Uma alteração na citoarquitetura hipotalâmica ocorre em animais adultos que receberam esta substância no período neonatal (HOLZWARTH-MCBRIDE; HURST; KNIGGE, 1976).

A região hipotalâmica mais sensível ao glutamato monossódico é a área do Núcleo Arqueado, a qual contém corpos celulares que estão envolvidos na liberação do Hormônio de Crescimento (HOLZWARTH-MCBRIDE; HURST; KNIGGE, 1976; TAKASAKI, 1978; BLOCH et al, 1983; MERCHENTHALER et al, 1984; GOLDSMITH, 2000). Os neurônios desta região são severamente afetados, havendo 80% da perda destes (HOLZWARTH-MCBRIDE; HURST; KNIGGE, 1976). A maior

parte da deterioração pode ocorrer dentro de seis horas após a administração (LEMKEY-JONSTON; BUTTLER; REYNOLDS, 1976). A extensão da lesão está diretamente relacionada com a dose administrada desta substância (OLNEY, 1971).

As lesões observadas após a administração do glutamato monossódico durante o período neonatal em animais adultos promovem diminuição no peso de glândulas como a pituitária anterior, os ovários e os testículos ocasionando atraso no crescimento, redução no peso corpóreo, redução na capacidade reprodutiva e redução do conteúdo de hormônios (HOLZWARTH-MCBRIDE; HURST; KNIGGE, 1976; BAKKE et al, 1978; BADGER; MILLARD et al 1982; MILLARD et al 1982; INKSTER; WHITEHEAD, 1986; WAKABAYSHI et al, 1986; MAITER et al 1991).

Dentre os hormônios da pituitária, o Hormônio de Crescimento é o mais profundamente afetado (BAKKE et al, 1978) e por isso a administração do glutamato monossódico tem sido utilizada com um modelo de deficiência do Hormônio de Crescimento (THOMPSON et al, 1996).

Este hormônio é secretado pela glândula pituitária sob o controle do hipotálamo (OLNEY, 2003). Seu efeito indireto no tecido ósseo é através da estimulação da produção do Fator-I de Crescimento Insulina Dependente no fígado e diretamente atua no tecido ósseo e na placa de crescimento epifisário (SPAGNOLI; ROSENFELD, 1996) estimulando a proliferação de osteoblastos como também de suas células precursoras (KASSEN et al 1993; KASSEN; MOSEKILDE; ERIKSEN, 1994). Este hormônio está envolvido no desenvolvimento e manutenção óssea, e sua deficiência promove baixa estatura e atraso na maturação óssea (OHLSSON et al, 1998).

Tecido Ósseo e Exercício Físico

Com o avançar da idade ocorre uma redução da massa óssea e mais precisamente uma redução da força óssea levando ao aumento do risco de fraturas (RIGGS; MELTON, 1992; DEMPSTER; LINDASAY, 1993; TURNER, 2002). Algumas estratégias têm sido implementadas objetivando minimizar esta redução com o avançar da idade e no período pós-menopausa (IWAMOTO; TAKEDA; SATO, 2005). Entre elas, o exercício físico é um recurso bastante utilizado para prevenção e tratamento de doenças ósseas que surgem nesta fase (IWAMOTO; TAKEDA; SATO, 2005).

A morfologia básica do esqueleto é determinada geneticamente, mas sua massa e arquitetura finais são moduladas por mecanismos adaptativos sensíveis aos fatores mecânicos impostos (FROST, 1987). Esses fatores mecânicos são clinicamente relevantes devido a sua capacidade de influenciar as atividades de modelagem e remodelagem óssea (FORWOOD, 2001).

O tecido ósseo apresenta uma propriedade piezoelétrica que converte as forças geradas pelos exercícios em estímulo osteogênico (HAGIHARA et al, 2005; KARATOSUM et al, 2006). A estrutura deste tecido se ajusta de acordo com o grau de estresse submetido se adaptando ao aumento das cargas que recebem. Isto resulta em aumento ou manutenção da densidade mineral óssea, o que está na dependência do tipo de exercício realizado (SWISSA-SIVAN et al, 1990; SHIBATA et al, 2003) e também da fase da vida em que a atividade física é implementada (KHAN et al, 2000; MACKELVIE et al, 2001). O tecido ósseo maduro é menos sensível a alterações quando submetidos a essas cargas mecânicas (TURNER; ROBLING, 2005).

Vários tipos de exercícios estão associados com aumento ou manutenção da massa óssea (HART et al, 2001). Os que envolvem impacto são favoráveis à formação óssea, porém este tipo de exercício é pouco indicado para idosos por agravar algumas doenças ósseas já existentes. Durante a corrida vários estresses são impostos aos ossos: força de tração em diferentes ângulos e direções gerado pelas contrações musculares, ação do peso corpóreo entre o pé e o solo, e finalmente a força da gravidade agindo no corpo.

As condições promovidas pelo ambiente aquático durante a natação podem ser vantajosas para um programa de exercícios para populações de risco, como em caso de reabilitação de antigas lesões ou em pessoas idosas (SWISSA-SIVAN et al, 1990). Na natação, por exemplo, o meio favorece a realização de um exercício sem carga de peso, assim nenhuma força membro-solo é exercida e a ação do peso corpóreo é reduzida significativamente, como também a força da gravidade é contida pela flutuação (SWISSA-SIVAN et al, 1989). Assim as alterações sofridas pelos ossos neste tipo de exercício podem ser atribuídas apenas ao estresse ocasionado pelas contrações musculares (SWISSA-SIVAN et al, 1990).

Local do estudo

O estudo foi realizado no laboratório de Histomorfometria do Departamento de Anatomia e no Mestrado em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Animais

Foram utilizados 28 neonatos da linhagem *Wistar*, fêmeas provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da UFPE. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia em ambiente com temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, em gaiolas coletivas (de, no máximo, 4 animais/gaiola) e com livre acesso à dieta e à água filtrada. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), ofício nº 23076.018024/2007-11 e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Modelo Experimental

Após o nascimento, os animais foram divididos inicialmente em 2 grupos: Glutamato Monossódico (GluM, n=14) e Salina (SAL, n=14). Os animais do grupo GluM receberam uma solução de glutamato monossódico via subcutânea, na dose de 4.0mg/g de peso corporal em dias alternados 14 dias de vida (BRAGA; MELLO; GOBATTO, 2004) e os do grupo SAL receberam solução Salina na mesma dose (figura 01). Ao completarem a idade de 60 dias, todos os animais do grupo GluM foram ovariectomizados (GluMO) para a retirada dos ovários bilateralmente, enquanto que no procedimento cirúrgico dos animais do grupo SAL não ocorreu a retirada dos ovários. Metade dos animais de cada grupo iniciou um programa de treinamento de natação (GluMOnat e SALnat).



Figura 01. Administração da solução de glutamato monossódico

Procedimento Cirúrgico

Ao completar 60 dias de vida todos os animais do grupo GluM foram submetidos à cirurgia para a retirada dos ovários. Sob anestesia, via subcutânea, com cloridrato de xilazina (Rompum® – Bayer) (0,02ml/100g peso) e quetamina (Ketalar®) (0,02ml/100g peso), foi tricotomizada a região dorsal dos animais, sendo feita assepsia no local com álcool iodado a 0,5% (figura 02 A e B).

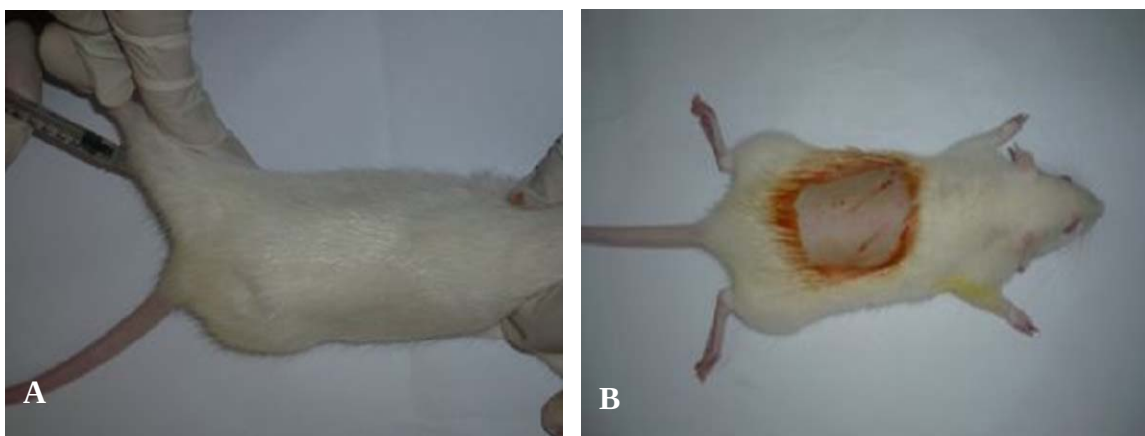


Figura 02. Preparação do animal para o procedimento cirúrgico. (A) Anestesia do animal com cloridrato de xilazina e quetamina. (B) Tricotomia e assepsia da região dorsal do animal

Com os animais ainda em decúbito ventral foi realizada uma incisão, com auxílio de um cabo bisturi nº03 (Bic) e uma lâmina nº15 (Socorex), de cerca de 2,0 cm de comprimento na pele (linha mediana) e tecido subcutâneo (figura 03A), e então a divulsão destas estruturas (figura 03B). Em seguida, uma incisão bilateral abaixo do gradil costal foi necessária para visualização dos ovários. Os órgãos foram pinçados e feito uma ligadura abaixo da tuba uterina e posteriormente o corte (figura 03C). O útero foi recolocado na cavidade abdominal, suturado o tecido muscular e em seguida a pele em planos separados (figura 03D), reforçados com uma camada de etilcianoacrilato (SANTANA; TORRES; SILVA, 2004). Após a cirurgia, os ratos receberam Pentabiótico veterinário (Fontoura Wyeth, SP, Brasil), via intramuscular profunda (bíceps femoral).

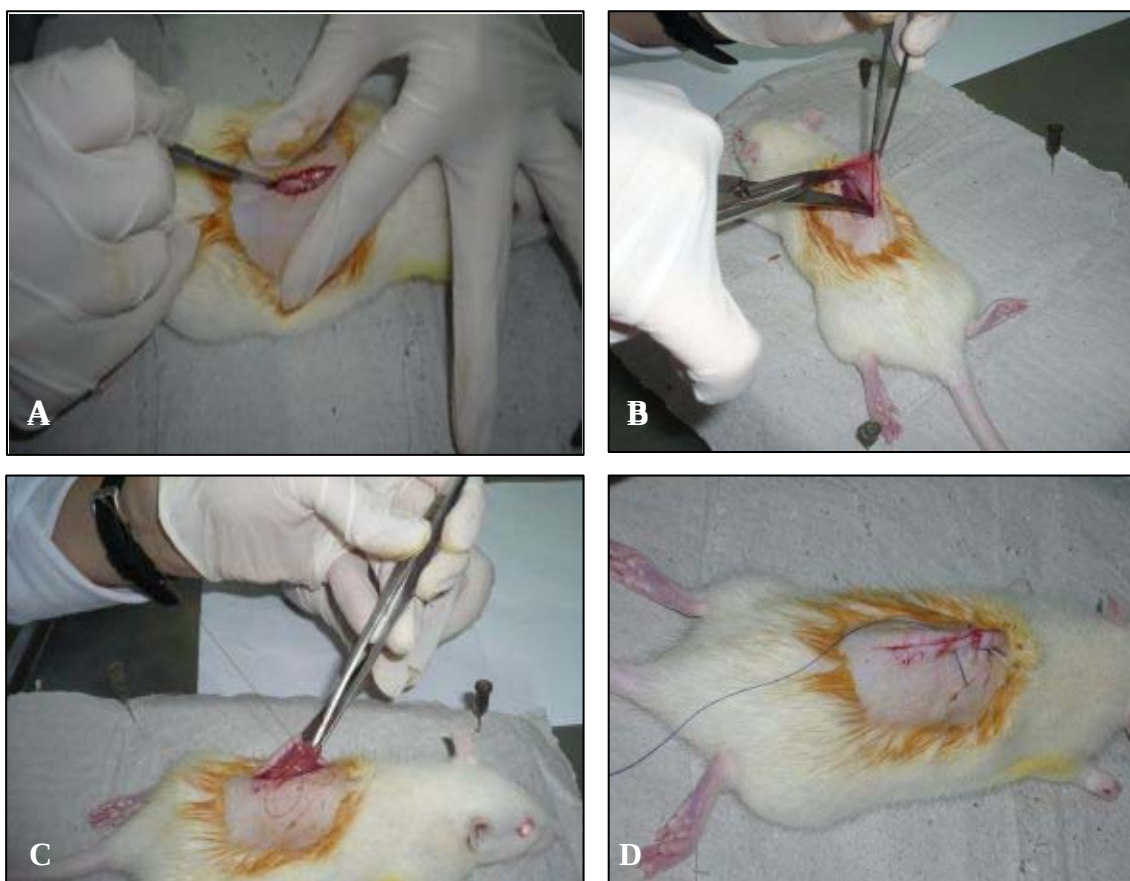


Figura 03. Procedimento cirúrgico para a retirada dos ovários. (A) Incisão. (B) Divulsão. (C) Retirada do Ovário. (D) Sutura.

