UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

LÍGIA DE ALBUQUERQUE MAIA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO E A DENSIDADE ÓSSEA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

JOÃO PESSOA
2010

LÍGIA DE ALBUQUERQUE MAIA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO E A HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof[a]. Dr.[a] Simone Bezerra Alves

JOÃO PESSOA
2010

M217e Maia, Lígia de Albuquerque.
Efeitos da suplementação de zinco e do treinamento físico sobre o metabolismo e a densidade óssea de ratas ovariectomizadas/ Lígia de Albuquerque Maia. – João Pessoa, 2010.
113f. :il.
Orientadora: Simone Bezerra Alves.
Dissertação (Mestrado) – UFPb - CCS

1.Nutrição – Suplemento de Zinco. 2. Densidade Óssea. 3. Exercício Terapêutico

UFPb/BC CDU: 612.39 (043)

Responsável pela catalogação: Maria de Fátima dos Santos Alves-CRB -15/149

LÍGIA DE ALBUQUERQUE MAIA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO E A DENSIDADE ÓSSEA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Nutrição.

Aprovada em : 05 de Março de 2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof.ª Dr.ª Simone Bezerra Alves (Orientadora) – Professora do Departamento de Fisioterapia da UFPB - Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof.ª Dr.ª Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves (Membro interno titular) - Professora do Departamento de Nutrição da UFPB - Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof.ª Dr.ª Luiza Sonia Rios Asciutti (Membro interno suplente) – Professora da Faculdade de Ciências Médicas - Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição – Centro de Ciências da Saúde - UFPB

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura (Membro externo titular) – Professor do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva (Membro externo suplente) – Professor do Departamento de Educação Física - Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dedico este trabalho aos meus pais, José Alberto e Eliane, por todo o empenho na educação e na formação do caráter de seus filhos.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, por ter guiado meus pensamentos e minhas mãos para desenvolver este trabalho e a quem peço luz todas as manhãs para que eu nunca desista dos meus objetivos;
- Aos meus pais, Alberto e Eliane, pela educação que me deram, pelo amor incondicional e pelos exemplos de caráter, força, dignidade e coragem que recebi durante toda a minha vida e pelas condições que me deram para ir em busca de conhecimento;
- Aos meus irmãos, Renato e Albertinho, por acreditarem no meu trabalho e pela paciência;
- À minha orientadora Prof.ª Simone por me receber e acreditar na minha capacidade, por todos os ensinamentos, pela paciência e, principalmente, pela amizade. Entrei no mestrado com uma orientadora, hoje saio com uma grande amiga;
- Ao Prof. Isac Almeida de Medeiros, por acreditar na relevância deste trabalho e abrir as portas do LTF;
- A Talita e aos alunos de iniciação cientifica, Plínio e Rafaela, pelo companheirismo e por toda a ajuda que foi imprescindível para a execução deste trabalho;
- A Crispim, por não só me receber no Biotério, mas também pelos cuidados com os animais e por me transmitir seus conhecimentos. Realmente, muito obrigada por tudo;
- Ao Sr. Luíz, por estar sempre disposto a ajudar-nos no Biotério, a minha coluna agradece;
- A todos que fazem parte do LTF por me receberem e me aceitarem;
- À Prof.ª Maria Luiza Pontual, pela competência e pelo conhecimento transmitido;
- À Prof.ª Cláudia Roberta Leite Vieira de Figueiredo, pela paciência e pelos ensinamentos sobre dissecação;
- Ao Prof. José Brandão Neto, pelas orientações sobre o zinco;
- A Naira, por se dispor a vir de Natal-RN para nos auxiliar no momento do sacrifício dos animais e coleta sanguínea;

- À Prof.ª Maria Aparecida Bezerra Quirino, também pelas orientações e por viabilizar nosso contato com a UFRN, o que foi muito importante para a realização deste trabalho;
- A Hosana Bandeira, pelas dosagens bioquímicas;
- À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro;
- Ao Prof. Egberto Gaspar de Moura, por tão gentilmente participar da Banca Examinadora deste trabalho;
- Ao Prof. Alexandre Sérgio Silva, por também participar da Banca Examinadora e pela incalculável colaboração;
- Aos colegas de mestrado, Alan, Eduardo e Lavoisiana, pela amizade, apoio e companheirismo durante as disciplinas, perto deles a caminhada foi mais agradável;
- À Prof.ª Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, pela compreensão, paciência e por acreditar no meu trabalho;
- Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, pelos ensinamentos e experiências transmitidos;
- Aos secretários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, em especial ao Sr. Carlos, que está sempre pronto a nos ajudar;
- Aos professores do Departamento de Fisioterapia, hoje meus amigos, Heleodório e Karen, por sempre acreditarem em mim e por terem acompanhado meus primeiros passos de vida acadêmica;
- Às minhas amigas, Amanda, Ana Karina, Patrícia, Adriana, Mariana e Larissa pelo incentivo e por estarem presente nos bons e maus momentos, sempre e para sempre;
- A todos da Vivance, pela compreensão, em especial a Aliana e a Suzana, por todos os "galhos quebrados";
- A todos que de alguma forma me permitiram chegar até aqui, e com certeza não foram esquecidos, apenas é impossível citar todos os nomes neste momento.

"Eu não sou quem eu gostaria de ser; eu ainda não sou quem eu poderei ser. Mas graças a Deus eu não sou mais quem eu era!"

Martin Luther King

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microradiografias do osso trabecular normal e osteoporótico 15

Figura 2: Ciclo de remodelação óssea 29

Figura 3: Efeitos da deficiência estrogênica no metabolismo ósseo 35

Figura 4: Ovariectomia 42

Figura 5: Ilustração da suplementação de zinco por gavagem. 43

Figura 6: Demonstração do sistema para o treinamento dos animais 44

Figura 7: Demonstração do colete com carga acoplado ao corpo do animal 45

Figura 8: Demonstração do filme posicionado sobre a plataforma de acrílico para padronização da distância foco-filme. 49

Figura 9: Fêmures, penetrômetro e lâmina de chumbo posicionados sobre o fime radiográfico. 49

Figura 10: Representação do gráfico de dispersão da densidade óptica líquida X espessura dos degraus em milímetros de alumínio, com sua respectiva equação e R quadrado. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Albumina
Ca	Cálcio sérico
Cox	Grupo controle ovariectomizado
CPP	Fosfopeptídeos de caseína
CT-x	Telopeptídeo carboxiterminal
DEN	Departamento de Energia Nuclear
DEXA	Densitometria óssea por absortimetria de raios-x em duas energias
DMO	Densidade mineral óssea
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DRI	Dietary Reference Intakes
ERα	Receptor estrogênico-α
ERβ	Receptor estrogênico-β
FAO	Food and Agriculture Organization
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica
IL-1	Interleucina-1
IL-11	Interleucina-11
IL-6	Interleucina-6
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
MBOs	Marcadores bioquímicos ósseos
MEIA	Imunoensaio Enzimático por Micropartículas
NTx	Telopeptídeo aminoterminal
P	Proteína total
PTH	Hormônio paratireóideo
RNA	Ácido Ribonucléico
S	Grupo Sham
TF	Grupo treinado
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Z	Grupo suplementado com zinco
Zn	Zinco
$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinco heptahidratado
ZTF	Grupo suplementado com zinco e treinado

RESUMO

A osteoporose é um sério problema de saúde pública, e cada vez mais, é reconhecida como enfermidade limitante da qualidade de vida, em especial para pessoas idosas. O papel do zinco na nutrição humana vem sendo bastante estudado. Vários hormônios e enzimas zinco-dependentes estão envolvidos no metabolismo ósseo. A atividade física tem sido defendida como um dos meios de promover aumento e manutenção da densidade mineral óssea (DMO). Sendo assim, esta pesquisa tem como objetivo determinar os efeitos da suplementação com zinco e/ou do treinamento físico com impacto limitado pelo meio aquático sobre o metabolismo e a densidade mineral óssea (DMO) de ratas ovariectomizadas. Desta forma, utilizou-se 60 ratas Wistar divididas em 5 grupos: Sham (S), controle ovariectomizado (Cox), zinco (Z), treinamento físico (TF) e zinco + treinamento físico (ZTF). Os grupos Z e ZTF receberam diariamente suplementação de zinco (25 mg/Kg de massa corporal) sob a forma de $ZnSO_4.7H_2O$ via oral (gavagem) durante 9 semanas. Os grupos TF e ZTF realizaram um protocolo de saltos aquáticos com carga progressiva três vezes por semana durante 10 semanas. Os parâmetros foram analisados por meio do teste t *student* pareado e ANOVA *one way* com *post hoc* de *Newman-Keuls*. Quando necessário, o teste ANOVA foi substituído pelo seu equivalente não paramétrico *Kruskal-Walli.* Adotou-se um nível de significância de 5% para todos os testes. A concentração sérica de fosfatase alcalina foi maior no grupo Cox ($p < 0,01$) quando comparado aos grupos C ($p < 0,01$) e ZTF ($p < 0,05$). A análise da DMO mostrou que esta foi maior para os grupos TF ($p < 0,05$) e ZTF ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos Cox e Z para as regiões da cabeça e colo cirúrgico femorais. Então, pode se observar que a suplementação de zinco não foi eficaz em promover aumento do metabolismo ósseo e da DMO, porém o protocolo de treinamento físico conseguiu intensificar a resposta osteogênica em ratas osteopênicas de maneira região dependente, podendo constituir uma modalidade terapêutica alternativa mais eficaz a ser utilizada no tratamento e na prevenção de perda óssea.

Palavras-chave: zinco, osso, densidade óssea, exercício terapêutico

ABSTRACT

Osteoporosis is a serious public health problem, and increasingly is recognized as a disease limiting quality of life, especially for the elderly. The role of zinc in human nutrition has been extensively studied. Several hormones and zinc-dependent enzymes are involved in bone metabolism. Physical activity has been advocated as a means to increase and maintain bone mineral density (BMD). Thus, this study aims to determine the effects of zinc supplementation and/or physical training with limited impact on the aquatic environment in bone metabolism and bone mineral density (BMD) in ovariectomized rats. Sixty (60) Wistar female rats were divided into 5 groups: Sham (S), ovariectomized control (Cox), zinc (Z), physical training (PT) and zinc + physical training (ZTF). The groups Z and ZTF received daily zinc supplementation (25 mg/kg of body weight) in the form of ZnSO4.7H2O by gavage for 9 weeks. Groups TF and ZTF performed a progressive loading exercise program of jumps in water three times a week for 10 weeks. The parameters were analyzed using Student t test and one-way ANOVA with post hoc Newman-Keuls. When necessary, ANOVA one way was replaced by its equivalent non-parametric Kruskal-Walli. A significance level of 5% was adopted for all tests. Serum alkaline phosphatase was higher in Cox ($p < 0.01$) when compared to the groups C ($p < 0.01$) and ZTF ($p < 0.05$). The BMD analysis showed that it was greater for TF ($p < 0.05$) and ZTF ($p < 0.05$) when compared to Cox and Z groups for the femoral head and femoral neck surgery. Therefore, zinc supplementation was not effective in increasing bone turnover and BMD, but the physical training protocol was able to enhance the osteogenic response in osteopenic rats in a region dependent way, and may constitute a more effective therapeutic modality for use in the treatment and prevention of bone loss.

Key-words: zinc, bone, bone density, exercise therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REFERENCIAL TEÓRICO 15
2.1 Osteoporose 15
2.2 Zinco 17
2.2.1 Funções do Zinco 18
2.2.2 Zinco e metabolismo ósseo 19
2.2.3 Recomendações nutricionais e fontes 21
2.2.4 Sistemas de absorção e excreção do zinco 22
2.2.5 Fatores que influenciam a biodisponibilidade do zinco 23
2.2.6 Deficiência nutricional de zinco 26
2.3 Remodelação Óssea 28
2.3.1 Estrogênio e metabolismo ósseo 31
2.3.2 Modelos Animais 34
2.3.3 Atividade física e densidade mineral óssea 36
3. METODOLOGIA 40
3.1 Ovariectomia 41
3.2 Delineamento do estudo 42
3.3 Suplementação de zinco 43
3.4 Protocolo de treinamento físico 44
3.5. Obtenção da massa corpórea dos animais e controle do consumo de ração 46
3.6 Sacrifício dos animais 47
3.7 Coleta Sanguínea 47
3.8 Coleta dos fêmures 47
3.9 Determinação da massa e do tamanho dos fêmures 48
3.10 Estudo da Radiopacidade 48
3.10.1 Seleção do tempo de exposição 48
3.10.2 Exposição dos espécimes, penetrômetro e dos corpos de prova 49
3.10.3 Processamento dos filmes radiográficos 50
3.10.4 Mensuração das densidades ópticas 50
3.10.5 Conversão dos valores das densidades ópticas em milímetros de alumínio (mmAl) 50
3.11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos 51
3.11.1 Concentração sérica de estradiol 51
3.11.2 Determinação da atividade da fosfatase alcalina 52
3.11.3 Determinação das concentrações séricas do cálcio total e ionizado 52
3.12 Análise estatística 53
4. REFERÊNCIAS 54
5. APRESENTAÇÃO DO ARTIGO 64
6. ANEXO I: ARTIGO 65

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é um sério problema de saúde pública. O envelhecimento populacional dos Estados Unidos leva a um aumento no número de mulheres que desenvolvem osteoporose. Entre as mulheres de 80 anos de idade, 97% têm osteopenia ou osteoporose. Na Europa, 23% das mulheres com idade de 50 anos ou mais têm osteoporose (DENNISON; COOPER, 2000). Estimativas sugerem que uma em cada duas mulheres apresentará uma fratura osteoporótica em algum momento de sua vida (SHAPSES et al., 2000).

O tecido ósseo é bastante rico em minerais como, por exemplo, cálcio, fósforo e zinco. Os ossos têm uma das maiores concentrações de zinco de todos os tecidos. Ele é o elemento mais abundante neste tecido, estando presente numa concentração de até 300 mg/g (ROSSI et al., 2001).

O papel do zinco na nutrição humana vem sendo bastante estudado, havendo um progresso dos conhecimentos no que diz respeito aos aspectos bioquímicos, imunológicos e clínicos. Vários hormônios e enzimas zinco-dependentes estão envolvidos no metabolismo ósseo. Por exemplo, o zinco pode estimular a atividade da enzima fosfatase alcalina, que está envolvida na deposição mineral óssea. As alterações ósseas, incluindo atraso na maturação, redução da atividade da fosfatase alcalina, redução da massa óssea na pré-menopausa e pós-osteoporose, têm sido associadas à deficiência de zinco. Pesquisadores mostraram que deficiência de zinco em ratos resulta numa redução do crescimento e do volume ósseo e da sobrecarga necessária para provocar fraturas (ROSSI et al., 2001). Hosea et al. (2004) encontraram uma relação direta entre zinco sérico, velocidade de crescimento e maturação óssea em crianças.

Scrimgeour et al. (2007) constataram que uma carência moderada de zinco afeta a integridade óssea em ratos, independente do consumo alimentar e do peso corporal. Porém, o

envolvimento e a significância clínica deste mineral no metabolismo ósseo necessitam de pesquisas adicionais em modelos animais e humanos, a fim de se elucidar os seus efeitos nas propriedades ósseas.

Cada vez mais, a osteoporose é reconhecida como enfermidade limitante da qualidade de vida em especial para pessoas idosas. A perda de independência, decorrente da incapacidade de deambular, é a principal conseqüência da fratura de quadril, seja por limitação funcional ou por medo de quedas. Essa inatividade física leva à piora da osteoporose e aumenta ainda mais os riscos de quedas e novas fraturas (GALSWORTHY; WILSON, 1996).

A atividade física induz um aumento da carga mecânica que age sobre o tecido ósseo devido a forças externas e contrações musculares. O aumento da carga mecânica gera uma força de tensão, que impede a remodelação dos ossos e conserva ou aumenta a massa óssea (BARENGOLTS et al., 1994; PENG et al., 1994). Turner e Robling (2005) afirmaram que cargas mecânicas em ossos criam um gradiente dentro da rede lacunar-canalicular preenchida pelos fluidos ósseos que promove uma cascata de eventos celulares, incluindo a elevação dos níveis de cálcio intracelulares, da expressão de fatores de crescimento e aumento da produção de matriz óssea.

Entretanto ainda existe divergência na literatura a respeito do melhor tipo de treinamento para estimular a formação óssea. Vários autores estudaram os benefícios do exercício físico de grande impacto na estimulação da formação óssea e na regulação da sua manutenção, prevenindo o desenvolvimento da osteoporose. (WOLFF et al., 1999; BORER, 2005; HEIKKINEN et al., 2007). Entretanto, resultados de pesquisas que limitaram o impacto em meio aquático ou mesmo que fizeram uso da natação mostraram um favorecimento da qualidade óssea (SNYDER et al.,1992; BOURRIN et al., 1995; HART et al., 2001; YUNG et al., 2005).

Diante das divergências e do pouco conhecimento a respeito do papel do zinco e da importância do treinamento físico sobre o metabolismo ósseo, esta pesquisa tem como objetivo determinar os efeitos da suplementação com zinco e/ou do treinamento físico com impacto limitado pelo meio aquático, no metabolismo e na densidade mineral óssea (DMO) de ratas ovariectomizadas. Além disso, se busca compreender se estes tratamentos podem interferir na qualidade óssea em idade mais avançada. Assim, pode-se ter maior clareza sobre se este treinamento físico pode ser capaz de proporcionar melhora da saúde óssea, bem como se pode compreender melhor os efeitos da suplementação de zinco nesse tecido, abrindo perspectivas para sua utilização como terapia em patologias que afetem o metabolismo ósseo, como a osteoporose.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OSTEOPOROSE

A osteoporose é um distúrbio ósseo caracterizado por perda de massa óssea, resultando em enfraquecimento dos ossos e em aumento da susceptibilidade a fraturas (RENNO et al., 2007). A figura 1 mostra a microradiografia do osso trabecular normal e osteoporótico evidenciando o padrão das trabéculas com afilamento e desconexão no caso de osteoporose.

Figura 1: Microradiografias do osso trabecular normal e osteoporótico (adaptado de EDDY et al., 1998).

Esta é uma doença de grande importância socioeconômica, tendo sido reconhecida como um importante problema de saúde pública mundial devido à sua alta prevalência, em função de seus efeitos devastadores na saúde física, psicológica e social, com grandes prejuízos financeiros (KOWALSKI; SJENZFELD; FERRAZ, 2001; GRANITO et al., 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 1/3 das mulheres brancas acima de 65 anos possuem a doença (MORAIS; CARVALHO, 2001). A partir de dados do IBGE, Oliveira (2000) constatou que em 1994, o Brasil apresentava uma população de 150 milhões de pessoas com 10 a 12% acima de 60 anos de idade. Com base nesses dados, pressupõe-se uma população osteoporótica de 2,5 milhões de indivíduos, estando as fraturas de quadril na casa dos 105 mil casos anuais. Torna-se, portanto, óbvia a necessidade do amplo conhecimento da patologia.

A repercussão econômica da osteoporose se traduz em custos extremamente elevados, sendo, direta ou indiretamente, gastos cerca de 14 bilhões de dólares anuais somente nos Estados Unidos, prevendo-se ainda que as despesas possam triplicar. No Brasil, levando-se em conta que a maioria dos pacientes fraturados (70 a 80%) é internada e tratada em hospitais públicos, gera-se um custo para os cofres públicos de quase 505 milhões de reais por ano (BÁLSAMO, 2002). Segundo Kowalski, Sjenzfeld e Ferraz (2001) os custos médios totais anuais com o tratamento dos pacientes com osteoporose pósmenopausa sob a perspectiva da sociedade do sistema público em São Paulo no ano de 1998 foram de R$ 908,18/paciente/ano.

A etiologia da perda de massa óssea é complexa, multifatorial, inclui hereditariedade, etnia, idade avançada, baixo peso corporal, deficiência hormonal, excessivo consumo de álcool, tabagismo, fatores nutricionais e inatividade física (CARVALHO; FONSECA; PEDROSA, 2004). A osteoporose, depois de diagnosticada, não tem cura, ou seja, ainda não existe nenhum tratamento que seja realmente efetivo, o que aumenta bastante o interesse em preveni-la e a falta de prevenção deverá resultar em algum tipo de fratura para a metade das mulheres ao redor dos 70 anos e para 2 em cada 3 mulheres aos 80 anos de idade (NORDSTROM; NORDSTROM; LORENTZON, 1997).

Desta forma observa-se que a osteoporose não traz apenas conseqüências econômicas, físicas e funcionais, mas também seqüelas sociais. Os pacientes adotam um estilo de vida

sedentário e mais isolado socialmente, não só pela dor, mas pelo medo de fraturas. Esse medo associado à deformidade progressiva, dor, inatividade e alteração do equilíbrio contribui para a instalação de depressão e progressivo declínio da função (DRIUSSO et al., 2000).

2.2 ZINCO

O zinco faz parte do grupo IIB da tabela periódica; seu número atômico é 30; sua massa atômica, 65.380; seu ponto de fusão, 419,5ºC; e seu ponto de ebulição, 908ºC. Trata-se de um metal sólido, branco-azulado, praticamente insolúvel em álcool e água, mas solúvel em ácidos diluídos (CANTERO, 1989). Este micronutriente difere dos outros metais de transição por conter a camada eletrônica "d" completa e, portanto, não participa de reações redox, mas age como ácido de Lewis para aceitar um par de elétrons, sendo desta forma, um íon estável.

O zinco ocorre naturalmente como cinco isótopos estáveis: ^{64}Zn, ^{66}Zn, ^{67}Zn, ^{68}Zn, e ^{70}Zn. Geralmente se complexa com aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos e tem afinidade com grupos tióis e hidrogênio (MAFRA; COZZOLINO, 2004).

Ele é considerado um oligoelemento, ou seja, um elemento que se apresenta em quantidades diminutas no organismo, representando apenas 0,003% (1,4 a 2,5 g) do corpo humano. É considerado o segundo elemento-traço mais prevalente no organismo. As maiores concentrações corporais estão na musculatura esquelética (57%), ossos (29%), pele (5%), cérebro (1,5%), rins (0,7%), coração (0,4%), cabelo (0,1%) e plasma sanguíneo (0,1%) (KING, 2000; WEISS; SENSI; KOH, 2001).

2.2.1 FUNÇÕES DO ZINCO

Como um componente estrutural e/ou funcional de várias metaloenzimas e metaloproteínas, o zinco participa de muitas reações do metabolismo celular, incluindo processos fisiológicos, tais como função imune, defesa antioxidante, crescimento e desenvolvimento (SZCKUREK; BJORNSSON; TAYLOR, 2001).

O entendimento das funções do zinco no metabolismo teve início em 1869 com Raulin, que descobriu sua essencialidade para *Aspergillus niger*. Quarenta anos mais tarde, Mazé descreveu problemas no cultivo de milho pela falta de zinco. Todd, Evehjem e Hart, em 1934, descobriram sua essencialidade para ratos, e, mais tarde, em 1955, Tucker e Salmon descobriram problemas na pele do ser humano, decorrentes da deficiência de zinco. Em 1960, O'Dell observou que este mineral era essencial para crianças. Várias pesquisas se seguiram demonstrando que a deficiência de zinco era revertida pela suplementação (SANDSTEAD, 1994).