Treinamento dos Animais

Os animais do GluMOnat e SALnat foram submetidos ao treinamento de natação que ocorreu de segunda à sexta-feira, em tanque de amianto. Este com capacidade de 500L, e área superficial para nado de 0,90m², que possuía em sua base uma resistência acoplada a um termostato que permitiu o controle da temperatura da água em torno de 32-34°C. A água foi trocada diariamente.

As ratas eram monitoradas durante todo o exercício a fim de que não tocassem nas laterais do recipiente (figura 04). O programa de exercício (HART; SHAW; VADJA, *et al*, 2001) foi realizado sempre no mesmo horário, iniciando com um período de adaptação (Tabela 01).



Figura 04. Animais realizando a natação.

Quadro 01. Protocolo de Treinamento.

Semanas	Duração
1º	1º dia: 5 minutos
	2º dia: 10 minutos
	3º dia: 10 minutos
	4º dia: 15 minutos
	5º dia: 15 minutos
Final de Semana	Cirurgia
2º	Recuperação Cirúrgica
3º	1º dia: 15 minutos
	2º dia: 20 minutos
	3º dia: 25 minutos
	4º dia: 30 minutos
	5º dia: 40 minutos
4º	1º dia: 45 minutos
	2º dia: 50 minutos
	3º dia: 55 minutos
	4º dia: 60 minutos
	5º dia: 60 minutos
5º - 12º	60 minutos

Os animais não submetidos à natação foram mantidos separados nas gaiolas, contendo aproximadamente 2 cm de água, durante o mesmo período em que foi praticada a natação pelos outros grupos. Desta forma foram submetidos ao semelhante estresse aquático sem, contudo, realizar o esforço físico.

Após a natação os animais foram secados em toalhas e em seguida acondicionados a uma câmara de aquecimento de madeira revestida com fórmica (área superficial de 0,25m²), tampa de vidro corrediço e fundo de amianto pintado com tinta lavável (figura 05). Abaixo da placa de amianto havia quatro lâmpadas comuns de 100 watts, ligada à rede elétrica, com saída para termômetro. A temperatura média para aquecimento foi de 32-36°C. Os animais ficaram acondicionados nesta câmara por um período de 10 minutos.



Figura 05. Câmara de aquecimento

Procedimentos

Todos os animais foram pesados diariamente do 1º ao 30º dia após o nascimento, a partir daí 1 vez por semana até o dia das respectivas datas de eutanásia, sempre no mesmo horário, utilizando-se balança eletrônica (Filizola, com sensibilidade de 0,1g).

Foram realizadas mensurações dos eixos látero-lateral e antero-posterior do crânio (fig. 06 A e B), e do comprimento da cauda do animal (fig. 07) (SILVA *et al*, 2005) durante os primeiros 30 dias de vida.

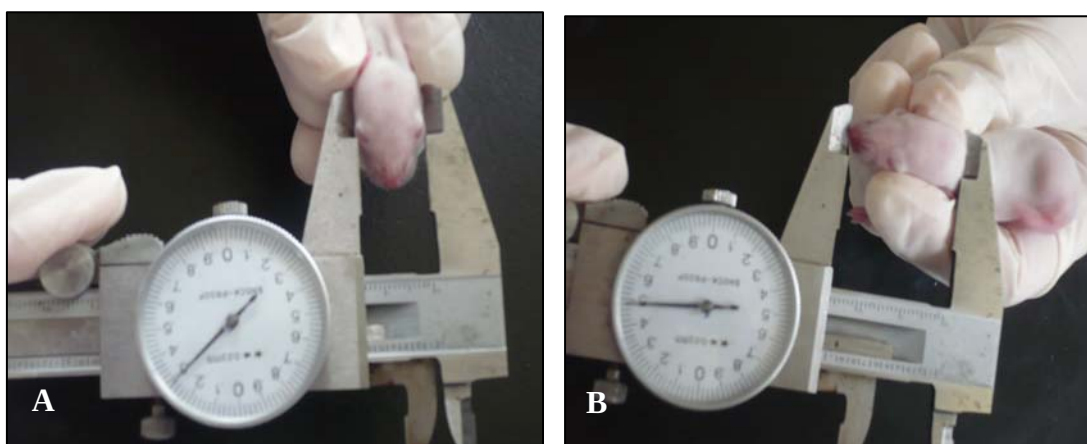


Figura 06. **A** - Mensuração eixo látero-lateral do crânio. **B** - Mensuração eixo antero - posterior do crânio.



Figura 07 - Mensuração do comprimento cauda.

Ao completarem o período de natação, os animais foram anestesiados, via subcutânea, com cloridrato de xilazina (Rompum® – Bayer) (0,03ml/100g peso) e quetamina (Ketalar®) (0,25ml/100g peso). Em seguida, foi realizada uma incisão com bisturi (cabo nº04 - Bic - e lâmina nº23 - Socorex) que se estendeu da região abdominal inferior direita (próxima a região inguinal) até o joelho (região infrapatelar) (figura 08A). O peritônio foi rebatido, foram removidos os músculos e tendões da região proximal da coxa, e a articulação coxo-femoral foi evidenciada. Na posição de decúbito lateral esquerdo à remoção dos músculos e tendões posteriores foi realizada. O fêmur foi desarticulado proximal e distalmente com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e, em seguida, dissecado completamente com a remoção dos tecidos moles (figura 08B).



Figura 08. **A** - Incisão da região abdominal inferior se estendendo até o joelho. **B** - Fêmur dissecado.

Após devidamente dissecado, o osso teve seu comprimento mensurado com a ajuda de um paquímetro (Western, 0,02mm). O osso foi posicionado com a face anterior voltada para cima e a mensuração deste se estendeu desde a cabeça femoral até a superfície articular dos côndilos do referido osso (figura 09).



Figura 09. Aferição do Comprimento do Fêmur com paquímetro (Western, 0,02mm).

Após as seguintes mensurações, o fêmur foi pesado em uma balança digital (marca AND, modelo HR-200, com sensibilidade 0,1 mg). Em seguida, foi fixado em formol tamponado (10ml de formol a 37% e 27ml de tampão fosfato 0,1M e pH = 7,0) em volume 50 vezes superior ao da amostra e armazenado em recipientes de vidro. A seguir, o osso foi descalcificado com solução de ácido clorídrico e ácido fórmico a 8% durante o tempo necessário para tal procedimento. Após a descalcificação, o fêmur foi seccionado transversalmente abaixo do trocante menor para remoção de sua epífise proximal. Em seguida, esta foi colocada em uma solução neutralizante (Hidróxido de Sódio a 5%) por 20 minutos e armazenado em álcool 70%. Posteriormente, o material foi encaminhado para o processamento histológico de rotina e incluído em parafina. Os cortes com 3µm de espessura foram corados pela hematoxilina-eosina e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan – Merck).

Análise Histomorfométrica

A partir das preparações histológicas (06 animais para cada grupo experimental) foram retiradas fotos com auxílio de uma máquina digital (Panasonic DMC-FX10) direto da ocular do microscópio óptico (Olympus - BX50) utilizando objetiva de 4X para avaliação dos seguintes parâmetros: diâmetro da cabeça femoral, área da cartilagem articular da cabeça do fêmur e a espessura da cortical deste osso. As mensurações foram realizadas através do programa Scion Image.

Para obtenção da proporção volumétrica da epífise femoral, esta região foi delimitada em três regiões: lateral, intermédia e medial. Para cada região foram avaliados três campos microscópicos totalizando nove campos por animal. Este parâmetro foi determinado utilizando uma lente de sobreposição com 441 pontos acoplada à ocular de 10X e utilizando a objetiva de 20X. Foram considerados na contagem os pontos que incidiram sobre o tecido ósseo trabecular.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o teste “t” de Student ou teste de Mann-Whitney para a comparação entre dois grupos.

ARTIGO 01

A NATAÇÃO MINIMIZA O RETARDO NO CRESCIMENTO SOMÁTICO E ÓSSEO DE RATOS?

Foi submetido para publicação como artigo original na **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. Apresentado segundo as normas do periódico.

A NATAÇÃO MINIMIZA O RETARDO NO CRESCIMENTO SOMÁTICO E ÓSSEO DE RATOS?

**Ana Cristina Falcão Esteves^a, Fabiana Soares Bizarria^b, Marcos Paulo
Galdino Coutinho^b, Tâmara Kelly Delgado Paes Barreto^b, Maria do Socorro
Brasileiro-Santos^c, Silvia Regina Arruda de Moraes^b**

^a Programa de Pós-Graduação em Patologia, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

^b Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Pernambuco, Recife, PE.

^c Departamento de Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Pernambuco, Recife, PE

Endereço para Correspondência:

Ana Cristina Falcão Esteves Costa
Rua Padre Anchieta, 578/702.Madalena
50720-280 Recife, PE (Brasil)
Tel. 81 32269043, Fax 81 21268554, E-Mail sramoraes@gmail.com

RESUMO

A formação óssea é regulada por fatores hormonais e modificada por estímulos extrínsecos, como a prática de exercícios. Avaliou-se o efeito da natação sobre o crescimento somático e ósseo de ratas submetidas a dois modelos experimentais a fim de reproduzir déficit hormonal. Utilizou-se 28 ratas *Wistar* neonatas fêmeas separadas em: Grupo Glutamato Monossódico (GluM,n=14; Solução de GM 4.0mg/g, dias alternados, primeiros 14 dias de vida) e Grupo Salina (Sal,n=14; Solução Salina). Peso corpóreo e mensurações murinométricas (eixos Látero-lateral, Antero-posterior do crânio - LLC/APC - e Comprimento da cauda - CC) foram avaliados do 1º ao 30º dia de vida. Aos 60 dias, o Grupo GluM foi ovariectomizado (GluMO) e o Sal apenas passou pelo estresse cirúrgico. Então, metade dos animais de cada grupo iniciou o programa de natação (12 semanas, 5 dias/semanas, 60 min/sessão) resultando nos seguintes grupos experimentais: Salina Sedentário (Salsed,n=7), Salina Natação (Salnat,n=7), Glutamato Ovariectomia Sedentário (GluMOsed,n=7) e Glutamato Ovariectomia Natação (GluMONat,n=7). Ao final do experimento o fêmur direito foi pesado e seu comprimento avaliado. Nos 30 dias iniciais, GluM reduziu o peso corpóreo e os eixos LLC, APC e CC comparado ao grupo SAL. Aos 60 dias, o peso corpóreo do GLuM permaneceu menor comparado ao SAL e ao final foi similar entre os grupos Salsed e SALnat e; GLuMOsed e GluMONat. Porém houve redução no peso do GlutMOsed comparado ao Salsed. A natação favoreceu o peso do fêmur no SAL e não o alterou entre os GluMOsed e GluMONat, porém houve aumento no grupo Salsed comparado ao GluMOsed. No comprimento, o SALnat foi similar ao Salsed e o mesmo ocorreu entre GluMONat e GluMOsed. Porém, Salsed apresentou comprimento maior que GluMOsed. A natação não foi capaz de reverter, em animais adultos jovens, os efeitos provocados por situações de desequilíbrio corpóreo induzidas precocemente no tecido ósseo.

Palavras-Chave: tecido ósseo, crescimento corpóreo, ovariectomia e natação

ABSTRACT

The bone formation is regulated by hormonal factors and modified by extrinsic stimuli, such as the practice of exercises. The effect of swimming on the somatic growth and bone of rats subjected to two experimental models to reproduce hormone deficiency. Twenty-eight Wistar, neonate rats separated into two groups: Monosodium glutamate (GluM, n = 14; solution of monosodium glutamate 4.0mg/g, alternate days, first 14 days of life) and Grupo Saline (SAL, n = 14; solution saline. The body weight and measurements of somatic development (latero-lateral axis of the skull, anterior-posterior axis of the skull - LLC / PCA - and length of the tail - LT) were evaluated from the 1st to the 30th day of life. After 60 days of the life, the GluM group was ovariectomized and SAL just went through surgical stress. Then, half of the animals in each group started the swimming training (12 weeks, 5 days / week, 60 min / session). Resulted in the following experimental groups: Sedentary Saline (Sedsal, n = 7), Swimming Saline (Swisal, n = 7), Sedentary glutamate Ovariectomy (SedGluMO, n = 7) and Swimming glutamate Ovariectomy (SwiGluMO, n = 7). At the end of the experiment the right femur was weighed and measured in its length. During the 30 days, the GluM group reduced its body weight and the LLC, PCA and CC compared to SAL. After 60 days, the body weight of GluM group remained lower and the end of the experiment it was similar between Swisal and Sedsal groups; SedGLuMO and SwiGluMO groups. However, there was a reduction in weight of SedGluMO compared to SedSAL. The swimming helped the weight of the femur in the SAL and didn't alter it between SedGluMO and SwiGluMO, but it increased in Sedsal compared to SedGluMO group. In length, the SwiSal was similar to Sedsal and the same occurred between SwiGluMO and SedGluMO. However, Sedsal group presented greater length than SedGluMO. The swimming was not able to reverse, in young adult animals, the effects caused by situations of imbalance in the body induced early bone.

Keywords: bone, body growth, ovariectomy and swimming

INTRODUÇÃO

Durante a vida, o osso está em contínuo processo de formação e reabsorção, onde, o aumento ou a perda da massa óssea depende do balanço entre esses processos ⁽¹⁾ que são regulados sistematicamente por hormônios, dentre eles, os ovarianos e os da hipófise ⁽²⁾.

Além dos fatores hormonais, a massa óssea também pode ser modificada por estímulos extrínsecos, tais como a prática regular de exercícios físicos ⁽³⁾, os quais geram forças mecânicas que aplicadas aos ossos podem modificar sua estrutura e morfologia ⁽⁴⁾. Portanto, estudar a influência da atividade física na dinâmica do esqueleto tem provocado grande interesse por sua importância na arquitetura óssea.

Os estímulos mecânicos originados por estas atividades culminam em forças reativas que juntamente com as contrações musculares estimulam o tecido ósseo promovendo osteogênese ⁽⁵⁾. Existem diferentes tipos de exercícios, quanto ao modo e a intensidade, que podem prevenir as perdas ósseas ⁽⁶⁾. Exercícios aeróbicos que incidem carga de peso, como a corrida em esteira, têm mostrado vantagens para a densidade mineral óssea ⁽⁷⁾. Por outro lado, exercícios aeróbicos que são realizados sem carga de peso, como a natação, ainda são pouco esclarecidos e controversos ⁽⁸⁾.

A administração de Glutamato Monossódico (GluM) em ratos no período neonatal causa destruição na maior parte dos neurônios produtores do Hormônio liberador do Hormônio de Crescimento (GHRH) e tem sido um modelo bastante utilizado para estudos sobre a deficiência do Hormônio de Crescimento (GH) ^(9,10,11,12,13). Por outro lado, a ovariectomia é considerada um

modelo apropriado para a investigação dos efeitos da deficiência do estrógeno⁽¹⁴⁾, o qual é de grande importância para a manutenção da remodelação óssea normal⁽¹⁵⁾. Desta forma, este estudo utilizou dois modelos associados para reproduzir o déficit hormonal com suas repercussões no tecido ósseo e avaliar o efeito do exercício de natação sobre esse tecido em ratas na idade adulta.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 28 ratas neonatas da linhagem *Wistar*, fêmeas (colônia de criação do Departamento de Nutrição da UFPE) foram mantidas em gaiolas coletivas em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12/12 horas e com livre acesso à dieta padrão e água filtrada. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), ofício nº 23076.018024/2007-11, e seguiu as normas recomendadas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A partir do primeiro dia de vida os animais foram separados aleatoriamente inicialmente em dois grupos: Glutamato monossódico (GluM, n=14) e Salina (SAL, n=14). Os animais do grupo GluM receberam uma solução de glutamato monossódico via subcutânea na dose de 4mg/g de peso em dias alternados nos primeiros 14 dias de vida⁽¹⁶⁾, enquanto que os animais do grupo SAL receberam solução salina na mesma dose e frequência. Todos os animais foram pesados diariamente do 1º ao 30º dia após o nascimento (Balança Digital Smart), no 60º dia de vida e ao final do experimento (Balança Filizola). Foi avaliado o desenvolvimento somático dos animais através de mensurações diárias nos primeiros 30 dias de vida, considerando os eixos

lâtero-lateral e antero-posterior do crânio (LLC e APC) e o comprimento da cauda (CC) ⁽¹⁷⁾.

Ao completarem a idade de 60 dias, os animais do grupo GluM foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a retirada dos ovários bilateralmente enquanto os animais do grupo SAL foram submetidos ao estresse cirúrgico sem retirada dos ovários.

Uma semana antes do procedimento cirúrgico, metade dos animais de cada grupo iniciou a fase de adaptação do programa de exercício de nado livre ⁽¹⁹⁾. A atividade ocorreu em um tanque de amianto com capacidade de 500L e área superficial para nado de 0,90m² possuindo em sua base uma resistência acoplada a um termostato que permite o controle da temperatura da água em torno de 32-34°C, trocada diariamente. Durante a sessão de exercício os ratos eram monitorados para evitar que tocassem nas laterais do recipiente. Os animais que não realizaram o exercício de natação foram mantidos separados em gaiolas com aproximadamente 2 cm de água durante o mesmo período em que foi praticada a natação pelo grupo exercitado. Desta forma foram submetidos indistintamente, ao mesmo tipo de estresse aquático sem, contudo, realizar o esforço físico. Após o nado os animais foram secados em toalhas e em seguida acondicionados a uma câmara de aquecimento (área superficial de 0,25m²).

Após o procedimento cirúrgico os animais permaneceram durante uma semana em repouso e em seguida metade dos animais do GluMO (Glutamato Monossódio Ovariectomizado) e do SAL reiniciaram o protocolo de exercício de natação durante dez semanas (Tabela. 1). Ao final do experimento, todos os

animais tiveram o fêmur direito coletado, pesado e mensurado o comprimento com auxílio de um paquímetro (Western, 0,02mm).

A análise estatística foi realizada com o teste “t” de Student seguido ou não pelo teste de Mann-Whithney para a comparação entre dois grupos.

RESULTADOS

Os animais tratados com Glutamato Monossódico (GLuM) apresentaram diminuição do peso corpóreo do 5º ao 30º dia (fig. 01), da dimensão do eixo láterolateral (LLC) (fig. 02) e do eixo ânteroposterior do crânio (APC) a partir do 8º ao 30º dia (fig. 03) e do comprimento de cauda (CC) a partir do 2º até o 25º dia (fig. 04).

Aos 120º dias não houve diferença no peso corpóreo entre os grupos SALsed (Salina sedentário) e SALnat (Salina Natação) e entre os grupos GLuMOsed (Glutamato Monossódio ovariectomizado sedentário) e GluMONat (Glutamato Monossódio ovariectomizado natação). O grupo GlutMOsed demonstrou redução do peso corpóreo quando comparado ao grupo SALsed (Tabela 02).

O exercício de natação promoveu um aumento no peso do fêmur no grupo SAL porém o mesmo exercício não foi eficiente para promover diferença do peso do fêmur entre os animais tratados com Glutamato Monossódio e ovariectomizados (Tabela 02). O peso do fêmur apresentou-se menor nos animais do grupo GluMOsed quando comparados ao SALsed (Tabela 02). O grupo SALnat não mostrou diferença no comprimento do fêmur em relação ao grupo SALsed e esse resultado foi similar na comparação entre os grupos GluMONat e GluMOsed. Enquanto que na comparação entre os grupos SALsed

e GluMOsed observou-se um comprimento maior dos fêmures do primeiro grupo (Tabela 02).

DISCUSSÃO

O ineditismo deste estudo foi avaliar o efeito de um programa de treinamento aeróbico numa situação em que foram associadas duas intervenções prejudiciais ao desenvolvimento corpóreo e ósseo de animais. A primeira intervenção foi a administração do Glutamato Monossódico (GluM) em ratas no período neonatal, que segundo a literatura, provoca lesões agudas e irreversíveis. Essas lesões afetam principalmente a região do Núcleo Arqueado e dependendo da dose pode produzir a perda de até 80-90% dos neurônios desta região, os quais secretam o GHRH ⁽¹⁹⁾, hormônio responsável pelo estímulo da secreção do GH pela adenohipófise ⁽²⁰⁾. Nesta condição, a atuação do GH no organismo é intensamente afetada ⁽⁹⁾.

Estudos mostraram que a administração do GluM promove redução no peso corpóreo de ratas ^(9,11,12,13) corroborando com os dados desta pesquisa, embora neste caso a redução foi observada a partir do quinto dia de vida. Entretanto, outros não evidenciaram alteração no peso destes animais ⁽¹⁰⁾ o que sugere que a discordância dos resultados possa estar relacionada às diferentes doses e frequências na administração do glutamato monossódico adotadas nesses estudos. Enquanto que a diminuição do peso corpóreo foi visto com a administração de GluM numa dose de 4mg/g de peso corpóreo num total de 5 a 6 injeções subcutâneas, em outros estudos, que obtiveram resultados opostos, ou a dose fornecida era menor ou a frequência de administração era inferior às utilizadas nesse estudo.

O desenvolvimento somático também se mostrou prejudicado nos animais que foram tratados com GluM. Os estudos que avaliam indicadores de crescimento como, o comprimento de cauda ⁽¹⁰⁾ e o comprimento naso-anal de ratos ⁽¹²⁾, demonstraram valores menores nos grupos tratados em relação ao controle, embora esses resultados tenham sido obtidos em animais na idade adulta. No presente estudo foram analisados, durante os primeiros 30 dias de vida, alguns parâmetros que também caracterizam o desenvolvimento somático de animais: além do comprimento de cauda, o eixo láterolateral (LLC) e o eixo ânteroposterior do crânio (APC). E constatou-se que eles também foram afetados negativamente pela administração do GluM no período avaliado. Contudo, não foi possível comparar esses achados em virtude da ausência de dados na literatura sobre esses parâmetros na idade avaliada. Supõe-se que este aparecimento precoce das conseqüências do GluM no crescimento corpóreo se deva ao fato de que as lesões hipotalâmicas ocasionadas por ele possam iniciar até 15 minutos depois de sua administração ⁽²¹⁾.