No organismo humano, sua essencialidade foi comprovada há cerca de 45 anos e, desde então, muitos esforços científicos têm-se voltado para o estudo deste mineral, com um grande número de pesquisas na área (PRASAD, 1996; SALGUEIRO et al., 2000; MAFRA; COZZOLINO, 2004; SINGH, 2004). Kaplan et al. (2007) consideram o zinco como o mineral que tem sido o maior foco de pesquisas do século XXI.

Pesquisas nas áreas de nutrição, fisiologia, medicina e bioquímica vêm aclarando o conhecimento das várias funções do zinco. Dentre muitos papéis fisiológicos, o zinco é componente funcional e/ou estrutural de mais de 300 enzimas, muitas delas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (SANDSTEAD, 1994); está envolvido na estabilização de membranas estruturais e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica (POWELL, 2000); é indispensável para a atividade de enzimas participantes da

síntese de DNA e RNA; influencia a divisão celular (VALLE; FALCHUK, 1993); participa do estímulo pós-receptor, o qual aumenta a translocação dos transportadores de glicose dos seus sítios intracelulares para a membrana plasmática (MAFRA; COZZOLINO, 2004); está relacionado com células do sistema imunológico, incluindo atividades das células T-Helper, desenvolvimento de linfócitos T-citotóxicos, hipersensibilidade retardada, proliferação de linfócitos T, produção de interleucina – 2 e morte programada de células de origem mielóide e linfóide (BAUM; POSNER-SHOR; CAMPA, 2000); está presente em botões sinápticos implicando papel vital, porém ainda pouco esclarecido, no córtex cerebral (FREDERICKSON et al., 2000). Além de todas as funções anteriormente citadas, o zinco ainda desempenha importante papel na regulação do apetite (SHAY; MANGIAN, 2000), estando envolvido na produção e/ou secreção de hormônios reguladores do metabolismo energético como a insulina e leptina (SHAY; MANGIAN, 2000; OTT; SHAY, 2001). Além disso, o zinco exerce papel essencial na estrutura e função de enzimas consideradas essenciais, como por exemplo a fosfatase alcalina, enzima importante para o metabolismo de formação óssea.

2.2.2 ZINCO E METABOLISMO ÓSSEO

O zinco parece desempenhar vários papéis sobre o metabolismo ósseo. Matsui e Yamaguchi (1995) demonstraram em pesquisa com culturas de células que o zinco aumenta o efeito anabólico do fator de crescimento insulínico nos osteoblastos, que são responsáveis pela formação e mineralização da matriz extracelular do osso durante a ossificação endocondral. Moonga e Dempster (1995) estudaram os seus efeitos em osteoclastos de ratos, e observaram que o zinco exerce um efeito inibitório na atividade dos osteoclastos *in vitro*, impedindo a reabsorção óssea. Enquanto que Peretz, Papadopoulos e Willems (2001)

observaram maior atividade osteoblástica evidenciada pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina após realizar suplementação oral de zinco em homens saudáveis por 12 semanas.

Yamaguchi e Ehara (1994) estudaram a alteração do metabolismo ósseo a partir da redução do teor de zinco na metáfise femoral de ratos, mostrando que a retirada da carga das forças musculares que agem sobre o tecido esquelético causou uma redução significante na atividade da fosfatase alcalina e da expressão do DNA. Estes autores observaram que estas reduções foram completamente restauradas por meio da adição de sulfato de zinco ou β-alanil-L-histidinato de zinco a uma cultura de tecidos metafisários *in vitro.* Com os resultados, estes autores sugerem que o desgaste esquelético induzido pela diminuição da concentração de zinco no fêmur de ratos desempenha um papel importante na deterioração do metabolismo ósseo.

Ilich e Kerstetter (2000) constataram haver correlação positiva entre o conteúdo de zinco nos ossos e a força óssea, sugerindo que ele desempenha um papel importante na saúde óssea. Ele inibe a diferenciação dos osteoclastos e promove a atividade osteoblástica. Além disso, aumenta a concentração dos fatores de crescimento ósseo e a matriz protéica que estão envolvidos na estimulação da proliferação osteoblástica e da formação óssea.

Mir et al. (2007) observaram que o zinco tem uma associação positiva com a DMO em homens com mais de 40 anos e que a sua deficiência é mais comum em indivíduos com osteoporose. Os mesmos indivíduos que apresentavam osteoporose possuíam concentrações de zinco sérico e plasmático reduzido, bem como aumento da excreção urinária deste mineral. Estes dados estão de acordo com Hyun, Barret-connor e Milne (2004) que mostraram que as concentrações plasmáticas de zinco eram mais baixas em homens com osteoporose do que naqueles sem a doença.

Hiperzincúria parece indicar aumento da reabsorção óssea associada ao envelhecimento. Evidências adicionais sugerem que o zinco ósseo é perdido nos períodos de

deficiência de cálcio, que é pronunciada em mulheres em processo de envelhecimento e que necessitam de um aporte de cálcio maior que o habitual. Sendo assim, hiperzincuria juntamente com uma ingestão inadequada de zinco e uma reabsorção óssea aumentada em mulheres pós-menopausadas, aumentam o risco de desenvolver deficiência deste mineral nestas mulheres (HERZBERG et al., 1990).

2.2.3 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS E FONTES DE ZINCO

As necessidades humanas de zinco diferem de acordo com sexo e faixa etária. As recomendações de ingestão (*DRIs - Dietary Reference Intakes*) propostas pelo Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos foram recentemente modificadas, uma vez que para mulheres sadias é de 8 mg/dia, enquanto que para homens é de 11 mg/dia, sendo o limite máximo tolerado de ingestão diária de 40 mg/dia para ambos os sexos (FNB, 2001).

O zinco é encontrado tanto em alimentos de origem animal quanto vegetal, porém, quando derivado de carnes, geralmente é mais biodisponível que o derivado de cereais. (CANTERO, 1989). O conteúdo de zinco varia bastante de um alimento para outro, sendo encontrado na quantidade de 0,002 mg/100 gramas de clara de ovo e até 75 mg/100 gramas de ostras. As principais fontes alimentares deste mineral são mariscos, ostras, carnes vermelhas, fígado, miúdos e ovos. As nozes e leguminosas são fontes relativamente boas de zinco (SANDSTRÖM, 1997).

2.2.4 SISTEMAS DE ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DO ZINCO

O zinco é absorvido ao longo do intestino delgado, principalmente no jejuno e íleo, e quantidades diminutas são absorvidas no estômago e intestino grosso. A absorção ocorre por transporte ativo (saturável) e passivo (difusão), sendo absorvido de 20 a 30% do zinco ingerido. A presença de glicose no lúmen intestinal auxilia a absorção na borda em escova das células absortivas do intestino delgado (VALLEE; FALCHUK, 1993). Na gravidez há aumento da absorção, e, a cada 1 mg/dia absorvido, 0,7 mg é transferido para o feto (KING, 2000).

Após ser absorvido, o zinco é liberado pela célula intestinal, passa para os capilares mesentéricos e é transportado no sangue portal, sendo captado pelo fígado e distribuído para os outros tecidos. Os genes envolvidos no transporte do zinco codificam proteínas na membrana celular e são responsáveis pelo efluxo deste mineral a tecidos como intestino, rins, fígado, ossos, testículos, cérebro e glândulas mamárias (COUSINS; MCMAHON, 2000).

A metalotioneína citoplasmática, principal enzima envolvida no seu metabolismo, pode ligar até sete átomos de zinco. Sua principal função está na regulação do metabolismo corporal total de zinco. Esta enzima capta o mineral para que ele possa ser utilizado pelo enterócito ou passar para a circulação portal, onde será transportado pela albumina (SALGUEIRO et al., 2000; FISBERG; BARROS, 2008.).

Cerca de 1/3 do zinco transportado pela albumina alcança o fígado e então segue para outros tecidos, podendo estar ligado à albumina, a aminoácidos ou à α-2-macroglobulina. Em órgãos como pâncreas, rins e baço, o zinco possui meia-vida de 12,5 dias, ao contrário de cérebro e ossos onde se renova bem mais lentamente, com uma meia-vida de 300 dias (FISBERG; BARROS, 2008).

O zinco é perdido do organismo por meio dos rins, da pele e do intestino. As perdas endógenas intestinais podem variar de 0,5 a 3,0mg/dia. Sob condições normais, 95% do zinco da fração filtrável do plasma é reabsorvido na parte distal do túbulo renal. As perdas urinárias variam de 300-600mg/dia, influenciadas por mecanismos de secreção no túbulo proximal do néfron (VALLEE; FALCHUK, 1993).

Portanto, o zinco não é estocado e a principal forma de controle corporal deste mineral é a quantidade absorvida da dieta, podendo variar ainda de acordo com o estado nutricional do indivíduo (FISBERG; BARROS, 2008).

Segundo Krebs et al. (1996), a absorção e a excreção de zinco obedecem a sistemas de auto-regulação com elevado nível de desenvolvimento e sensibilidade, proporcionando reajustes de estoques reguladores e mantendo a homeostase, mesmo com oferta de zinco no limite inferior da normalidade.

2.2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODISPONIBILIDADE DO ZINCO

A simples presença do nutriente na dieta não garante sua utilização pelo organismo. Alguns fatores podem afetar a biodisponibilidade do zinco na dieta. O conteúdo de fitato, por exemplo, reduz a biodisponibilidade de zinco (ZHOU; ERDMAN, 1995). O ferro, cálcio e cobre também podem limitar sua absorção (LÖNNERDAL, 2000). Já as fibras, taninos e cafeína parecem não afetar a utilização do zinco pelo organismo (ZHOU; ERDMAN, 1995).

O zinco é encontrado tanto em alimentos de origem animal quanto vegetal, porém, quando derivado de carnes, geralmente é mais biodisponível que o derivado de cereais; a absorção é influenciada por fatores dietéticos e inibida por fitato, teores elevados de fibra, oxalato, cobre, ferro e estanho, mas é potencializada pela proteína animal. A diminuição de sua absorção pode ocorrer devido a doenças intestinais, e o aumento de sua excreção, por

hiperzinciúria decorrente de patologias renais (PRASAD, 1996). Existem fatores intraluminais facilitadores da absorção de zinco como: aminoácidos (histidina e metionina), fosfatos, ácidos orgânicos e algumas prostaglandinas (LÖNNERDAL, 2000).

O conteúdo de fitato presente em alimentos como cereais, milho, arroz, reduz a biodisponibilidade de Zn. O`Dell (1969) e Vohra e Kratzer (1964) foram os primeiros a mostrar que o fitato tem um efeito inibitório sobre o zinco. A razão molar fitato:Zn de 20 já pode produzir efeito negativo, pois o fitato é carregado negativamente; logo, tem um forte potencial para ligar cátions bivalentes, tais como o zinco, impedindo assim sua absorção (ZHOU; ERDMAN, 1995). Hexafosfato inositol e pentafosfato são as formas de fitato que exercem este efeito negativo, enquanto que outros fosfatos têm pouco ou nenhum efeito sobre a absorção de zinco (LÖNNERDAL, 2000).

Ao compilar os resultados de várias pesquisas com os seres humanos, em que várias fontes e montantes de proteína tinham sido administradas, a fração de absorção de zinco aumentou linearmente com o aumento do conteúdo protéico (SANDSTRÖM, 1992). Proteínas específicas como a caseína tem efeito inibitório na absorção. Entretanto, deve ser salientado que a proteína é uma das principais fontes de zinco dietético, então alimentos com maior teor de proteínas resultam em um aumento da ingestão de zinco. Assim, em geral, aumento da dieta protéica leva a uma maior ingestão de zinco e uma maior biodisponibilidade deste mineral (LÖNNERDAL, 2000).

Os fosfopeptídeos de caseína (CPP), que são formados durante a sua digestão, podem afetar a absorção de zinco de forma diferente da caseína como tal. Esses pequenos peptídeos contêm resíduos fosforilados de treonina e serina que, dependendo da proximidade dos grupos fosfato carregados negativamente, podem se ligar a íons como o zinco (LÖNNERDAL, 1997). Hansen, Sandström e Lönnerdal (1996) verificaram que a adição de CPP a soluções

contendo fitato aumentou significativamente a absorção de cálcio e de zinco em ratos filhotes, bem como em células intestinais de humanos (Caco-2) em cultura.

Outro estudo mostrou que a adição de CPP associado à alta concentração de fitato no mingau infantil de humanos não tinha qualquer efeito na absorção de zinco, enquanto que um efeito estimulatório foi encontrado para um mingau a base de arroz com teor muito baixo de fitato (HANSEN et al., 1997a). Assim, o efeito do CPP pode ser dependente da composição da refeição, especialmente seu conteúdo de fitato. Isto também pode explicar a ausência de um efeito de CPP sobre absorção de zinco em refeições com pão. Também é possível que um efeito benéfico do CPP seja mais pronunciado em refeições líquidas do que com alimentos sólidos (por exemplo, mingau, pão). Por último, CPP parece ser potencialmente mais ativo quando é formado durante a digestão do que quando ingerido pré-formado; qualquer efeito sobre a absorção de zinco pode, na realidade, depender da liberação e da digestão de aminoácidos a partir do CPP, o que por si podem afetar positivamente a absorção de zinco (HANSEN et al., 1997b).

O ferro, se fornecido junto com Zn como suplemento pode ter efeito negativo na absorção do Zn, enquanto que nenhum efeito é observado quando os mesmos montantes estão presentes em uma refeição (LÖNNERDAL, 2000). Com relação ao cálcio, parece improvável que este tenha um efeito negativo sobre a absorção do zinco. Lönnerdal et al. (1984) adicionaram cálcio ao leite de vaca em um nível de aproximadamente 1300 mg/L e não encontraram diferença significativa na absorção de zinco quando compararam à fórmula tradicional com o nível de 500mg/L de cálcio. De acordo com Yan et al. (1996) também parece que o uso de suplementos de cálcio não interfere na absorção, pois em sua pesquisa as mulheres que foram suplementadas com 1000 mg/dia de cálcio apresentaram a mesma concentração de zinco plasmático que aquelas que não receberam o suplemento. Entretanto, o cálcio dietético pode afetar negativamente a absorção a partir de alimentos ricos em fitato,

devido ao fato de que o mesmo tem propensão a formar complexos insolúveis com fitato e com o zinco (LÖNNERDAL, 2000).

A absorção de zinco a partir de soluções aquosas é muito diferente da que é a partir de refeições sólidas (SANDSTRÖM et al., 1985; SANDSTRÖM, 1992). A compilação de dados de absorção em pesquisas com zinco em seres humanos mostra que a quantidade de zinco absorvido a partir de uma única refeição sólida é normalmente em níveis de 18-20 µmol, enquanto que a absorção a partir de soluções de água pode atingir níveis de 80-100 µmol (SANDSTRÖM, 1992; LÖNNERDAL, 1997). Estas pesquisas claramente ilustram que diferentes considerações devem ser feitas quando zinco é administrado como um suplemento, separado das refeições, e quando ele é parte de uma refeição ou adicionado aos alimentos como um fortificante.

A suplementação de oligoelementos na dieta de animais tradicionalmente tem sido conseguida por meio da utilização de sais inorgânicos. No entanto, uma vez que um conjunto de fatores intrínsecos e extrínsecos é conhecido por afetar a biodisponibilidade de oligoelementos dietéticos, esforços contínuos têm sido feitos ao longo dos anos para melhorar a sua utilização pelos seres humanos e animais (BUZADZIC et al., 2002).

2.2.6 DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL DE ZINCO

O retardo no crescimento foi a primeira manifestação da deficiência de zinco descrita em humanos (SALGUEIRO et al., 2000). Em crianças e adolescentes, retardo no crescimento e desenvolvimento pode ser evidente muito antes que outros sinais da deficiência sejam reconhecidos. Em virtude do zinco ser necessário para a síntese protéica, bem como para replicação e transcrição do DNA, este metal exerce forte influência sobre a divisão e

diferenciação celular. Este parece ser o mecanismo pelo qual a deficiência de zinco retarda o crescimento em animais e em humanos (TAKEDA, 2000).

Depois da deficiência do mineral estar instalada por algum tempo, podem ser observados outros sinais, como hipogonadismo, retardo no desenvolvimento genital e maior morbidade e mortalidade por diarréia, pneumonia e outras infecções, além de prejuízo na função cerebral (MARET; SANDSTEAD, 2006). Em contrapartida, uma das últimas manifestações da deficiência grave de zinco é a dermatite. Outras possíveis manifestações são: intolerância a glicose, anorexia, alopecia, alterações de paladar, oligospermia, impotência sexual, adaptação anormal ao escuro (por restrição da utilização da vitamina A), lentidão na cicatrização, letargia mental, desordens emocionais e de comportamento, dificuldades de memorização e de aprendizado, entre outros. Na gestação, observa-se o aumento no risco de aborto e também o aumento da prevalência de defeitos na formação do tubo neural de fetos (PRASAD, 1996; SALGUEIRO et al., 2000; SILVA-SANTANA et al., 2002).

A deficiência de zinco é conhecidamente disseminada no mundo todo. A *Food and Agriculture Organization* (FAO) estima que a prevalência mundial da deficiência deste mineral possa estar em torno de 40% (MARET; SANDSTEAD, 2006). Algumas estimativas sugerem que esta deficiência possa ser o maior problema de saúde pública em muitas regiões do mundo (SALGUEIRO et al., 2000; BRYAN et al., 2004), afetando igualmente grupos populacionais de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nos países em desenvolvimento, isso parece ser especialmente verdadeiro, pois em geral a dieta contém baixos níveis de proteína animal e altos níveis de fitatos e fibras (HAMADANI, et al., 2002).

Pesquisa realizada nos Estados Unidos e em países latino-americanos mostra que a ingestão média de zinco varia entre 50 e 80% da recomendação, independente de raça, gênero e idade, ou seja, o consumo é deficiente (SALGUEIRO et al., 2000). Considerando níveis séricos e plasmáticos de zinco, Bhatnagar e Mouli (2004) afirmam que, entre 30 e 50% das

crianças residindo em áreas de baixa renda, possuem baixos níveis do mineral. Os mesmos pesquisadores sugerem que a deficiência de zinco parece ser comum em crianças de países em desenvolvimento, mostrando ainda que na Índia mais de 50% das crianças, aparentemente saudáveis apresentam sinais clínicos de deficiências de micronutrientes diversos, sendo que a deficiência de zinco é bastante comum.

No Brasil, poucas pesquisas avaliando os níveis e o consumo alimentar de zinco foram publicadas. Em uma pesquisa realizada em São Paulo, ao avaliar 126 crianças, encontraram deficiência de zinco no plasma em 13% da amostra (FAVARO; VANNUCCHI, 1990). No Rio de Janeiro, uma pesquisa envolvendo 104 crianças na faixa de 1 a 5 anos de idade, teve como resultado deficiência de zinco em 7,5% da amostra (BORGES et al., 2007).

Destaca-se que as crianças estão entre os grupos de maior risco para a deficiência deste mineral, juntamente aos idosos, mulheres grávidas, vegetarianos, adeptos de dietas de emagrecimento, alguns grupos de atletas, pessoas hospitalizadas ou institucionalizadas e indivíduos com doenças inflamatórias crônicas (BIESALSKI et al., 2003).

2.3 REMODELAÇÃO ÓSSEA

O processo de remodelação óssea ilustrado na figura 2 dura três semanas. Isto se dá pela ativação dos osteoclastos, que formam um túnel no interior do osso cortical ou nas lacunas na superfície do osso trabecular. Estas células reabsorvem as substâncias ósseas, dissolvendo tanto a substância osteóide como os depósitos minerais. Os osteoclastos entram em apoptose. Em seguida, os osteoblastos são atraídos para as cavidades resultantes da reabsorção e começam a produzir osteóides que são posteriormente mineralizados. Esta ação se repete continuamente por vários meses e novo conteúdo ósseo é depositado em círculos concêntricos de camadas sucessivas (lamelas) nas superfícies internas das cavidades. Isto

ocorre até que o local seja preenchido e a deposição é interrompida quando o osso começa invadir os canais de HAVERS (PEAKE et al,. 2000).

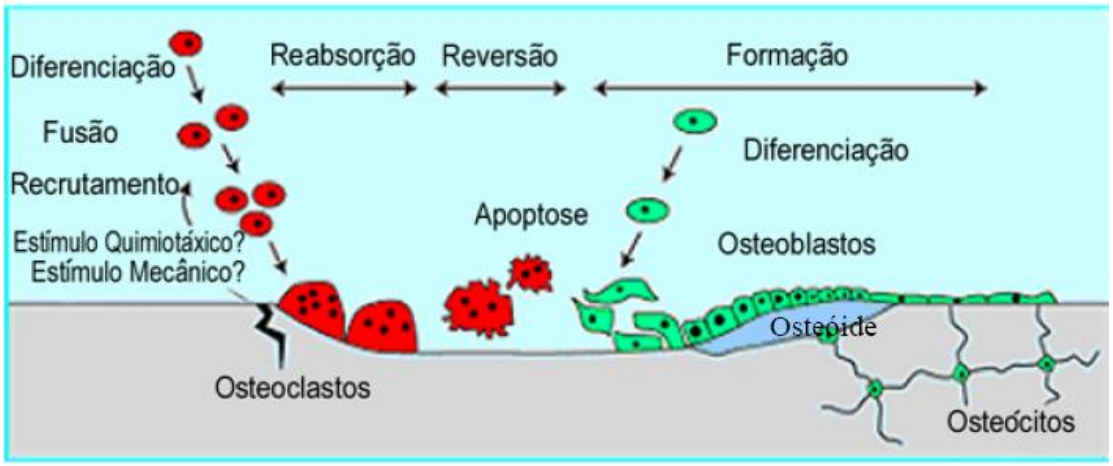

Figura 2: Ciclo de remodelação óssea (TENÓRIO, 2002)

Uma das formas de entender este processo é por meio da teoria do *mechanostat*, apresentada por Frost (1987), que sugere quatro zonas onde ocorre a tensão sobre o osso, para descrever a relação entre a intensidade da tensão no osso e a adaptação desse osso ao estímulo. Quando a atividade estiver abaixo dos valores fisiológicos mínimos de tensão, ocorre a perda da massa óssea. Dentro da zona de carga fisiológica, o osso é mantido; os ganhos ocorrerão somente quando a intensidade de carga for aumentada. Em resposta a cargas extremas, um novo osso desorganizado pode ser produzido. Assim cargas mecânicas sobre os ossos deformam ou tencionam, modelam e remodelam este tecido. Conseqüentemente com o desuso a modelação e a remodelação óssea ficam comprometidas, levando a osteopenia.

Similar a Frost (1987), Snow-Harter e Marcus (1991) relatam que todas as forças impostas ao osso produzem tensão de alguma magnitude, e essas forças criam estresses dentro do osso que podem estimular uma remodelação interna, externa ou ambas, e levar a uma possível mudança na densidade óssea. Segundo esses autores, a hipertrofia óssea ocorre quando o estresse é aplicado em níveis maiores do que os níveis normais, ou seja, quando a atividade osteoblástica excede a atividade osteoclástica . Os osteoclastos removem o material

danificado para que os osteoblastos possam depositar tecido e mineral onde o estresse foi imposto.