A segunda intervenção foi a ovariectomia, que é utilizada como modelo animal para estudos de deficiência do estrógeno, simulando o período pós-menopausa em humanos ⁽¹⁴⁾. Este procedimento foi realizado quando o animal atingiu sessenta dias de vida, idade em que a maturidade sexual do animal é alcançada e logo em seguida foi iniciada a fase de exercício físico. A prática regular de exercício é considerada uma influência positiva para o esqueleto e tem sido indicada na prevenção e no tratamento de doenças ⁽²²⁾. No presente estudo, a associação de um protocolo de exercício físico de intensidade considerada não exaustiva ⁽²³⁾ logo após a ovariectomia objetivou avaliar se a

prática da natação poderia contribuir para atenuar os danos causados no tecido ósseo em virtude das intervenções promovidas no seu metabolismo.

Ao final do experimento houve redução do peso corpóreo nos animais que receberam Glutamato Monossódico e foram ovariectomizados. A ovariectomia é também referida na literatura como um modelo experimental para a indução de obesidade ⁽²⁴⁾, porém não há relatos sobre valores do peso corpóreo em animais que retiraram os ovários e receberam o GluM no período neonatal. Entretanto, no estudo de Yeh *et al* (1997) ⁽²⁵⁾ onde foi associado hipofisectomia, outro modelo usado para fins de déficit hormonal, à ovariectomia o peso corpóreo destes animais foi menor quando comparado com o grupo controle. O peso corpóreo final dos animais do grupo Glutamato Monossódico ovariectomizadas, após o período da atividade de natação, não foi alterado. Da mesma forma, não foi observada interferência do exercício físico sobre o peso corpóreo dos animais dos grupos Salina. O mesmo resultado foi descrito em outros estudos com protocolos de natação semelhantes ao aplicado ^(26,23). Quando o exercício de natação foi realizado em períodos de vida diferentes, observou-se que o peso corpóreo só foi influenciado nos grupos que começaram o exercício logo após o desmame, não havendo alterações quando o início foi na idade adulta ⁽²⁷⁾.

Ao analisarmos o peso do fêmur foi observada uma redução desse parâmetro nos animais tratados precocemente com GluM e submetidos à ovariectomia. Do mesmo modo, no estudo de Yeh *et al* (1997) ⁽²⁵⁾, foi verificado que o peso da vértebra L₄ de ratas submetidas à ovariectomia e à hipofisectomia foi menor comparado com o grupo controle. A ovariectomia isoladamente induz a perda óssea pela maior taxa de reabsorção comparada

com a de formação ⁽²⁸⁾ e, a partir dos resultados apresentados nesse estudo, demonstrou que, ao ser associada à administração do GluM a taxa de formação e aumento da reabsorção óssea foi afetada numa dimensão maior.

Os ossos reagem aos estresses físicos que lhes são impostos através das alterações em sua estrutura e no aumento de sua massa, e estas alterações ocorrem se o estresse atingir uma força efetiva mínima, acima da qual os ossos irão se adaptar ⁽⁴⁾. O exercício de natação promoveu um aumento no peso do fêmur no grupo Salina, porém o mesmo exercício não foi eficiente para promover diferença do peso do fêmur entre os animais tratados com GluM e ovariectomizadas, demonstrando que o estresse ocasionado pelo modelo de atividade física adotado nesse estudo não foi capaz de promover recuperação ou minimizar os efeitos das duas intervenções associadas. Na natação, diferente do que ocorre na corrida, o ambiente aquático anula a interação membro-solo, a ação do peso corpóreo sobre o osso e também a ação da força da gravidade ⁽⁸⁾. Desta forma, acredita-se que o tipo de modalidade não tenha sido capaz de atingir a força efetiva mínima necessária para o osso se adaptar.

Estudos que utilizaram à natação em animais sadios observaram aumento no peso do úmero e da tíbia de animais adultos jovens ^(8,26). Quando associado à ovariectomia, o exercício também promoveu melhorias estruturais como formação de osso cortical, aumento da densidade e melhor suporte em teste mecânicos no fêmur ⁽¹⁸⁾. Contudo, para a elucidação dos possíveis mecanismos que estejam contribuindo para o remodelamento ósseo, neste caso onde associamos duas intervenções que impõem ajustes no metabolismo do osso não foi encontrado informações na literatura.

Semelhante ao peso do fêmur, o comprimento final deste osso também foi afetado negativamente nos animais que receberam o Glutamato Monossódico e foram ovariectomizadas. Ou seja, houve uma redução na taxa de crescimento longitudinal óssea nestes animais. Outras investigações deste parâmetro mostraram sua redução em animais tratados com Glutamato Monossódico ^(10,12,13). Uma possível explicação seria que a deficiência crônica de GHRH ocasionada por este modelo resultou numa inibição da secreção de GH ⁽¹⁰⁾. A ausência de diferença do comprimento ósseo entre os grupos SAL exercitado com o não exercitado e GluMOnat com GluMOsed demonstra que mesmo sob efeito de uma atividade estimulante como exercício regular e apesar da placa de crescimento epifisária, em ratos, permanecer presente durante toda a vida ⁽³⁰⁾, a capacidade de crescimento está limitada por já ter atingido a maturidade óssea ⁽³⁰⁾ podendo ser comprovado pelo aumento do comprimento do fêmur em animais mais jovens submetidos a exercício de natação ⁽⁸⁾.

Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram que o protocolo de treinamento aeróbico utilizado não foi capaz de reverter, em animais adultos jovens, os efeitos provocados por situações de desequilíbrio corpóreo induzidas precocemente no tecido ósseo.

REFERÊNCIA

1. Mosley, JR. Osteoporosis and bone functional adaptation: Mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. J Rehabil Res Dev 2000; 37(2):189-199.
2. Yeh JK, Chen MM, Aloia JF. Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy. Am J Physiol 1997; 273:E734-E742.
3. Kim CS, Fukuoka H, Obata F. Review of bone metabolic turnover under microgravity environment. Ann Rep Phys Edu 2002; 34:65-73.

4. Frost HM. Bone mass and the mechanostat: a proposal. *Anat Rec* 1987; 219: 1-9 1987.
5. Mullender MG, Huikes R. Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law. *J Orthop Res* 1995; 13:503-512.
6. Forwood MR. Mechanical Effects on the Skeleton: Are There Clinical Implication? *Osteoporos Int* 2001; 12:77-83.
7. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp Anim* 2005; 54(1), 1-6.
8. Swissa-Sivan A, Simkin A, Leichter I, Nyska A, Nyska M, Statter, M, et al. Effects of swimming on bone growth and development in young rats. *Bone Miner* 1989; 7:91-105.
9. Millard WJ, Martin Jr. JB, Audet J, Sagar SM, Martin JB. Evidence that reduced growth hormone secretion observed in monosodium glutamate-related rats is the result of deficiency in growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 1982; 110:540-550.
10. Maiter D, Underwood LE, Martin JB, Koenig JI. Neonatal Treatment with Monosodium Glutamate: Effects of Prolonged Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone Deficiency on Pulsatile GH Secretion and Groth in Female Rats. *Endocrinology* 1991 128:1100-1106.
11. Thompson MC, Norton NS, Rodriguez-Sierra JF, Lippiello L. Is glutamate-induced reduction in growth hormone-releasing hormone a neuroendocrine model of aging in the rat? *Proc. Soc. Exp Biol Med* 1994; 206:69-75.
12. Thompson MC, Norton NS, Rodriguez-Sierra JF, Lippiello L. Growth Hormone-Releasing Hormone Depletion in the Female Rat: Similarities to Aging. *J Gerontol* 1996; 51A:B83-B90.
13. Rol De Lama MA, Perez-Romero A, Ariznavarreta MC, Hermanussen M, Tresguerres JAF. Periodic Growth in rats. *Ann Hum Biol* 1998; 25: 441-451.
14. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15:175-191.
15. Pacifi R. Cytokines, estrogen and postmenopausal osteoporosis-the second decade. *Endocrinology* 1998; 139:2659-61.
16. Braga RL, Mello MAR, Gobatto CA. Continuous and intermittent exercise: effects of training and detraining on body fat in obese rats. *Arch Latino Am Nutr* 2004; 54(1):58-65.

17. Silva HJ, Marinho SMOC, Silva AETM, Albuquerque CG, Moraes SRA, Castro RM. Protocol of Mensuration to Avaliation in Indicators of Somatic Development of Wistar Rats. *Int J Morphol* 2005; 23(3):227-230.
18. Hart KJ, Shaw JM, Vadja E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol* 2001; 91:1663-1668.
19. Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971; 30:75-90.
20. Sassolas G. Growth Homone-Releasing Hormone: Past and present. *Horm Res* 2000; 53(suppl3):88-92.
21. Lemkey-Johnston N, Butler V, Reynolds WA. Glial changes in the progress of a chemical lesion. An electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1976; 167:481-502.
22. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp Anim* 2005; 54(1):1-6.
23. Warner SE, Shea JE, Miller SC, Shaw JM. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif Tissue Int* 2006; 79:395-403.
24. Diemen VV, Trindade NE, Trinadade MRM. Experimental model to induced obesity in rats. *Acta Cirur Bras* 2006; 21(6):425-429.
25. Yeh JK, Chen MM, Aloia JF. Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy. *Am J Physiol* 1997;;273(4 Pt 1):E734-42.
26. Swissa-Sivan A, Azoury R, Statter M, Leichter I, Nyska, A, Nyska, M et al. The effects of swimming on bone modeling and composition in young adult rats. *Calcif Tissue Int* 1990; 47:173-177.
27. Scomparin DX, Grassioli S, Marçal AC, Gravena C, Andreazzi AE, Mathias PCF. Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium L-gluamate-obesity onset in mice. *Life Sciences* 2006; 79:2151-56.
28. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Citron M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 1989; 45:360-366.
29. Roach HI, Mehta G, Oreffo ROC, Clarke NMP, Cooper C. Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despeti presence of a physis. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:373-383.

30. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol* 2003; 95:300-307.

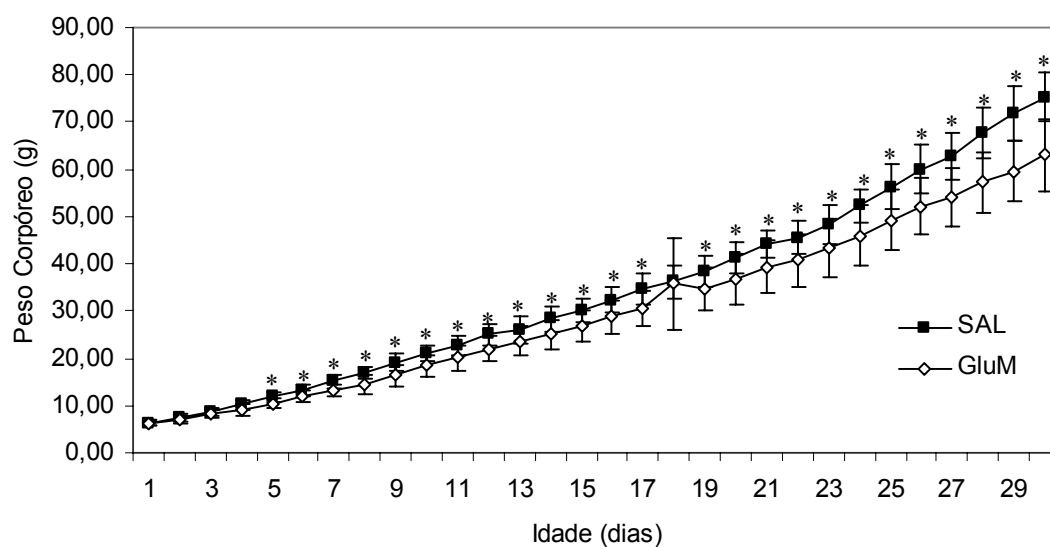


Figura 01. Efeito da administração de glutamato monossódico no período neonatal sobre a evolução ponderal de ratas fêmeas *Wistar*. Dados apresentados em média $\pm$ DP ($n = 14$ no SAL e $n = 14$ no GluM). Teste estatístico: teste t de Student e Mann Whitney, $p < 0,05$.

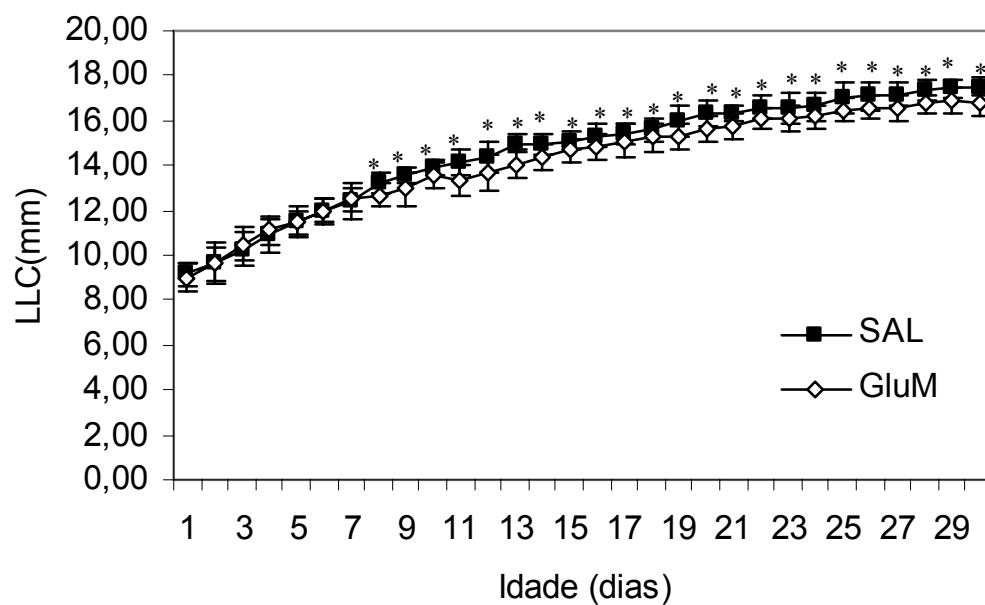


Figura 02. Efeito da administração de glutamato monossódico no período neonatal sobre o desenvolvimento do eixo látero-lateral do crânio de ratas fêmeas *Wistar*. Dados apresentados em média $\pm$ DP (n = 14 no SAL e n = 14 no GluM) Teste estatístico: teste *t* de Student e Mann Whitney, $p < 0,05$.

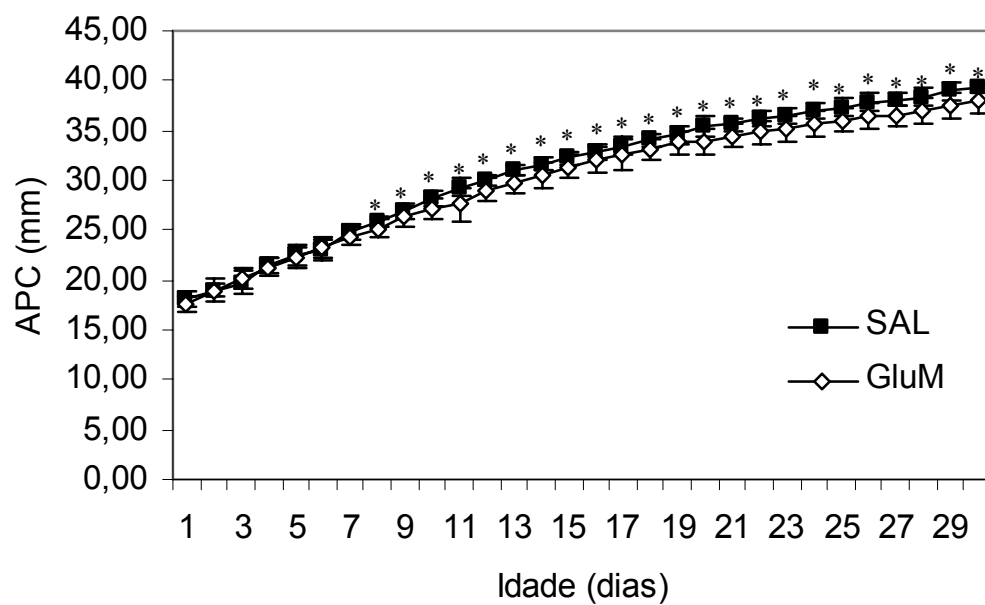


Figura 03 - Efeito da administração de glutamato monossódico no período neonatal sobre o desenvolvimento do eixo ântero-posterior do crânio de ratas fêmeas *Wistar*. Dados apresentados em média $\pm$ DP ($n = 14$ no SAL e $n = 14$ no GluM). Teste estatístico: teste t de Student e Mann Whitney, $p < 0,05$.

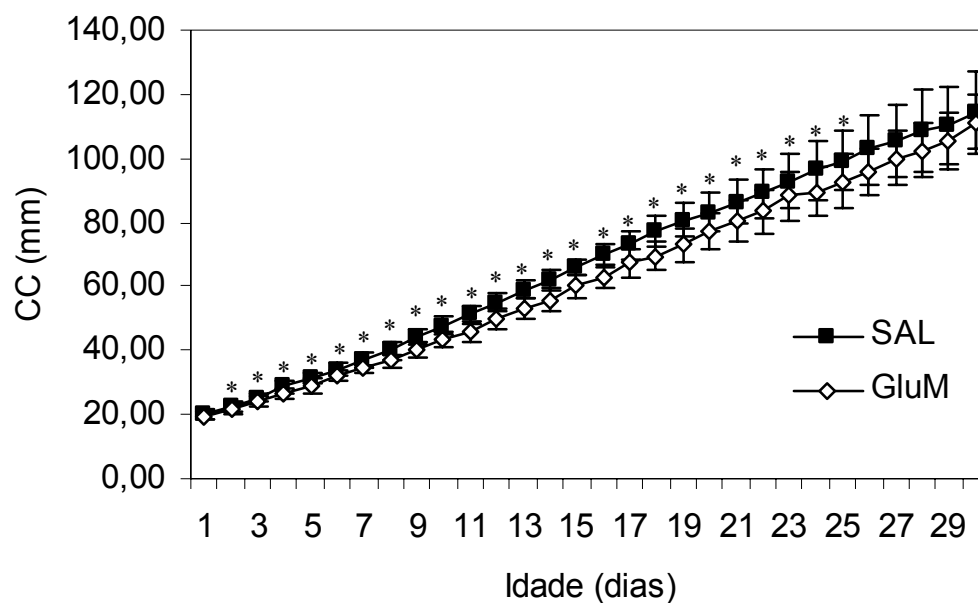


Figura 04. Efeito da administração de glutamato monossódico no período neonatal sobre o desenvolvimento da cauda de ratas fêmeas *Wistar*. Dados apresentados em média $\pm$ DP ($n = 14$ no SAL e $n = 14$ no GluM). Teste estatístico: teste t de Student e Mann Whitney, $p < 0,05$.

Quadro 1. Protocolo do treinamento de natação.

Semanas	Duração
1º	1º dia: 5 minutos
	2º dia: 10 minutos
	3º dia: 10 minutos
	4º dia: 15 minutos
	5º dia: 15 minutos
Final de Semana	Cirurgia
2º	Recuperação Cirúrgica
3º	1º dia: 15 minutos
	2º dia: 20 minutos
	3º dia: 25 minutos
	4º dia: 30 minutos
	5º dia: 40 minutos
4º	1º dia: 45 minutos
	2º dia: 50 minutos
	3º dia: 55 minutos
	4º dia: 60 minutos
	5º dia: 60 minutos
5º - 12º	60 minutos

Tabela 1. Valores médios do peso corpóreo, do peso do fêmur e do comprimento do fêmur nos grupos experimentais ao final do experimento.

<i>Grupos</i>	<i>Peso Corpóreo (g)</i>	<i>Peso Fêmur (mg)</i>	<i>Comprimento Fêmur (mm)</i>
SALsed	241,7 ± 12,1	0,608 ± 0,01	33,51± 0,52
SALnat	237,7 ± 13,2	0,656 ± 0,03 [†]	33,12 ± 0,60
GluMOsed	204,8 ± 18,7 [*]	0,399 ± 0,02 ^{\$}	28,60 ± 0,52 [¥]
GluMONat	190,3 ± 18,9	0,385 ± 0,009	28,27 ± 0,56

Valores expressos em média ± DP de 07 animais por grupo.

Teste *t* de Student (^{*}SALsed vs. GluMOsed, [†]SALsed vs. SALnat, ^{\$}SALsed vs. GluMOsed, [¥]SALsed vs. GluMOsed, p≤0,001).

ARTIGO 02

O EFEITO DA NATAÇÃO NA ESTRUTURA ÓSSEA DE ANIMAIS QUE RECEBERAM GLUTAMATO MONOSSÓDICO E FORAM OVARIECTOMIZADOS.

Será submetido para publicação como artigo original na Revista: **Experimental Animals**. No momento está sendo traduzido para língua inglesa e está apresentado segundo as normas do periódico.

**O EFEITO DA NATAÇÃO NA ESTRUTURA ÓSSEA DE ANIMAIS QUE
RECEBERAM GLUTAMATO MONOSSÓDICO E FORAM
OVARIECTOMIZADOS.**

**Ana Cristina Falcão Esteves^a, Patrícia Verçoza de Vastro Silveira^b, Marcelo
Tavares Viana^d, Liriane Baratella Evêncio^d,
Silvia Regina Arruda de Moraes^b**

^aPrograma de Pós-Graduação em Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

^bDepartamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

^cDepartamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

^dDepartamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

Endereço para Correspondência:

Ana Cristina Falcão Esteves Costa
Rua Padre Anchieta, 578/702.Madalena
50720-280 Recife, PE (Brasil)
Tel. 81 32269043, Fax 81 21268554, E-Mail sramoraes@gmail.com

RESUMO

Avaliar o efeito da natação na estrutura óssea de animais que receberam glutamato monossódico e foram ovariectomizados. Utilizou-se 24 ratas *Wistar* neonatas separadas em grupos: glutamato monossódico (GluM,n=12; Solução de GM 4.0mg/g) e salina (SAL,n=12; solução salina). Aos 60 dias, os animais GluM foram ovariectomizados. Metade dos animais de cada grupo iniciou um treinamento de natação (12 semanas, 5 dias/semanas, 60 min/sessão) resultando nos grupos: salina sedentário (SALsed,n=6), salina natação (SALnat,n=6), glutamato ovariectomia sedentário (GluMOsed,n=6) e glutamato ovariectomia natação (GluMONat,n=6). Com imagens histológicas do fêmur avaliou-se: diâmetro da cabeça do fêmur, área da cartilagem articular, espessura da cortical e proporção volumétrica (PV) da epífise deste osso. Diâmetro da cabeça foi menor no GluMO comparado ao SAL e a natação não alterou este parâmetro nos grupos SALnat e GluMONat comparado aos controles sedentários. Área da cartilagem articular mostrou-se reduzida no GluMONat comparado ao GluMOsed e nenhuma alteração foi observado nos grupos SALnat e GluMOsed comparados ao Salsed. Corticais da diáfise do GluMO mostraram-se reduzidas comparadas ao SAL. A natação aumentou a espessura das corticais no grupo SAL, porém não influenciou no GluMO. Na região lateral da epífise houve redução da PV no grupo GluMONat comparado ao GluMOsed. A região intermédia não foi alterada. Na região medial, a natação aumentou a PV no grupo SAL, porém não influenciou GluM. Logo a natação pode ser utilizada como estimulante ósseo em animais saudáveis, porém, em animais debilitados pode não exercer nenhum efeito estimulante.

Palavras-Chave: Glutamato monossódico, natação, ovariectomia e tecido ósseo.

INTRODUÇÃO

O declínio do funcionamento normal do organismo tem início na maturidade e progride rapidamente com o avançar da idade [32]. O envelhecimento altera a dinâmica da remodelação óssea resultando em um acúmulo de microfraturas levando ao desenvolvimento da fragilidade do esqueleto, particularmente no osso trabecular [34].