Em outras palavras, o processo de remodelação óssea se desenvolve com base em dois processos antagônicos, mas acoplados: a formação e a reabsorção. O seu acoplamento permite a renovação e remodelação óssea e é mantido, a longo prazo, por um complexo sistema de controle que inclui hormônios, fatores físicos e fatores humorais locais. (VIEIRA,1999)

Além desses fatores, também existe o efeito piezoelétrico, que é a transformação de energia mecânica em energia elétrica. Ele acontece durante a contração muscular. Essa energia é transmitida dos músculos para o osso pelos tendões, provocando um aumento na atividade dos osteoblastos e aumentando a incorporação do cálcio no osso, tendo como resultado a hipertrofia das trabéculas ósseas e, conseqüentemente, o aumento da densidade óssea (GÓES et al., 1999).

A ação da gravidade ou mesmo contração muscular provocam forças mecânicas sobre os cristais de hidroxiapatita, gerando assim, um potencial negativo desenvolvido no local da compressão e um potencial positivo na tração. Pequenas quantidades de corrente fluindo no osso causam atividade osteoblástica na extremidade negativa da corrente, o que poderia explicar o aumento da deposição óssea nos locais de compressão. O contrário ocorreria pela ação dos osteoclastos, realizando reabsorção nos locais de tensão (GÓES et al., 1999).

A compreensão do processo de formação e reabsorção do tecido ósseo pode ser possível pela avaliação dos marcadores de formação e de reabsorção óssea. Estes marcadores bioquímicos ósseos (MBOs) são substâncias produzidas pelas células envolvidas no processo de remodelação óssea e que indicam as diferentes fases da formação e reabsorção óssea. Os principais marcadores de formação óssea são: fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina específica óssea e osteocalcina que são produzidos pelos osteoblastos (UELAND et al., 2001). Já os principais marcadores de reabsorção óssea são a D-piridinolina, o telopeptídeo

aminoterminal e telopeptídeo carboxiterminal (NTx e CT-x, respectivamente) que são sintetizados pelos osteoclastos (CHANDANI et al., 2000; GEENSPAN; ROSEN; PARKER, 2000).

Assim, admite-se que os marcadores bioquímicos podem ser empregados juntamente com a densitometria óssea na avaliação do estado do esqueleto e a resposta à terapia na menopausa e pós-menopausa. Entretanto, a baixa especificidade individual desses marcadores, mesmo quando empregados em conjunto, faz com que a sua utilização e a interpretação de seus resultados devam ser ponderadas apropriadamente (VIEIRA, 1999).

2.3.1 ESTROGÊNIO E METABOLISMO ÓSSEO

Sabe-se que o hormônio estrogênio influencia a diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas em osteoclastos e participa da regulação de citocinas e de fatores locais envolvidos nos mecanismos de remodelação óssea (JILKA et al., 1996; RAISZ, 1999). Durante a deficiência estrogênica pode haver uma maior atuação de várias citocinas, como por exemplo, IL-1, IL-6 e IL-11, acelerando o processo de reabsorção óssea (LIMA; NÓBREGA; NÓBREGA, 2001).

O controle da formação e reabsorção óssea é complexo e é regulado em nível local e sistêmico por processos autócrinos, parácrinos e endócrinos. Os fatores locais incluem as citocinas, fatores de crescimento, óxido nítrico, comunicação célula-célula e sinais resultantes da resistência mecânica sofrida pelo tecido ósseo. O controle sistêmico é exercido pela ação das citocinas, fatores de crescimento e hormônios. A regulação endócrina é mediada por hormônios como a calcitonina, o paratormônio, a vitamina D e os hormônios sexuais, como o estrogênio, que são importantes reguladores da função de células ósseas e podem desencadear um crescimento ou metabolismo ósseo anormal (ROSEN, 2000; GENNARI et al., 2002).

Durante a formação óssea, os estrogênios promovem o aumento da matriz protéica e a incorporação de cálcio e fósforo. Os efeitos dos estrogênios dão-se diretamente nos ossos, por meio de receptor no citosol e dos efeitos na rede de colágeno, bem como efeito indireto através da oposição aos efeitos reabsortivos do hormônio paratireóideo (PTH). Em razão disto, a queda acelerada na massa óssea, devido ao hipoestrogenismo, é mediada por diversos mecanismos (TURNER; ROGGS; SPELSBERG, 1994). Estudos mostram que a ação do estrogênio seria mediada por um receptor presente nas células ósseas, implicando na sua função no metabolismo ósseo (MANO et al., 1996; MITRA; DESAI; KHATKHATAY, 2006).

Os esteróides sexuais são muito importantes para o desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo (GENNARI et al., 2002; HARADA; RODAN, 2003). A preservação do esqueleto pelo estrogênio nas fêmeas é relacionada evolutivamente com a necessidade de armazenar cálcio para o desenvolvimento embrionário do esqueleto. Nos mamíferos adultos, tanto machos quanto fêmeas, incluindo os humanos, os estrogênios inibem a reabsorção óssea pela redução do número de osteoclastos (HARADA; RODAN, 2003), participam da regulação do metabolismo do cálcio no osso cortical e esponjoso e são necessários para fechar as placas de crescimento das epífises e para fazer a manutenção da massa óssea após a puberdade (GENNARI et al., 2002; HARADA; RODAN, 2003).

O estrogênio exerce suas funções através da ligação e ativação a receptores específicos. Dois tipos de receptores estrogênicos: alfa e beta (ERα e ERβ) foram identificados. Segundo Windahl; Andersson; Gustafsson (2002) estudos com camundongos têm sido desenvolvidos para esclarecer as atividades dos receptores estrogênicos, tendo demonstrado a presença de ambos (ERα e ERβ) no tecido ósseo. A atuação destes receptores é de grande importância nos efeitos do estrogênio sobre o metabolismo ósseo, tanto no sexo masculino, quanto no sexo feminino. Estes dois tipos de receptores foram identificados nos

osteoblastos e em células estromais da medula óssea, porém a sua expressão nos osteoclastos ainda é controversa (GENNARI et al., 2002).

Estudos desenvolvidos por Holzer; Einhorn; Majeska (2002) têm sugerido que muitos efeitos do estrogênio sobre o osso são mediados através da sua ação sobre células da linhagem osteoblástica, incluindo osteoblastos, osteócitos e progenitoras osteoblásticas da medula óssea estromal, sendo esta ação ligada à presença dos receptores estrogênicos. Serakides et al. (2004) sugerem uma ação direta dos estrogênios sobre o osso devido a estes receptores nos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, bem como nas células osteoprogenitoras da medula óssea. Além disso, esses autores afirmam que o estrogênio nos osteoblastos regula a expressão dos genes que codificam o colágeno do tipo l, osteopontina, osteocalcina e osteonectina; estimula, também, a diferenciação dos osteoblastos e a síntese de matriz óssea. Adicionalmente, em outro mecanismo regulador da remodelação óssea, ele estimula a apoptose dos osteoclastos e mantém viáveis os osteócitos.

A deficiência dos esteróides sexuais promove aumento na taxa de remodelação óssea, havendo aumento da osteoclastogênese e da osteoblastogênese. Estas mudanças são temporariamente associadas ao aumento da formação e da reabsorção óssea, porém, o processo de perda de mineralização óssea é acelerado, porque a reabsorção ocorre mais rapidamente que a formação óssea. Assim o novo osso se torna mais frágil que o osso mais velho. Além disso, o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea se deve ao maior tempo de vida e atividade dos osteoclastos, e também pelo menor tempo de vida e atividade dos osteoblastos, provocadas pela alteração hormonal (MANOLAGAS, 2000).

Na deficiência dos estrogênios, parece ainda ocorrer uma diminuição da massa óssea em função de uma redução na absorção intestinal de cálcio, devido a sua ação direta sobre a mucosa intestinal e indireta sobre a vitamina D. Essa deficiência diminui os receptores de

vitamina D no intestino e é responsável por uma menor conversão do 25 hidroxicolecalciferol na forma ativa da vitamina D, o 1,25 diidroxicolecalciferol (RIBEIRO et al., 2003).

Sendo assim, a deficiência estrogênica promove uma cascata de eventos que estão resumidos na figura 3 e finalizam com a perda de massa óssea.

Figura 3: Efeitos da deficiência estrogênica no metabolismo ósseo (adaptado de MOLOKWU; LI, 2006)

2.3.2 MODELOS ANIMAIS

Segundo Bortoli et al. (1996) a deficiência estrogênica é a causa mais comum de osteoporose, e o modelo animal que melhor representa a redução de massa óssea após a menopausa é a rata ovariectomizada, pois a redução de estrogênios observada neste modelo produz aumento na taxa de remodelação óssea com reabsorção superando a formação.

O esqueleto do rato adulto tem muitas similaridades com o esqueleto humano. Os ossos longos de ambas as espécies alongam pelo crescimento epifiseal (ossificação endocondral) e aumentam sua seção transversal pelo crescimento periosteal (ossificação

intramembranosa secundária). Nos ratos adultos, o crescimento radial ocorre em graus ínfimos e a ossificação esponjosa secundária ocorre como remodelação seqüencial similar àquela observada no tecido ósseo esponjoso em humanos (MARTIN; RITMAN; TURNER, 2003).

A rata e o camundongo fêmea ovariectomizadas exibem uma diminuição na densidade mineral, volume e resistência óssea, além de aumento na taxa de reabsorção óssea semelhantes ao que é visto nas mulheres (MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; TAMAKI et al., 1998; JEE; YAO, 2001). Por esse motivo, diversos estudos têm utilizado estes animais como modelo experimental para o estudo da osteoporose conseqüente à deficiência estrogênica, bem como para a avaliação do potencial terapêutico de agentes para a osteoporose (BORTOLI et al., 1996; YEH; CHEN; ALOIA, 1997; KAWATA et al., 1998; CHEN et al., 2001; LATOUR, 2001).

Segundo Thompson et al. (1995), o mecanismo aceito para a perda óssea observada em ratas ovariectomizadas é a deficiência de estrogênio causando um desbalanceamento no turnover ósseo, com a reabsorção excedendo a formação óssea. Segundo estes autores, os efeitos da ovariectomia iniciam-se ao redor de 14 dias após a cirurgia, com o aumento do turnover e da reabsorção óssea, levando a um decréscimo significativo do volume trabecular ósseo.

Já Chakraborty e Gore (2004) afirmam que a responsividade para depleção estrogênica é mais acentuada em ratas jovens com ciclos estrais regulares e que uma semana após a ovariectomia, os níveis de hormônios ovarianos já são indetectáveis no sangue, bem como Tanizawa et al. (2000) constataram que a perda óssea em ratas ovariectomizadas se inicia cinco dias após a cirurgia e que a relação entre o volume ósseo e o volume trabecular diminui com o tempo, sendo menor do que o observado nas ratas não ovariectomizadas 30 dias após cirurgia.

2.3.3 ATIVIDADE FÍSICA E DENSIDADE MINERAL ÓSSEA

A relação entre a densidade mineral óssea (DMO) e a atividade física tem sido muito estudada nos últimos anos. A imobilização prolongada leva a perda substancial do tecido ósseo, sendo que pacientes imobilizados podem perder 40% da massa óssea original em 1 ano (MARCUS, 2001). Desta forma a atividade física tem sido defendida como um dos meios de promover aumento e manutenção da DMO, constituindo um tratamento eficiente para administrar a perda de massa óssea em pacientes com osteoporose (RENNO et al., 2007).

A atividade física está associada com o fortalecimento da estrutura corporal auxiliando sua integridade. Assim o desenvolvimento dos ossos é regulado parcialmente pela pressão exercida sobre eles – quanto mais apropriada for a pressão, maior será a deposição dos seus nutrientes. Os ossos sem uso tendem a atrofiar-se, enquanto a estimulação contínua e adequada proporciona ossos mais espessos e mais fortes (OURIQUES, 2000).

Pesquisadores têm comparado a DMO de atletas com não-atletas (NICKOLS-RICHARDSON et al., 2000; JANZ, 2002; HELGE; KANSTRUP, 2002), de atletas de diferentes esportes (LEHTONEN-VEROMAA et al., 2000; ANDREOLI et al., 2001) e de praticantes de atividade física com não praticantes (BÁLSAMO, 2002). Há também pesquisas em que ocorre intervenção com exercícios na população (KONTULAINEN et al., 2002).

A pesquisa de Vilariño et al. (1998) salienta que existe uma diferença estatisticamente significativa, entre mulheres de vida ativa e entre mulheres de vida sedentária, em relação à existência ou não de osteoporose. Foram analisadas 60 pacientes do Cleveland Menopause Clinic, por meio do estudo da massa óssea, verificada pelo exame de densitometria (DEXA). Concluíram que mulheres praticantes de atividade física com freqüência tinham maior nível de DMO em várias partes do corpo.

Krall e Dawson (1994), com o objetivo de verificar se a caminhada influencia na densidade mineral óssea, analisaram 239 mulheres brancas, saudáveis e pós-menopausadas. Os resultados indicaram que as mulheres que caminhavam em torno de uma milha por dia (7,5 milhas semanais) apresentavam maior densidade mineral óssea total do que aquelas que caminhavam distâncias menores. Já Kohrt, Ehsani e Birge (1997) ao comparar a caminhada com exercícios localizados e musculação, observaram um considerável aumento na densidade mineral óssea corporal total em ambos os grupos. Entretanto, os praticantes de exercícios localizados e musculação tiveram um aumento maior. Em virtude destas constatações, Ouriques e Fernandes (1997) realizaram uma pesquisa comparativa entre a relação da atividade física e a DMO de mulheres ativas (caminhada e ginástica) e mulheres fisicamente não ativas, com idade média de 62,5 anos. Os autores verificaram uma maior densidade nas regiões do fêmur proximal e da coluna lombar nas mulheres que praticavam a ginástica e a caminhada.

Com relação a sustentação de peso, outros estudos mostram que este tipo de exercício pode aumentar a DMO (GRIMSTON, 1993; HEINONEN et al., 2000). Após 9 meses de um programa de aulas de step, complementado com saltos verticais adicionais, Kontulainen et al. (2002) verificaram um crescimento de 5% do conteúdo mineral ósseo da coluna lombar em meninas, em fase de crescimento. Contraditoriamente, Bourrin et al. (1995) afirmam que embora a sustentação de peso seja um dos fatores mais importantes para influenciar a formação e reabsorção de ossos esponjosos, existem evidências de que exercícios que não utilizam sustentação de peso também poderiam beneficiar a osteogênese Por exemplo, em humanos, Yung et al. (2005) observaram que nadadores apresentavam mais massa óssea calcânea do que os controles sedentários. Supõe-se que as contrações musculares realizadas durante o exercício de nadar podem exercer efeitos osteogênicos, sendo responsáveis pela adaptação positiva de massa óssea (HART et al., 2001). Aparentemente, mais de 70% do

momento de inclinação de um osso são transmitidos pela força muscular ao invés de pelo peso corpóreo, amparando a idéia de que a força muscular impõe cargas maiores aos ossos do que as forças gravitacionais associadas ao peso (IWAMOTO; YEH; ALOIA, 1999).

Porém, Bassey (2001) afirma que atividades físicas que não proporcionam suporte de peso, como a natação e o ciclismo, provavelmente são ineficazes para aumentar a DMO, presumivelmente porque não existe carga gravitacional suficiente no esqueleto. Na água, o corpo flutua, e no ciclismo, a maior parte do peso corporal está na sela. Fehling; Alekel e Clasey (1995) compararam a DMO de mulheres atletas participantes de esportes de impacto (volleyball e ginástica olímpica) com outras participantes de natação e ainda com um grupo controle sedentário. O grupo de esportes de impacto apresentou DMO mais elevada em quase todo o esqueleto, enquanto que não houve diferença significativa em nenhum osso entre as nadadoras e as sedentárias.

Para Bassey e Ramsdale (1994), atividades mais vigorosas parecem mais eficazes. Saltos diários com duração de 60 segundos aumentaram a DMO do quadril em aproximadamente 4% após 5 meses em mulheres na pré-menopausa. Porém, este mesmo protocolo foi repetido em mulheres na pós-menopausa, e não se encontrou mudanças significativas no conteúdo mineral ósseo que pudessem ser atribuídas ao exercício. Talvez isso tenha ocorrido devido ao fato de mulheres mais idosas necessitarem de um programa mais prolongado do que apenas um minuto e também de um número maior de saltos (BASSEY et al., 1998).

Com relação aos esportes, praticantes de ginástica olímpica, esporte caracterizado pelo alto impacto corporal com superfícies duras e exposição esquelética a grandes forças musculares, possuem uma maior DMO do que corredoras e grupo controle (LEHTONEN-VEROMAA et al., 2000). Estando no início (NICKOLS-RICHARDSON et al., 2000) ou no final da adolescência (HELGE; KANSTRUP, 2002), quando comparado somente ao grupo

controle, as ginastas continuam apresentando maior DMO. Andreoli et al. (2001) relataram que todos os grupos de atletas têm maior DMO do que o grupo controle e que os atletas de judô possuem valores de DMO mais altos que os outros atletas. Isso sugere que atividades com grandes cargas mecânicas parecem resultar em uma maior massa óssea do que atividades onde o peso do corpo é pouco usado. Corroborando com esses achados, Grimston e Hanley (1992), executaram uma pesquisa objetivando a avaliação do efeito de atividades com carga de impacto (ginástica olímpica) e com carga ativa (natação) sobre a DMO em atletas de 10 a 16 anos. A partir da densitometria óssea da coluna lombar e fêmur proximal, os autores concluíram que as atletas da ginástica olímpica possuíam maior valor de DMO que as nadadoras.

Em pesquisas realizadas com animais, investigando as respostas osteogênicas a exercícios físicos, foram avaliados diversos tipos de treinos, inclusive corridas e caminhadas em animais osteopênicos jovens (NOTOMI et al., 2000; HONDA et al., 2003; TENÓRIO et al., 2005). O efeito de exercícios de resistência voluntários ou não-voluntários, como escalada ou saltos, foi analisado em ratos intactos e a magnitude do aumento da massa óssea foi maior do que com a corrida (MOSEKILDE et al., 1994; NOTOMI et al., 2000; NOTOMI et al., 2001). Tenório et al. (2005) avaliaram o efeito do treinamento físico em esteira sobre o tecido ósseo e a concentração sérica de cálcio em camundongos fêmeas ovariectomizadas, concluindo que este tipo de exercício preveniu as alterações do tecido ósseo decorrentes da ovariectomia e possibilitou um aumento da formação óssea.

Notomi et al. (2000) compararam o efeito do treino de corrida e saltos sobre a massa, a força e o metabolismo ósseo de ratos. Ao final de 4 semanas de treino, o grupo que realizou saltos apresentou aumento da força e da massa óssea das vértebras lombares e da diáfise femoral, o que não foi evidenciado no grupo que realizou a corrida e nem no grupo controle, sugerindo que os exercícios de resistência (salto) aumentam a DMO por estimular o

metabolismo ósseo mais eficientemente do que os do tipo aeróbico (corrida). Enquanto que Snyder et al. (1992) compararam os efeitos de um programa de corrida e um treinamento de natação, e observaram que os ratos nadadores demonstravam maior conteúdo mineral ósseo do que os ratos corredores.

Embora diversos pesquisadores tenham demonstrado um efeito estimulatório dos exercícios sobre o tecido ósseo, os mecanismos pelos quais os exercícios interferem neste tecido e em seu metabolismo não estão totalmente compreendidos. Além disso, alguns pontos sobre intensidade, duração e freqüência dos exercícios permanecem confusos e contraditórios. Portanto, é importante estudar os mecanismos que possam interferir na resposta óssea aos exercícios físicos, de forma que os mesmos possam ser utilizados confiantemente como tratamento em um ambiente clínico.

Pouco se sabe a respeito dos efeitos de programas de exercícios aquáticos sobre o tecido ósseo de ratos e de humanos. Nesses casos, provavelmente as contrações musculares realizadas durante os exercícios podem ser eficazes para induzir um efeito osteogênico, promovendo aumento da força muscular e massa óssea, mesmo na água, onde o impacto sobre os segmentos corporais é menor. Este tipo de exercício pode ser útil em pacientes osteoporóticos, constituindo uma modalidade terapêutica mais segura em relação aos exercícios tradicionais, como caminhadas e saltos, uma vez que o risco de quedas e, conseqüentemente, de fraturas, é menor em ambientes aquáticos.

3. METODOLOGIA

Foram utilizadas 60 ratas Wistar, nulíparas, com idade de 60 dias, que foram mantidas no biotério “Prof. Dr. Thomas George” do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As

mesmas permaneceram em gaiolas apropriadas, cuja população não ultrapassou 6 animais por gaiola, sob ciclos de claro e escuro controlados (12 horas-12 horas) com temperatura de 22±1ºC. Estes animais receberam ração pró-biotério (Labina® Purina) e água destilada em quantidades suficientes para o consumo *ad libidum.* Tratou-se de uma dieta balanceada e normoprotéica (17%), contendo 110mg de zinco por quilo de ração. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da UFPB sob o protocolo 0604/09.

3.1 OVARIECTOMIA

Aos 60 dias de idade, 48 ratas foram ovariectomizadas. Para tanto, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina como pré-anestésico e em seguida ketamina base a 2%, administrando-se 1ml/1000g por via intraperitoneal, obtendo-se os efeitos necessários para a realização de todos procedimentos cirúrgicos. Após tricotomia da região abdominal lateral, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na região abaixo da última costela e próxima ao nível dos rins. O ovário foi identificado e exposto, sendo o mesmo e a gordura circundante extraídos. A musculatura e a pele foram posteriormente suturadas com fio de seda 4.0 (Figura 4). Esse procedimento cirúrgico foi realizado bilateralmente em cada animal.

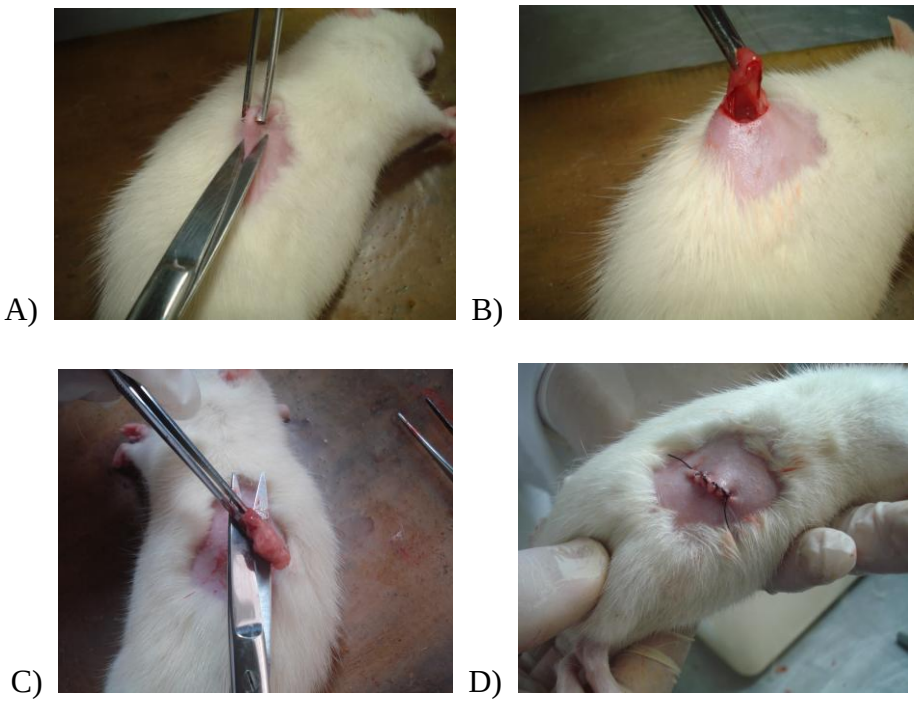

Figura 4: Ovariectomia: A) Excisão da epiderme; B) Excisão da musculatura; C) Exposição e extração do ovário; D) Sutura

Com a mesma idade, outras 12 ratas foram incluídas no grupo Sham (submetidas à falsa-ovariectomia), pois tiveram seus ovários identificados e expostos cirurgicamente, sendo a seguir reposicionados para posterior sutura da musculatura e pele previamente incisadas.