Doença sistêmica do esqueleto, a osteoporose é considerada a forma mais comum de perda óssea relacionada com a idade [16] e é caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração da sua estrutura com um conseqüente aumento da fragilidade [24] relacionada à população feminina devido à deficiência de estrógeno numa idade avançada da vida [2, 24]. A perda acelerada de tecido ósseo é uma conseqüência constatada depois da menopausa, pós-ovariectomia ou em decorrência de qualquer tipo de falência ovariana [6]. Desde o estudo pioneiro de Saville (1969) [29], que introduziu o modelo da ovariectomia em ratos, este procedimento tem sido bastante utilizado para mimetizar a deficiência de estrógeno em humanos [2, 16, 15].

Durante o envelhecimento ocorre uma significativa perda de neurônios hipotalâmicos, especialmente nas regiões produtoras do Hormônio-Liberador do Hormônio de Crescimento (GHRH) [19, 32], havendo um declínio dos níveis do Hormônio de Crescimento (GH). O tratamento com Glutamato Monossódico (GluM) em ratos no período neonatal mostrou ser um modelo que pode reproduzir essa situação experimentalmente, tendo em vista que a sua administração causa perda da maior parte dos corpos celulares na região do Núcleo Arqueado Hipotalâmico, o local primário para a produção do GHRH. Por isso tem sido um modelo usado para ocasionar alterações do envelhecimento em animais jovens.

O esqueleto tem sua morfologia básica determinada geneticamente, mas sua arquitetura e massa final são moduladas por meio da adaptação aos fatores mecânicos

[9] que promovidos pela atividade física resultam num efeito positivo no sistema músculo-esquelético [14, 22]. A atividade física é, assim, de grande importância para a manutenção de um esqueleto saudável [35]. Em indivíduos idosos e osteoporóticos a natação, por ser um exercício de baixo impacto [13], tem sido bastante recomendado.

No presente estudo buscou-se mimetizar situações que ocorrem com o tecido ósseo durante o envelhecimento, através da utilização de animais jovens submetidos à administração GluM e à ovariectomia e posteriormente avaliar se o exercício de natação teria algum efeito sobre a estrutura óssea destes modelos.

MATERIAL E MÉTODOS

Ratas neonatas da linhagem *Wistar* (n=24) provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da UFPE, foram mantidos em condições controladas de temperatura de $22 \pm 1^{\circ}$ C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, em gaiolas coletivas e com livre acesso à dieta padrão e água filtrada. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE) e seguiu as normas recomendadas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A partir do primeiro dia de vida os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: Glutamato Monossódico (GluM, n=12) e Salina (SAL, n=12). O grupo GluM recebeu uma solução de Glutamato Monossódico via subcutânea na dose de 4mg/g em dias alternados nos primeiros 14 dias de vida [3], enquanto que os animais do grupo Salina receberam solução salina na mesma dose e frequência.

Ao completarem a idade de 60 dias, o grupo GluM foi submetido a um procedimento cirúrgico para a retirada dos ovários bilateralmente enquanto o grupo SAL foi submetido ao estresse cirúrgico sem retirada dos ovários.

Uma semana antes do procedimento cirúrgico metade dos animais de cada grupo realizou um programa de exercício de nado livre, que teve início com uma semana de adaptação [13], em tanque de amianto com capacidade de 500L e área superficial para nado de 0,90m² possuindo em sua base uma resistência acoplada a um termostato que permite o controle da temperatura da água em torno de 32-36°C, trocada diariamente. Durante a sessão de exercício os ratos eram monitorados para evitar que tocassem nas laterais do recipiente.

Os animais que não realizaram o exercício de natação foram mantidos separados em gaiolas com aproximadamente 2 cm de coluna de água durante o mesmo período em que foi praticada a natação pelos outros grupos. Desta forma foram submetidos indistintamente, ao mesmo tipo de estresse aquático sem, contudo, realizar o esforço físico. Após o nado os animais eram enxutos em toalhas e em seguida acondicionados a uma câmara de aquecimento (área superficial de 0,25m²).

Após o procedimento cirúrgico os animais permaneceram durante uma semana em repouso e em seguida metade dos animais do GluMO (Glutamato monossódio Ovariectomizado) e o do SAL iniciaram o protocolo de exercício de natação durante dez semanas [13]. Ao final, os animais tiveram o fêmur direito coletado e fixado em formol tamponado (10ml de formol a 37% e 27 ml de tampão fosfato 0,1 M - pH = 7,0) em volume 50 vezes superior ao da amostra. A descalcificação dos ossos foi realizada com uma solução de ácido clorídrico a 8% e ácido fórmico a 8%. Os fêmures foram seccionados transversalmente ao nível do terço proximal da diáfise, abaixo do trocanter menor. Cortes frontais de 4µm foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

Com uma máquina digital (Panasonic DMC-FX10) acoplada a um microscópio óptico (Olympus - BX50), com aumento final de 40X foram digitalizadas imagens de 06 preparações histológicas para cada grupo experimental para avaliação dos seguintes

parâmetros: diâmetro da cabeça femoral, área da cartilagem articular da cabeça do fêmur e a espessura da cortical deste osso. Após a digitalização das imagens as mensurações foram feitas com o programa Scion Image.

Para obtenção da Proporção Volumétrica da epífise femoral esta região foi delimitada em três regiões: lateral, intermédia e medial. Para cada região foram avaliados três campos microscópicos totalizando nove campos por animal. Este parâmetro foi determinado com auxílio de uma lente de sobreposição com 441 pontos acoplada a ocular de 10X e utilizando a objetiva de 20X. Foram considerados na contagem os pontos que incidiram sobre o tecido ósseo trabecular.

A análise estatística foi realizada com o teste “t” de Student seguido ou não pelo teste de Mann-Whithney para a comparação entre dois grupos.

RESULTADOS

Os animais tratados com GluM e Ovariectomizadas apresentaram um menor diâmetro da cabeça do fêmur quando comparados com o grupo Salina ($p = 0,012$). O exercício de natação não promoveu alteração nos valores do diâmetro da Cabeça do Fêmur nos grupos SALnat e GluMOnat quando comparado com seus respectivos controles sedentários (Tabela 1).

A área da cartilagem articular do fêmur mostrou-se reduzida no Grupo GluMOnat em relação ao grupo GluMOsed ($p = 0,003$). Nenhuma alteração deste parâmetro foi observado nos grupos SALnat e GluMOsed quando comparados ao Salina sedentário (Tabela 1).

Para a cortical da diáfise do fêmur foram analisadas as faces medial e lateral. As duas corticais dos animais tratados com GluM e ovariectomizados mostraram-se reduzidas em relação ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). A natação aumentou a espessura da

cortical medial e lateral no grupo Salina ($p \leq 0,05$), porém não influenciou nos animais que receberam glutamato monossódico e foram ovariectomizados (Tabela 2).

A Proporção Volumétrica da epífise femoral foi avaliada em três regiões separadamente: Lateral, Intermédia e Medial. Na região lateral houve redução no Grupo GluMOnat em relação ao grupo GluMOsed ($p = 0,037$) e nenhuma alteração deste parâmetro foi observado nos grupos SALnat e GluMOsed quando comparados ao Salina sedentário. Na região intermédia, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos avaliados. E na região medial, a natação aumentou o conteúdo ósseo no grupo Salina ($p \leq 0,001$), porém em animais tratados com GluM e ovariectomizadas o exercício não influenciou (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Vários fatores aumentam o risco da perda óssea com o avançar da idade, entre eles: diminuição do Hormônio de Crescimento e deficiência de Estrógeno [20]. A administração do GluM durante o período neonatal somada a realização da ovariectomia buscou mimetizar esses efeitos do envelhecimento no tecido ósseo. Como também é visto que o estresse físico estimula a atividade osteoblástica e a calcificação [9], utilizou-se a natação que é uma atividade de pouco impacto para verificar seu efeito na estrutura óssea.

A forma da articulação é definida pelas diferentes taxas de proliferação da cartilagem na superfície articular durante o desenvolvimento e este processo é regulado pela magnitude e orientação dos estresses mecânicos impostos [25]. Neste estudo, os parâmetros avaliados a fim de demonstrar os efeitos da natação na articulação coxofemural de animais submetidos ao modelo experimental utilizado foram: diâmetro da cabeça femoral e área da cartilagem articular.

Em nossos resultados, animais tratados com Glutamato Monossódico e Ovariectomizadas apresentaram um menor diâmetro da cabeça do fêmur quando comparados com o grupo Salina. Na literatura, não foram encontrados estudos que utilizaram à junção destes dois modelos experimentais, porém dados isolados podem sustentar esse dado. A administração do Glutamato Monossódico mostrou reduzir a taxa de crescimento corpóreo [5, 26, 33] assim como, após a ovariectomia ocorre um declínio do conteúdo mineral ósseo, principalmente do tecido ósseo trabecular [6, 10,36].

Por outro lado, os animais que realizaram o exercício de natação não demonstraram alteração no diâmetro da Cabeça do Fêmur, tanto no grupo Salina quanto no GluMOnat. Isto mostra que animais tanto exercitados como sedentários sob condições experimentais semelhante não sofreram influência da natação. Entretanto, aumento do diâmetro da cabeça femoral foi observado em animais que realizaram um protocolo de corrida em esteira [12]. Por ser uma atividade com ausência de impacto [30] a natação talvez não tenha sido capaz de produzir estímulo suficiente para favorecer este parâmetro.

A morfologia da cartilagem articular, outro parâmetro avaliado neste estudo, é determinada tardiamente no período pós-natal, quando a ossificação endocondral é completada [7]. Maiores dimensões desta cartilagem promovem aumento da resistência e assim garantem melhor proteção contra danos ao tecido ósseo [11]. A relação entre o estímulo mecânico e o tamanho articular ainda não está definida, porém estudos relatam que o primeiro fator é importante para o desenvolvimento articular [25].

Nenhuma alteração da área articular foi observado no grupo GluMOsed comparados ao Salina sedentário. Apesar de não ter sido constatado diferença entre esses grupos experimentais, pode-se observar que há uma tendência da área da

cartilagem articular do grupo GluMOsed ser maior que a do grupo Salina. Isto pode ter ocorrido pelo fato de o Glutamato Monossódico associado à ovariectomia provocar retardo no desenvolvimento ósseo, resultando em uma maior área cartilaginosa no tecido.

Entre os animais exercitados e sedentários do grupo Salina não houve diferença no tamanho da área da cartilagem articular. Estudos com ratos jovens observaram que a natação não alterou a altura da cartilagem articular da região proximal do úmero e do fêmur [30, 23] e também, outros estudos não observaram diferenças entre grupos exercitados e sedentários mesmo sendo utilizado outros tipos de exercícios diferente da natação [21, 8]. Eckstein em 2005 [8], avaliando o comportamento da deformação da cartilagem articular em diferentes tipos de atividades físicas observou que na articulação femorotibial em humanos sua deformação é mínima, necessitando de atividades de alto impacto para se obter uma deformação efetiva. Talvez, para a articulação coxo-femoral seja necessário o mesmo raciocínio.

Apesar de o exercício influenciar positivamente o tamanho, a forma, bem como a distribuição do tecido articular [25], fato curioso ocorreu na comparação entre os animais sedentários e exercitados do Grupo GluMO: a menor área da cartilagem articular foi vista no grupo exercitado sugerindo que as alterações causadas pelas duas intervenções podem ter causado consequências muito agressivas à estrutura avaliada e como a intensidade da deformação da cartilagem articular depende da magnitude do estímulo mecânico [17, 28], esse programa de atividade física pode ter prejudicado a cartilagem.

A espessura do osso cortical é um importante parâmetro para avaliar a qualidade e a força do tecido ósseo [37]. Foi avaliada a espessura das duas corticais (medial e lateral) do fêmur e foi visto que em animais tratados com Glutamato Monossódico e

ovarietomizados elas foram menores em relação ao grupo SAL. Corroborando com estes dados, animais apenas ovariectomizadas apresentaram diminuição na área e espessura da cortical [37], assim como animais que receberam o GluM tiveram o diâmetro da diáfise femoral reduzidos [32].

A natação, atividade sem carga de peso, já foi considerada inadequada para o aumento da massa óssea. Porém, estudos mais recentes mostraram benefícios na morfologia óssea com a realização deste tipo de exercício [13, 38]. Neste estudo, a natação favoreceu a espessura de ambas as corticais no grupo Salina, porém não influenciou quando os animais receberam Glutamato Monossódico e foram ovariectomizados. Este dado mostra que as tensões geradas pela contração muscular durante a natação favoreceram a cortical óssea de animais saudáveis [13], porém não foram eficazes para garantir benefício à massa óssea dos animais desfavorecidos pela administração do Glutamato e ovariectomizados posteriormente.

O aumento da incidência de fraturas em idosos está relacionado com a perda de osso trabecular [18]. Após a ovariectomia há um imediato *turnover* ósseo [6] acarretando em diminuição da Densidade Mineral Óssea pela deficiência de estrogênio [2]. Esta rápida perda óssea leva perfurações de placas ósseas e desconectividades entre as trabéculas [1]. Além disso, a deficiência de Hormônio de Crescimento também causa alteração no balanço entre reabsorção e formação óssea e vários estudos mostram redução significativa na Densidade Mineral Óssea em indivíduos adultos com esta deficiência [4, 27, 39]. O conteúdo de tecido ósseo trabecular foi verificado neste trabalho através da análise da proporção volumétrica da epífise femoral, avaliada em três regiões: Lateral, Intermédia e Medial. Não se constatou alteração entre os grupos GluMO e SAL sedentários em nenhuma das regiões avaliadas. Porém pode ser observado que há uma tendência, que deve ser considerada, dos animais que receberam

a administração de Glutamato Monossódico e foram ovariectomizadas apresentarem menor conteúdo ósseo trabecular.

A natação estimulou o aumento do conteúdo mineral de osso trabecular na região medial no grupo SALnat, enquanto que nas outras regiões ocorreu o aumento, porém, sem significância. Isto demonstra que mesmo sendo uma atividade que não envolva estresse mecânico com carga ao membro [30], há a ação da contração muscular que isoladamente favoreceu o tecido ósseo destes animais saudáveis. Semelhantes resultados podem ser encontrados em outros estudos [23, 31, 38]. Entretanto, o mesmo efeito benéfico da natação não foi observado nos grupo que recebeu o Glutamato Monossódico e submeteu-se a ovariectomia. Neste caso, em que o tecido ósseo se encontra visivelmente frágil, o programa de natação utilizado mostrou-se agressivo o suficiente para reduzir ainda mais o conteúdo ósseo nestes grupos.

Constatou-se com este estudo a ação agressiva do Glutamato Monossódico e da ovariectomia na morfologia óssea do fêmur. Podendo prejudicar tanto a mobilidade com alterações nos parâmetros articulares, como as propriedades ósseas pela redução no conteúdo ósseo trabecular e cortical. Por outro lado foi reforçada a idéia que a natação pode ser utilizada como estímulo à remodelação óssea de animais saudáveis, porém, no tecido ósseo debilitado pode não exercer nenhum efeito estimulante a este tecido.

REFERÊNCIA

1. Abe, T., Sato, K., Miyakoshi, N., Kudo, Y., Tamura, Y., Tsuchida, T., Kasukawa, Y., 1999. Trabecular remodeling process in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. *Bone* 24(6), 591-596.
2. Baggi, C.M., Ammann, P., Rizzoli, R., Miller, S.C., 1997. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif. Tissue Int.* 61:336-344.
3. Braga, R.L., Mello, M.A.R., Gobatto, C.A., 2004. Continuous and intermittent exercise: effects of training and detraining on body fat in obese rats. *Arch Latinoam Nutr.* 54(1):58-65.
4. Bing-You, R.G., Denis, M.C., Rosen, C.J., 1993. Low bone mineral density in adults with previous hypothalamic-pituitary tumors: Correlations with serum

- growth hormone responses to GH-releasing hormone, insulin-like growth factor I, and IGF binding protein 3. *Calcif. Tissue Int.* 52(3):183-187.
5. Bulluaro, N., Mudo, G., Bindoni, M., 1990. Effects of early destruction of the mouse arcuate nucleus by monosodium glutamate on age-dependent natural killer activity. 534: 225-33.
 6. Dempster, D.W., Birchman, R., Xu, R., Lindsay, R., Shen, V., 1995. Temporal changes in cancellous bone structural of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16(1): 157-61.
 7. Eckstein, F., Hudelmaier, M., Putz, R., 2006. The effects of exercise on human articular cartilage. *J Anat.* 208(4): 491-512.
 8. Eckstein, F., Lemberger, B., Gratzke, C., Hudelmaier, M., Glaser, C., Englmeier, K-H., Reiser, M., 2005. In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status. *Ann Rheum Dis.* 64: 291-295.
 9. Forwood, M.R., 2001. Mechanical Effects on the Skeleton: Are There Clinical Implication? *Osteoporos Int.* 12:77-83.
 10. French, D.L., Muir, J.M., Webber, C.E., 2008. The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the sparing effects of curcumin. *Phytomedicine* 15(12): 1069-78.
 11. Frost, H.M., 1999. Joint anatomy, design and arthroses: insights of the Utan paradigm. *Anat Rec.* 255:162:174.
 12. Hamrick, M.W., Skedros, J.G., Pennington, C., McNeil, P.L., 2006. Increased osteogenic response to exercise in metaphyseal versus diaphyseal cortical bone. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 6(3):258-263.
 13. Hart, K.J., Shaw, J.M., Vadja, E., Hegsted, M., Miller, S.C., 2001. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J. Appl. Physiol.* 91:1663-1668.
 14. Iwamoto, J., Takeda, T., Sato, Y., 2005. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp. Anim.* 54(1):1-6.
 15. Jee, W.S.S., Yao, W., 2001. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact.* 1(3):193-207.
 16. Kalu, D.N., 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 15:175-191.
 17. Kim, Y.J., Bonassar, I.J., Grodzinsky, A.J., 1995. The role pf cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression. *J. Biomech.* 28:1055-66.
 18. Lundeen, G.A., Vadja, E.G., Bloebaum, R.D., 2000. Age-related cancellous bone loss in the proximal femur of Caucasian females. *Osteoporos. Int.* 11:505-511.
 19. Meites, J., 1888. Neuroendocrine biomarkers of aging in the rat. *Exp. Gerontol.* 23:349-358.
 20. Melton, S.A., Hegsted, M., Keenan, M.J., Morris, G.S., O'Neil, C.E., Zablah-Pimennel E.M., 2004. Water Exercise Prevents Femur Density Loss Associated with Oariectomy in the Retired Breeder Rat . *Journal of Strength and Conditioning Research.* 18(3), 508-512.
 21. Newton, P.M., Mow, V.C., Gardner, T.R., Buckwalter, J.A., Albright, J.P., 1997. The effect of lifelong exercise on canine articular cartilage. *Am. J. Sports Med.* 25:282-7.

22. Nordstrom, A., Olsson, T., Nordstrom, P., 2006. Sustained benefits from previous physical activity on bone mineral density in males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:2600-2604.
23. Nyska, M., Nyska, A., Swissa-Sivan, A., Samueloff, S., 1995. Histomorphometry of long bone growth plate in swimming rats. *Int J Exp Path* 76:241-245.
24. Ozeraitiene, V., Butenaite, V., 2006. The evaluation of bone mineral density based on nutritional status, age, and anthropometric parameters in elderly women. *Medicina (Kaunas)* 42(10): 836-841.
25. Plochocki, J.H., Riscigno, C.J., Garcia, M., 2006. Functional Adaptation of the femoral Head to Voluntary Exercise. *Anat. Rec.* 288(7): 776-81.
26. Rol De Lama, M.A., Perez-Romero, A., Ariznavarreta, M.C., Hermanussen, M., Tresguerres, J.A.F., 1998. Periodic Growth in rats. *Annals of Human Biology* 25: 441-451.
27. Rosén, T., Hansson, T., Granhed, H., Szucs, J., Bengtsson, B.A., 1997. Reduced bone mineral content in adult patients with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol.* 129(3):201-206.
28. Sah, R.L., Kim, Y.J., Doong, J.Y., Grodzinsky, A.J., Plaas, A.H., Sandy, J.D., 1989. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J. Orthop. Res.* 7:619-36.
29. Saville, P.D., 1969. Changes in the skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis. *J. Am. Geriatr. Soc.* 17:155-164.
30. Swissa-Sivan, A., Simkin, A., Leichter, I., Nyska, A., Nyska, M., Statter, M., Bivas, A., Menczel, J., Samueloff, S., 1989. Effects of swimming on bone growth and development in young rats. *Bone Miner* 7:91-105.
31. Swissa-Sivan, A., Azoury, R., Statter, M., Leichter, I., Nyska, A., Nyska, M., Menczel, J., Samueloff, S., 1990. The effects of swimming on bone modeling and composition in young adult rats. *Calcif Tissue Int* 47:173-177.
32. Thompson, M.C., Norton, N.S., Rodriguez-Sierra, J.F., Lippiello, L., 1994. Is glutamate-induced reduction in growth hormone-releasing hormone a neuroendocrine model of aging in the rat? *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206:69-75.
33. Thompson, M.C., Norton, N.S., Rodriguez-Sierra, J.F., Lippiello, L., 1996. Growth Hormone-Releasing Hormone Depletion in the Female Rat: Similarities to Aging. *Journal of Gerontology* 51A:B83-B90.
34. Turner, CH., 2002. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos. Int.* 13(2):97-104.
35. Turner, C.H., Robling, A.G., 2005. Mechanisms by which exercise improves bone strength. *J. Bone Miner. Metab.* 23(Suppl):16-22.
36. Tuukkanen, J., Peng, Z., Vaananen, H.K., 1991. Effect of exercise on osteoporosis Induced by ovariectomy in rats. *Calcif Tissue Int. Suppl* 49:S80.
37. Ulku, C., Bagis, S., Yalin, S., Ogenler, O., Yildiz, A., Sahin, N.O., Oguz, I., Hatungil, R., 2007. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin. Rheumatol.* 26:380-384.
38. Warner, S.E., Shea, J.E., Miller, S.C., Shaw, J.M., 2006. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif Tissue Int* 79:395-403.
39. Wuster, C., 2000. Fracture rates in patients with growth hormone deficiency. *Horm. Res.* 54(Suppl1):31-35.

Tabela 1. Valores do Diâmetro da Cabeça e da Área da Cartilagem Articular do Fêmur nos Grupos Experimentais.

<i>Grupos</i>	<i>Diâmetro da Cabeça do Fêmur (μm)</i>	<i>Área da Cartilagem Articular (μm^2)</i>
SALsed	3581,41 $\pm$ 154,35	639863,28 $\pm$ 108046,64
SALnat	3679,40 $\pm$ 215,01	653072,92 $\pm$ 166897,76
GluMOsed	3312,21 $\pm$ 147,91[*]	692324,22 $\pm$ 110513,57[†]
GluMONat	3206,38 $\pm$ 103,27	490136,27 $\pm$ 55806,32

Valores expressos em média $\pm$ DP; n= 06 animais por grupo. Teste *t* de Student.

^{*} SALsed vs. GluMOsed, [†] GluMOsed vs. GluMONat, $p \leq 0,05$.

Tabela 2. Valores médios da Espessura da Cortical da Diáfise do Fêmur nos grupos experimentais.

Grupos	<i>Espessura da Cortical da</i>	<i>Diáfise do Fêmur</i>
	<i>Medial</i>	<i>Lateral</i>
SALsed	550,72 ± 48,98	387,09 ± 58,74
SALnat	674,05 ± 36,74[*]	471,28 ± 39,31^{\$}
GluMOsed	388,44 ± 27,60[†]	296,07 ± 45,45[¥]
GluMOnat	357,56 ± 50,58	299,75 ± 40,64

Valores expressos em média ± DP; n= 06 animais por grupo. Teste estatístico: teste *t* de Student. ^{*} SALsed vs. SALnat, [†] GluMOsed vs. SALsed, ^{\$}SALsed vs. SALnat, [¥]GluMOsed vs. SALsed p≤0,05.