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais, cada um com 12 ratas:

- S (Sham): não receberam nenhum tipo de tratamento, sendo feita a falsa ovariectomia;
- Cox (controle ovariectomizadas): foram submetidas à ovariectomia e não receberam nenhum outro tipo de tratamento;

- Z (zinco): foram submetidas à ovariectomia e receberam suplementação de zinco;
- TF (treinamento físico): foram submetidas à ovariectomia e realizaram treinamento físico;
- ZTF (zinco + treinamento físico): foram submetidas à ovariectomia, receberam suplementação de zinco e realizaram treinamento físico.

Trinta (30) dias após o procedimento cirúrgico, iniciaram-se os protocolos de suplementação de zinco e de treinamento físico.

3.3 SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO

Aos 90 dias de idade, os animais dos grupos Z e ZTF receberam suplementação de zinco na dose de 25mg/kg de peso corporal/dia via oral (gavagem), na forma de $ZnSO_4.7H_2O$. As ratas dos demais grupos receberam a mesma quantidade de água milli-Q pela mesma via oral (Figura 5).

A suplementação do zinco teve início na segunda semana de treinamento físico, que será mais detalhada a seguir, totalizando nove semanas de tratamento diário.

Figura 5: Ilustração da suplementação de zinco por gavagem.

3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

A primeira semana de treinamento foi destinada a adaptação dos animais ao meio aquático. Os treinos ocorriam três vezes por semana sempre pela manhã, durante o período de 10 semanas, que coincidiu com o período de suplementação de zinco.

Os animais dos grupos TF e ZTF foram submetidos a um programa específico de saltos em um cilindro de PVC de 25 cm de diâmetro contendo água, objetivando limitar a alternativa do animal em ir para outra direção ou agarrar-se para subir, favorecendo o salto apropriado como demonstrado na Figura 6.

Figura 6: Demonstração do sistema para o treinamento dos animais; observa-se uma rata durante o treino e que as paredes lisas facilitam a realização dos saltos sem que ela se agarre às paredes.

A profundidade da água contida nos tanques foi aproximadamente equivalente ao dobro do comprimento do rato. A temperatura da água foi mantida aproximadamente em 32°C por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do rato (MARQUETI et al., 2006).

O programa de treinamento foi adaptado do protocolo desenvolvido por Marqueti et al. (2006) e Renno et al. (2007) e constituiu de 4 séries de 10 saltos em meio líquido, com

intervalo de 30 segundos entre as séries, sendo ajustada uma sobrecarga progressiva de acordo com o peso do animal. A sobrecarga foi acoplada ao tórax dos animais através de um colete especial que permitiu a execução dos saltos sem que a carga escorregasse do corpo dos mesmos ou impedisse seus movimentos como demonstrado na Figura 4. Uma sobrecarga a mais correspondente ao peso do colete quando molhado (20 g), foi considerada e debitada da carga específica correspondente à massa corporal do animal para uma melhor precisão do treinamento.

Figura 7: Demonstração do colete com carga acoplado ao corpo do animal

O treino foi desenvolvido da seguinte forma:

1ª semana (semana de adaptação dos animais ao exercício): foi utilizada uma sobrecarga equivalente a 50% do peso do animal, com um número de séries e repetições ajustadas diariamente, e um intervalo de 30 segundos para repouso entre as séries:

1º dia: 2 séries X 5 saltos,

2º dia: 4 séries X 5 saltos,

3º dia: 4 séries X 9 saltos.

- 2ª semana: marcou o início do treino específico e da suplementação com zinco, os animais realizaram 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de repouso entre as séries e sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal do animal.

- 3ª e 4ª semanas: foram realizadas 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de intervalo entre as séries e sobrecarga de 60% do peso do animal.

- 5ª e 6ª semanas: composta também de 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de repouso entre as séries, porém com sobrecarga de 70% do peso do animal.

- 7ª e 8ª semanas: também 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de repouso entre as séries, porém com sobrecarga de 80% do peso do animal.

- 9ª e 10ª semanas: permaneceram as 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de repouso entre as séries, porém com sobrecarga de 90% do peso do animal.

3.5 OBTENÇÃO DA MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS E CONTROLE DO CONSUMO DE RAÇÃO

A massa corpórea dos animais foi verificada duas vezes por semana, com intervalos de 3 e 4 dias entre cada medida, utilizando-se balança analítica (Mettler, Suíça) – precisão: 0,1 g, capacidade máxima: 2610g. O controle do consumo da ração foi realizado nos mesmos dias, pesando-se na mesma balança a sobra da ração, e subtraindo da quantidade que foi estipulada a ser colocada como padrão (500g). Obtendo-se o consumo total por gaiola. Posteriormente foi calculada a média de consumo por animal.

3.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Passado o período experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.7 COLETA SANGUÍNEA

O sangue foi retirado por punção cardíaca com seringa de 10 mL e agulha 25x7, sendo o material acondicionado em tubos para sorologia, contendo uma barreira de gel no fundo do tubo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, a 4°C por 15 minutos. Durante a centrifugação, a barreira de gel moveu-se para cima posicionando-se entre o soro e o coágulo, formando uma barreira estável, separando o soro dos outros componentes celulares. As dosagens bioquímicas foram realizadas imediatamente. Enquanto que o soro restante foi armazenado em tubos eppendorf e mantido em freezer -80°C, para a posterior realização da dosagem de estradiol que ocorreu 30 dias após a coleta.

3.8 COLETA DOS FÊMURES

Após o sacrifício foram realizadas incisões no 1/3 proximal das patas traseiras direitas, até ser atingida a articulação coxo-femoral, então foram desinseridos músculos e tendões da região anterior. Com os animais em decúbito lateral, foram removidos músculos e tendões posteriores, o fêmur direito foi desarticulado proximal e distalmente e fixado em solução de formol tamponado com tampão fosfato de sódio, 0,1M.

3.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA E DO TAMANHO DOS FÊMURES

Logo após a retirada do fêmur direito de cada animal, os ossos foram cuidadosamente dissecados, macerados e pesados em balança semi-analítica (A&D Company Limited). Em seguida, foi realizada a mensuração do comprimento do osso com paquímetro digital 7VS 150mm (6’’) EDA.

3.10 ESTUDO DA RADIOPACIDADE

3.10.1 SELEÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO

Para a seleção do tempo de exposição, foram obtidas radiografias de 3 espécimes do grupo controle, do penetrômetro e da lâmina de chumbo com os tempos de exposição de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7 segundos. Os 3 espécimes e penetrômetro foram posicionados sobre um mesmo filme radiográfico oclusal Insight (Kodak Eastman Rochester, EUA) e expostos por um aparelho de raios X Medicor Budapeste Tipo SR-331 operando a 70kVp, 8mA, filtração total equivalente a 2,5mm de alumínio, a uma distância foco-filme de 40 cm. Para padronização da distância foco-filme foi utilizada uma platafoma de acrílico (Figura 8). As radiografias foram avaliadas em negatoscópio por um radiologista, de modo que se elegeu a radiografia com tempo de exposição de 0,3 segundos como aquela que apresentou densidade e contraste adequados das imagens dos espécimes e dos degraus do penetrômetro.

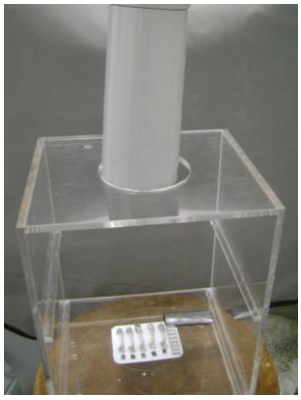

Figura 8: Demonstração do filme posicionado sobre a plataforma de acrílico para padronização da distância foco-filme.

3.10.2 EXPOSIÇÃO DOS ESPÉCIMES, PENETRÔMETRO E DOS CORPOS DE PROVA

Utilizando o tempo de exposição selecionado, sob as mesmas condições anteriormente descritas, foram obtidas radiografias dos espécimes, do penetrômetro e lâmina de chumbo. Foram posicionados sobre um filme radiográfico oclusal Insight (Kodak Eastman Rochester, EUA) 1 fêmur de cada grupo, o penetrômetro de alumínio e a lâmina de chumbo como demonstrado na figura 9. Desta forma, foram obtidas 11 radiograficas, seguindo a mesma metodologia realizada para a escolha do tempo de exposição.

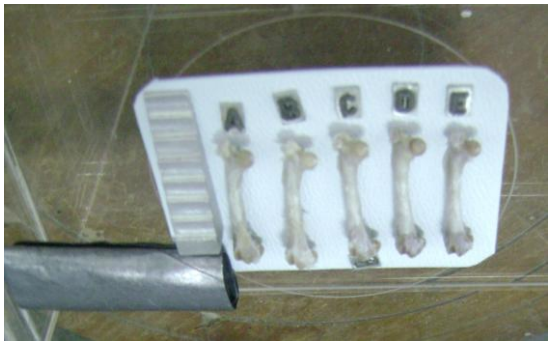

Figura 9: Fêmures, penetrômetro e lâmina de chumbo posicionados sobre o fime radiográfico.

3.10.3 PROCESSAMENTO DOS FILMES RADIOGRÁFICOS

Os filmes foram processados em câmara escura portátil totalmente opaca (Del Grandi, Ribeirão Preto, Brasil), utilizando soluções pronto uso Kodak (Kodak, Eastman Rochester, EUA) pelo método temperatura/tempo e secas em ambiente isento de poeira.

3.10.4 MENSURAÇÃO DAS DENSIDADES ÓPTICAS

As densidades ópticas de cada um dos espécimes e dos degraus do penetrômetro foram mensuradas utilizando um densitômetro digital Macbeth TD 931 (Kollmorgen Instruments. New Windsor, NY, EUA), calibrado com base nas especificações do fabricante, no Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A mensuração da densidade base e velamento (imagem correspondente da lâmina de chumbo), das densidades ópticas das imagens dos degraus, dos espécimes foram feitas em cinco e três pontos aleatórios, respectivamente. Nos fêmures, foi possível realizar uma mensuração em cada uma das regiões avaliadas: cabeça, colo cirúrgico, diáfise e epicôndilos.

3.10.5 CONVERSÃO DOS VALORES DAS DENSIDADES ÓPTICAS EM MILÍMETROS DE ALUMÍNIO(mm/Al)

Com o objetivo de evitar influência de possíveis variações da corrente elétrica do aparelho de raios X, processamento radiográfico e filme, converteu-se as densidades ópticas dos espécimes em milímetro de alumínio. Os valores da densidade óptica de cada degrau, da densidade base e velamento e dos espécimes foram tabulados no programa Microsoft Excell

2007®. Em seguida, calculou-se o valor da densidade óptica líquida dos degraus e dos espécimes, segundo a fórmula abaixo:

Densidade óptica líquida= densidade óptica - densidade base e velamento

Para cada radiografia, com os valores da densidade óptica líquida foi construído um gráfico de dispersão da densidade óptica no eixo da abscissa e milímetros de alumínio no eixo da ordenada, conforme a Figura 10. Com o gráfico, selecionou-se a equação que apresentou o valor de R quadrado mais próximo de 1. A partir da equação, com o valor médio da densidade óptica de cada espécime, foi obtido o respectivo valor em milímetro de alumínio.

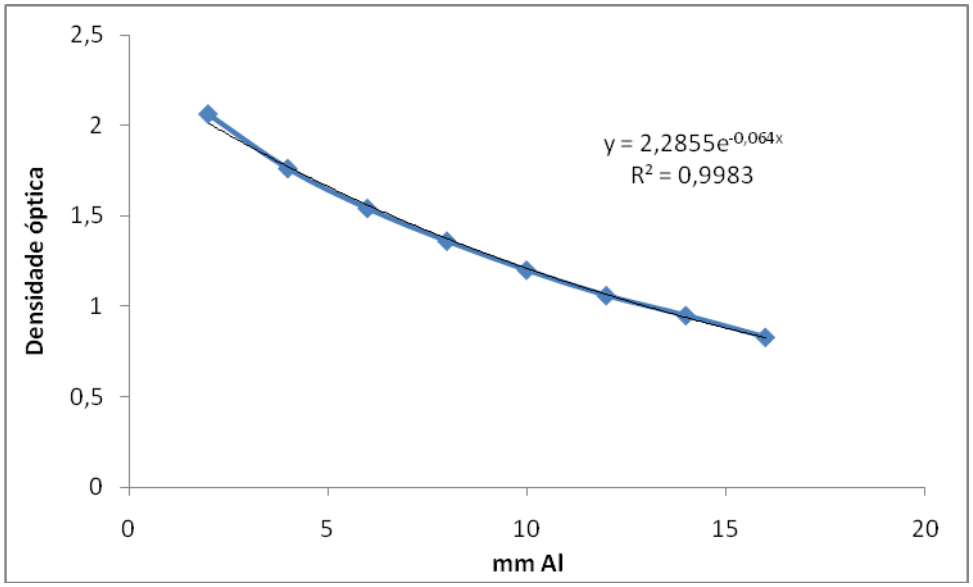

Figura 10: Representação do gráfico de dispersão da densidade óptica líquida X espessura dos degraus em milímetros de alumínio, com sua respectiva equação e R quadrado.

3.11 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.11.1 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ESTRADIOL

A técnica de Imunoensaio Enzimático por Micropartículas (MEIA) foi utilizada para dosagem da concentração sérica do hormônio estradiol (Kit Abbott AxSYM SYSTEM®), a

qual tem como princípio básico a competição entre antígenos por um número determinado de sítios de ligação no anticorpo. Esta dosagem foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Lauro Wanderley (UFPB), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

3.11.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FOSFATASE ALCALINA TOTAL

A dosagem da concentração sérica de fosfatase alcalina total foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB e foi determinada através de método proposto pela Labtest-Diagnóstica, Brasil (Bowers e Mc Comb modificado), que segue o princípio de que a fosfatase alcalina do soro, em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico, segundo a seguinte reação:

p-nitrofenilfosfato + H2O → p-nitrofenol + fosfato

A quantidade de p-nitrofenol produzida, que tem elevada absorbância a 405 nm é diretamente proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) na amostra.

3.11.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CÁLCIO TOTAL E IONIZADO

Para a determinação do cálcio, utilizou-se o método proposto pela Labtest-Diagnóstica (Brasil), no qual se utiliza um reagente aquoso estabilizado. A adição de um agente tensio-ativo exclui a interferência das proteínas na reação e a interferência do magnésio é eliminada pela adição de 8-hidroxiquinoleína, tornando assim, o método mais específico para a determinação do cálcio.

Os reagentes utilizados foram: tampão composto por 2-amino 2-metil 1- propanolol 0,5 mol/l, estabilizador e surfactante; reagente de cor (o-cresoftaleína complexona 92 nmol/l, 8-hidroxiquinoleína e estabilizador); padrão (cálcio 10 mg/dl). Os reagentes foram conservados em temperatura de 15-25º C.

O método colorimétrico foi usado para determinar o cálcio sérico. Medido em espectrofotômetro (Gehaka G3410, Brasil) a 570 nm da cor produzida pelo complexo formado entre ortocresoftaleína complexona e o cálcio, em pH alcalino.

O cálcio ionizado representa a concentração livre e biologicamente ativa no soro, foi determinado utilizando as dosagens de cálcio sérico, proteína total e albumina, segundo a fórmula:

$$\text{Cal (mg/dL)} = \frac{\dfrac{6 \times ca - [(0{,}19 \times P) + A]}{3}}{(0{,}19 \times P) + A + 6}$$

Onde: Ca= Cálcio sérico (mg/dL); P = proteína total (g/dL); A= Albumina (g/dL)

Esta dosagem foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Foi feito o teste de normalidade dos dados. Com base neste teste, os dados foram analisados por meio do teste t *student* pareado ou ANOVA *one way* com *post hoc* de *Newman-Keuls*. Quando necessário, o teste ANOVA foi substituído pelo seu equivalente não paramétrico *Kruskal-Walli.* Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados foram processados no programa estatístico GraphPad Prism 5 (San Diego, CA).

4. REFERÊNCIAS

ANDREOLI, A. et al. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 33, p. 507-511, 2001.

BÁLSAMO, S. **A influência da musculação e da hidroginástica na densidade mineral óssea.** 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado em Educação Fisica) – Universidade Católica de Brasília, Brasila, 2002.

BARENGOLTS; E. I. et al. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, p. 133-140, 1994.

BASSEY, E. J. ; RAMSDALE, S. J. Increase in femoral bone density in young women following high impact exercise. **Osteoporosis International**, v. 4, p. 72–75, 1994.

BASSEY, E. J. et al. Pre- and postmenopausal women have different Journal of Bone and Mineral Researchal density responses to the same high-impact exercise. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 12, p. 1805-1813, 1998.

BASSEY, E. J. Exercise for prevention of osteoporotic fracture. **Age and ageing**, v. 30, n. 4, p. 29-31, 2001.

BAUM, M.K; POSNER-SHOR, G, CAMPA, A. Zinc status in human immunodeficiency virus infection. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1421-1423, 2000.

BHATNAGAR, S.; MOULI, N.U.C. Zinc in child health and disease. **Indian Journal of Pediatrics**, v.71, n.11, p. 991-995, 2004.

BIESALSKI, H. K. et al. Micronutrients deficiencies: Hohenheim Consensus Conference. **European Journal of Nutrition,** v.6, n.42, p.353-63, 2003.

BORER, K. T. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women: interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. **Sports Medicine**, v. 35, p. 779-830, 2005.

BORGES, C. V. D. et al. Associação entre concentrações séricas de minerais, índices antropométricos e ocorrência de diarréia entre crianças de baixa renda da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Revista de Nutrição**, v.2, n.20, p.159-169, 2007.

BORTOLI, M. A. et al. Variaciones en el contenido de calcio, fosfato, magnesio y sodio en huesos de ratas ovariectomizadas. **Archives Latin Americano de Nutricion**, v.46, n.1, 1996.

BOURRIN, S. et al. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, p. 820-828, 1995.

BRYAN, J. et al. Nutrients for congnitive development in school-aged children. **Nutrition Reviews**, v.62, n.8, p.295-306, 2004.

BUZADZIC, B. et al. Effect of supplementation with Cu and Zn on antioxidant enzyme activity in the rat tissues. **Food Research International**, v. 35, n. 2, p. 217-220, 2002.

CANTERO, B. B. Estudio sobre el mecanismo de acción del zincum metalico. **La Homeopatía de México**, v. 2, p. 2-14, 1989.

CARVALHO, C. M. R. G. de ; FONSECA, C. C. C. ; PEDROSA, J. I. Educação para a saúde em osteoporose com idosos de um programa universitário: repercussões. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 719-726, 2004.

CHAKRABORTY, T. R.; GORE, A. C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Experimental biology and medicine**, v. 229, n. 10, p. 977-87, 2004.

CHANDANI, A. K. et al. Journal of Bone and Mineral Researchal Density and Serum Levels of Aminoterminal Propeptides and Cross-Linked N-telopeptides of Type I Collagen in Elderly Men. **Bone**, v. 26, n. 5, p. 513–518, 2000.

CHEN, J. L. et al. Bipedal stance exercise enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effects on bone formation in sham and ovariectomized rats. **Bone**, v.29, n.2, p. 126-133, Aug. 2001.

COUSINS, R. J.; MCMAHON, R. J. Integrative aspects of zinc transporters. **The Journal of Nutrition,**; v. 130, p. 1384-1387, 2000.

DENNISON, E.; COOPER, C. Epidemology of osteoporosis fractures. **Hormone Research**, v. 54, p. 58-63, 2000.

DRIUSSO, P. et al. Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida de mulheres com osteoporose. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, v. 7, n. 1/2, p. 1-9, 2000.

EDDY, D. M. et al. Osteoporosis: review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost- effectiveness analysis. **Osteoporosis International**, v.8, p. S1-S88, 1998.

FAVARO, R. M. D.; VANNUCCHI, H. Níveis plasmáticos de zinco e antropometria de crianças da periferia de centro urbano no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 1990.

FEHLING, P. C.; ALEKEL, L.; CLASEY, J. A comparison of Journal of Bone and Mineral Researchal densities among female athletes in impact loading and active loading sports. **Bone**, v. 17, p. 205–10, 1995.

FISBERG, M.; BARROS, M. J. L. **O papel dos nutrientes no crescimento e desenvolvimento infantil**. São Paulo: Sarvier, 2008, p. 65-80.

FNB. FOOD AND NUTRITION BOARD. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromiun, copper, iodine, iron, manganese, molybdnum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington: **National Academic Science**, 2001.

FREDERICKSON, C. J. et al. Importance of zinc in the central nervous nervous system: the zinc-containing neuron. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1417-1483, 2000.

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

GALSWORTHY, T. D.; WILSON, P. L. Osteoporosis - it steals more than bone. **The American Journal of Nursing**, v. 96, p. 27-33, 1996.

GEENSPAN, S. L.; ROSEN, H.; PARKER, R. A. Early Changes in Serum N-Telopeptide and C-Telopeptide Cross-Linked Collagen Type 1 Predict Long-Term Response to Alendronate Therapy in Elderly Women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v. 85, n. 10, p. 3537–3540, 2000.

GENNARI, L. et al. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. Review. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 81, p.1-24, 2002.

GIBSON, R. S. et al. Dietary interventions to prevent zinc deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 484S–487S, 1998.

GÓES, J. C. et al. Piezoelectricity of Native and Anionic Collagen. **Journal of Materials Science Letters**, v. 18, p. 983–986, 1999.

GRANITO, R. N. et al. Efeitos de um Programa de Atividade Física na Postura Hipercifótica Torácica, na Dorsalgia e na Qualidade de Vida de Mulheres com Osteoporose. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 8, n. 3, p. 231-237, 2004.

GRIMSTON, S. K. An application of mechanostat theory to research design: a theoretical model. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 25, p. 1293-1297, 1993.

GRIMSTON, S. K.; HANLEY, D. A. Journal of Bone and Mineral Researchal density in children is related to mechanical loading regime. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 24, n. 45, 1992.

HAMADANI, J. D. et al. Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental development and behavior of infants: a follow-up study. **Lancet**, v.360, p. 290–94, 2002.

HANSEN, M. et al. Casein phosphopeptides improve zinc and calcium absorption from rice-based but not from whole-grain infant cereal. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 24, p. 56–62, 1997a.

HANSEN, M. et al. Effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from bread meals. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 11, p. 143–149, 1997b.

HANSEN, M.; SANDSTRÖM, B.; LÖNNERDAL, B. The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. **Pediatric Research**, v. 40, p. 547–552, 1996.

HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, p. 349-355, 2003.

HART, K. J. et al. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. **Journal of Applied Physiology**, v. 9, p. 1663-1668, 2001.

HEIKKINEN, R. et al. Acceleration slope of exercise-induced impacts is a determinant of changes in bone density. **Journal of Biomechanics** , v. 40, n. 13, p. 2967-2974, 2007.

HEINONEN, A. et al. High-impact exercise and bones of growing girls: a 9-month controlled trial. **Osteoporosis International**, v. 11, p. 1010-1017, 2000.

HELGE, E. W.; KANSTRUP,I. Bone Density in Female Elite Gymnasts: Impact of Mucle Strength and Sex Hormones. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 34, n. 1, p. 174–180, 2002.

HERZBERG, M. et al. Zinc excretion in osteoporotic women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 3, p. 251–257, 1990.

HOLZER, G.; EINHORN, T.A.; MAJESKA, R.J. Estrogen regulation of growth and alkaline phosphatase expression by cultured human bone marrow stromal cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.20, p.281-288, 2002.

HONDA, A. et al. High-impact exercise strengthens bone in rats ovariectomized with the same outcome as Sham rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, p. 1032-1037, 2003.

HOSEA, H. J. et al. Zinc-Deficient Rats Have More Limited Bone Recovery During Repletion Than Diet-Restricted Rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, p. 303-311, 2004.

HYUN, T. H.; BARRETT-CONNOR, E.; MILNE, D. B. Zinc intake and plasma concentrations in men with osteoporosis: the Rancho Bernardo Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 3, p. 715-721, 2004.

ILICH, J. Z.; KERSTETTER, J. E. Nutrition in bone health revisited, a history beyond calcium. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 19, n. 6, p. 715-37, 2000.

IWAMOTO, J.; YEH, J. K.; ALOIA, J. F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. **Bone**, v. 24, p. 163-169, 1999.

JANZ, K**.** Physical activity and bone development during childhood and adolescence. Minerva, **Pediatrica**, v. 54, n. 2, 2002.

JEE, W. S. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal Musculoskeletal Neuron Interact**, v. 1, n. 3, p. 193-207, 2001.

JILKA R. L. et al. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. **The Journal of Clinical Investigation,** v .97, n. 7, p. 1732-1740, 1996

KAPLAN, B.J. et al. Vitamins, Minerals and Mood. **Psychological Bulletin,** v.133, n.5, p. 747-760, 2007.

KAWATA, T. et al. Suspension "hypokinesia/hypodinamia" may decrease bone mass by stimulating osteoclast production in ovariectomized mice. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.44, n.5, p.581-590, 1998.

KING, J. C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1334-1343, 2000.

KOHRT, W. M.; EHSANI, A. A.; BIRGE, S. J. Jr. Effects of exercise involving predominantly joint-reaction or ground-reaction forces on Journal of Bone and Mineral Researchal density in older women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 8, p. 1253-1261, 1997.

KONTULAINEN, S. A. et al. Does Previous Participation in High-Impact Training Result in Residual Bone Gain in Growing Girls? One year Follow-Up of a 9 Mouth Jumping Intervention. **International Journal of Sports Medicine**, v. 23, p. 575–581, 2002.

KOWALSKI, S. C.; SJENZFELD, V. L.; FERRAZ, M. B. Utilização de Recursos e Custos em Osteoporose. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 352-357, 2001.

KRALL, E. A.; DAWSON, H. B. Walking is related to bone density and rates of bone loss. **American Journal of Medicine**, v. 96, n. 1, p. 20-26, 1994.

KREBS, N. F. et al. Zinc homeostasis in breastted. **Pediatric Research**, v.39 , p. 661-665, 1996.

LATOUR, M. G. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Journal of Applied Physiology**,v. 90, p.235-241, 2001.

LEHTONEN-VEROMAA, L. et al. A 1-Year Prospective Study on the Relationship between Physical Activity, Markers of Bone Metabolism, and Bone Acquisition in Peripubertal Girls. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 3726-3732, 2000.

LIMA, J. G. L.; NÓBREGA, L. H. C.; NÓBREGA, M. L. C. **Aulas em Endocrinologia**, ed. Atheneu, São Paulo, 2001.

LÖNNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1378-1383, 2000.

LÖNNERDAL, B. The effects of milk and milk components on calcium, magnesium and trace element absorption during infancy. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 634–699, 1997.

LÖNNERDAL, B. et al. The effect of individual components of soy formula and cow's milk formula on zincbioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 1064–1070, 1984.

MAFRA, D; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

MANO, H. et al. Mammalian mature osteoclastos as estrogen target cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 223, p. 637-642, 1996.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatmnt of Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 115–137, 2000.

MARCUS, R. Role of Exercise in Preventing and Treating Osteoporosis. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 27, 2001.

MARET, W.; SANDSTEAD, H. H. Zinc requirements and risks and benefits of zinc supplementation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.20, p. 3-18, 2006.

MARQUETI, R. C. et al. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. **American Journal of Sports Medicine**, v. 34, p. 1274-1280, 2006.

MARTIN, E. A.; RITMAN, E. L.; TURNER, R. T. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. **Bone**, n. 32, p. 261–267, 2003.

MATSUI, T.; YAMAGUCHI, M. Zinc modulation of insulin-like growth factor's effect in osteoblastic MC3T3–E1 cells. **Peptides**, v. 6, p. 1063–1068, 1995.

MILLER, S. C.; BOWMAN, B. M.; JEE, W. S. S. Available animal models of osteopenia-small and large. **Bone**, v. 17, n.4, 117S-123S, oct. 1995.

MIR, E. et al. Serum Zinc Concentration Could Predict Journal of Bone and Mineral Researchal Density and Protect Osteoporosis in Healthy Men. **Iranian Journal of Public Health**, p. 30-36, 2007.

MITRA, S.; DESAI, M.; KHATKHATAY, M. I. Association of estrogen receptor α gene polymorphisms with Journal of Bone and Mineral Researchal density in postmenopausal Indian women. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 87, p. 80-87, 2006.

MOLOKWU, C. O.; LI, Y. V. Zinc homeostasis and bone mineral density. **Ohio Research and Clinical Review**, v. 15, p. 6-15, 2006.

MOONGA, B. S.; DEMPSTER, D.W. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption *in vitro*. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, p. 453–457, 1995.

MORAIS, M. B. M.; CARVALHO, J. G. Osteoporose. **Revista Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 53-62, 2001.

MOSEKILDE, L. et al. The effect of long-term exercise on vertebral, and femoral bone mass, dimensions, and strength-assessed in a rat model. **Bone**, v. 15, p. 292–301, 1994.

NICKOLS-RICHARDSON, S.M. et al. Premenarcheal gymnasts possess higher boné density than controls. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 3201, p. 63-70, 2000.

NORDSTROM, P.; NORDSTROM, G.; LORENTZON, R. Correlation of bone density to strength and physical activity in young men with a low or moderate level of physical activity. **Calcified Tissue International**, v. 60, p. 332-337, 1997.

NOTOMI, T. et al. Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 82, p. 268–274, 2000.

NOTOMI, T. et al. Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, p. 166–174, 2001.

O'DELL, B. L. Effect of dietary components upon zinc bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition,** v. 22, p. 1315–1322, 1969.

OLIVEIRA, S. A. Osteoporose – Uma visão atual. **Revista Femina**, v. 28, n. 8, p. 407-418, 2000.

OTT, E. S.; SHAY, N. F. Zinc deficiency reduces leptin gene expression and leptin secretion in rat adipocites. **Experiences of Biology Medicine**, v. 226, n. 9, p. 841-846, 2001.

OURIQUES, E. P. M. **Hábitos de atividade física e histórico de vida associados à densidade mineral óssea de pessoas com idade acima de 80 anos**. 2000. 10-35 p. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

OURIQUES, E. P. M.; FERNANDES, J. A. Atividade física na terceira idade: uma forma de prevenir a osteoporose? **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v. 2, n.1, p. 53-59, 1997.

PEAKE, M. A. et al. Cellular Responses to Mechanical Stress Selected Contribution: Regulatory Pathways Involved in Mechanical Induction of c-fos Gene Expression in Bone Cells. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, p. 2498-2507, 2000.

PENG, Z. et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, p. 523-532, 1994.

PERETZ, A ; PAPADOPOULOS, T. ; WILLEMS, D. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 15, n. 2/3, p. 175–178, 2001.

POWELL, S. R. The antioxidant properties of zinc. **The Journal of Nutrition**, v.130, p. 1447-1454, 2000.

PRASAD, A. S. Zinc deficiency in women, infants and children. **Journal of the American College of Nutrition**, v.15, n.2, p. 113-120, 1996.

RAISZ, L. G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n.8-B, p. 1353-1358, 1999.

RENNO, A. C. M. et al. Os efeitos de um programa de atividade física de carga progressiva nas propriedades físicas e na força óssea de ratas osteopênicas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 15, n. 5, p. 276-279, 2007.

RIBEIRO, A.F. C.; SERAKIDES, R.; NUNES A.V.; SILVA, C.M.; OCARINO, N.M. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n.3, p. 22-236, 2003.

RIGGS, B.L.; PARFITT, A. M. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. **Journal of Bone and Mineral Research**, *v.* 20, p. 177-84, 2005.

ROSEN, C. J. Pathogenesis of osteoporosis. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 2, v. 14, p. 181-193, 2000.

ROSSI, L. et al. Reduced Growth and Skeletal Changes in Zinc-Deficient Growing Rats Are Due to Impaired Growth Plate Activity and Inanition. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1142-1146, 2001.

SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research**, v. 20, n.5, p. 737-755, 2000.

SANDSTEAD, H. H. Understanding zinc: recent observations and interpretations. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 124, n. 3, p. 322-327, 1994.

SANDSTRÖM, B. Biovailability of zinc. **European Journal of Clinical Nutrition,** v. 51, p. S17-S9, 1997.

SANDSTRÖM, B. Dose dependence of zinc and manganese absorption in man. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 51, p. 211–218, 1992.

SANDSTRÖM, B. et al. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 115, p. 411–414, 1985.

SCRIMGEOUR, A. G. et al. Moderate zinc deficiency negatively affects biomechanical properties of rat tibiae independently of body composition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 813–819, 2007.

SERAKIDES, R. et al. Efeito da associação hipertireoidismo-castração no osso de ratas adultas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 875-884, 2004.

SHAPSES, S. A. et al. Osteoporosis. Recommended guidelines and New Jersey legislation. **New Jersey Medicine**, v. 97, p.53-57, 2000.

SHAY, N. F.; MANGIAN, H. F. Neurobiology of zinc-influenced eating behavior. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1493S-1499S, 2000.

SILVA-SANTANA, S. C. et al. Parâmetros de avaliação do estado nutricional de zinco: comparação entre os teores de zinco no cabelo e fosfatase alcalina sérica em pré-escolares do município de João Pessoa, Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde Materno-infantil**, v.2, n.3, p. 275-282, 2002.

SINGH, M. Role of micronutrients for physical growth and mental development. **Indian Journal of Pediatrics,** v.71, n.1, p. 59-62, 2004.

SNOW-HARTER, C.; MARCUS, R. Exercise, Journal of Bone and Mineral Researchal density and osteoporosis **Exercise and sport sciences reviews**, v.19, p.351-388, 1991.

SNYDER, A. et al. The effects of exercise mode, swimming vs. running, upon bone growth in the rapidly growing female rat. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 66, p. 59-69, 1992.

SZCKUREK, E.I.; BJORNSSON, C. S.; TAYLOR, C. G. Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. **The Journal of Nutrition** ., v. 131, p. 2132-21138, 2001.

TAKEDA, A. Movement of zinc and its functional significance in the brain**. Brain Research Reviews**, v. 34, p. 137-148, 2000.

TAMAKI, H. et al. Effects of exercise trainning and etidronate treatment on Journal of Bone and Mineral Researchal density and trabecular bone in ovariectomized rats. **Bone**, v.23, n.2, p. 147-153, Aug. 1998.

TANIZAWA, T. et al. Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. **Bone**, v. 26, n.1, p. 43-53, 2000.

TENÓRIO, A. S. Influência do treinamento físico sobre o metabolismo ósseo em camundongos ovariectomizadas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biofísica do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

TENÓRIO, A. S. et al. Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo e a concentração sérica de cálcio em camundongos fêmeas ovariectomizadas. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, p. 280-283, 2005.

THOMPSON, D. D. et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, n. 4, v. 17, 1995

TURNER, C. H.; ROBLING, A. G. Exercises for improving bone strength. **British Journal of Sports Medicine**, v. 39, p. 188-189, 2005.

TURNER, R.T.; ROGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Reviews**. v. 15, p. 275-300, 1994.

UELAND, T. et al. Increase Levels of Biochemical Markers of Bone Turnover in Relation to Persistent Immune Activation in Common Variable Immunodeficiency. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21; p. 72–78, 2001.

VALLEE, B.L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiology Reviews**, v.73, n.1, p. 79-118, 1993.

VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, p. 415-423, 1999.

VILARIÑO, A. et al. Actividad física y osteoporosis en mujeres postmenopáusica. **Obstetricia y ginecología latino-americanas**, v. 56, n. 1, p. 10-4, 1998.

VOHRA, P.;KRATZER, F. H. Influence of various chelating agents on the availability of zinc. **The Journal of Nutrition**, v 82, p. 249–256, 1964.

WEISS, J.H.; SENSI, S. L.; KOH, J.Y. Zn2+: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 395-401, 2001.

WINDAHL, S.H.; ANDERSSON, G.; GUSTAFSSON, J. Elucidation of estrogen receptor function in bone with the use of mouse models. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 195-200, 2002.

WOLFF, I. et al. The effect of exercise training programs on bone mass: a meta-analysis of published controlled trials in pre- and postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 9, p. 1–12, 1999.

YAMAGUCHI, M.; EHARA, Y. Zinc decrease and bone metabolism in the femoral–metaphyseal tissues of rats with skeletal unloading. **Calcified Tissue International**, v. 57, n. 3, p. 218–223, 1995.

YAN, L. et al. The effect of long-term calcium supplementation on indices of iron, zinc and magnesium status in lactating Gambian women. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 821–831, 1996.

YEH, J. K.; CHEN, M.; ALOIA, F. J. Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.273, Insue 4, E734-E742, Oct. 1997.

YUNG, P. et al. Effects of weight bearing and non-weight bearing exercises on bone properties using calcaneal quantitative ultrasound. **British Journal of Sports Medicine**, v. 39, p. 547-551, 2005.

ZHOU, J. R.; ERDMAN, J.W. Phytic acid in health and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 495-508, 1995.

5. APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

Os capítulos de resultados e discussão estão estruturados sob a forma de um artigo original intitulado: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO E A DENSIDADE ÓSSEA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS. A versão em inglês deste artigo foi enviado para publicação no periódico *Bone*.

ANEXO I

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO E DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO E A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.

Lígia de Albuquerque Maia[a], Talita Maria Alves Lopes da Silva[a], Plínio Luna de Albuquerque[b], Maria Luíza dos Anjos Pontual[c], Hosana Bandeira Santos[d], José Brandão Neto[e], Maria Aparecida Bezerra Quirino[f],Simone Bezerra Alves[f]

[a]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição – Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba

[b]. Graduação em Fisioterapia – Departamento de Fisioterapia – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba

[c]. Departamento de Odontologia - Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba

[d]. Laboratorio de Tecnologia Farmeceutica (LTF) – Departamento de Farmácia - Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba

[e]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Departamento de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

[f]. Departamento de Fisioterapia – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba – Endereço: Campus I - Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil – CEP 58059-900 – e-mail: simonea@gmail.com

Autor correspondente:

Simone Bezerra Alves

Endereço: Campus I - Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil – CEP 58059-900 –

Número de Telefone: +55 (083) 3216-7183 - +55 (083) 3216-7032 - +55 (083) 8883-7409

E-mail: simonea@gmail.com

RESUMO

Esta pesquisa tem como objetivo determinar os efeitos da suplementação com zinco e/ou do treinamento físico com impacto limitado pelo meio aquático sobre o metabolismo e a densidade mineral óssea (DMO) de ratas ovariectomizadas. Utilizou-se 60 ratas Wistar divididas em 5 grupos: Sham (S), controle ovariectomizado (Cox), zinco (Z), treinamento físico (TF) e zinco + treinamento físico (ZTF). Os grupos Z e ZTF receberam diariamente suplementação de zinco (25 mg/Kg de massa corporal) sob a forma de $ZnSO_4.7H_2O$ via oral (gavagem) durante 9 semanas. Os grupos TF e ZTF realizaram um protocolo de saltos aquáticos com carga progressiva três vezes por semana durante 10 semanas. Os parâmetros foram analisados por meio do teste t *student* pareado e ANOVA *one way* com *post hoc* de *Newman-Keuls*. Quando necessário, o teste ANOVA foi substituído pelo seu equivalente não paramétrico *Kruskal-Walli.* Adotou-se um nível de significância de 5% para todos os testes. A concentração sérica de fosfatase alcalina foi maior no grupo Cox ($p < 0,01$) quando comparado aos grupos C ($p < 0,01$) e ZTF ($p < 0,05$). A análise da DMO mostrou que esta foi maior para os grupos TF ($p < 0,05$) e ZTF ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos Cox e Z para as regiões da cabeça e colo cirúrgico femorais. Então, a suplementação de zinco não foi eficaz em promover aumento do metabolismo ósseo e da DMO, porém o protocolo de treinamento físico conseguiu intensificar a resposta osteogênica em ratas osteopênicas de maneira região dependente, podendo constituir uma modalidade terapêutica alternativa mais eficaz a ser utilizada no tratamento e na prevenção de perda óssea.

Palavras-chave: zinco, osso, densidade óssea, exercício terapêutico

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é um sério problema de saúde pública. Estimativas sugerem que uma em cada duas mulheres apresentará uma fratura osteoporótica em algum momento de sua vida [1].

Vários hormônios e enzimas zinco-dependentes estão envolvidos no metabolismo ósseo. O zinco pode estimular a atividade da fosfatase alcalina, enzima envolvida diretamente no processo de formação óssea, como também pode atuar na reabsorção [2]. Também se estudou seus efeitos em osteoclastos de ratos, e observaram que o zinco exerce um efeito inibitório na atividade dos osteoclastos *in vitro*, impedindo a reabsorção [3].

A atividade física tem sido defendida como um dos meios de promover aumento e manutenção da densidade mineral óssea (DMO), constituindo um tratamento eficiente para administrar a diminuição da DMO em pacientes com osteopenia ou osteoporose, principalmente com a utilização de exercícios de grande impacto [4, 5, 6, 7]. Adicionalmente, resultados de pesquisas que utilizaram exercícios com impacto limitado pelo meio aquático, ou mesmo a natação, mostraram um favorecimento da qualidade óssea [8, 9, 10, 11].

A literatura atual é escassa sobre a suplementação de zinco associada ao treinamento físico. Sabe-se que ambos têm efeito positivo para o metabolismo ósseo, porém questões como o tipo e a intensidade do treinamento físico permanecem inconclusivas. Também ainda não se conhece os efeitos de ambos quando atuando em conjunto. Além disso, não existe na prática clínica um protocolo de treinamento físico com impacto limitado pelo meio aquático que possa servir como alternativa terapêutica no tratamento ou na prevenção da osteopenia ou osteoporose.

Sendo assim, esta pesquisa tem como objetivo estudar os efeitos da suplementação com zinco e/ou do treinamento físico com impacto limitado pelo meio aquático, no metabolismo e na DMO de ratas ovariectomizadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 60 ratas Wistar, nulíparas, com idade de 60 dias, que foram mantidas em biotério, em gaiolas apropriadascom não mais que 6 animais por gaiola, sob ciclos de claro e escuro controlados (12 horas-12 horas) com temperatura de 22±1ºC. Estes animais receberam ração pró-biotério (Labina® Purina) e água destilada em quantidades suficientes para o consumo *ad libidum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal da Paraíba sob o protocolo 0604/09.

As ratas foram divididas em 5 grupos experimentais: S (Sham); Cox (controle ovariectomizado - foram submetidas à ovariectomia e não receberam nenhum outro tipo de tratamento); Z (zinco - foram submetidas à ovariectomia e receberam suplementação de zinco; TF (treinamento físico - foram submetidas à ovariectomia e realizaram treinamento físico; ZTF (zinco + treinamento físico - foram submetidas à ovariectomia, receberam suplementação de zinco e realizaram treinamento físico).

2.2 OVARIECTOMIA

Aos 60 dias de idade, 48 ratas foram ovariectomizadas. Para tanto, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina como pré-anestésico e em seguida

ketamina base a 2%, administrando-se 1ml/1000g por via intraperitoneal. Após tricotomia da região abdominal lateral, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na região abaixo da última costela e próxima ao nível dos rins. O ovário foi identificado e exposto, sendo o mesmo e a gordura circundante extraídos. A musculatura e a pele foram posteriormente suturadas com fio de seda 4.0. Esse procedimento cirúrgico foi realizado bilateralmente em cada animal.

Com a mesma idade, outras 12 ratas foram incluídas no grupo *Sham*.

2.3 SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO

Os animais dos grupos Z e ZTF receberam suplementação de zinco na dose de 25mg/kg de peso corporal/dia via oral (gavagem), na forma de $ZnSO_4.7H_2O$. As ratas dos demais grupos receberam a mesma quantidade de água milli-Q pela mesma via oral. A suplementação do zinco teve início na segunda semana de treinamento físico.

2.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Os animais dos grupos TF e ZTF foram submetidos a um programa específico de saltos em um cilindro de PVC de 25 cm de diâmetro contendo água, objetivando limitar a alternativa do animal em ir para outra direção ou agarrar-se para subir, favorecendo o salto apropriado. Os treinos ocorreram três vezes por semana sempre pela manhã, durante o período de 10 semanas. A profundidade da água contida nos tanques foi aproximadamente equivalente ao dobro do comprimento do rato. A temperatura da água foi mantida aproximadamente em 32 °C por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do rato [12].

O programa de treinamento foi adaptado do protocolo desenvolvido por Marqueti et al. [12] e Renno et al. [4] e constituiu de 4 séries de 10 saltos, com intervalo de 30 segundos entre as séries, sendo ajustada uma sobrecarga progressiva de acordo com o peso do animal. Para reduzir o estresse, os animais foram adaptados à água na primeira semana (pré-treinamento). A carga aumentava durante o experimento, da seguinte forma: Primeira e segunda semanas de treinamento: sobrecarga em 50% do peso corpóreo. Terceira e quarta semanas: 60%. Quinta e sexta semanas: 70%. Sétima e oitava semanas: 80%; e nona e décima semanas: em 90% do peso corpóreo das ratas.

A sobrecarga foi acoplada ao tórax dos animais através de um colete especial que permitiu a execução dos saltos sem que a carga escorregasse do corpo dos mesmos ou impedisse seus movimentos. Uma sobrecarga a mais correspondente ao peso do colete quando molhado (20 g), foi considerada e debitada da carga específica correspondente à massa corporal do animal para uma melhor precisão do treinamento.

2.5 OBTENÇÃO DA MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS E CONTROLE DO CONSUMO DE RAÇÃO

A massa corpórea dos animais foi verificada duas vezes por semana, utilizando-se balança analítica (Mettler, Suíça) – precisão: 0,1 g, capacidade máxima: 2610g. O controle do consumo da ração foi realizado nos mesmos dias, pesando-se na mesma balança a sobra da ração, e subtraindo da quantidade que foi estipulada a ser colocada como padrão (500g). Obtendo-se o consumo total por gaiola. Posteriormente foi calculada a média de consumo por animal.

2.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

2.7 COLETA SANGUÍNEA

O sangue foi retirado por punção cardíaca com seringa de 10 mL e agulha 25x7, sendo o material acondicionado em tubos para sorologia contendo uma barreira de gel no fundo do tubo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, a 4°C por 15 minutos. Durante a centrifugação, a barreira de gel moveu-se para cima posicionando-se entre o soro e o coágulo, formando uma barreira estável, separando o soro dos outros componentes celulares. As dosagens bioquímicas de fosfatase alcalina total e de cálcio foram realizadas imediatamente. Enquanto que o soro restante foi armazenado em tubos eppendorf e mantido em freezer -80°C, para a posterior realização da dosagem de estradiol que ocorreu 30 dias após a coleta.

2.8 DETERMINAÇÃO DA MASSA E DO TAMANHO DOS FÊMURES

Logo após a retirada do fêmur direito de cada animal, os ossos foram cuidadosamente dissecados, macerados e pesados em balança semi-analítica (A&D Company Limited). Em seguida, foi realizada a mensuração do comprimento do osso com paquímetro digital 7VS 150mm (6’’) EDA.

2.9 ESTUDO DA RADIOPACIDADE

Para a obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios X Medicor Budapeste Tipo SR-331 operando a 70kVp, 8mA, filtração total equivalente a 2,5mm de

alumínio, a uma distância foco-filme de 40 cm. Foram posicionados sobre um filme radiográfico oclusal Insight (Kodak Eastman Rochester, EUA) 1 fêmur de cada grupo, o penetrômetro de alumínio e a lâmina de chumbo. Foram obtidas 11 radiografias.

As densidades ópticas de cada um dos espécimes e dos degraus do penetrômetro foram mensuradas utilizando um densitômetro digital Macbeth TD 931 (Kollmorgen Instruments. New Windsor, NY, EUA). Nos fêmures, foi possível realizar uma mensuração em cada uma das regiões avaliadas: cabeça, colo cirúrgico, diáfise e epicôndilos.

O valor de densidade radiográfica foi convertido em milímetros de alumínio (mmAl) no programa Microsoft Excell 2007® a partir de uma equação obtida no gráfico de dispersão relacionando os valores de radiopacidade de cada degrau de alumínio, da densidade base e velamento e dos espécimes e sua espessura correspondente.

2.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

2.10.1 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ESTRADIOL

Esta dosagem foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. Foi utilizado o kit Abbott AxSYM SYSTEM® por meio da técnica de Imunoensaio Enzimático por Micropartículas (MEIA), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

2.10.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FOSFATASE ALCALINA TOTAL

A dosagem da concentração sérica de fosfatase alcalina total foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. Foi determinada através de método proposto pela Labtest-Diagnóstica, Brasil (Bowers e Mc Comb modificado), que segue o princípio de que a fosfatase alcalina do soro, em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico.

2.10.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CÁLCIO TOTAL E IONIZADO

A determinação da concentração do cálcio foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, utilizando-se o método proposto pela Labtest-Diagnóstica (Brasil). Os reagentes utilizados foram: tampão composto por 2-amino 2-metil 1- propanolol 0,5 mol/l, estabilizador e surfactante; reagente de cor (o-cresoftaleína complexona 92 nmol/l, 8-hidroxiquinoleína e estabilizador); padrão (cálcio 10 mg/dl). Os reagentes foram conservados em temperatura de 15-25º C.

O método colorimétrico foi usado para determinar o cálcio sérico. Medido em espectrofotômetro (Gehaka G3410, Brasil) a 570 nm da cor produzida pelo complexo formado entre ortocresoftaleína complexona e o cálcio, em pH alcalino.

O cálcio ionizado representa a concentração livre e biologicamente ativa no soro, foi determinado utilizando as dosagens de cálcio sérico, proteína total e albumina.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Foi feito o teste de normalidade dos dados. Com base neste teste, os dados foram analisados por meio do teste t

student pareado e ANOVA *one way* com *post hoc* de *Newman-Keuls*. Quando necessário, o teste ANOVA foi substituído pelo seu equivalente não paramétrico *Kruskal-Walli.* Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados foram processados no programa estatístico GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS

Os animais apresentaram massa corporal semelhante no início do experimento (Tabela 1). Após as 10 semanas, houve um ganho ponderal de massa corporal significativo para todos os grupos. Os dados do peso no final do experimento mostraram que o treinamento físico ou a suplementação de zinco não influenciou a evolução do peso corporal nos animais. No que diz respeito à ingestão alimentar, pode-se observar que todos os grupos ingeriram uma quantidade semelhante de ração, havendo significância estatística apenas quando se comparou o grupo ZTF ao grupo *Sham*.

Observa-se na Tabela 2 que a concentração sérica média de estradiol (pg/mL) apresentou-se menor em todos os grupos quando comparados ao grupo sham, apresentando diferença estatisticamente significativa com todos os grupos, confirmando o sucesso do procedimento cirúrgico.

Com relação à fosfatase alcalina, os dados mostram que a ovariectomia induziu um aumento da atividade desta enzima, o que foi observado por uma concentração significativamente aumentada desta enzima nos grupos Cox e Z em relação ao grupo *Sham*. Por outro lado, percebe-se que o treinamento físico inibiu esse aumento, pois os grupos treinados TF e ZTF não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o grupo *Sham* (Tabela 2).

No que diz respeito à DMO, pode-se observar para as regiões da cabeça e do colo cirúrgico femorais que o treinamento físico reverteu a perda de massa óssea induzida pela ovariectomia, pois os grupos treinados TF e ZTF não foram estatisticamente diferentes do grupo S, porém apresentaram DMO significativamente maior que os grupos Cox e Z. No entanto, a suplementação de zinco não foi capaz de minimizar a perda de DMO em relação aos grupos S e Cox (Figura 1).

Nessa mesma figura, pode-se observar que nas regiões da diáfise e dos epicôndilos femorais nem o treinamento físico e nem a suplementação de zinco reverteram a perda de massa óssea promovida pela ovariectomia. Entretanto, o treinamento isoladamente teve uma tendência a reverter a perda de DMO em relação ao grupo Cox na região dos epicôndilos (p=0,08 entre TF e Cox).

4. DISCUSSÃO

A determinação da concentração sérica do hormônio estradiol neste estudo foi menor nos animais ovariectomizados em relação ao controle, confirmando o sucesso do procedimento cirúrgico. Também se constatou que nem a supressão de estrogênio, nem a suplementação de zinco, nem o treinamento físico alteraram o ganho de massa corporal desses animais. É importante salientar que o acompanhamento da massa corporal e consumo de ração é de fundamental importância para este estudo, uma vez que a literatura mostra que pode existir uma relação entre a obesidade e a DMO. Sendo que para alguns autores esta correlação é negativa [13, 14] e para outros é positiva [15, 16]. Assim é possível notar que todos os grupos aumentaram a massa corporal similarmente, o que não caracteriza obesidade. Além disso, é válido salientar que todos os animais estavam em fase de crescimento, o que

pode explicar o ganho de massa similar mesmo após a supressão estrogênica. Assim, o hipoestrogenismo não causou maior aumento de massa. Estes dados corroboram com os de Chen et al. [17], que verificaram em estudo utilizando ratas Sprague-Dawley, um aumento da massa corpórea após 30 dias de ovariectomia. No entanto, entre os animais treinados, ovariectomizados e não-ovariectomizados não houve diferença estatisticamente significativa na massa corpórea.

Observou-se que a carência de estrogênio não alterou o consumo de ração. Dados similares foram observados por Wallen et al. [18]. Os mesmos verificaram que a supressão do estrogênio, proporcionada pela ação de droga antagonista do receptor tecidual deste hormônio, pode induzir a um aumento similar da massa corpórea sem aumento da ingestão alimentar.

Curiosamente, o grupo ZTF teve uma média de ingestão alimentar diária menor em relação ao grupo controle. Como foi apenas este grupo que teve a alimentação reduzida, não se pode associar este fenômeno à ovariectomia, ao treinamento físico ou a suplementação de zinco isoladamente. Dados prévios apontam que o zinco pode promover aumento da produção de leptina [19, 20] e desempenhar papel importante na regulação do apetite [21, 22]. Do mesmo modo, alguns relatos associam o treinamento físico à redução do apetite [23]. Entretanto, não existem estudos associando exercício físico e zinco na supressão do apetite. De qualquer maneira, os dados de nosso estudo devem ser ponderados pelo fato de que a diferença na ingestão dos animais ZTF foi tão pequena quanto apenas 1,42g/dia/animal. Além disso, esta diferença não foi capaz de promover um menor aumento de massa corporal destes animais.

Com relação à concentração sérica de cálcio total e ionizado, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. As suas concentrações séricas mantiveram-se dentro dos limites esperados para a homeostasia em

todos os grupos. Isto comprova a prioridade do organismo em manter a homeostasia do cálcio, mobilizando-o principalmente dos ossos, e também aumentando a sua absorção intestinal e reabsorção renal [24, 25, 26].

Observou-se uma alta concentração de fosfatase alcalina nos grupos ovariectomizados, o que poderia evidenciar uma alta taxa de formação óssea. Porém, não podemos afirmar isto somente com a avaliação desta variável, uma vez que uma maior atividade osteoblástica pode ser acompanhada por aumento da reabsorção.

Rahnama e Swiatkowski [27] observaram elevada concentração de fosfatase alcalina no grupo de ratas ovariectomizadas. Estas também apresentaram maiores concentrações de fosfatase ácida, indicando um aumento da remodelação. Dados similares foram apresentados por Iwamoto et al.[28] em estudo com macacas ovariectomizadas. Assim a carência de estrogênio não leva a inibição dos osteoclastos, o que aumenta a reabsorção óssea. Conseqüentemente, isto vem acompanhado de uma intensificação da atividade dos osteoblastos, que é refletida no presente estudo pela maior concentração de fosfatase alcalina, principalmente no grupo Cox.

Estes dados corroboram com Sones et al. [29] que também observaram elevadas concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina em animais osteopênicos pós-ovariectomia. Dados similares também foram observados por Christiansen et al. [30], que verificaram em mulheres aumento de aproximadamente 20% da concentração de fosfatase alcalina na menopausa em comparação a valores pré-menopausicos. Assim, acredita-se que na supressão estrogênica pode haver um mecanismo compensatório que visa evitar perda óssea, o que é observado pela atividade da fosfatase alcalina total aumentada.

A ração destinada aos animais não continha nutrientes que afetassem a absorção do zinco, como no caso do fitato e caseína. Além disso, realizou-se a suplementação por gavagem da solução de sulfato de zinco hepta-hidratado, pois estudos mostram que

quantidade de zinco absorvido a partir de uma única refeição sólida é normalmente de 18-20 µmol, enquanto que a absorção a partir de soluções de água pode atingir 80-100 µmol [31, 32]. Apesar de termos adotado o melhor meio para assegurar a máxima absorção de zinco, observou-se que a suplementação de zinco não teve influência positiva no metabolismo ósseo, na DMO, massa e comprimento femorais. Em contraste, Ovesen et al. [33] mostraram que a suplementação de zinco na ração aumentou as taxas de crescimento corporal e ósseo em ratos jovens (4 semanas de idade) sem supressão hormonal. Ma et al. [34] também constataram que a suplementação oral de zinco teve efeito anabólico sobre os componentes ósseos em ratas idosas (50 semanas de idade), não ovariectomizadas, sugerindo um papel importante do zinco na prevenção da perda de massa óssea com o aumento da idade.

Kishi, Segawa e Yamaguchi [35] suplementaram zinco via oral durante 3 meses, e observaram que as doses testadas preveniram a perda de massa óssea decorrente da ovariectomia em ratas também com 50 semanas de idade. O modelo experimental utilizado no presente estudo não se assemelha a nenhum dos anteriores, uma vez que nós utilizamos animais bem mais jovens (aproximadamente 24 semanas). Então se acredita que a idade para a realização da suplementação com zinco é determinante para seu efeito anabólico no tecido ósseo. Isso talvez se deva ao fato de que cada fase da vida apresenta suas peculiaridades metabólicas, sendo necessário avaliar esta hipótese em estudos futuros.

Com relação ao treinamento físico, encontramos resultados semelhantes aos encontrados na literatura, ao observarmos que a prática regular de exercícios pode atenuar a perda óssea decorrente da menopausa [4, 7, 36, 37, 38].

Em nosso estudo, optamos por um protocolo de exercício com minimização dos impactos. Honda et al. [37] realizaram uma pesquisa onde ratas ovariectomizadas desempenharam um protocolo de treinamento físico com impacto. Observaram que o treinamento e a ovariectomia não afetaram o comprimento ósseo, porém aumentou a DMO.

Todos estes dados estão de acordo com presente estudo, mesmo com a limitação do impacto pelo meio aquático. Fato também constatado por Renno et al. [4] em protocolo semelhante ao nosso e por Kato et al. [39] em treinamento com impacto em mulheres jovens. Heikkinen et al. [7] verificaram que existe uma correlação positiva entre o número de impactos, a DMO e a ultrasonografia de calcâneo após longo período de exercícios de impacto.

A metodologia por nós adotada permitiu a observação de que os ganhos de DMO são região-dependentes. Kato et al. [39] mostraram que exercícios de alto impacto são efetivos para a melhora da DMO principalmente no colo do fêmur. Os dados do nosso estudo mostraram que a melhora da DMO em conseqüência do treinamento físico se dá na região mais proximal dos fêmures, pois pudemos observar melhora da DMO na cabeça e no colo femorais, enquanto que não se observou essa melhora na diáfise e nos epicôndilos, apesar de que nestes últimos houve uma tendência a aumento da DMO. Já foi relatado que a formação óssea causada por cargas mecânicas é estrategicamente localizada nos sítios biomecanicamente mais ativos do osso [40]. Nossos dados sugerem que o treinamento físico tem efeito benéfico principalmente nas regiões de osso esponjoso do fêmur, nas epífises. Isto pode ser explicado porque a atividade física induz um aumento da carga mecânica que age sobre o tecido ósseo devido a forças externas e contrações musculares, o que gera uma força de tensão que impede o remodelamento dos ossos e conserva ou aumenta a massa óssea [41, 42], e o osso esponjoso por causa de sua estrutura porosa tem uma ampla capacidade em armazenar energia e é metabolicamente mais ativo, respondendo melhor a esses estímulos [43, 44], além de que o efeito do treinamento físico ocorre especificamente nos locais que suportam o estresse [45, 46, 47]. Este benefício tem importantes implicações, pois ossos primariamente esponjosos, como a região proximal do fêmur, são mais afetados pela deficiência estrogênica quando comparados ao osso cortical. Sendo assim, eles estão mais sujeitos a fraturas[37]. Desta forma, o protocolo de treinamento utilizado foi capaz de

promover ganho de massa óssea nas regiões mais frágeis do fêmur, podendo constituir uma terapia alternativa para a prevenção de fraturas decorrentes da osteoporose.

A literatura é escassa no que diz respeito a pesquisas que relacionam suplementação de zinco e treinamento físico. Seco et al. [48] avaliaram os efeitos da suplementação de zinco e do exercício na esteira sobre o fêmur de ratas adultas sem ovariectomia. Eles sugeriram que o zinco pode prevenir a perda de massa óssea em ratos submetidos ao exercício intenso. Entretanto é importante destacar que neste modelo os animais não tinham carências de hormônios importantes para o metabolismo ósseo e foram submetidos a um treinamento extenuante, similar aos dos atletas, que pode ter um efeito negativo sobre o tecido ósseo, como sugeriu Nordsletten et al. [49]. Estes dados são contrários aos do presente estudo, onde se utilizou modelo de rata ovariectomizada, mimetizando a perda de massa óssea que ocorre em mulheres na pós-menopausa e um protocolo de treinamento físico com possibilidade terapêutica, respeitando os limites fisiológicos, sem levar o animal a exaustão.

Em resumo, pode-se concluir que os exercícios com carga progressiva realizados em ambiente aquático conseguiram intensificar a resposta osteogênica no tecido osteopênico. Embora a força gravitacional e o impacto da carga sejam menores na água, provavelmente a carga imposta pelas contrações musculares em regiões especificas do fêmur também sobrecarregou o tecido ósseo, aumentando o metabolismo de formação óssea e a DMO em regiões especificas do fêmur. Dessa forma, o protocolo de treinamento utilizado neste estudo pode ser mais eficaz para aumentar a qualidade óssea de indivíduos adultos que os exercícios aeróbicos de alto impacto com carga. Também não se deve desconsiderar a importância do zinco para o metabolismo ósseo, uma vez que se faz necessário uma análise dos seus possíveis benefícios em diferentes fases da vida, além de avaliar a sua ação juntamente com outros tipos de treinamentos físicos. Assim este estudo abre perspectivas para a utilização em

humanos de uma modalidade terapêutica alternativa e eficaz no tratamento e na prevenção da osteoporose.

5. REFERÊNCIAS

5. REFERENCES

[1] Shapses SA, Luckey MM, Levine JP, Timins JK, Mackenzie GM. Osteoporosis: recommended guidelines and New Jersey legislation. N J Med. 2000; 97:53-57

[2] Peretz A, Papadopoulos T, Willems D. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. J Trace Elem Med Biol. 2001; 15(2/3):175–8.

[3] Moonga BS, Dempster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. J Bone Miner Res. 1995; 10:453–7.

[4] Renno ACM, Faganello FR; Moura FM, Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Zuanon JA, Benatti Neto C, Parizotto NA. Os efeitos de um programa de atividade física de carga progressiva nas propriedades físicas e na força óssea de ratas osteopênicas. Acta Ortop Bras. 2007; 15(5):276-9.

[5] Wolff I, van Croonenborg JJ, Kemper HC, Kostense PJ, Twisk JW. The effect of exercise training programs on bone mass: a meta-analysis of published controlled trials in pre- and postmenopausal women. Osteoporos Int. 1999; 9:1–12.

[6] Borer KT. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women: interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. Sports Med. 2005; 35(9):779-830.

[7] Heikkinen R, Vihriälä E, Vainionpää A, Korpelainen R, Jämsä T. Acceleration slope of exercise-induced impacts is a determinant of changes in bone density. J Biomech. 2007; 40(13):2967-74.

[8] Snyder A, Zierath JR, Hawley JA, Sleeper MD, Craig BW. The effects of exercise mode, swimming vs. running, upon bone growth in the rapidly growing female rat. Mech Ageing Dev. 1992; 66(1):59-69.

[9] Bourrin S, Palle S, Genty C, Alexandre C. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. J Bone Miner Res. 1995; 10(5):820-8.

[10] Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. J Appl Physiol. 2001; 91(4):1663-8.

[11] Yung P, Lai YM, Tung PY, Tsui HT, Wong CK, Hung VW, Oin L. Effects of weight bearing and non-weight bearing exercises on bone properties using calcaneal quantitative ultrasound. Br J Sports Med. 2005; 39:547-51

[12] Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SE, Selistre-de-Araujo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. Am J Sports Med. 2006; 34:1274-80

[13] Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, Pail P, Rauner M, Stupphann D, Resch H, Moser D, Zysset PK, Stulnig TM, Pietschmann P. Metabolism. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity, Metabolism - Clinical and Experimental 2010; 19.

[14] Hipmair G, Böhler N, Maschek W, Soriguer F, Rojo-Martínez G, Schimetta W, Pichler R. Serum leptin is correlated to high turnover in osteoporosis. Neuro Endocrinol Lett 2010; 31:155-160.

[15] Reid IR, Ames R, MC Evans, S Sharpe, G Gamble, JT France, TM Lim, TF Cundy. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women- a key role for fat mass. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:45-51.

[16] Khosla S, EJ Atkinson, BL Riggs, LJ Melton, Relationship between body composition and bone mass in women, J Bone Miner Res 1996; 11:857-63.

[17] Chen JL, Yao W, Frost HM, Li CY, Settemberg RB, Jee WSS. Bipedal stance exercise enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effects on bone formation in sham and ovariectomized rats. Bone 2001 Aug; 29(2):126-133.

[18] Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. J Nutr. 2001;131(9):2351-7

[19] Baltaci AK, Ozyurek K, Mogulkoc R, Kurtoglu E, Ozkan Y, Celik I. Effects of zinc deficiency and supplementation on the glycogen contents of liver and plasma lactate and leptin levels of rats performing acute exercise. Biol Trace Elem Res. 2003; 96:227-236.

[20] Baltaci AK, Mogulkoc R, Halifeoglu I. Effects of zinc deficiency and supplementation on plasma leptin levels in rats. Biol Trace Elem Res. 2005 April;104(1):41-6.

[21] Shay NF, Mangian HF. Neurobiology of zinc-influenced eating behavior. J Nutr. 2000;130:1493S-1499S.

[22] Ott ES, Shay NF. Zinc deficiency reduces leptin gene expression and leptin secretion in rat adipocites. Exp Biol Med. 2001; 226(9):841-6.

[23] Erdmann J, Tahbaz R, Lippl F, Wagenpfeil S, Schusdziarra V. Plasma ghrelin levels during exercise — Effects of intensity and duration. Reg Peptides 2007; 143:127-135.

[24] Nordin BEC. Calcium and osteoporosis. Nutrition. 1997;718(13):1-23.

[25] Horcajada MN, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N, Pastoureau P, Leterrier C, Culioli J, Barlet JP. Influence of treadmill running on femoral bone in young orchidectomized rats. J Appl Physiol. 1997 Jul; 83(1):129-33.

[26] Takada Y, Matsuyama H, Kato K, Kobayashi N, Yamamura J, Yahiro M, Aoe S. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. Nutr Res. 1997 Nov; 17(11):1709-20.

[27] Rahnama M, Świątkowski W. Effect of ovariectomy on biochemical markers of bone turnover (ALP, ACP) and calcium content in rat mandible and teeth. Bull Vet Inst Pulawy. 2002; 46:281-7.

[28] Iwamoto J, Seki A, Matsuura M, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H, Yeh JK. Influence of Ovariectomy on Bone Turnover and Trabecular Bone Mass in Mature Cynomolgus Monkeys. Yonsei Med J. 2009 Jun; 50(3):358–67.

[29] Sones AD, Wolinsky LE, Kratochvil FJ. Osteoporosis e mandibular bone resorption in the Sprague Dawley rat. Calcif Tissue Int. 1986; 39(4):267-70

[30] Christiansen C, Rodbro P, Tjellesen L. Serum alkaline phosphatase during hormone treatment in early postmenopausal women. Acta Med Scand. 1984; 216(1):11-17.

[31] Sandström B. Dose dependence of zinc and manganese absorption in man. Proc Nutr Soc. 1992; 51:211–8.

[32] Lönnerdal B. The effects of milk and milk components on calcium, magnesium and trace element absorption during infancy. Physiol Rev. 1997; 77:634–99.

[33] Ovesen J, Møller-Madsen B, Thomsen JS, Danscher G, Mosekilde L. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats. Bone. 2001; 29(6):565-70.

[34] Ma ZJ, Igarashi A, Yamakawa K, Yamaguchi M. Enhancing Effect of Zinc and Vitamin K2 (Menaquinone-7) on Bone Components in the Femoral Tissue of Female Elderly Rats. J Health Sci. 2001; 47(1):40-45.

[35] Kishi S, Segawa Y, Yamaguchi M. Histomorphological confirmation of the preventive effect of beta-alanyl-l-histidinato zinc on bone loss in ovariectomized rats. Biol Pharm Bull. 1994; 17:862–5.

[36] Chen X, Aoki H, Fukui Y. Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. Biomed Mater Eng. 2004; 14(1):53-5.

[37] Honda A, Sogo S, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in rats ovariectomized with the same outcome as Sham rats. J Appl Physiol. 2003; 95:1032-7

[38] Turner CH, Robling AG, Exercises for improving bone strength. Brit J Sports Med 2005; 39:188-189.

[39] Kato T, Terashima T, Yamashita T, Hatanaka Y, Honda A, Umemura Y. Effect of low-repetition jump training on bone mineral density in young women. J Appl Physiol. 2006; 100(3):839-43.

[40] Robling AG, Hinant FM, Burr DB, and Turner CH. Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. J Bone Miner Res 17: 1545–1554. 2002.

[41] Peng Z, Tuukkanen H, Zhang H, Jamsa T. The mechanical strength of bone in differentrat models of experimental osteoporosis. Bone. 1994; 15:523-32.

[42] Barengolts EI, Lathon PV, Curry, DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. Bone Miner. 1994; 26:133-40.

[43] Vincent KR, Braith RW. Resistance training and bone turnover in elderly men and women. Med Sci Sports Exerc 2002;34:17-23.

[44] Menkes A, Mazel S, Redmond RA, Koffler K, Libanati CR, Gundemberg CM, et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. J Appl Physiol 1993;74:2478-84.

[45] Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M, Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. Med Sci Sports Exerc 2001;33:507-11.

[46] Sandström P, Jonsson P, Lorentzon R, Thorsen K. Bone mineral density and musclestrength in female ice hockey players. Int J Sports Med 2000;21:524-8.

[47] Morris FL, Smith RM, Payne WR, Galloway MA, Wark JD. Compressive and shear force generated in the lombar spine of female rowers. Int J Sports Med 2000;21:518-23.

[48] Seco C, Revilla M, Hernandez ER, Gervas J, Gonzalez-Riola J, Villa LF, Rico H. Effects of Zinc Supplementation on Vertebral and Femoral Bone Mass in Rats on Strenuous Treadmill Training Exercise. J Bone Miner Res. 1998;13:508–12.

[49] Nordsletten L, Kaastad TS, Madsen JE, Reikeras O, Ovstebo R, Stromme JH, et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. Calcif Tissue Int. 1994; 55:436-42

Tabela 1: Valores médios de massa corporal, porcentagem de ganho de massa corporal, valores médios de ingestão de ração, valores médios da massa e do comprimento femorais

GRUPOS	MASSA CORPORAL (g)				INGESTÃO DE RAÇÃO (g/dia/animal)	COMPRIMENTO FEMORAL (mm)	MASSA FEMORAL (g)	N
	Inicial	Final	Ganho (%)	Valor de p				
S	224,6 ± 21,44	288,2 ± 22,24	22,1%	p < 0,01	17,82 ± 1,14	35,46 ± 0,72	0,90 ± 0,08	11
Cox	224,4 ± 19,66	304,8 ± 24,21	26,4%	p = 0,01	17,51 ± 1,34	35,19 ± 0,96	0,82 ± 0,06	09
Z	219,7 ± 17,90	303,2 ± 27,63	27,7%	p < 0,01	17,52 ± 1,62	35,17 ± 0,73	0,82 ± 0,07	11
TF	220,2 ± 20,28	293,5 ± 33,14	25%	p < 0,01	17,57 ± 1,31	35,58 ± 1,49	0,90 ± 0,08	12
ZTF	221,5 ± 25.86	286,4 ± 16,46	22,7%	p < 0,01	16,40 ± 1,31*	34,93 ± 0,94	0,84 ± 0,06	11

Nota: Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. S (Sham); Cox (Controle ovariectomizado); Z (zinco); TF (treinamento físico); ZTF (zinco + treinamento físico); * = p< 0,05 em relação ao grupo S.

Tabela 2: Valores das concentrações séricas médias de Estradiol; Cálcio total e ionizado; e Fosfatase Alcalina Total para cada um dos grupos estudados

GRUPOS	ESTRADIOL pg/mL	CÁLCIO TOTAL mg/dL	CÁLCIO IONIZADO mg/dL	FOSFATASE ALCALINA TOTAL U/L
S	13,00 ± 3,4	10,78 ± 0,61	5,86 ± 0,37	92,38 ± 27,18
Cox	4,75 ± 2,9*	11,25 ± 0,97	6,35 ± 0,54	155,17 ± 44,29**
Z	3,5 ± 3,7*	10,98 ± 1,03	6,25 ± 0,61	141,38 ± 29,19*
TF	1,20 ± 1,8**	10,39 ± 0,37	5,97 ± 0,24	129,00 ± 21,71
ZTF	0,20 ± 0,45**	10,92 ± 0,86	6,1 ± 0,44	105,43 ± 28,25†

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão para 04 a 11 animais; S(Sham); Cox (Controle ovariectomizado); Z (zinco); TF (treinamento físico); ZTF (zinco + treinamento físico); * = p<0,05 comparado ao grupo S; ** = p<0,01 comparado ao grupo S; † = p<0,05 comparado ao grupo Cox.

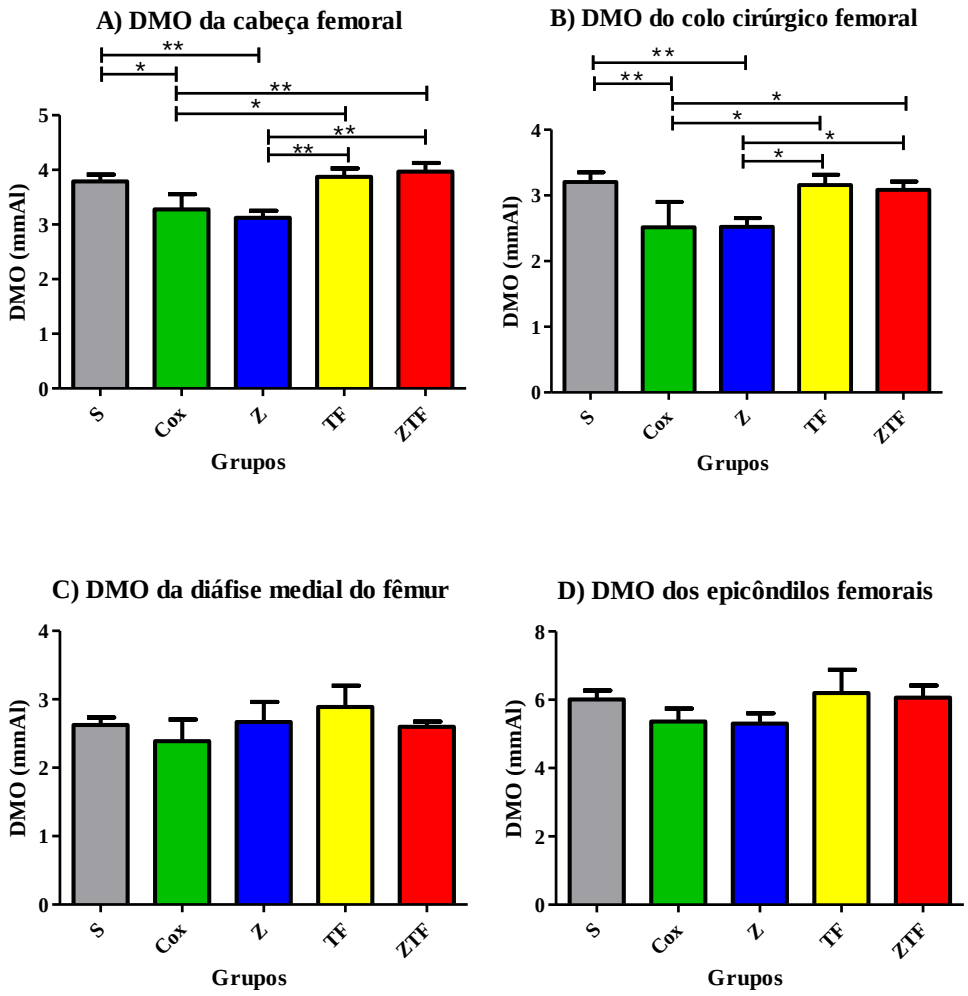

Figura 1: Valores médios da Densidade Mineral Óssea para as regiões dos fêmures das ratas: A) Cabeça; B) Colo cirúrgico; C) Diáfise; D) Epicôndilos. Dados são expressos como média e desvio padrão da média. S (Sham); Cox (Controle ovariectomizado); Z (zinco); TF (treinamento físico); ZTF (zinco + treinamento físico); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

EFFECTS OF ZINC SUPPLEMENTATION AND PHYSICAL TRAINING ON BONE METABOLISM AND BONE MINERAL DENSITY OF OVARIECTOMIZED RATS

Lígia de Albuquerque Maia[a], Talita Maria Alves Lopes da Silva[a], Plínio Luna de Albuquerque[b], Maria Luíza dos Anjos Pontual[c], Hosana Bandeira Santos[d], José Brandão Neto[e], Maria Aparecida Bezerra Quirino[f],Simone Bezerra Alves[f]

[a]. Post-graduation program in Nutrition Sciences – Department of Nutrition - Center of Health Sciences – Paraíba Federal University

[b]. Graduation in – Department of Physiotherapy – Center of Health Sciences – Paraíba Federal University

[c]. Department of Odontology - Center of Health Sciences – Paraíba Federal University

[d]. Laboratory of Pharmaceutical Technology (LTF) – Department of Pharmacy - Center of Health Sciences – Paraíba Federal University

[e]. Post-graduation program in Health Sciences – Department of Health Sciences – Rio Grande do Norte Federal University

[f]. Department of Physiotherapy - Department of Health Sciences – Paraíba Federal University – Address: Campus I - Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil – Postal Code 58059-900 – e-mail: simonea@gmail.com

ABSTRACT

This research aims to determine the effects of supplementation with zinc and/or physical training in water on bone metabolism and bone mineral density (BMD) of ovariectomized rats. 60 Wistar female rats were divided into 5 groups: sham (S), ovariectomized control (Cox), zinc (Z), physical training (PT) and zinc + physical training (ZPT). The groups Z and ZPT received daily zinc supplementation (25 mg/kg of body weight) in the form of ZnSO4.7H2O by gavage for 9 weeks. Groups PT and ZPT performed a progressive loading exercise program of jumps in water three times a week for 10 weeks. The parameters were analyzed using Student t test and one-way ANOVA with post hoc Newman-Keuls. When necessary, ANOVA one way was replaced by its equivalent non-parametric Kruskal-Walli. A significance level of 5% was adopted for all tests. Serum alkaline phosphatase was higher in Cox ($p < 0.01$) when compared to C ($p < 0.01$) and ZPT ($p < 0.05$). BMD was higher for PT ($p < 0.05$) and ZPT ($p < 0.05$) when compared to Cox and Z for the femoral head and femoral neck surgery. So, zinc supplementation was not effective in increasing bone turnover and BMD, but the physical training program was able to enhance the osteogenic response in osteopenic rats in a region dependent way and may constitute an alternative therapeutic modality more effective for use in the treatment and the prevention of bone loss.

Key-words: zinc; bone metabolism; bone mineral density; physical training.

1. INTRODUCTION

Osteoporosis is a serious problem to public health. Estimates suggest that one in every two women will have an osteoporotic fracture at some moment of her life [1].

Several hormones and zinc-dependent enzymes are involved in the bone metabolism. Zinc may stimulate the alkaline phosphatase activity, an enzyme directly involved in the process of bone formation, and may also act in the reabsorption [2]. Their effects on rats' osteoclasts were also studied and it was found out that zinc has an inhibitory effect on the activity of *in vitro* osteoclasts, hindering the reabsorption [3].

Physical activity has been advocated as one of the means to promote the increase and maintenance of bone mineral density (BMD), an efficient treatment to administer the reduction of BMD in patients with osteopeny or osteoporosis, especially using high impact exercises [4, 5, 6, 7]. Additionally, results of the research that used water exercises with a limited impact, or even swimming, showed a benefit to the bone quality [8. 9. 10. 11].

Current literature is poor on the zinc supplementation associated to physical exercise. It is known that both have a positive effect to the bone metabolism; however, issues such as the type and intensity of physical exercise remain inconclusive. Likewise, the effects of both when acting jointly is not yet known. Furthermore, there is not in the clinical practice a physical exercise protocol with impact limited by the water environment which may serve as a therapeutic alternative to the treatment or prevention of osteopeny or osteoporosis.

Therefore, this research aims at studying the effects of zinc supplementation and/or the physical exercise with impact limited by the water environment, in the metabolism and the BMD of ovariectomized rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMALS

Sixty nuliparous 60-day-old female Wistar rats were used, housed in a laboratory, inside appropriate cages with a maximum of six animals per cage, under controlled light-dark cycles (12 hours-12 hours) at a temperature of 22±1°C. These animals were fed a pro-laboratory feed (Labina® Purina) and distilled water in quantities sufficient for *ad libidum* ingestion . The present work was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Paraíba, under protocol number 0604/09.

The rats were divided into 5 experimental groups: S (Sham); Cox (ovariectomized control – were submitted to ovariectomy and did not receive any other type o treatment); Z (zinc – they were submitted to ovariectomy and received a zinc supplementation; PT (physical exercise- were submitted to ovariectomy and exercised; ZPT (zinc + training and exercised- were submitted to ovariectomy, received zinc supplementation and exercised).

2.2 OVARIECTOMY

Forty-right female rats (60 days old) were ovariectomized. The animals were anesthetized with a solution of xilazine chloridrate as the pre-anesthetic followed by ketamine base at 2%, and 1ml/1000g via intraperitoneal. After the tricotomy of the side abdominal region, the skeen and the muscles were lengthwise incised, in the region below the last rib and close to the kidneys level. The ovary was identified and exposed, and the same and the surrounding fat were extracted. The muscles and skin were subsequently sutured with a 4.0 silk thread. Such surgical procedure was performed bilaterally in each animal.

With the same age, 12 other rats were included in the Sham group.

2.3 ZINC SUPPLEMENTATION

The animals from groups Z and ZPT received a zinc supplementation of 25mg/kg of the body weight/day orally (gavage feeding), in the form of $ZnSO_4.7H_20$. The rats from the other groups received the same amount of water milli-Q also orally. The zinc supplementation started on the second week of physical exercises.

2.4 PHYSICAL TRAINING PROTOCOL

The animals from PT and ZPT groups were submitted to a specific program of jumps on a 25 cm diameter PVC cylinder with water, with the purpose of limiting the animal's alternative to go the other direction or grasping to climb, thus favoring the appropriate jump. The exercises were made three times a week always in the morning, during a 10-week period. The water depth contained in the tanks was approximately equivalent to the double of the rat's length. The water temperature was kept approximately at 32^oC, a thermatically neutral temperature as related to the rat's body temperature [12].

The exercise program was adapted to the protocol developed by Marqueti et al [12] and Renno et al [4] and comprised 4 bouts of 10 jumps, at 30 seconds intervals between the bouts, and the adjustment of a progressive overload according to the weight of the animal. To reduce the stress, the animals were adapted to the water in the first week (pre-exercise). The load increased during the experiment, as follows: First and second weeks of exercise: overload at 50% of the body weight. Third and fourth weeks: 60%. Fifth and sixth weeks: 70%. Seventh and eighth weeks: 80%; and ninth and tenth weeks: at 90% of the rats' body weight.

The overload was coupled to the thorax of the animals through a special vest which allowed the performance of the jumps without the slipping of the load from their bodies or the

hindrance of their movements. An overload corresponding to the weight of the wet vest (20g) was considered and debited from the specific load corresponding to the animal's body mass for a better accuracy of the exercise.

2.5 OBTAINING THE ANIMALS' BODY MASS AND THE CONTROL OF THE FOOD INGESTION

The animals' body mass was checked twice per week, using an analytical scale (Mettler, Switzerland) – precision: 0.1g, maximum capacity: 2610g. The control of the food ingestion was performed on the same days, by weighing on the same scale the food leftovers, and subtracting from the quantity stipulated to be placed as a standard (500g). The total ingestion per cage was obtained. Subsequently, the average ingestion per animal was calculated.

2.6 SACRIFICE OF THE ANIMALS

The animals were sacrificed through cervical movement.

2.7. BLOOD COLLECTION

The blood was collected through a cardiac puncture with a 10mL syringe and a 25x7 needle, the material was packed in serology tubes. Following, the samples were centrifuged at 3,000 rpm, at 4°C for 15 minutes. During the centrifugation, the gel barrier moved upwards and was positioned between the serum and the coagulant, forming a stable barrier, separating the serum from the other cellular components. The biochemical doses of total alkaline phosphatase and calcium were carried out immediately. The remaining serum was stored in eppendorf tubes and kept in a freezer at -80 ° C, for later dosing of stradiol that occurred 30 days after collection.

2.8 DETERMINATION OF THE MASS AND OF THE SIZE OF FEMURS

Soon after the withdrawal of the right femur of each animal, the bones were carefully dissected, macerated and weighed in a semi-analytical scale (A & D Company Limited). Next, the measurement of the bone length was accomplished with a digital caliper 7VS 150mm (6") EDA.

2.9 STUDY OF RADIO-OPACITY

The radiographic images were obtained using the X-ray machine Medicor Budapest Type SR-331, operating at 70 kVp, 8mA, total filtration equivalent to 2.5 mm of aluminum, at a focus-film distance of 40 cm. One femur of each group, the aluminum penetrometer and the plumb blade were place on an occlusal R-x film Insight (Eastman Kodak Rochester, USA). Eleven radiographs were obtained.

The optical densities of each species and the degrees of the penetrometer were measured using a Macbeth TD 931 digital densitometer (Kollmorgen Instruments. New Windsor, NY, USA).

In the femurs, it was possible to perform a measurement on each of the studied regions: head, surgical neck, shaft and epicondilus.

The value of the radiographic density was converted to millimeters of aluminum (mmAl) in the Microsoft ® Excel 2007 from an equation obtained in the scatter graph listing the radiopacity values of each degree of aluminum, of the base density and fog and of the specimens and their corresponding thickness.

2.10 EVALUATION OF THE BIOCHEMICAL PARAMETERS

2.10.1 SERIC LEVELOF STRADIOL

This measurement was performed in the Clinical Analysis Laboratory of the University Hospital Lauro Wanderley of the Federal University of Paraíba. The kit used was the Abbott AxSYM SYSTEM ® using the technique of Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA), closely following the manufacturer's instructions.

2.10.2 DETERMINATION OF THE SERIC LEVEL OF TOTAL ALKALINE PHOSPHATASE

The dosage of the seric level of total alkaline phosphatase was performed at the Laboratory of Pharmaceutical Technology of the Federal University of Paraíba. It was determined using the method proposed by Labtest-Diagnostica, Brazil (Bowers and Mc Comb modified), which follows the principle that the serum alkaline phosphatase in alkaline pH, hydrolyses the p-nitrophenylphosphate, releasing p-nitrophenol and inorganic phosphate.

2.10.3 DETERMINATION OF THE SERIC CONCENTRATIONS OF TOTAL AND IONIZED CALCIUM

The determination of the calcium level was performed at the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba, using the method proposed by Labtest-Diagnostic (Brazil). The reagents used were: buffer composed of 2-amino 2-methyl 1 - propranolol 0.5 mol / l, stabilizer and surfactant; color reagent (o-cresoftalein complexone 92 nmol / l, 8-hydroxyquinoline and stabilizer), standard (calcium 10 mg / dl). The reagents were kept at a temperature of 15-25°C.

The colorimetric method was used to determine seric calcium. Measured by spectrophotometer (Gehaka G3410, Brazil) at 570 nm of the color produced by the complex formed between ortocresoftalein complexone and the calcium in an alkaline pH.

The ionized calcium represents the free and biologically active levelin serum, it was determined using the measurements of seric calcium, total protein and albumin.

2.11 STATISTICAL ANALYSIS

The results are given in mean ± standard deviation. The test of data normality was performed. Based on this test, the data were analyzed using paired t student test and one-way ANOVA with *post hoc* of Newman-Keuls. When necessary, ANOVA was replaced by the equivalent non-parametric Kruskal-Walli. For all comparisons it was considered a significance level of 5%. The data were processed using the statistical program GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

The animals had a body similar mass in the beginning of the experiment (Table 1). After 10 weeks, there was a significant weight gain of body mass for all groups. Data from the weight at the end of the experiment showed that the physical exercise or the zinc supplementation did not influence the evolution of the animals' body weight. With regard to food intake, it can be seen that all groups ate a similar amount of food, with a statistical significance only when comparing the ZPT group to the Sham group.

It can be seen on Table 2 that the mean seric stradiol (pg / mL) was smaller in all groups when compared to the Sham group, showing a statistically significant differences with all groups, confirming the success of the surgical procedure.

With respect to alkaline phosphatase, data show that the ovariectomy induced an increased activity of this enzyme, which was observed by a significantly increased levelof this enzyme in the Cox and Z groups in relation to the Sham group. On the other hand, it can be noticed that the

physical exercise inhibited such increase, as the PT and ZPT exercised groups showed no statistically significant difference with the Sham group (Table 2).

With regard to BMD, it can be observed for the head and femoral surgery neck regions that physical exercise reversed the loss of bone mass induced by ovariectomy, as the PT and ZPT exercised groups were not statistically different from group S, but had a BMD significantly higher than the Cox and Z groups. However, zinc supplementation has not been able to minimize the loss of BMD in the S and Cox groups (Figure 1).

In the same figure, it can be noticed that in the regions of the diaphysis and femoral epicondilus neither physical exercise nor zinc supplementation reversed the loss of bone mass promoted by ovariectomy. However, exercise alone had a tendency to reverse the loss of BMD in relation to the Cox group in the region of epicondilus ($p = 0.08$ between PT and Cox).

4. DISCUSSION

The determination of seric level of the stradiol hormone in this study was lower in the ovariectomized animals in relation to the control, confirming the success of the surgical procedure. It was also discovered that neither the suppression of estrogen, nor zinc supplementation, nor physical exercise altered the body mass gain of these animals. It is important to emphasize that monitoring of body weight and feed intake is crucial to this study, since the literature shows that there may be a link between obesity and BMD. For some authors, this correlation is negative [13, 14] and for other s it is positive [15, 16]. Therefore, it is possible to note that all groups increased similarly to body mass, which does not characterize obesity. It is also worth noting that all animals were in growth phase, which may explain the similar weight gain even after estrogen suppression. Thus, estrogen deprivation caused no greater increase in the mass. These data corroborate those of Chen et al. [17], who observed in a study using Sprague-

Dawley rats, an increase in body mass after 30 days of ovariectomy. However, among the trained animals, ovariectomized and non-ovariectomized there was no statistically significant difference in body mass.

It was observed that the lack of estrogen did not alter feed intake. Similar data were observed by Wallen et al. [18]. They found that the suppression of estrogen, caused by the action of the antagonist drug of the tissue receptor of this hormone, can induce a similar increase in body mass without increasing food intake.

Interestingly, the ZPT group had a daily average food intake lower than the control group. Since only this group had the food reduced, one cannot associate this phenomenon to ovariectomy, to the physical exercise or to the zinc supplementation alone. Previous data suggest that zinc may enhance the leptin production [19, 20] and play an important role in appetite regulation [21, 22]. Similarly, some reports link the physical exercise to the appetite reduction [23]. However, to our knowledge, no studies involving physical exercise and zinc in the suppression of appetite. Anyway, our study's data must be balanced by the fact that the difference in the intake of ZPT animals was as small as only 1.42 g/day/animal. Furthermore, this difference was not able to promote a smaller increase in body mass of these animals.

With respect to seric levelof total and ionized calcium, the results showed no statistically significant difference between the groups studied. Their seric concentrations were within the range expected for homeostasis in all groups. This proves the priority of the body to maintain homeostasis of calcium, mobilizing mainly the bones, and also increasing its intestinal absorption and renal reabsorption [24, 25, 26].

There was a high level of alkaline phosphatase in the ovariectomized groups, which could prove a high rate of bone formation. However, we cannot say this only with the evaluation of this variable, since a higher osteoblastic activity may be accompanied by increased bone reabsorption.

Rahnama and Swiatkowski [27] observed a high levelof alkaline phosphatase in the group of ovariectomized rats. They also showed higher concentrations of acid phosphatase, indicating an increase in remodeling. Similar data were presented by Iwamoto et al. [28] in a study with ovariectomized monkeys. So the lack of estrogen does not lead to inhibition of osteoclasts, which increases bone reabsorption. Therefore, this comes with an increased activity of osteoblasts, which is reflected in the present study by the largest levelof alkaline phosphatase, especially in the Cox group.

These data give support to Sones et al. [29] who also observed high plasmatic concentrations of alkaline phosphatase in osteopenic animals after ovariectomy. Similar data were also observed by Christiansen et al. [30], who verified in women an increase of approximately 20% of the levelof alkaline phosphatase in during menopause when compared to pre-menopausal values. Thus, it is believed that the estrogen suppression may have a compensatory mechanism designed to prevent bone loss, which is observed by the activity of the total increased alkaline phosphatase.

The feed for the animals did not contain nutrients that could affect the absorption of zinc, as in the case of phytate and casein. In addition, a supplementation was made by gavage solution of zinc sulfate heptahydrate, since studies show that the quantity of zinc absorbed from a single solid meal is normally 18-20 µmol, while absorption from water solutions can reach 80-100 µmol [31, 32]. Although we have adopted the best way to ensure maximum absorption of zinc, we observed that zinc supplementation had no positive influence on bone metabolism, BMD, femoral mass and length. In contrast, Ovesen et al. [33] showed that zinc supplementation in the diet increased the body and bone growth rates in young rats (4 weeks old) without hormone suppression. Ma et al. [34] also found that oral zinc supplementation had an anabolic effect on bone components in aged, non-ovariectomized, female rats (50 weeks old), suggesting an important role of zinc in the prevention of bone loss with increasing age.

Kishi, Segawa and Yamaguchi [35] supplemented zinc orally for 3 months, and observed that the doses tested prevented the bone loss due to ovariectomy in female rats also 50 weeks old. The experimental model used in this study does not resemble any of the previous ones, since we used very young animals (approximately 24 weeks). So it is believed that the age for completion of zinc supplementation is critical for its anabolic effect on bone tissue. This may be due to the fact that each stage of life presents its metabolic peculiarities, being necessary to evaluate this hypothesis in future studies.

With regard to physical exercise, we found results similar to those found in the literature; we noticed that regular exercises can reduce bone loss due to menopause [4, 7, 36, 37, 38].

In our study, we chose an exercise protocol with the minimization of the impacts. Honda et al. [37] performed a research where ovariectomized female rats performed a protocol of physical exercises with impact. They noticed that the exercise and the ovariectomy did not affect bone length, but increased BMD. All these data are consistent with this study, even with the limitation of the impact in aquatic environment. It was also verified by Renno et al. [4] in a protocol similar to ours and by Kato et al. [39] in impact exercises in young women. Heikkinen et al. [7] found that there is a positive correlation between the number of impacts, the BMD and the calcaneal ultrasonography after a long period of impact exercises.

The methodology that we used allowed the observation that the gains in BMD are region-dependent. Kato et al. [39] showed that high-impact exercises are effective for improving BMD especially in the femoral neck. The data from our study showed that the improvement in BMD as a result of physical exercise takes place in the region closest to the femurs, as we could see improvement in BMD in the head and femoral neck, while there was no such improvement in the diaphysis and epicondilus , although there has been a recent tendency to increase BMD in the latter ones. It has been reported that bone formation caused by mechanical loads is strategically located on sites biomechanically more active of the bone [40]. Our data suggest

that physical exercise has a beneficial effect mainly in the spongy bone areas of the femur, on the epiphyses. This can be explained since physical activity induces an increased mechanical load acting on the bone tissue due to external forces and muscle contractions, which generates a tensile strength that prevents the bone remodeling and preserves or increases bone mass [41, 42] and the spongy bone because of its porous structure has a large capacity to store energy and is metabolically more active, responding to these stimuli [43, 44], and also the effect of physical exercises occurs specifically at areas that support the stress [45, 46, 47]. This benefit has important implications, as primarily spongy bone, as in the area close to the femur, are most affected by estrogen deficiency when compared to cortical bone. Therefore, they are more prone to fractures [37]. Thus, the exercise protocol used was capable of promoting bone mass gain in the most fragile regions of the femur, and may be an alternate therapy for the prevention of fractures cause by osteoporosis.

The literature lacks research related to zinc supplementation and physical training. Seco et al. [48] evaluated the effects of zinc supplementation and exercise on a treadmill on the femur of adult female rats without ovariectomy. They suggested that zinc can prevent bone loss in rats subjected to intense exercise. However it is important to note that in this model the animals had no lack of hormones important for bone metabolism and were subjected to a grueling training, similar to the athletes, which may have a negative effect on bone tissue, as suggested by Nordsletten et al. [49]. These data are contrary to the present study, which used an ovariectomized rat model, mimicking the loss of bone mass occurring in women after menopause and a protocol of physical training with therapeutic potential, respecting the physiological limits, without the animal exhaustion.

In summary, we can conclude that the progressive load exercises performed in the aquatic environment were able to enhance the osteogenic response in the osteopenic tissue. Although the gravitational force and the impact loading are lower in the water, probably the

load imposed by muscle contractions in specific regions of the femur also overloaded the bone tissue, increasing metabolism and BMD in specific regions of the femur. Thus, the training protocol used in this study may be more effective to improve the bone quality of adult individuals than the high impact aerobic exercise with load. It should not be overlooked the importance of zinc in bone metabolism, since it is necessary to examine their potential benefits in different stages of life, and also evaluate its action with other types of physical training. Thus, this study opens perspectives for the use in humans of an alternative therapeutic modality and effective in the treatment and prevention of osteoporosis.

5. REFERENCES

[1] Shapses SA, Luckey MM, Levine JP, Timins JK, Mackenzie GM. Osteoporosis: recommended guidelines and New Jersey legislation. N J Med. 2000; 97:53-57

[2] Peretz A, Papadopoulos T, Willems D. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. J Trace Elem Med Biol. 2001; 15(2/3):175–8.

[3] Moonga BS, Dempster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. J Bone Miner Res. 1995; 10:453–7.

[4] Renno ACM, Faganello FR; Moura FM, Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Zuanon JA, Benatti Neto C, Parizotto NA. Os efeitos de um programa de atividade física de carga progressiva nas propriedades físicas e na força óssea de ratas osteopênicas. Acta Ortop Bras. 2007; 15(5):276-9.

[5] Wolff I, van Croonenborg JJ, Kemper HC, Kostense PJ, Twisk JW. The effect of exercise training programs on bone mass: a meta-analysis of published controlled trials in pre- and postmenopausal women. Osteoporos Int. 1999; 9:1–12.

[6] Borer KT. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women: interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. Sports Med. 2005; 35(9):779-830.

[7] Heikkinen R, Vihriälä E, Vainionpää A, Korpelainen R, Jämsä T. Acceleration slope of exercise-induced impacts is a determinant of changes in bone density. J Biomech. 2007; 40(13):2967-74.

[8] Snyder A, Zierath JR, Hawley JA, Sleeper MD, Craig BW. The effects of exercise mode, swimming vs. running, upon bone growth in the rapidly growing female rat. Mech Ageing Dev. 1992; 66(1):59-69.

[9] Bourrin S, Palle S, Genty C, Alexandre C. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. J Bone Miner Res. 1995; 10(5):820-8.

[10] Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. J Appl Physiol. 2001; 91(4):1663-8.

[11] Yung P, Lai YM, Tung PY, Tsui HT, Wong CK, Hung VW, Oin L. Effects of weight bearing and non-weight bearing exercises on bone properties using calcaneal quantitative ultrasound. Br J Sports Med. 2005; 39:547-51

[12] Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SE, Selistre-de-Araujo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. Am J Sports Med. 2006; 34:1274-80

[13] Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, Pail P, Rauner M, Stupphann D, Resch H, Moser D, Zysset PK, Stulnig TM, Pietschmann P. Metabolism. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity, Metabolism - Clinical and Experimental 2010; 19.

[14] Hipmair G, Böhler N, Maschek W, Soriguer F, Rojo-Martínez G, Schimetta W, Pichler R. Serum leptin is correlated to high turnover in osteoporosis. Neuro Endocrinol Lett 2010; 31:155-160.

[15] Reid IR, Ames R, MC Evans, S Sharpe, G Gamble, JT France, TM Lim, TF Cundy. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women- a key role for fat mass. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:45-51.

[16] Khosla S, EJ Atkinson, BL Riggs, LJ Melton, Relationship between body composition and bone mass in women, J Bone Miner Res 1996; 11:857-63.

[17] Chen JL, Yao W, Frost HM, Li CY, Settemberg RB, Jee WSS. Bipedal stance exercise enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effects on bone formation in sham and ovariectomized rats. Bone 2001 Aug; 29(2):126-133.

[18] Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. J Nutr. 2001;131(9):2351-7

[19] Baltaci AK, Ozyurek K, Mogulkoc R, Kurtoglu E, Ozkan Y, Celik I. Effects of zinc deficiency and supplementation on the glycogen contents of liver and plasma lactate and leptin levels of rats performing acute exercise. Biol Trace Elem Res. 2003; 96:227-236.

[20] Baltaci AK, Mogulkoc R, Halifeoglu I. Effects of zinc deficiency and supplementation on plasma leptin levels in rats. Biol Trace Elem Res. 2005 April;104(1):41-6.

[21] Shay NF, Mangian HF. Neurobiology of zinc-influenced eating behavior. J Nutr. 2000;130:1493S-1499S.

[22] Ott ES, Shay NF. Zinc deficiency reduces leptin gene expression and leptin secretion in rat adipocites. Exp Biol Med. 2001; 226(9):841-6.

[23] Erdmann J, Tahbaz R, Lippl F, Wagenpfeil S, Schusdziarra V. Plasma ghrelin levels during exercise — Effects of intensity and duration. Reg Peptides 2007; 143:127-135.

[24] Nordin BEC. Calcium and osteoporosis. Nutrition. 1997;718(13):1-23.

[25] Horcajada MN, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N, Pastoureau P, Leterrier C, Culioli J, Barlet JP. Influence of treadmill running on femoral bone in young orchidectomized rats. J Appl Physiol. 1997 Jul; 83(1):129-33.

[26] Takada Y, Matsuyama H, Kato K, Kobayashi N, Yamamura J, Yahiro M, Aoe S. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. Nutr Res. 1997 Nov; 17(11):1709-20.

[27] Rahnama M, Świątkowski W. Effect of ovariectomy on biochemical markers of bone turnover (ALP, ACP) and calcium content in rat mandible and teeth. Bull Vet Inst Pulawy. 2002; 46:281-7.

[28] Iwamoto J, Seki A, Matsuura M, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H, Yeh JK. Influence of Ovariectomy on Bone Turnover and Trabecular Bone Mass in Mature Cynomolgus Monkeys. Yonsei Med J. 2009 Jun; 50(3):358–67.

[29] Sones AD, Wolinsky LE, Kratochvil FJ. Osteoporosis e mandibular bone resorption in the Sprague Dawley rat. Calcif Tissue Int. 1986; 39(4):267-70

[30] Christiansen C, Rodbro P, Tjellesen L. Serum alkaline phosphatase during hormone treatment in early postmenopausal women. Acta Med Scand. 1984; 216(1):11-17.

[31] Sandström B. Dose dependence of zinc and manganese absorption in man. Proc Nutr Soc. 1992; 51:211–8.

[32] Lönnerdal B. The effects of milk and milk components on calcium, magnesium and trace element absorption during infancy. Physiol Rev. 1997; 77:634–99.

[33] Ovesen J, Møller-Madsen B, Thomsen JS, Danscher G, Mosekilde L. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats. Bone. 2001; 29(6):565-70.

[34] Ma ZJ, Igarashi A, Yamakawa K, Yamaguchi M. Enhancing Effect of Zinc and Vitamin K2 (Menaquinone-7) on Bone Components in the Femoral Tissue of Female Elderly Rats. J Health Sci. 2001; 47(1):40-45.

[35] Kishi S, Segawa Y, Yamaguchi M. Histomorphological confirmation of the preventive effect of beta-alanyl-l-histidinato zinc on bone loss in ovariectomized rats. Biol Pharm Bull. 1994; 17:862–5.

[36] Chen X, Aoki H, Fukui Y. Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. Biomed Mater Eng. 2004; 14(1):53-5.

[37] Honda A, Sogo S, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in rats ovariectomized with the same outcome as Sham rats. J Appl Physiol. 2003; 95:1032-7

[38] Turner CH, Robling AG, Exercises for improving bone strength. Brit J Sports Med 2005; 39:188-189.

[39] Kato T, Terashima T, Yamashita T, Hatanaka Y, Honda A, Umemura Y. Effect of low-repetition jump training on bone mineral density in young women. J Appl Physiol. 2006; 100(3):839-43.

[40] Robling AG, Hinant FM, Burr DB, and Turner CH. Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. J Bone Miner Res 17: 1545–1554. 2002.

[41] Peng Z, Tuukkanen H, Zhang H, Jamsa T. The mechanical strength of bone in differentrat models of experimental osteoporosis. Bone. 1994; 15:523-32.

[42] Barengolts EI, Lathon PV, Curry, DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. Bone Miner. 1994; 26:133-40.

[43] Vincent KR, Braith RW. Resistance training and bone turnover in elderly men and women. Med Sci Sports Exerc 2002;34:17-23.

[44] Menkes A, Mazel S, Redmond RA, Koffler K, Libanati CR, Gundemberg CM, et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. J Appl Physiol 1993;74:2478-84.

[45] Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M, Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. Med Sci Sports Exerc 2001;33:507-11.

[46] Sandström P, Jonsson P, Lorentzon R, Thorsen K. Bone mineral density and musclestrength in female ice hockey players. Int J Sports Med 2000;21:524-8.

[47] Morris FL, Smith RM, Payne WR, Galloway MA, Wark JD. Compressive and shear force generated in the lombar spine of female rowers. Int J Sports Med 2000;21:518-23.

[48] Seco C, Revilla M, Hernandez ER, Gervas J, Gonzalez-Riola J, Villa LF, Rico H. Effects of Zinc Supplementation on Vertebral and Femoral Bone Mass in Rats on Strenuous Treadmill Training Exercise. J Bone Miner Res. 1998;13:508–12.

[49] Nordsletten L, Kaastad TS, Madsen JE, Reikeras O, Ovstebo R, Stromme JH, et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. Calcif Tissue Int. 1994; 55:436-42

Table 1: Average values of body mass, percentage of body mass gain, average values of feed intake, average values of femoral mass and length

GROUPS	BODY MASS (g)				FEED INTAKE (g/day/animal)	FEMORAL LENGTH (mm)	FEMORAL MASS (g)	N
	Inicial	Final	Gain (%)	p				
S	224,6 ± 21,44	288,2 ± 22,24	22,1%	p < 0,01	17,82 ± 1,14	35,46 ± 0,72	0,90 ± 0,08	11
Cox	224,4 ± 19,66	304,8 ± 24,21	26,4%	p = 0,01	17,51 ± 1,34	35,19 ± 0,96	0,82 ± 0,06	09
Z	219,7 ± 17,90	303,2 ± 27,63	27,7%	p < 0,01	17,52 ± 1,62	35,17 ± 0,73	0,82 ± 0,07	11
PT	220,2 ± 20,28	293,5 ± 33,14	25%	p < 0,01	17,57 ± 1,31	35,58 ± 1,49	0,90 ± 0,08	12
ZPT	221,5 ± 25.86	286,4 ± 16,46	22,7%	p < 0,01	16,40 ± 1,31*	34,93 ± 0,94	0,84 ± 0,06	11

Note: Data are expressed as mean ± standard deviation. S (Sham), Cox (ovariectomized control) Z (zinc), PT (physical training); ZPT (zinc + physical training) * = p <0.05 when compared to group S.

Table 2: Values of average serum concentrations of stradiol, total and ionized Calcium, and total Alkaline Phosphatase for each of the groups studied.

GROUPS	STRADIOL pg/mL	TOTAL CALCIUM mg/dL	IONIZED CALCIUM mg/dL	TOTAL ALKALINE PHOSPHATASE U/L
S	13,00 ± 3,4	10,78 ± 0,61	5,86 ± 0,37	92,38 ± 27,18
Cox	4,75 ± 2,9*	11,25 ± 0,97	6,35 ± 0,54	155,17 ± 44,29**
Z	3,5 ± 3,7*	10,98 ± 1,03	6,25 ± 0,61	141,38 ± 29,19*
PT	1,20 ± 1,8**	10,39 ± 0,37	5,97 ± 0,24	129,00 ± 21,71
ZPT	0,20 ± 0,45**	10,92 ± 0,86	6,1 ± 0,44	105,43 ± 28,25†

Data are expressed as mean and standard deviation. S (Sham), Cox (ovariectomized control) Z (zinc), PT (physical training); ZPT (zinc + physical training). * = $p<0,05$ compared to S; ** = $p<0,01$ compared to S; † = $p<0,05$ compared to Cox.

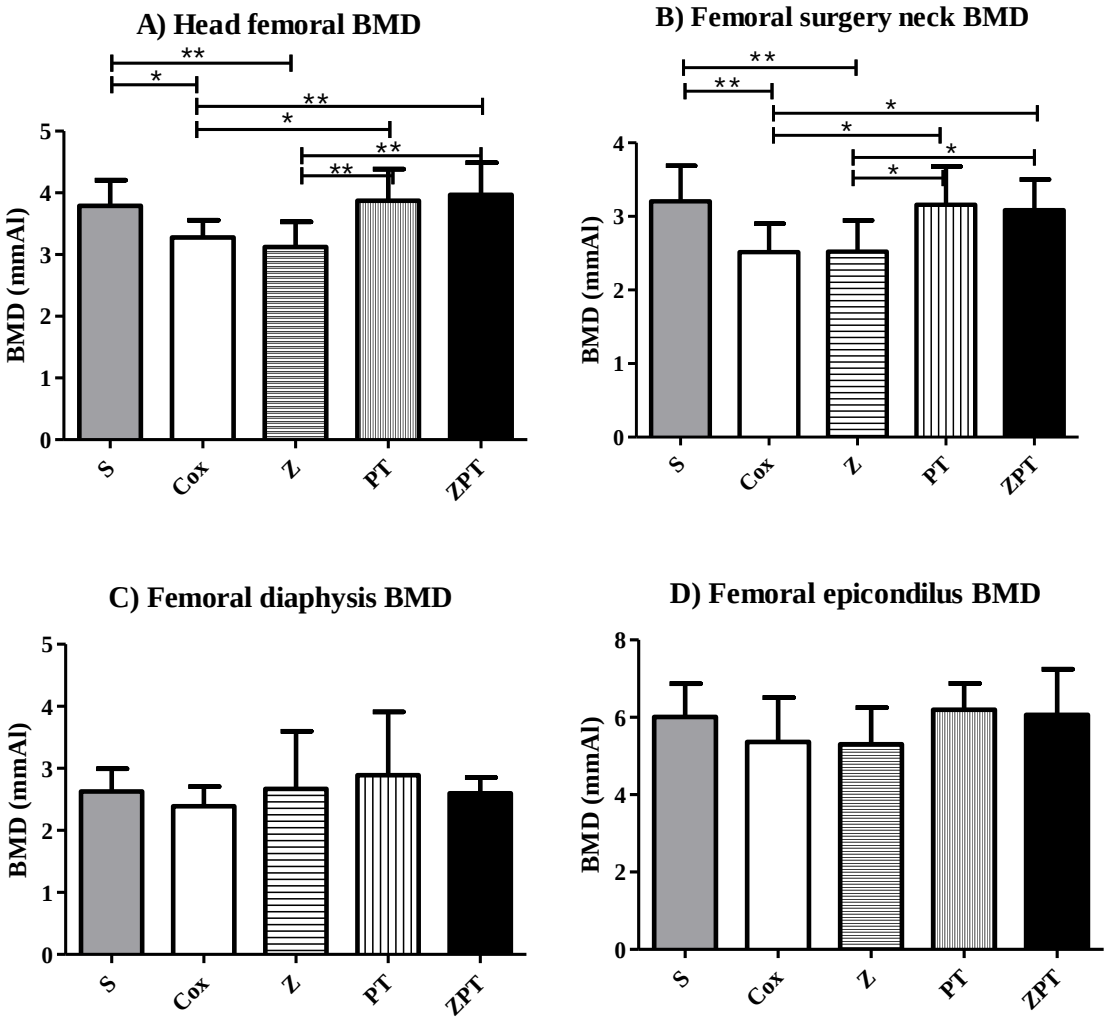

Figure 1: Mean values of Bone Mineral Density for the regions of femurs of female rats: A) Head; B) Surgical neck; C) Diaphysis; D) Epicondyles. Data are expressed as mean and standard deviation. S (Sham), Cox (ovariectomized control) Z (zinc), PT (physical training); ZPT (zinc + physical training) * = p <0.05, ** = p <0.01.