Tabela 3. Valores médios da Proporção Volumétrica da Epífise do Fêmur nos grupos experimentais.

<i>Grupos</i>	<i>Lateral</i>	<i>Intermédia</i>	<i>Medial</i>
SALsed	491,33 ± 296,5	380,17 ± 321,4	24,33 ± 46,1
SALnat	573,83 ± 297,6	487,83 ± 360,6	190,33 ± 113,1[†]
GluMOsed	479,33 ± 59,5[*]	319,00 ± 19,6	4,00 ± 7,6
GluMONat	206,3 ± 271,4	131,50 ± 204,3	7,17 ± 17,6

Valores expressos em média ± DP; n= 06 animais por grupo. Teste estatístico: teste *t* de Student. ^{*} GluMOsed vs. GluMONat, [†] SALsed vs. SALnat, p≤0,05.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se:

- A administração do Glutamato Monossódico durante o período neonatal de ratas prejudicou precocemente o desenvolvimento somático e ósseo dos animais. E estas consequências se mantiveram até a idade adulta.
- Em animais que receberam Glutamato Monossódico e foram ovariectomizadas houveram danos tanto no tecido ósseo trabecular como no compacto.
- O tecido ósseo de animais saudáveis foi beneficiado pelo treinamento de natação. Porém no estudo apresentado, no qual se obteve uma estrutura óssea frágil, esta atividade não estimulou o tecido ósseo.

- Analisar o comportamento das células ósseas no tecido ósseo dos animais do presente estudo.
- Avaliar histomorfometricamente o tecido ósseo do membro superior de animais utilizando a administração do Glutamato Monossódico e a ovariectomia;
- Analisar quais as repercussões de outros protocolos de treinamentos físicos como a corrida no tecido ósseo destes mesmos animais.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science** 164:719-721, 1969.

NEMEROFF, C.B.; LIPTON, M.A.; KIZER, J.S. Models of neuroendocrine regulation: Use of monosodium glutamate as an investigational tool. **Dev. Neurosci.** 1:102-109, 1978.

MEITES, J. Neuroendocrine biomarkers of aging in the rat. **Exp. Gerontol.** 23:349-358, 1988.

BADGER, T.M. *et al.* Hypothalamic-Pituitary function in the adult rats treated neonatally with monosodium glutamate. **Endocrinology** 111:203, 1982.

MILLARD, W.J. *et al.* Evidence that reduced growth hormone secretion observed in monosodium glutamate-related rats is the result of deficiency in growth hormone-releasing factor. **Endocrinology**, 110:540-550, 1982.

MAITER, D. *et al.* Neonatal Treatment with Monosodium Glutamate: Effects of Prolonged Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone Deficiency on Pulsatile GH Secretion and Growth in Female Rats. **Endocrinology**. 128:1100-1106;1991.

SAVILLE, P.D. Changes in the skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis. **J. Am. Geriatr. Soc.** 17:155-164, 1969.

DOWNEY, P.A.; SIEGEL, M.I. Bone Biology and Clinical Implications for **Osteoporosis**. 86:77-91, 2006.

BUCKWALTER, J.A. *et al.* Bone biology, part I: structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. **Instr Course Lect.** 45:371-386,1996.

HILL, P.A.; ORTH, M. Bone Remodeling. **British Journal of Orthodontics**. 25:101-107, 1998.

RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**. 45:1353-1358, 1999.

SKEDROS, J.G.; MASON, M.W.; BLOEBAUM, R.D. Modeling and remodeling in a developing artiodactyls calcaneus: a model for evaluating Frost's mechanostat hypothesis and its corollaries. **Anat Rec.** 2001; 167-185.

CANALIS, E. The hormonal and focal control of bone formation. **Endocrine Reviews**, 4,62-77,1983.

SOYKA, L.A.; FAIRFIELD, W.P.; KLIBANSKI, A. Hormonal determinants and disorders of peak bone mass in children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 85(11):3951-3963, 2000.

PARFITT, A. M. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis, **Metabolic Bone Disease Related Research**, 4, 1-6,1982.

OLNEY, R.C. Regulation of bone mass by Growth Hormone. **Med. Pediatr. Oncol.** 41:228-234, 2003.

RIGGS, B.L.; MELTON, III L.J. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. **Bone**, 17:505S-11S,1995.

HAWKER, G.A. The epidemiology of osteoporosis. **J. Rheumatol**, 23:2-5, 1996.

WHO STUDY GROUP. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. **WHO Technical Reports Series** ,843, 1994.

MELTON, III L.J.; RIGGS, B.L. Clinical spectrum. In: Riggs BL and Melton LJ III, eds. Osteoporosis: etiology, diagnosis and management. New York: Raven Press, 155-179, 1988.

RITTWEGER, J. Can exercise prevent osteoporosis? **J. Musculoskelet Neuronal Interact.** 6(2):162-166; 2006.

CHRISCHILLES, E.A.; BUTLER, C.D.; DAVIS, C.S.; WALLACE, R.B. A model of lifetime osteoporosis impact. **Arch Inter Med.** 151:2026-2032, 1991.

MELTON, III L.J. Hip fractures: a worldwide problem today and tomorrow. **Bone**, 14:S1-S8, 1993.

RUAN, X.Y. *et al.* Effects of vibration therapy on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **Chin Med J**, 5;121(13):1155-8,2008.

JILKA, R.L. Cytokines, bone remodeling, and estrogen: A 1998 update. **Bone** 23:75-8, 1998.

SEEMAN, E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. **Lancet**; 359:1841-50, 2002.

VAN DER EERDEN, B.C.J.; KARPERIEN, M.; WIT, J.M. Systemic and local regulation of the growth plate. **Endocr. Rev.**, 24,782-801, 2003.

DEMPSTER, D.W.; LINDASAY, R. Pathogenesis of osteoporosis. **Lancet**, 341, 797-801, 1993.

GRUMBACH, M.M. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. **J Pediatr Endocrinol Metab** 13,1439-1455, 2000.

LINDBERG, M.K. *et al.* Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in female mice. **J Endocrinol**, 171(2):229-36, 2001.

RODD, C.; JOURDAIN, N.; ALINI, M. Action of estradiol on epiphyseal growth plate chondrocytes. **Calcif Tissue Int**, 75(3):214-24, 2004.

HUGHES, D.E. *et al.* Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. **Nat Med** 1996; 2:1132-36.

MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr Rev.** 21:115-37, 2000.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner** 15:175-191; 1991.

OMI, N.; EZAWA, I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. **Bone** 17(4): 163S-168S.

DIAZ-CURIEL, M.; GALA, J.L. Is the ovariectomized rat an appropriate model to study osteoporosis in postmenopausal human subjects. **Revista Espanola de Enfermedades Metabólicas Óseas** 3,83-84, 1994.

GOLDSMITH, P.C. Neuroglial responses to elevated glutamate in the medial basal hypothalamus of the infant mouse. **J. Nutr.** 130:1032S-1038S, 2000.

HOLZWARTH-MCBRIDE, M.A.; HURST, E.M.; KNIGGE, K.M. Monosodium Glutamate induced lesions of the Arcus Nucleus. **Anat. Rec.** 186:185-196, 1976.

BLOCH, B. *et al.* Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. **Nature.** 301:607-608, 1983.

MERCHENTHALER, I. *et al.* Immunocytochemical localization of growth hormone-releasing factor in the rat hypothalamus. **Endocrinology**, 114:1082-1085, 1984

TAKASAKI, Y. Studies on brain lesion by administration of monosodium L-glutamate to mice. I. Brain lesions in infant mice caused by administration of monosodium L-glutamate. **Toxicology** 9:293-305.

LEMKEY-JONSTON, N.; BUTTLER, V.; REYNOLDS, W.A. Glial changes in the progress of a chemical lesion. An electron microscopic study. **J.Comp. Neurol.** 167:481-502, 1976

OLNEY, J.W. Glutamate- induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. **J. Neuropath. Exp. Neurol.**, 30:75-90, 1971.

BAKKE, J.L. *et al.* Late endocrine effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. **Neuroendocrinology**, 26:220-228, 1978.

INKSTER, S.E.; WHITEHEAD, S.A. Increased responsiveness of the hypothalamic-pituitary axis to steroid feedback effects in ovariectomized rats treated neonatally with monosodium L-glutamate. **Experimentia** 43, 1987.

WAKABAYSHI, I. *et al.* Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on plasma growth hormone (GH) response to GH-releasing factor in adult male and female rats. **Brain Research**, 372:361-365, 1986.

THOMPSON, M.C. *et al.* Growth Hormone-Releasing Hormone Depletion in the Female Rat: Similarities to Aging. **Journal of Gerontology**, 51A:B83-B90, 1996.

SPAGNOLI, A.; ROSENFELD, R.G. The mechanisms by which growth hormone brings about growth. The relative contributions of growth hormone and insulin-like growth factors. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.**, 25(3):615-631, 1996.

KASSEN, M. *et al.* Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblastic-like cells in vitro. **Calcif. Tissue Int.** 52(3):222-226, 1993.

KASSEN, M.; MOSEKILDE, L.; EIKSEN, E.F. Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. **Growth Regul.** 4(3):131-135, 1994.

OHLSSON, C. *et al.* Growth Hormone and Bone. *Endocrine Reviews*, 19(1):55-19, 1998.

RIGGS, B.L.; MELTON III L.J. The prevention and treatment of osteoporosis. **N Engl J Med.**, 327:620-627, 1992.

TURNER, C.H. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. **Osteoporos. Int.**, 13(2):97-104, 2002.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; SATO, Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. **Exp. Anim.**, 54(1):1-6, 2005.

FROST, H.M. Bone mass and the mechanostat: a proposal. **Anat. Rec.**, 219: 1-9, 1987.

FORWOOD, M.R. Mechanical Effects on the Skeleton: Are There Clinical Implication? **Osteoporos Int.**, 12:77-83, 2001.

HAGIHARA, Y. *et al.* How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? **J. Bone Miner Metab.**, 23(4):289-94, 2005.

KARATOSUN, H. *et al.* Effects of swimming training and free mobilization on bone mineral densities of rats with the immobilization-induced osteopenia. **Saudi Med J.**, 27(3):312-16, 2006.

SHIBATA, Y. *et al.* Effects of physical training on bone mineral density and bone metabolism. **J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.**, 22(4):203-208, 2003.

SWISSA-SIVAN, A. *et al.* The effects of swimming on bone modeling and composition in young adult rats. **Calcif Tissue Int**, 47:173-177, 1990.

KHAN, K. *et al.* Does childhood and adolescence provide a unique opportunity for exercise to strengthen the skeleton? **J. Sci. Med. Sport**, 3:150-64, 2000.

MACKELVIE, K.J. *et al.* A school-based exercise intervention augments bone mineral accrual in early pubertal girls. **J. Pediatr.** 139:501-8, 2001.

TURNER, C.H.; ROBLING, A.G. Mechanisms by which exercise improves bone strength. *J. Bone Miner. Metab.*, 23(Suppl):16-22, 2005.

HART, K.J. *et al.* Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. **J. Appl. Physiol.**, 91:1663-1668, 2001.

SWISSA-SIVAN, A. *et al.* Effects of swimming on bone growth and development in young rats. **Bone Miner**, 7:91-105, 1989.

Fontes Consultadas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. Informações e documentação – referências – elaboração: NBR 6023:2002. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. Informações e documentação – Citações em documentos – apresentação: NBR 10520:2002. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 03/08

Recife, 04 de janeiro de 2008

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE
Para: **Profa. Sílvia Regina Arruda de Moraes**
Departamento de Anatomia - UFPE
Processo nº 018024/2007-11

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEa sobre o projeto de pesquisa intitulado **“Influência do treinamento com natação sobre o tecido ósseo de ratas obesas e osteoporóticas”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEa-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEa