

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ROBERTO CONDE SANTOS

**AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E MORFOMÉTRICA DOS EFEITOS DA NATAÇÃO
EM FÊMURES DE CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA O GENE DO RECEPTOR
DE LDL (LDLr^{-/-})**

ALFENAS/MG

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ROBERTO CONDE SANTOS

**AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E MORFOMÉTRICA DOS EFEITOS DA NATAÇÃO
EM FÊMURES DE CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA O GENE DO RECEPTOR
DE LDL (LDLr^{-/-})**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde

Orientadoras: Profa. Dra. Sílvia G. Ruginsk Leitão
Profa. Dra. Luciana Azevedo

Co-orientadora: Profa. Dra. Evelise Aline Soares

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Roberto Conde.

Avaliação Biomecânica e morfométrica dos efeitos da natação em fêmures de camundongos knockout para o gene do receptor de LDL (LDLr-/r-) / Roberto Conde Santos. - Alfenas, MG, 2022.

52 f. : il. -

Orientador(a): Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Hiperlipidemia. 2. Exercício Físico. 3. Tecido Ósseo. I. Leitão, Silvia Graciela Ruginsk , orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

ROBERTO CONDE SANTOS

AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E MORFOMÉTRICA DOS EFEITOS DA NATAÇÃO EM FÊMURES DE CAMUNDONGOS
KNOCKOUT PARA O GENE DO RECEPTOR DE LDL (LDLr/-)

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências aplicadas à Saúde.

Aprovada em: 08 de novembro de 2022

Profa. Dra. Luciana Azevedo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Flávia Da Ré Guerra
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Daniel Martinez Saez
Instituição: Universidade Federal de Lavras
UFLA



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Azevedo**, Professor do Magistério Superior, em 08/11/2022, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Martinez Saez**, Usuário Externo, em 08/11/2022, às 17:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia da Ré Guerra**, Professor do Magistério Superior, em 08/11/2022, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0842865 e o código CRC 37D6115D.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG, na figura do Magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Amadeu Cerveira.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, da Universidade Federal de Alfenas, nível Mestrado, na figura do Prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero.

Às Orientadoras: Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Profa. Dra. Luciana Azevedo e Profa. Dra. Evelise Aline Soares.

À minha esposa e filhos pela resignação e compreensão do sequestro do tempo dedicado ao Mestrado em detrimento da família.

A todos que diretamente e indiretamente me auxiliaram e me encorajaram a completar esta etapa de minha vida.

À Deus, que me propiciou esta benção!

RESUMO

As hiperlipidemias desencadeiam alterações nas concentrações das lipoproteínas plasmáticas, favorecendo o desenvolvimento de doenças crônicas. Os altos níveis do colesterol e triglicérides podem causar modificações no tecido ósseo. Para o tratamento de doenças metabólicas, tais como as hiperlipidemias e a osteoporose, exercícios físicos são indicados, entre estes a natação, exercício de baixo impacto e promotor de contrações musculares que são estimuladoras do remodelamento ósseo. O presente estudo realizou uma análise dos efeitos da natação sobre a morfologia e a biomecânica de fêmures de camundongos selvagens e *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}). Os camundongos foram divididos nos grupos sedentário e natação, alimentados com ração padrão ou ração hiperlipídica. O grupo submetido à natação passou por sessões diárias com duração de 40 min. cada, em tanques individuais com controle de temperatura, por 60 dias. Após esse período, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta de amostras de sangue total para análises bioquímicas. Os fêmures foram coletados para processamento histológico e análises biomecânicas. A análise dos resultados demonstra que os camundongos LDLr^{-/-}, se apresentaram como um bom modelo experimental para hiperlipidemia e que a natação, combinado ou não com dieta hiperlipídica, estabeleceu relação com a redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides, bem como com o aumento dos níveis de HDL e cálcio plasmáticos. Os achados morfométricos e biomecânicos mostraram alterações mais pronunciadas nos ossos cortical e trabecular dos fêmures dos camundongos LDLr^{-/-} que receberam a dieta rica em gordura e não foram submetidos a natação. Mudanças nos níveis plasmáticos de cálcio, triglicérides e colesterol e suas frações também foram mais marcantes neste grupo. Em contraste, camundongos do tipo selvagem e LDLr^{-/-} submetidos ao treinamento aquático, independente da dieta consumida, apresentaram níveis plasmáticos elevados de HDL, o que provavelmente protegeu contra alterações mecânicas e morfológicas dos fêmures. As avaliações biomecânicas e morfométrica realizadas no presente estudo sugerem que a natação e a dieta balanceada em teor lipídico possam prevenir os efeitos nocivos da hiperlipidemia sobre o tecido ósseo.

Palavras-chave: Hiperlipidemia; Exercício físico; Tecido ósseo.

ABSTRACT

Hyperlipidemias trigger changes in plasma lipoprotein concentrations, favoring the development of chronic diseases. High levels of cholesterol and triglycerides may cause changes in bone tissue. For the treatment of metabolic diseases, such as hyperlipidemia and osteoporosis, physical exercises are indicated, including swimming, and low-impact exercise, which may promote muscle contractions that stimulate bone remodeling. Therefore, the present study analyzed the effects of swimming on the morphology and biomechanics of femurs from wild-type and LDL receptor gene *knockout* (LDLr^{-/-}) mice. Mice were divided into sedentary and swimming groups, and subdivided in those fed with standard rodent chow or high-fat diet. The group submitted to swimming underwent daily sessions lasting 40 min. each, which were performed in individual tanks with controlled temperature, for 60 days. After this period, the animals were anesthetized and euthanized for collection of whole blood samples for biochemical analysis. Femurs were collected for histological processing and biomechanical analysis. The results demonstrate that LDLr^{-/-} mice represent a good experimental model for hyperlipidemia and that swimming, combined or not with a high-fat diet, established a relationship with the reduction of plasma concentrations of total cholesterol and triglycerides, as well as with increased levels of plasma HDL and calcium. The morphometric and biomechanical findings showed more pronounced alterations in the cortical and trabecular bones of the femurs obtained from LDLr^{-/-} mice that received the high-fat diet and were not submitted to swimming. Changes in plasma levels of calcium, triglycerides and cholesterol and their fractions were also more marked in this group. In contrast, wild-type and LDLr^{-/-} mice submitted to aquatic training, regardless of the diet consumed, showed high plasma levels of HDL, which probably protected against mechanical and morphological bone alterations. In conclusion, the biomechanical and morphometric evaluations carried out in the present study suggest that swimming and a balanced lipid diet can prevent the harmful effects of hyperlipidemia on bone tissue.

Keywords: Hyperlipidemia; Physical exercise; Bone tissue.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho esquemático para obtenção do limite elástico. (a) Determinação da equação da reta na região (fase) elástica. (b) Limite elástico exatamente no ponto onde a curva e a nova reta se cruzam. No desenho: y é a variável que representa a força, A e B são constantes, x é a variável que representa os deslocamentos e x' é a variável que representa os novos deslocamentos na reta deslocada 0,2%..... **23**
- Figura 2** - Concentrações plasmáticas de Colesterol total (CT) dos camundongos selvagens (S) e LDL-/- (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H). Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo..... **29**
- Figura 3** - Concentrações plasmáticas de HDL dos camundongos selvagens (S) e LDL-/- (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H). Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo..... **31**
- Figura 4** - Concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG) dos camundongos selvagens (S) e LDL-/- (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H). Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo..... **33**
- Figura 5** - Concentrações plasmáticas de cálcio ionizado dos camundongos selvagens (S) e LDL-/- (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H). Os dados são expressos como média \pm EPM e

	foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.....	34
Figura 6	– Concentrações plasmática de cálcio ionizado dos camundongos selvagens (S) e LDL ^{-/-} , sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H). Os dados são expressos com média ± EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós teste de Tukey. N=12 animais/grupo.....	35
Figura 7	–Força máxima em camundongos selvagens (S) e LDL ^{-/-} (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H). Os dados são expressos como média ± EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.....	40
Figura 8	- Fotomicrografias de cortes transversais da diáfase femoral de camundongos dos grupos Snat (A), S (B), SHnat (C), Lnat (D), L (E), Lhnat (F), LH (G). Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 4x. Coloração por hematoxilina e eosina.....	43
Figura 9	- Fotomicrografias de cortes transversais da epífise distal femoral de camundongos dos grupos Snat (A), S (B), SHnat (C), Lnat (D), L (E), Lhnat (F), LH (G). Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 4x. Coloração por hematoxilina e eosina.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingestão média de líquidos (mL/dia), consumo médio de alimento (g/dia) e ganho de massa corporal (g) nos animais dos diferentes grupos experimentais.....	27
Tabela 2 - Dimensões do fêmur (em mm) nos diferentes grupos experimentais.....	37
Tabela 3 – Características morfométricas (área trabecular/cortical: mm ² , e espessura trabecular/cortical: mm) e análise das propriedades biomecânicas (deslocamento: mm, rigidez extrínseca: N/mm, tensão máxima: MPa, módulo de elasticidade: Mpa, e deformação: Mpa) nos diferentes grupos experimentais.....	42

LISTA DE SIGLAS

HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
CT	Colesterol total
TG	Triglicérides
OVX	Ovariectomia
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EUA	Estados Unidos da América
ANOVA	Análise de Variância
USA	<i>NIS-Elements: Advanced Ressecar</i>
NOS	Óxido nítrico-sintase
MMPs	Metaloproteinases da matriz extracelular
TA	Treinamento aquático
NO	Óxido nítrico
AMP	Adenosina mono fosfato
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS	19
3.2	ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL	19
3.3	ANESTESIA E EUTANÁSIA.....	21
3.4	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	21
3.5	ANÁLISE DOS FÊMURES	22
3.5.1	Medidas das Dimensões do Osso	22
3.5.2	Teste Mecânico	22
3.5.3	Área trabecular e do osso cortical	24
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÃO	477
	REFERÊNCIAS	488
	ANEXO A	53

1 INTRODUÇÃO

As hiperlipidemias são modificações no metabolismo dos lipídios que desencadeiam alterações nas concentrações das lipoproteínas plasmáticas, favorecendo o desenvolvimento de afecções crônicas, principalmente de doenças cardiovasculares (GARCIA *et al.*, 2008). As alterações lipídicas mais frequentes são: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, redução da lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL), as quais podem ocorrer de forma isolada ou combinada. Alterações qualitativas nas lipoproteínas, tais como a formação de partículas de LDL pequenas e densas, em função do aumento dos níveis de triglicérides, também são comumente encontradas. O aumento nas concentrações de LDL e colesterol total (CT) está relacionado ao risco aumentado de doenças cardiovasculares, ao contrário das concentrações de HDL, que atuam como um fator de proteção para estas doenças (RUBENFIRE *et al.* 2010).

As hiperlipidemias podem ser classificadas como primárias ou secundárias. As primárias são decorrentes de fatores genéticos e as secundárias, associadas a outras doenças, tais como o etilismo, hipotireoidismo e obesidade. O desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto calórico, juntamente com o sedentarismo, os quais estimulam a obesidade, bem como o consumo de etanol e tabagismo, são fatores que contribuem para o seu desenvolvimento (MANFREDINI *et al.*, 2000). Na verdade, o tabagismo e etilismo, considerados isoladamente ou em conjunto, já são, por si só, responsáveis por diminuir a resistência mecânica óssea (SOARES *et al.*, 2010). Assim, as hiperlipidemias constituem um sério problema de saúde pública, ao qual, de acordo com Kraus *et al.*, (2002), deve ser tratado por meio de programas de prevenção e educação. A terapêutica desta doença deve iniciar-se com bem-estar emocional, redução do tabagismo, mudanças no estilo de vida, estímulo ao hábito alimentar saudável, exercício físico regular e manutenção ou aquisição de massa corporal adequada (BEZNER 2015).

Nesse contexto, diversos modelos experimentais têm evoluído no sentido de permitir aos pesquisadores investigar os mecanismos pelos quais se desenvolvem as doenças. Entre eles, estão os modelos *knockout* para genes de interesse, ou seja, animais geneticamente modificados nos quais a expressão de determinado gene encontra-se suprimida. Na década de 1990, foram desenvolvidos camundongos

knockout para o gene do receptor de LDL (LDLr-/-), os quais, uma vez submetidos à ingestão de dieta hiperlipídica, desenvolvem lesões equivalentes às lesões em humanos, como aterosclerose, aumento na concentração plasmática de colesterol e triglicérides (KRIEGER *et al.*, 2006) e hipertrofia ventricular esquerda (GARCIA *et al.*, 2008).

Além dos impactos diretos sobre o sistema cardiovascular, há evidências de que os altos níveis de colesterol e triglicérides (TG) podem causar alterações no metabolismo do tecido ósseo. Krieger *et al.* (2007) demonstraram que ratos hiperlipidêmicos apresentam número elevado de osteoclastos, inibição da atividade osteoblástica e redução do processo de remodelagem óssea. Luegmayr *et al.* (2004) concluíram, em seus estudos, que o aumento do colesterol (tanto LDL quanto HDL) pode quebrar o delicado equilíbrio entre a reabsorção óssea realizada por osteoclastos e a deposição de osso novo pelos osteoblastos, tendo como consequência a redução da massa óssea. Mais recentemente, Ascenzi *et al.* (2014) demonstraram que animais com hiperlipidemia apresentam alterações no padrão de orientação das fibras de colágeno do tipo 1, o que, somado à redução da densidade mineral, afetam a estrutura da porção cortical óssea e sua resistência.

Estudos demonstraram que ratos hiperlipidêmicos apresentaram intensa atividade osteoclástica, densidade do osso alveolar reduzida e aumento do estresse oxidativo, originando doença periodontal (SANBE *et al.*, 2007). De acordo com Tomofuji *et al.* (2005), as doenças periodontais observadas em ratos hiperlipidêmicos estão associadas ao aumento da reabsorção óssea e a uma proliferação do epitélio juncional. Utilizando tanto modelos genéticos quanto dietéticos para induzir hiperlipidemia, Xen *et al.* (2016) demonstraram redução da atividade osteoblástica e aumento da atividade osteoclástica. Neste trabalho, ficou demonstrado ainda que as células da medula óssea de animais LDLR-/- “*mice*” apresentavam aumento da adipogênese e inibição da osteogênese. Em conjunto, estes fatores contribuíram para uma redução significativa da massa óssea, tanto induzida pela dieta quando pela deleção do receptor de LDL. Ademais, a hipercolesterolemia parece ter um efeito prejudicial sobre a qualidade do remodelamento da inserção tendão-osso em caso de lesões (CHUNG *et al.*, 2016).

De fato, a indução de hiperlipidemia por ingestão de dieta hiperlipídica em animais experimentais é um fator de risco para a integridade óssea, gerando diminuição de resistência e maior susceptibilidade a fraturas, efeitos estes que são

significativamente atenuados pela administração de sinvastatina, uma das principais estratégias farmacológicas de controle dos níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol (SOARES *et al.*, 2015). Também já descrito na literatura que as hiperlipidemias estão associadas à hipovitaminose D (PREMAOR; FURLANETTO 2006), o que pode acarretar inúmeras alterações no metabolismo ósseo, uma vez que a vitamina D auxilia na manutenção da massa óssea, mobiliza cálcio do osso para a circulação, participa da maturação de colágeno e estimula a formação de osteocalcina, osteopantina e fosfatase alcalina (BOUILLON *et al.*, 1995). Também já está clara na literatura a relação de alterações endócrinas relacionadas à síndrome metabólica e a saúde óssea (WONG *et al.*, 2016, 2018).

No que tange à prevenção de doenças crônicas no geral e também à prevenção da perda de massa óssea, os exercícios físicos desempenham papel fundamental, tanto aguda quanto cronicamente. A execução de atividades físicas programadas, com objetivos definidos e realizadas com repetições sistemáticas induzem alterações alostáticas extremamente benéficas. Assim, há, basicamente, três tipos de exercícios: 1) anaeróbio, caracterizado por exercícios de curta duração e intensidade máxima (como exemplo a musculação); 2) aeróbio, caracterizado por exercícios de longa duração (como exemplo a natação) e 3) mistos, que mesclam exercícios aeróbios e anaeróbios (como exemplo o futebol) (BROOKS; FAHEY 1984).

Além disso, os exercícios físicos podem contribuir indiretamente para melhorias do perfil lipídico por auxiliar na redução da massa corporal. Para cada 1 quilograma de massa corporal perdida, ocorre redução de 1% nos níveis de CT e LDL, 5-10% nos TG e aumento de 1-2% nas concentrações de HDL (DÂMASO 2001). Segundo BRINKLEY *et al.* (2010), o perfil lipídico sofre alterações em função do exercício físico moderado e de longa duração, levando a um aumento do HDL e a uma diminuição do CT, do LDL e dos triglicérides. Estudos realizados por Devi *et al.* (2003) demonstraram que ratos *Wistar* submetidos à natação (5 dias/semana e 30 min/dia, durante 8 semanas) apresentaram níveis plasmáticos de CT e LDL reduzidos e aumento dos níveis plasmáticos de HDL.

Durante a execução de exercícios físicos, as variáveis cardiorrespiratórias modificam-se com a finalidade de aumentar o transporte de oxigênio e nutrientes aos músculos em atividade contrátil, para manter, ao longo do tempo, a formação de ATP e/ou restaurar as suas reservas, que serão consumidas durante as fases de contração anaeróbia. O exercício físico aeróbio, como a natação, realizado regularmente,

provoca importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas que vão influenciar o sistema cardiovascular, com o objetivo de manter a homeostasia celular diante do incremento das demandas metabólicas.

Assim, ocorre aumento no débito cardíaco, redistribuição no fluxo sanguíneo e elevação da perfusão circulatória para os músculos em atividade. A pressão arterial sistólica aumenta diretamente na proporção do aumento do débito cardíaco, enquanto a pressão arterial diastólica reflete a eficiência do mecanismo vasodilatador local dos músculos em atividade, aumentando proporcionalmente à densidade capilar local (MONTEIRO 2004). A vasodilatação do músculo esquelético diminui a resistência periférica do fluxo sanguíneo, e a vasoconstrição concomitante, que ocorre em tecidos não exercitados, compensa a vasodilatação. Conseqüentemente, a resistência total ao fluxo sanguíneo cai drasticamente quando o exercício alcança 75% do volume máximo expirado de oxigênio (DÂMASO 2001). Os níveis tensionais elevam-se durante o exercício físico, tendo já sido constatados em indivíduos jovens e saudáveis níveis de pressão intra-arterial superiores a 400/250 mmHg, sem quaisquer danos à saúde (FORJAZ *et al.*, 2003). Dessa forma, a natação, como um exercício de características aeróbias, não oferece riscos aos pacientes hiperlipidêmicos ou com doenças cardiovasculares, diferentemente de exercícios resistidos de alta intensidade, que colocam em risco a vida do praticante quando não prescritos ou acompanhados de maneira adequada.

De fato, os efeitos benéficos dos exercícios aeróbicos sobre o manejo das hiperlipidemias são mais pronunciados conforme se aumenta o volume das sessões de exercícios (KRAUS *et al.*, 2002). Isso porque à medida que aumenta a duração do exercício físico, modifica-se a predominância na utilização de substratos energéticos, de forma que em exercícios aeróbios de longa duração a fonte lipídica é acentuadamente utilizada (DÂMASO 2001). Dessa forma, os ácidos graxos livres são mais utilizados devido ao melhor funcionamento dos processos enzimáticos envolvidos no metabolismo, por meio do aumento da atividade da lipase lipoprotéica, que promove o aumento da capacidade oxidativa muscular (PRADO; DANTAS, 2002). Essa atividade aumentada favorece ainda um maior catabolismo das lipoproteínas ricas em TG, formando menos partículas de LDL aterogênicas e elevando a produção de HDL. A atividade da lipase lipoproteica pode aumentar a partir de uma única sessão de exercício físico, bem como ao longo do treinamento. Sendo assim, indivíduos

treinados tendem a apresentar uma maior atividade desta enzima (BRINKLEY *et al.*, 2010).

A associação do treinamento aeróbio com a redução da incidência de doenças crônicas vem sendo amplamente estudada desde a década de 50 (MORRIS, *et al.*, 1958). Esses benefícios têm sido comprovados não somente para promoção da saúde e prevenção de doenças, como também para reabilitação em hipertensos, diabéticos e pacientes diagnosticados com osteoporose, entre outras condições (McLATCHIE, 2010; SINAKI *et al.*, 2010;).

De acordo com Paffenbarger *et al.* (1993), indivíduos que praticam exercício aeróbio de forma regular apresentam risco 35% menor de desenvolver doenças metabólicas do que indivíduos sedentários. Ainda segundo os autores, fica ainda claramente caracterizada nestes indivíduos uma relação inversa entre a prática de atividade física e o risco de morte por todas as causas. O sedentarismo, portanto, constitui um importante fator de risco, já estando bem estabelecida uma maior taxa de eventos cardiovasculares e mortalidade entre indivíduos com baixo nível de condicionamento físico. Estima-se que a prevalência do sedentarismo seja de até 56% nas mulheres e 37% nos homens, na população urbana brasileira (MYERS 2003). A diminuição desses índices de sedentarismo é importantíssima para a saúde pública, minimizando os riscos de doenças dos sistemas cardiovascular e esquelético.

Estudos realizados em populações ativas e sedentárias mostraram correlação positiva entre o nível de atividade e a densidade óssea mineral (BMD, da sigla em inglês *bone mineral density*). Desta forma, o exercício físico desempenha um papel importante na prevenção de perdas de massa óssea, sendo recomendado a pacientes com osteoporose e osteopenia como medida preventiva e terapêutica. O exercício físico é considerado um agente anabólico, pois induz ganho de massa óssea, com aumento do cálcio intracelular e AMP cíclico (AMPc), bem como acúmulo de prostaglandinas e óxido nítrico (JEE 2000). Programas de exercícios físicos têm efeitos positivos e, dependendo da frequência na qual o exercício é realizado, são capazes de estimular a formação óssea e aumentar a resistência mecânica (NORDSLETTEN *et al.*, 1994; RENNO *et al.*, 2007). Desse modo, o exercício físico, quando realizado regularmente, exerce efeitos benéficos sob o tecido ósseo, sendo considerado uma estratégia para prevenir a osteoporose (SINAKI *et al.*, 2010).

Além das vantagens para o sistema cardiovascular, a prática da natação também beneficia fisiologicamente o tecido ósseo, além de promover a

neovascularização, a atividade oxidativa enzimática e o aumento do número de mitocôndrias, mecanismos que auxiliam o metabolismo ósseo (MCARDLE *et al.*, 2006) e aumentam a massa óssea em humanos e modelos animais (BRANCA, 1999; IWAMOTO *et al.*, 1999). O ambiente aquático muitas vezes é indicado como estratégia terapêutica por ortopedistas e fisioterapeutas, pois esse ambiente cria uma diminuição da força gravitacional. Ao induzir hipertrofia muscular, a natação promove sobrecarga mecânica no tecido ósseo, o que, por sua vez, constitui um fator de estímulo à osteogênese. Assim, as características estruturais e geométricas do osso são afetadas, contribuindo para a manutenção e ganho de massa óssea (MITCHELL *et al.*, 1998). Conseqüentemente, diminui-se a reabsorção e aumenta-se a osteogênese (IWAMOTO *et al.*, 1999, 2005).

Assim, baseado nestes achados, pode-se afirmar que o treinamento físico se mostra uma medida não farmacológica bastante eficaz que integra o controle do metabolismo e a saúde óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da natação e da dieta hiperlipídica sobre as propriedades biomecânica e morfológica de fêmures de camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar, em camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}), os efeitos da dieta hiperlipídica e da natação sobre;
- b) Os níveis plasmáticos de cálcio, triglicerídeos, colesterol total e HDL;
- c) As propriedades biomecânicas estruturais e materiais de amostras de fêmur;
- d) A morfometria e estrutura do osso cortical e trabecular de amostras de fêmur.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Trata-se de estudo experimental, conduzido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O presente projeto foi previamente aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Velano – UNIFENAS (Anexo A).

3.2 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados em camundongos selvagens (linhagem C57BL6) e em camundongos homozigotos para a deleção do gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}), gerados no *background* C57BL6, machos, com quatro meses de idade, pesando 22 ± 3 g. Os animais foram obtidos da *Jackson Laboratories*, Estados Unidos da América (EUA) e criados no biotério da pós-graduação da Universidade José do Rosário Velano (Unifenas), sob responsabilidade do Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia, colaborador do presente projeto. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco®) com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro, em caixas com forração de maravalha. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais (“sedentário” e “natação”) e alimentados com as respectivas dietas ração comercial (Nuvital®) e ração hiperlipídica (INTAL®) e água *ad libitum*.

GRUPO I – SEDENTÁRIO: (n=48)

* **Subgrupo S** - Camundongos selvagens que receberam ração comercial (Nuvital®) por 60 dias e permaneceram sedentários (**n=12**).

* **Subgrupo SH** - Camundongos selvagens que receberam ração hiperlipídica (INTAL®) com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 60 dias e permaneceram sedentários (**n=12**).

* **Subgrupo L** - Camundongos LDLr/- que receberam ração comercial (Nuvital®) por 60 dias e permaneceram sedentários (**n=12**).

* **Subgrupo LH** - Camundongos LDLr/- que receberam ração hiperlipídica (INTAL®) com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 60 dias e permaneceram sedentários (**n=12**).

GRUPO II – NATAÇÃO: (n=48)

* Subgrupo Snat - Camundongos selvagens que receberam ração comercial (Nuvital®) por 60 dias e foram submetidos a sessões diárias de natação (**n=12**).

* **Subgrupo SHnat** - Camundongos selvagens que receberam ração hiperlipídica (INTAL®) com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 60 dias e foram submetidos a sessões diárias de natação (**n=12**).

* **Subgrupo Lnat** - Camundongos LDLr/- que receberam ração comercial (Nuvital®) por 60 dias e foram submetidos a sessões diárias de natação (**n=12**).

* **Subgrupo LHnat** - Camundongos LDLr/- que receberam ração hiperlipídica (INTAL®) com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 60 dias e foram submetidos a sessões diárias de natação (**n=12**).

Os animais do grupo treinado (Snat, SHnat, Lnat e LHnat) foram submetidos à natação em tanques individuais de 30 cm de altura x 15 cm x 15 cm, sendo a água trocada diariamente e mantida entre 32-36°C.

As sessões de treinamento (natação com carga progressiva) aconteceram sempre no mesmo horário do dia e se iniciaram com frequência progressiva e sobrecarga crescente até 5% do peso dos animais, aumentando o esforço dos camundongos durante a natação (GUERINO *et al.*, 2008):

Primeira semana: três sessões semanais, de dez minutos cada, em dias alternados, sem carga.

Segunda semana: quatro sessões semanais, de 20 minutos cada, com carga de 2,5% do peso corporal do animal.

A partir da terceira semana: cinco sessões semanais, de 40 minutos cada, com carga de 5% de do peso corporal do animal.

Para obtenção das sobrecargas de treinamento, foram utilizados pesos de chumbo equivalentes a 5% da massa corporal, colocados nos camundongos imediatamente antes da natação por meio de uma cinta elástica amarrada ao tórax, de modo a não prejudicar a dinâmica do movimento (FRATESCHI 2002). Após a

fixação do peso, os animais foram colocados nos tanques com água para o treinamento. Durante a natação, os animais foram monitorados para que não flutuem ou se apoiem na borda do tanque, deixando de se movimentar. O valor da carga foi ajustado semanalmente, conforme o peso corporal (GUERINO *et al.*, 2008).

Os animais do grupo sedentário (S, SH, L e LH) foram também submetidos ao ambiente aquático, por um minuto apenas, seguindo-se os mesmos critérios dos grupos treinados, a fim de mimetizar o estresse aquático (EVANGELISTA *et al.*, 2003).

O treinamento foi realizado no período da manhã ao longo de 60 dias. Após o término da sessão de natação, os animais foram secos utilizando-se um aquecedor de ar (FRATESCHI, 2002).

3.3 ANESTESIA E EUTANÁSIA

Os camundongos foram anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompun®, Bayer Animal Health), cloridrato de ketamina (90 mg/Kg, Dopalen®, Agribands Brasil Ltda.) e solução salina (NaCl 0,9%) para administração intraperitoneal.

3.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Para a realização das dosagens bioquímicas, o sangue total foi coletado e centrifugado a 3.000 rpm, 4° C por 20 minutos para obtenção de soro. Alíquotas de plasma foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante e submetidas à determinação das concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total e colesterol HDL utilizando-se kits enzimáticos colorimétricos (Labtest), com leitura em espectrofotômetro (Gehaka G3410, Brasil) com comprimento de onda 540 ou 500 nm.

Alíquotas de soro também foram submetidas à determinação das concentrações de cálcio por meio de teste colorimétrico (Labtest-Diagnóstica), com leitura em comprimento de onda 570 nm.

3.5 ANÁLISE DOS FÊMURES

3.5.1 Medidas das Dimensões do Osso

Após a eutanásia dos animais, foram realizadas a retirada e a limpeza das peças ósseas, com remoção de todo tecido circundante ao fêmur. Com um paquímetro digital e uma lupa, foram feitas quatro medidas no fêmur de cada animal. Cada medida corresponde à distância entre dois pontos de referência do próprio osso.

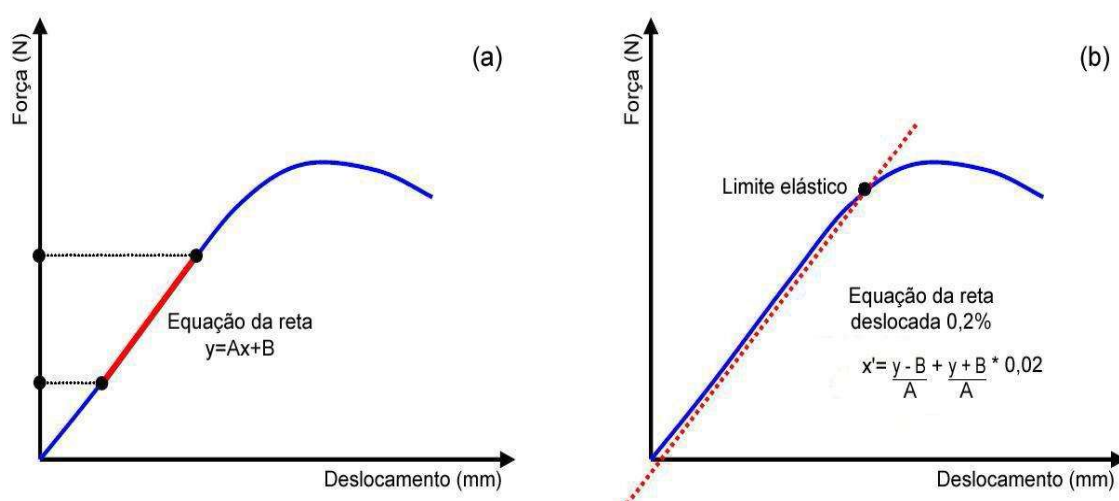
3.5.2 Teste Mecânico

Para a realização do teste mecânico, após a eutanásia, o fêmur esquerdo dos animais foi coletado, limpo e acondicionado em gaze embebida em solução fisiológica (NaCl 0.9%) e armazenado em freezer (-20°C) até o dia anterior ao ensaio. O fêmur foi testado mecanicamente até sua fratura completa, em teste de flexão em três pontos, a uma velocidade de 0,05 mm/s (3 mm/min) no equipamento mecânico MTS (modelo TESTSTAR II), com célula de carga de 100 Kgf. O ponto superior e os dois suportes inferiores possuem 0,5 mm de raio em suas extremidades. A distância entre os dois suportes inferiores foi de 5 mm. Cada fêmur foi testado no plano anteroposterior com o lado anterior voltado para cima, suportando compressão, e com o lado posterior para baixo, suportando tensão.

A força foi aplicada na superfície anterior porque há maior estabilidade do osso com o aparato mecânico, minimizando a rotação durante o teste. Os dados de força (carga ou *load*) e deslocamento (deformação absoluta ou *displacement*) foram obtidos diretamente do sistema MTS e registrados pelo software do computador acoplado à máquina de ensaio. Os registros desses dados foram utilizados para aquisição e cálculo das propriedades estruturais, dentre eles a força máxima (*maximum load*). A rigidez extrínseca foi calculada como sendo a inclinação da porção mais linear da região elástica da curva força-deslocamento. A força no limite elástico foi obtida no ponto da curva força-deslocamento, denominada de “limite elástico” ou “limite de proporcionalidade” (*yield point*). O limite elástico é o ponto imaginário que divide a região elástica da região plástica. É definido como a maior força que o material pode suportar, sem deixar qualquer deformação permanente quando descarregado. Para a determinação desse ponto, foi obtida a equação da reta de um trecho linear da fase

elástica (Figura 1a). A partir dessa equação, foi obtida uma reta linear deslocada 0,2%, que possibilitou a determinação do limite elástico, exatamente no ponto onde essa reta e a curva força-deslocamento se cruzam (Figura 1b). Dessa equação da reta, onde y é a variável que representa a força e x a variável que representa o deslocamento, foram determinados novos deslocamentos acrescidos de 0,2% para as forças. Assim, para cada força (y), um novo deslocamento (x') foi determinado (Figura 1b).

Figura 1 - Desenho esquemático para obtenção do limite elástico.



Fonte: do autor.

Legenda: (a) Determinação da equação da reta na região (fase) elástica. (b) Limite elástico exatamente no ponto onde a curva e a nova reta se cruzam. No desenho: y é a variável que representa a força, A e B são constantes, x é a variável que representa os deslocamentos e x' é a variável que representa os novos deslocamentos na reta deslocada 0,2%.

Depois da execução do teste de três pontos de cada espécime, as duas extremidades do local da ruptura foram processadas para se obter os parâmetros da área de secção transversal da diáfise (osso cortical). As extremidades distais do fêmur foram processadas por técnica histológica, realizando-se cortes com 5 μ m de espessura, que foram corados com Hematoxilina-Eosina. As extremidades proximais foram fotografadas por uma câmera digital de alta resolução e escala milimétrica, com auxílio do software *NIS-Elements: Advanced Ressecar* (USA). A partir das medidas obtidas de cada extremidade, foi determinada a média de cada um dos parâmetros. Os parâmetros da área de secção transversal foram utilizados para calcular o momento de inércia de área da diáfise. Para esse cálculo, foi assumido que a diáfise tinha um formato elíptico. Para isso, será utilizada a equação:

$$I = \frac{\pi}{64} [ab^3 - (a - 2t)(b - 2t)^3]$$

Onde I é o momento de inércia de área; a é a largura da área de secção transversal na direção médio-lateral; b é a largura da área de secção transversal na direção anteroposterior; e t é a média da espessura do osso cortical. A média da espessura cortical foi calculada das medidas feitas em cada um dos quadrantes da área cortical da diáfise. As propriedades materiais [tensão máxima (*maximum stress*), módulo elástico (*elastic modulus*) e deformação (*strain*) foram calculadas a partir desses parâmetros, segundo as equações abaixo:

$$\sigma = \frac{\text{força} \cdot L \cdot c}{4I} \quad \varepsilon = \frac{12 \cdot c \cdot d}{L^2} \quad E = \frac{\text{rigidez} \cdot L^3}{48I}$$

Onde: σ é a tensão; L é a distância entre os dois suportes inferiores; c é igual à metade de b (descrito anteriormente); ε é a deformação; d é o deslocamento; E é módulo elástico. A força poderá ser a máxima ou a correspondente ao limite elástico.

3.5.3 Área trabecular e do osso cortical

Para esta análise, foram utilizados seis fêmures de cada grupo (seis animais por grupo), sendo que, para cada fêmur, foram utilizados seis cortes histológicos e, de cada corte, foram capturados dois campos. Assim, foi utilizado um total de 72 campos, escolhidos aleatoriamente. Para essa análise, foi utilizada a epífise distal e a diáfise do fêmur esquerdo. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas em temperatura ambiente e descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 35 dias. Em seguida, as amostras foram processadas por meio de técnicas histológicas de rotina e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais com 5 μ m de espessura, que foram corados com Hematoxilina-Eosina. Na sequência, foi realizada a medida da área e da espessura das trabéculas ósseas na epífise distal dos fêmures e a mensuração da área e espessura cortical da diáfise dos fêmures, com auxílio do software *NIS-Elements: Advanced Research* (USA) com objetiva de 20X acoplada a uma foto microscópio da marca Nikon modelo Eclipse E400 com câmera Nikon modelo DXM 1200C.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisas envolvendo uso de fármacos e dietas específicas necessitam de atenção especial no que refere ao estado nutricional dos animais em experimentação, pois as variações no valor biológico e calórico do alimento podem provocar alterações nas respostas biológicas encontradas, atuando como um viés experimental (WEISBROTH *et al.*, 1977). Assim, embora não tenha sido objetivo direto do presente estudo avaliar a homeostase energética, por utilizarmos modelo baseado na ingestão de dieta modificada, foi realizada a análise da ingestão diária média de água e de alimento, bem como da variação de massa corporal ao longo do experimento, sendo estes dados trazidos na Tabela 1, apresentada a seguir.

Observamos uma redução significativa da ingesta hídrica nos animais SH submetidos à natação, em relação ao respectivo grupo sedentário ($p < 0,001$). Houve também um discreto aumento na ingestão alimentar do grupo LH treinado, relativamente ao respectivo grupo sedentário ($p < 0,05$). Portanto, não foi verificado um efeito claro da dieta ou da manipulação genética sobre os parâmetros de ingestão hídrica e alimentar. Porém, observamos aumento significativo do ganho de massa corporal nos grupos SH, independentemente do exercício, em comparação aos respectivos grupos S ($p < 0,001$), evidenciando um efeito direto do consumo de ração hiperlipídica, efeito este que não esteve presente nos animais LDLr^{-/-}. De fato, um estudo realizado previamente por Soares *et al.* (2011) demonstrou que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso e consumo de ração.

De acordo com Chorilli *et al.* (2007), para manter o estado nutricional adequado de camundongos e evitar a desnutrição e a desidratação, estes animais devem apresentar consumo médio diário superior a 4 g de ração e 6 mL de água. Assim, nossos resultados mostraram que todos os animais ganharam peso durante o experimento, e que mesmo os grupos que apresentaram menor ingesta líquida e/ou sólida mantiveram o consumo dentro do padrão sugerido pela literatura. Desta forma, podemos assumir que os parâmetros biomecânicos e morfométricos dos fêmures sofreram alterações em função da hiperlipidemia genética e da dieta hiperlipídica, conforme discutiremos adiante.

Tabela 1 – Ingestão média de líquidos (ml/dia), consumo médio de alimento (g/dia) e ganho de massa corporal (g) nos animais dos diferentes grupos experimentais.

Variável	Grupo	S		SH		L		LH	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Ingestão média de líquidos	Sedentário	8,10	0,26	8,87	0,15	8,45	0,25	7,92	0,21
	Natação	8,13	0,11	7,35###	0,15	8,02	0,28	8,60	0,27
Consumo médio de alimento	Sedentário	6,47	0,15	6,82	0,17	6,97	0,19	6,77	0,30
	Natação	6,92	0,09	7,37	0,11	7,32	0,29	7,67#	0,21
Ganho de massa corporal	Sedentário	6,22	0,31	7,90***	0,12	6,65	0,15	7,00	0,31
	Natação	6,04	0,28	7,67***	0,21	6,70	0,24	6,72	0,18

Fonte: do autor

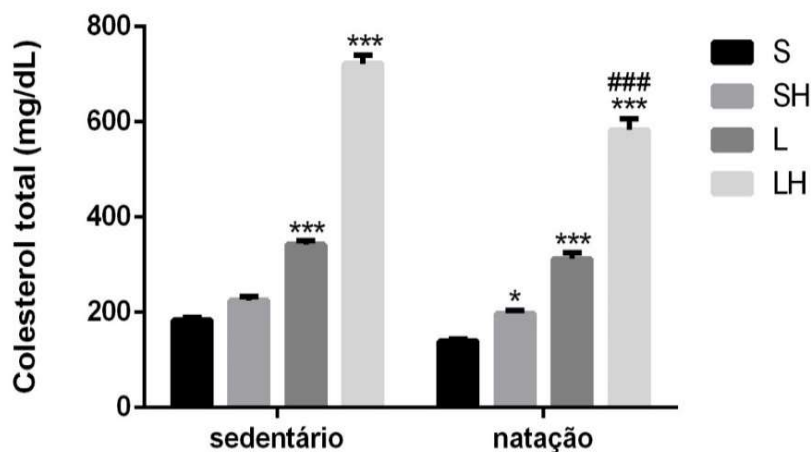
Legenda: Análise por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ versus respectivo grupo S (mesma linha); # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ versus respectivo grupo Sedentário (mesma coluna). N = 12 animais/grupo.

Quanto ao perfil lipídico, sabe-se que camundongos naturalmente apresentam níveis elevados de HDL e baixos para LDL em relação aos valores encontrados em humanos, sendo que tais condições exercem um papel protetor contra a aterosclerose (SMITHIES; MAEDA 1995). Nas décadas de 60 e 70, foram desenvolvidas dietas capazes de induzir hiperlipidemia leve em camundongos (VESSELINOVITCH; WISSILER 1968). Na busca de modelos animais ideais para pesquisas relacionadas à dislipidemia, nos anos 90 a engenharia genética permitiu o desenvolvimento de modelos de camundongos transgênicos capazes de desenvolver lesões avançadas, em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (BRESLOW 1996).

Os camundongos *knockout* para ApoE (apolipoproteína E) ou para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) podem desenvolver lesões que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (Johnson Jackson, 2001; Song *et al.*, 2001). No presente estudo foram utilizados camundongos selvagens e camundongos *knockout* LDLr^{-/-}, sedentários e submetidos a natação, alimentados com ração padrão para roedores ou ração hiperlipídica, para análise dos níveis lipídicos, morfológicos e biomecânicos após 60 dias de experimentação.

Conforme podemos observar da Figura 2, considerando o grupo sedentário, os animais LDLr^{-/-}, independentemente de terem ou não recebido dieta hiperlipídica, apresentaram aumento das concentrações de colesterol total, quando comparados ao respectivo grupo controle (grupo L: 342,32 ± 8,78 versus 183,93 ± 5,51 mg/dL, p<0,001; grupo LH: 722,31 ± 17,77 versus 183,93 ± 5,51 mg/dL, p<0,001), sendo os maiores valores encontrados no grupo LH. O mesmo comportamento foi observado no grupo submetido à natação (grupo L: 312,14 ± 13,25 versus 139,36 ± 4,42 mg/dL, p<0,001; grupo LH: 582,69 ± 24,21 versus 139,36 ± 4,42 mg/dL, p<0,001). Contudo, a natação preveniu que esse aumento nas concentrações de CT induzido pela dieta hiperlipídica fosse tão grande como no grupo LH sedentário (722,31 ± 17,77 versus 582,69 ± 24,21 mg/dL, p<0,001). Adicionalmente, o exercício físico aumentou significativamente os níveis de CT também no grupo de animais selvagens que consumiu dieta hiperlipídica (197,66 ± 5,76 versus 139,36 ± 4,42 mg/dL, p<0,05). Como veremos mais adiante, esse resultado pode estar associado, entre outros fatores, com o aumento mais expressivo da fração HDL neste grupo experimental.

Figura 2 - Concentrações plasmáticas de Colesterol total (CT) dos camundongos selvagens (S) e LDL-/- (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H).



* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus o respectivo grupo controle (S)
 ### $p < 0,001$ versus o respectivo grupo sedentário

Fonte: do autor.

Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.

Assim, apesar de os animais *knockout* apresentarem hipercolesterolemia espontânea mesmo consumindo ração padrão (grupos L), é possível constatar que o treinamento aquático atenuou o aumento das concentrações plasmáticas de CT induzidas pelo consumo de dieta hiperlipídica nestes animais (grupos LH).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017), o tratamento das hiperlipidemias baseia-se em mudanças de hábitos de vida (mudanças alimentares, controle de peso, estímulo ao exercício físico e combate ao tabagismo) e, quando não atingidos os objetivos propostos, deve ser considerado o tratamento medicamentoso.

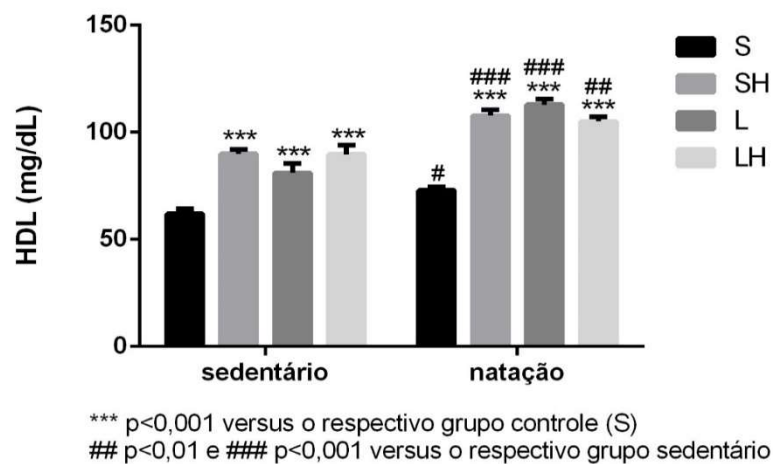
Zhang *et al.* (2021) investigaram os efeitos da natação na formação de lesões ateroscleróticas e o mecanismo correspondente, utilizando vinte camundongos machos jovens deficientes em ApoE, divididos em dois grupos: o grupo de aterosclerose (alimentação com dieta rica em colesterol) e grupo de natação (90 min/dia, 6 dias ao longo de 10 semanas). Os pesquisadores analisaram índice de peso, alterações histológicas da área da aorta, níveis de lipídios no sangue, níveis de expressão de óxido nítrico-sintase (NOS), níveis de

expressão de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), níveis de fatores inflamatórios e estresse oxidativo, concluindo que o protocolo de natação diminuiu significativamente o desenvolvimento de placa aterosclerótica em camundongos com deficiência de ApoE, possivelmente devido à redução na expressão de lipídios sanguíneos e elevação na expressão de NOS.

Fernandes *et al.* (2013) demonstraram que o treinamento aeróbico de intensidade moderada, combinado ou não com dieta hiperlipídica, reduz lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE^(-/-) com aterosclerose preexistente. Entretanto, esta redução da lesão parece não ser dependente da ApoE, e é independente das mudanças do colesterol no plasma. Em pessoas com deficiência da ApoE, a redução do colesterol e o aumento do treinamento físico podem atenuar significativamente a formação da lesão aterosclerótica ao longo das mudanças na formação do indivíduo.

Ademais, podemos observar na Figura 3 que os grupos SH, L e LH sedentários apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de HDL em relação ao respectivo grupo S ($61,92 \pm 2,23$ versus $89,87 \pm 2,14$ mg/dL, $p < 0,001$; $61,92 \pm 2,23$ versus $81,07 \pm 4,54$ mg/dL, $p < 0,001$; $61,92 \pm 2,23$ versus $89,68 \pm 4,20$ mg/dL, $p < 0,001$, respectivamente). Também podemos observar que este efeito se repetiu de maneira ainda mais pronunciada nos grupos submetidos à natação, inclusive no grupo controle. Assim, ficou claro o efeito benéfico da atividade física em aumentar as concentrações de HDL em relação aos respectivos grupos sedentários, independentemente do fator dieta (grupos S: $61,92 \pm 2,23$ versus $72,88 \pm 1,69$ mg/dL, $p < 0,05$; grupos SH: $89,87 \pm 2,14$ versus $107,86 \pm 2,57$ mg/dL, $p < 0,001$; grupos L: $81,07 \pm 4,54$ versus $112,87 \pm 2,58$ mg/dL, $p < 0,001$; grupos LH: $89,68 \pm 4,20$ versus $105,11 \pm 2,21$ mg/dL, $p < 0,001$).

Figura 3 – Concentrações plasmáticas de HDL dos camundongos Selvagens (S) e LDL -/- (L) sedentários e dos submetidos a treinamento Aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H).



Fonte: do autor.

Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.

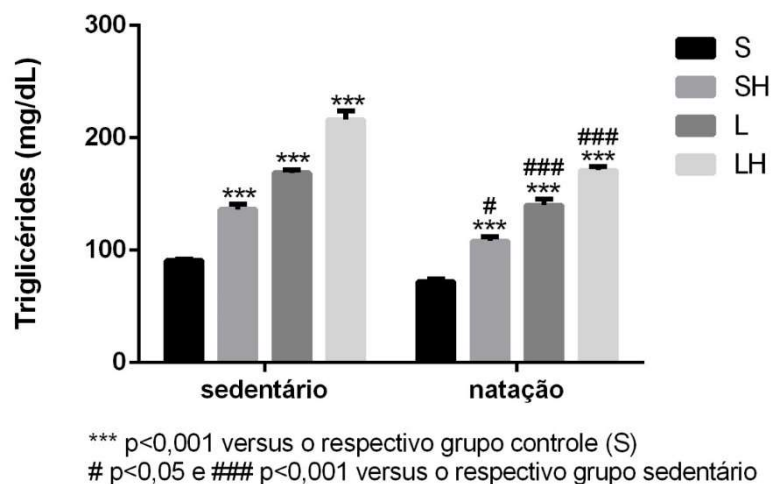
De maneira similar, Pitanga (2001) encontrou correlações estatisticamente significativas entre a prática de exercícios físicos e as concentrações de HDL. Em seu estudo, os indivíduos ativos apresentaram maiores concentrações de HDL em comparação aos sedentários. Adicionalmente, Casquero *et al* (2017) observaram uma redução de 18% nos níveis de HDL, 25% dos valores de triglicerídeos e de 20% ácidos graxos livres em camundongos que subexpressam o gene endógeno do receptor de LDL, submetidos a seis semanas de treinamento de natação, reforçando os efeitos metabólicos positivos do exercício.

Terra *et al.* (2013) não somente pesquisou os efeitos do treinamento aquático (TA) no perfil lipídico, como também nas estruturas ventriculares esquerdas de camundongos LDLr-/-. Para isso, utilizaram animais machos, divididos aleatoriamente nos grupos: sedentários alimentados com ração padrão (C); treinados alimentados com ração padrão, sedentários alimentados com

ração hiperlipídica e treinados alimentados com ração hiperlipídica (HL+TRE). Os animais dos grupos treinados praticaram TA em intensidade moderada, por 60 minutos durante 60 dias consecutivos. Os resultados mostraram que o TA sem cargas adicionais foi mais eficiente em melhorar as concentrações plasmáticas de lipídeos quando acompanhado por uma dieta adequada, confirmando que a associação exercício físico com dieta equilibrada é essencial para obtenção de seus benefícios. Além disso, o TA ocasionou hipertrofia ventricular esquerda excêntrica no grupo alimentado com dieta padrão e, principalmente, diminuiu o depósito de colágeno intersticial no miocárdio dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, o que pode indicar uma melhora na função diastólica, com conseqüente melhoria da função sistólica.

Por fim, analisamos ainda as concentrações de TG nos diferentes grupos experimentais (Figura 4). Novamente, dentre os animais sedentários, observamos aumento das concentrações de TG no grupo SH ($90,88 \pm 1,04$ versus $136,36 \pm 4,41$ mg/dL, $p < 0,001$) e também nos grupos *knockout*, independentemente da dieta (grupo L: $90,88 \pm 1,04$ versus $168,83 \pm 2,81$ mg/dL, $p < 0,001$; grupo LH: $90,88 \pm 1,04$ versus $216,07 \pm 8,16$ mg/dL, $p < 0,001$). O mesmo padrão de resposta foi observado nos grupos submetidos à natação, porém os grupos SH, L e LH treinados apresentaram valores plasmáticos de TG atenuados em relação aos seus pares sedentários (grupos SH: $108,07 \pm 4,02$ versus $136,36 \pm 4,41$ mg/dL, $p < 0,001$; grupos L: $140,08 \pm 5,35$ versus $168,83 \pm 2,81$ mg/dL, $p < 0,001$; grupos LH: $171,21 \pm 3,11$ versus $216,07 \pm 8,16$ mg/dL, $p < 0,001$).

Figura 4 – Concentrações plasmáticas de triglicérides (TG) dos camundongos selvagens (S) e LDL $-/-$ (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H).



Fonte: do autor.

Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.

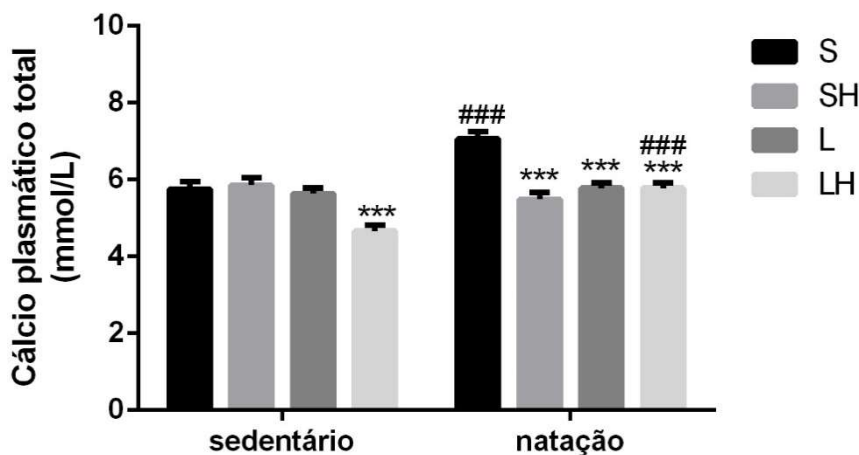
Em resumo, o presente estudo demonstrou redução nas concentrações de TG nos grupos submetidos à natação, independentemente da dieta, corroborando dados prévios da literatura que mostram o efeito benéfico do treinamento físico aeróbio em reduzir de forma consistente as concentrações plasmáticas de TG (RIQUE *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o presente estudo analisou as concentrações plasmáticas de cálcio total (Figura 5) e ionizado (Figura 6), uma vez que há evidência de que a hiperlipidemia seja um fator de risco para as doenças do sistema esquelético, aparentemente promovendo osteoporose por interferência na sinalização do remodelamento ósseo (NUZZO *et al.*, 2009).

Em mamíferos, quase todo o cálcio está localizado no tecido ósseo, sendo que apenas 0,1% do cálcio corporal total está presente na sua forma solúvel. Na circulação, o cálcio é dividido 1) na fração ligada a proteínas (albumina e globulinas), o que corresponde a 35-40%; 2) na fração ionizada (livre), correspondente a 50%; e, por fim, 3) na fração complexada (bicarbonato, fosfato, lactato etc.), somando os restantes 10-15%. Portanto, o cálcio ionizado é a forma fisiologicamente ativa presente nos líquidos extracelulares.

Em nosso estudo, observamos redução das concentrações de cálcio total em animais LH sedentários, em relação ao respectivo grupo controle ($5,75 \pm 0,20$ versus $4,66 \pm 0,15$ mmol/L, $p < 0,001$). Esse efeito foi completamente revertido pelo exercício físico no grupo LH natação ($4,66 \pm 0,15$ versus $5,78 \pm 0,12$ mmol/L, $p < 0,001$). Além do mais, a natação, por si só, aumentou as concentrações totais de cálcio no grupo S ($5,75 \pm 0,20$ versus $7,05 \pm 0,19$ mmol/L, $p < 0,001$), fazendo com que os valores encontrados nos grupos SH e L treinados ficassem mais baixos em relação ao respectivo grupo controle (grupo SH: $5,49 \pm 0,17$ versus $7,05 \pm 0,19$ mmol/L, $p < 0,001$; grupo L: $5,78 \pm 0,13$ versus $7,05 \pm 0,19$ mmol/L, $p < 0,001$).

Figura 5 – Concentrações plasmáticas de cálcio total dos camundongos selvagens (S) e LDL -/- (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H).



*** $p < 0,001$ versus o respectivo grupo controle (S)

$p < 0,001$ versus o respectivo grupo sedentário

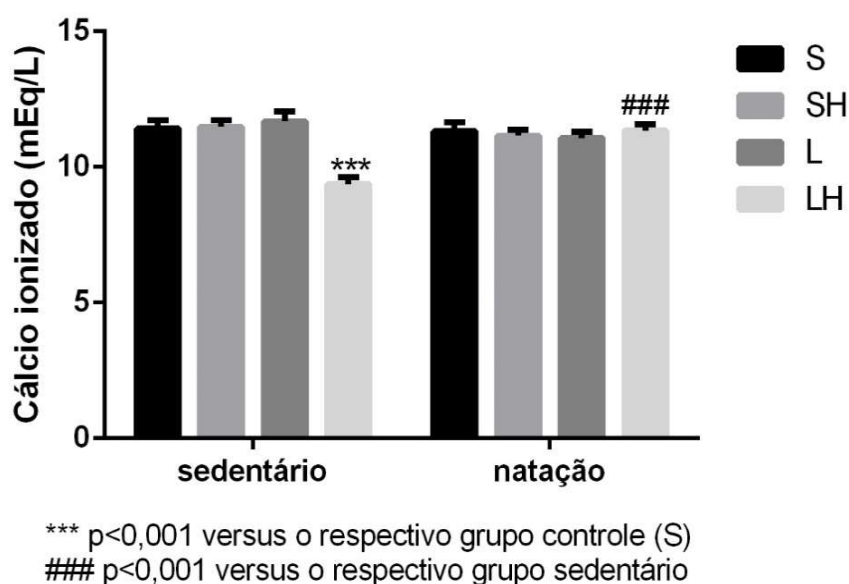
Fonte: do autor.

Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.

Em relação à fração ionizada de cálcio (Figura 6), observamos um efeito significativo de redução dos valores no grupo LH, em relação ao respectivo grupo controle ($11,41 \pm 0,30$ versus $9,36 \pm 0,25$ mEq/L, $p < 0,001$). Adicionalmente, a

natação foi capaz de reverter completamente esse efeito ($9,36 \pm 0,25$ versus $11,34 \pm 0,24$ mEq/L, $p < 0,001$).

Figura 6 – Concentrações plasmáticas de cálcio ionizado dos camundongos selvagens (S) e LDL -/- (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H).



Fonte: do autor

Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.

Nesse sentido, foi demonstrado que a hiperlipidemia aumenta a atividade osteoclástica e inibe a ação osteoblástica, descompensando o equilíbrio entre a absorção e reabsorção do tecido ósseo (LUEGMAYR *et al.*, 2004). De maneira similar, estudo realizado previamente por Soares *et al.* (2012) evidenciou que camundongos LDLr-/-, alimentados com dieta normal e hiperlipídica apresentavam níveis baixos de cálcio, quando comparados com camundongos selvagens (controle).

A calcificação aterosclerótica que leva mineralização da parede vascular induzindo perda de cálcio do osso é uma característica comum da hiperlipidemia (BARENGOLTS *et al.*, 1998). Evidências clínicas mostram uma associação entre

aterosclerose e calcificação vascular com surgimento de osteoporose, no entanto nenhum mecanismo ainda explica esta relação (LUEGMAYR *et al.*, 2004).

Diante destes achados, o presente estudo avaliou as propriedades biomecânicas nos diferentes grupos experimentais. Os ensaios biomecânicos ósseos apresentam-se basicamente por dois tipos: os destrutivos e os não destrutivos. De acordo com Kruzic, Ritchie (2006), os ensaios mecânicos comumente mais utilizados para determinação das propriedades mecânicas dos materiais são: ensaio de tração, compressão, flexão em 3 ou 4 pontos, torção e nanoindentação. No presente estudo, optou-se pelo teste de flexão em 3 pontos, indicado para ossos longos (tubulares).

Para estas análises, além do ensaio no módulo de flexão, a obtenção das dimensões dos fêmures (o comprimento do fêmur, a largura proximal, distal e da diáfise) é fundamental para a realização dos cálculos referentes às propriedades materiais e estruturais do osso. A Tabela 2, apresentada a seguir, mostra a análise das dimensões ósseas nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 2 – Dimensões do fêmur (em mm) nos diferentes grupos experimentais

Variável	Grupo	S		SH		L		LH	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Comprimento do fêmur	Sedentário	13,00	0,21	12,08	0,26	12,00	0,27	11,33***	0,25
	Natação	11,75#	0,37	11,75	0,28	11,41	0,28	11,08	0,39
Largura do fêmur proximal	Sedentário	3,41	0,15	3,57	0,13	3,05	0,13	3,10	0,15
	Natação	3,57	0,15	3,38	0,13	3,26	0,19	3,13	0,15
Largura do fêmur distal	Sedentário	3,49	0,10	3,27	0,17	3,21	0,08	3,07*	0,07
	Natação	3,66	0,13	3,28	0,07	3,11**	0,06	3,30	0,05
Largura da diáfase do fêmur	Sedentário	2,22	0,07	2,13	0,005	1,89***	0,06	1,86***	0,06
	Natação	2,15	0,004	2,15	0,006	2,10#	0,06	2,03	0,06

Fonte: do autor.

Legenda: Análise por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 versus respectivo grupo S (mesma linha); # p<0,05 versus respectivo grupo Sedentário (mesma coluna). N = 12 animais/grupo.

Considerando o comprimento do fêmur, observou-se diminuição deste parâmetro no grupo LH sedentário, comparativamente ao respectivo grupo S ($p < 0,001$). Ademais, o grupo S submetido à natação mostrou redução nesta variável em relação ao grupo S sedentário ($p < 0,05$). A largura do fêmur distal, por sua vez, mostrou-se significativamente reduzida no grupo LH sedentário, em relação ao respectivo grupo S ($p < 0,05$). Não foram observadas alterações significativas na largura do fêmur proximal. Dentre os grupos submetidos ao protocolo de natação, observamos apenas redução da largura do fêmur distal no grupo L, em comparação ao respectivo grupo S ($p < 0,01$). Dentre os animais sedentários, todos os animais *knockout* para o receptor de LDL apresentaram redução significativa da largura da diáfise do fêmur, independentemente da dieta ($p < 0,001$). A natação não somente reverteu esse efeito para o grupo LH, como também aumentou a largura da diáfise nos animais L, em relação ao respectivo grupo L sedentário ($p < 0,05$). Portanto, neste parâmetro, fica claro um efeito prejudicial da manipulação genética combinada à dieta sobre a largura da diáfise, sendo este efeito prevenido pelo treinamento aquático.

De acordo com Diniz *et al.*, (2009) as propriedades materiais, geometria estrutural e transversal dos ossos permitem o aperfeiçoamento do tecido para sustentar as cargas aplicadas pelo deslocamento fisiológico. No entanto, a aplicação de forças intensas pode causar deformações. Se depois de removida a força aplicada sobre o objeto (osso) ele reassume posição e conformação original, podemos afirmar que houve uma deformação elástica no tecido, sendo está diferente de quando a força aplicada faz com que a deformação seja permanente, teremos aí uma "deformação plástica" (FRANKEL 1980). A continuidade da aplicação da carga de força permitirá a obtenção "ponto de fratura" (SCHWARZ, 1996).

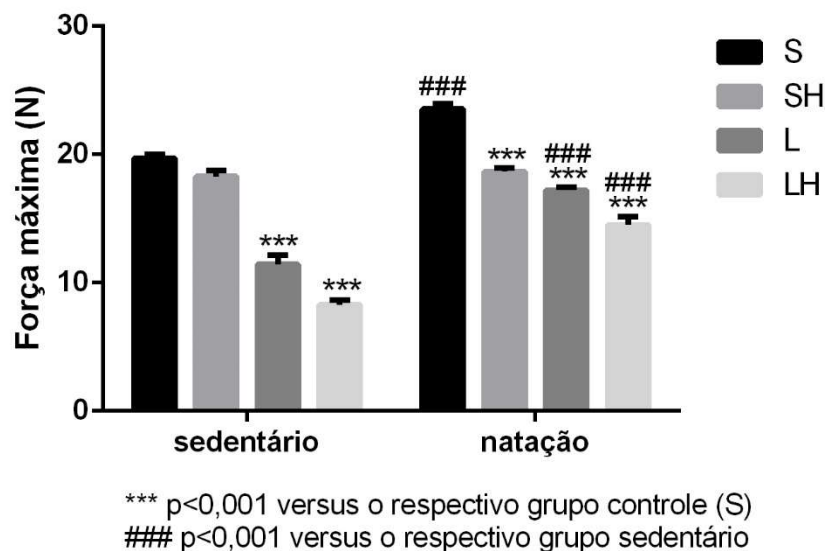
O ensaio de flexão é uma das mais importantes análises biomecânicas, pois provoca encurvamento de um corpo de prova até sua ruptura, fornecendo dados quantitativos de deformação e força da amostra testada (CORDEY, 2000). No presente estudo foi realizado o teste de flexão sob a diáfise do fêmur, para a obtenção da força máxima (de ruptura), ou seja, a quantidade de força (N) necessária para que o fêmur frature, força que determina a partir de quando a deformação elástica passa a ser plástica.

A relação entre as hiperlipidemias e as alterações no tecido ósseo vem sendo discutida em diferentes estudos (KRIEGER *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2012, 2015; XIAO *et al.*, 2009). No entanto, a literatura carece de dados que correlacionem a hiperlipidemia com as propriedades biomecânicas do osso. Os camundongos LDLr *-/-* representam um bom modelo para o estudo de doenças ósseas relacionadas à hiperlipidemia genética ou hiperlipidemia induzida por uma dieta rica em gordura (SOARES *et al.*, 2012).

Segundo Nuzzo *et al.* (2009) a hiperlipidemia é um fator de risco para as doenças do sistema esquelético, associando-a ao mecanismo promotor da osteoporose ao interferir na sinalização do remodelamento ósseo. A hiperlipidemia aumenta a atividade osteoclástica e inibe a ação osteoblástica, descompensando o equilíbrio entre a absorção e reabsorção do tecido ósseo (LUEGMAYR *et al.*, 2004). Este desequilíbrio tem sido atribuído a uma redução no conteúdo de óxido nítrico (NO) (MARTE *et al.*, 2007), já que a diferenciação dos osteoblastos é mediada pelo aumento de sua síntese (DINIZ *et al.*, 2002). A inibição da síntese de NO ocorre em função da associação entre hiperlipidemia e hipertensão arterial (MARTE *et al.*, 2007).

Por fim, ao analisarmos o desempenho ósseo em teste mecânico (Figura 7), observamos, dentre os animais sedentários, um efeito bastante claro da manipulação genética, associada ou não à dieta, em reduzir a força máxima (grupo L: $19,71 \pm 0,26$ versus $11,44 \pm 0,70$ N, $p < 0,001$; grupo LH: $19,71 \pm 0,26$ versus $8,27 \pm 0,37$ N, $p < 0,001$). Já nos grupos treinados, o efeito benéfico da natação é evidente já no grupo controle ($19,71 \pm 0,26$ versus $23,53 \pm 0,43$ N, $p < 0,001$). Embora não haja diferença relacionada ao treinamento aquático entre os grupos SH, observamos que a natação atenuou (mas não impediu) os efeitos da manipulação genética associada ou não à dieta sobre a força máxima (grupo L: $11,44 \pm 0,70$ versus $17,20 \pm 0,22$ N, $p < 0,001$; grupo LH: $8,27 \pm 0,37$ versus $14,50 \pm 0,62$ N, $p < 0,001$). Assim, novamente fica claro no teste de resistência mecânica o efeito prejudicial do aumento das concentrações séricas de lipídeos, sendo este efeito parcialmente revertido pelo exercício físico.

Figura 7 - Força máxima em camundongos selvagens (S) e LDL^{-/-} (L), sedentários e dos submetidos a treinamento aquático, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica (H).



Fonte: do autor.

Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. N = 12 animais/grupo.

Neste contexto, Soares *et al* (2012) já avaliaram o efeito da hiperlipidemia nas propriedades biomecânicas e morfológicas do fêmur de camundongos LDL^{-/-} e selvagens (C57BL6), alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Foi demonstrado que a força (N) necessária para ruptura do fêmur dos camundongos LDL^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica era menor, quando comparada aos demais grupos compostos por camundongos selvagens alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, bem como em relação a camundongos LDL^{-/-} alimentados com ração padrão.

Além da força máxima, características físicas ósseas, área cortical, espessura cortical e área trabecular oferecem dados importantes sobre a resistência à fratura (HUANG *et al.*, 2003). As características morfométricas (área trabecular/cortical, espessura trabecular/cortical) e as propriedades biomecânicas (deslocamento, rigidez extrínseca, tensão máxima, módulo de elasticidade e deformação) dos diferentes grupos experimentais são trazidas na Tabela 3 e demonstradas nas fotomicrografias contidas nas figuras 8 e 9, apresentada a seguir.

Como pode ser observado, houve uma redução significativa da área trabecular no grupo LH sedentário, em relação ao respectivo grupo S ($p < 0,001$), sendo este efeito revertido pela natação ($p < 0,001$). A redução da espessura cortical e trabecular nos fêmures de animais LH é claramente visível a partir das fotomicrografias.

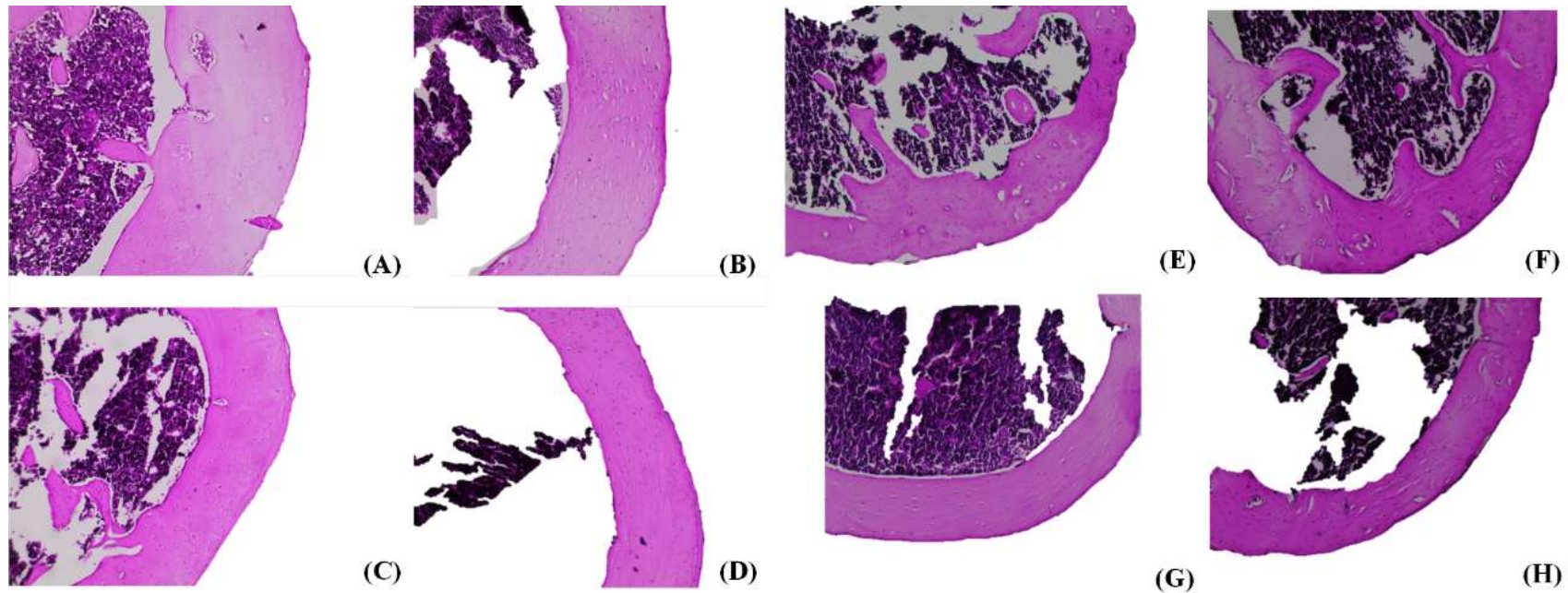
Tabela 3 – Características morfométricas (área trabecular/cortical: mm², e espessura trabecular/cortical: mm) e análise das propriedades biomecânicas (deslocamento: mm, rigidez extrínseca: N/mm, tensão máxima: MPa, módulo de elasticidade: Mpa, e deformação: Mpa) nos diferentes grupos experimentais.

Variável	Grupo	S		SH		L		LH	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Área trabecular	Sedentário	3,70	0,13	3,35	1,00	3,33	0,15	2,21***	0,12
	Natação	3,71	0,12	3,42	0,13	3,77	0,12	3,3####	0,11
Espessura trabecular	Sedentário	0,200	0,009	0,187	0,006	0,130***	0,013	0,128***	0,010
	Natação	0,235	0,011	0,207	0,009	0,181**###	0,007	0,135***	0,012
Área cortical	Sedentário	4,85	0,07	4,76	0,05	4,63	0,10	4,56	0,14
	Natação	4,78	0,05	4,86	0,12	4,60	0,11	4,43	0,07
Espessura cortical	Sedentário	0,96	0,02	0,87	0,02	0,80**	0,02	0,74***	0,03
	Natação	1,01	0,04	0,80***	0,04	0,83**	0,03	0,80***	0,03
Deslocamento	Sedentário	0,32	0,02	0,25	0,02	0,27	0,02	0,30	0,02
	Natação	0,42###	0,01	0,31**	0,01	0,31**	0,02	0,31**	0,03
Rigidez extrínseca	Sedentário	132,75	4,05	84,66***	1,76	76,33***	1,40	70,66***	1,32
	Natação	137,08	1,62	92,58***#	1,11	98,08***####	1,60	82,08***###	2,93
Tensão máxima	Sedentário	16,15	0,35	12,40***	0,54	10,80***	0,23	10,73***	0,34
	Natação	20,42####	0,56	14,16***###	0,41	13,40***####	0,29	14,44***####	0,31
Módulo de elasticidade	Sedentário	116,81	3,87	99,91**	1,81	66,73***	4,09	69,00***	1,77
	Natação	169,70***####	4,21	101,84***	1,53	77,47***	3,93	87,11***####	2,08
Deformação	Sedentário	0,172	0,008	0,054***	0,007	0,083***	0,010	0,097***	0,005
	Natação	0,253***####	0,015	0,114***####	0,005	0,175***####	0,014	0,136***#	0,006

Fonte: do autor

Legenda: Análise por Two-Way ANOVA (ANOVA de duas vias), seguida de pós-teste de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 versus respectivo grupo S (mesma linha); # p<0,05, ## p<0,01 e ### p<0,001 versus respectivo grupo Sedentário (mesma coluna). N = 12 animais/grupo.

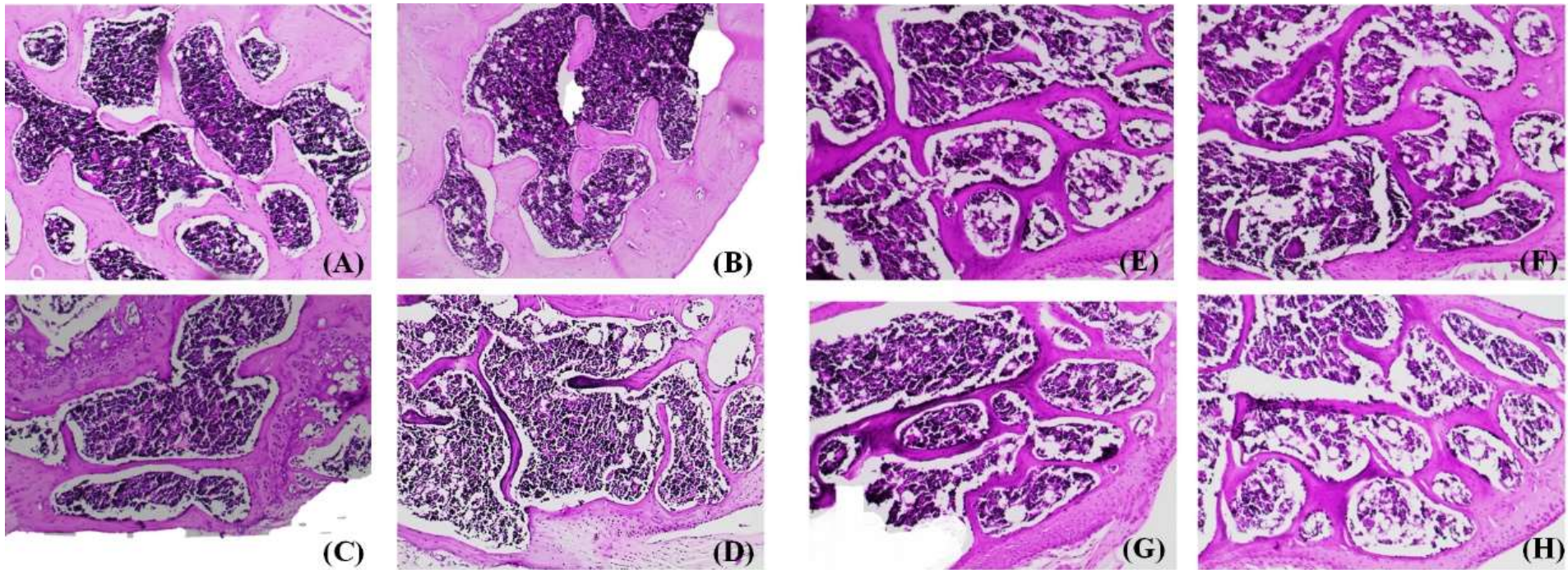
Figura 8 – Fotomicrografias representativas de cortes transversais da diáfise femoral de camundongos dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: do autor.

Legenda: Grupo Selvagem + Natação (A), Selvagem + Sedentário (B), Selvagem + Dieta Hiperlipídica + Natação (C), Selvagem + Dieta Hiperlipídica + Sedentário (D), LDLr-/- + Natação (E), LDLr-/- + Sedentário (F), LDLr-/- + Dieta Hiperlipídica + Natação (G), LDLr-/- + Dieta Hiperlipídica + Sedentário (H). Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 4x. Coloração por hematoxilina e eosina.

Figura 9 - Fotomicrografias representativas de cortes transversais da epífise distal de fêmures de camundongos dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: do autor

Legenda: Grupo Selvagem + Natação (A), Selvagem + Sedentário (B), Selvagem + Dieta Hiperlipídica + Natação (C), Selvagem + Dieta Hiperlipídica + Sedentário (D), LDLr^{-/-} + Natação (E), LDLr^{-/-} + Sedentário (F), LDLr^{-/-} + Dieta Hiperlipídica + Natação (G), LDLr^{-/-} + Dieta Hiperlipídica + Sedentário (H). Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 4x. Coloração por hematoxilina e eosina.

A espessura da área trabecular do fêmur de camundongos LDL -/- alimentados com dieta hiperlipídica foi cerca de 59% menor do que a do grupo de camundongos selvagens alimentados com dieta padrão. Provavelmente porque o nível sérico de colesterol elevado causa redução da massa óssea, diminuição da remodelação óssea, intensa proliferação de osteoclastos e inibição da atividade dos osteoblastos, conseqüentemente comprometendo a arquitetura trabecular e possivelmente causando osteoporose (YAMAGUCHI *et al.*, 2002; LUEGMAYR *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2011).

Ademais, o parâmetro deslocamento mostrou-se inalterado nos grupos sedentários. Nos grupos submetidos à natação, porém, esse parâmetro foi reduzido nos grupos SH, Le LH ($p < 0,01$), em comparação ao respectivo grupo S. Houve também um efeito do exercício em aumentar o deslocamento no grupo controle, comparativamente ao grupo S sedentário ($p < 0,01$).

De acordo com Ferretti *et al.* (2001), as propriedades estruturais referem-se ao órgão como um todo (massa, arquitetura, tamanho e distribuição). Soares *et al.* (2011) observaram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentavam maiores comprometimentos das propriedades estruturais (deslocamento e rigidez) e materiais (tensão máxima, deformidade e módulo de elasticidade). Assim, a análise mecânica mostrou que as propriedades estruturais (deslocamento e rigidez) e materiais (tensão máxima, deformidade e módulo de elasticidade) estão mais comprometidas nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (grupo SH e LH sedentários).

A diminuição da rigidez óssea, que está associada a uma eventual baixa taxa de mineralização óssea e alterações do módulo de elasticidade, deve-se à descalcificação óssea, redução da matriz mineral e fatores de fragilidade (FERRETTI *et al.*, 2001; HERNANDEZ; *et al.*, 2001; RUPPEL, MILLER; BURR, 2008). Em nosso estudo, a rigidez extrínseca mostrou-se significativamente reduzida nos grupos SH, L e LH sedentários ($p < 0,001$), sendo este efeito parcialmente modulado pela natação. O mesmo perfil foi observado para a tensão máxima, sendo detectado, inclusive, efeito positivo do exercício físico no grupo controle ($p < 0,001$). O módulo de elasticidade também foi reduzido pela dieta hiperlipídica, combinada ou não com a deleção do receptor de LDL, sendo este efeito parcialmente revertido pelo exercício físico apenas nos grupos S e LH ($p < 0,001$). Por fim, a deformação mostrou-se reduzida em todos os grupos sedentários, comparativamente ao respectivo grupo S ($p < 0,001$), sendo que

a natação incrementou significativamente esses valores em todos os grupos experimentais, inclusive no grupo S. Assim, aliado aos dados prévios de Soares *et al.* (2015), o presente estudo confirma que o consumo da dieta hiperlipídica atua como fator de risco para a integridade óssea, tornando os ossos menos resistentes e mais suscetíveis a fraturas.

5 CONCLUSÃO

Os camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) apresentaram-se como um bom modelo experimental para o estudo da hiperlipidemia. Camundongos selvagens e modificados geneticamente para o gene do receptor (LDLr^{-/-}) quando alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram alterações deletérias dos parâmetros analisados e quando submetidos ao treinamento aquático, estabeleceram relação com a redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides, bem como com o aumento dos níveis de HDL, cálcio plasmáticos e cálcio ionizado, o que provavelmente os protegeu contra as alterações deletérias biomecânicas e morfométricas.

Os achados morfométricos e biomecânicos demonstraram alterações mais pronunciadas nos ossos cortical e trabecular dos fêmures dos camundongos LDLr^{-/-} que receberam a dieta rica em gordura e não foram submetidos a natação. Mudanças nos níveis plasmáticos de cálcio, triglicerídeos e colesterol e suas frações também foram mais marcantes neste grupo.

Portanto, as avaliações bioquímicas, biomecânicas e morfométricas realizadas no presente estudo sugerem que a natação e a dieta balanceada em teor lipídico possam prevenir os efeitos nocivos da hiperlipidemia/dislipidemia sobre o tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

- ASCENZI, Maria-Grazia; et al. Hyperlipidemia affects multiscale structure and strength of murine femur. **Journal of biomechanics**, USA; v. 47, n. 10, p. 2436-2443, 2014.
- BARENGOLTS, Elcon I. et al. **Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women**. **Calcif Tissue Int**, University of Illinois; Chicago, USA; v. 62, p. 209-213, 1998.
- BEZNER, Jorge R. Promoting Health and Wellness: Implications for Physical Therapist Practice, **Physical Therapy**; v. 95, issue 10, 1 October 2015, Texas State University, USA; Pages 1433–1444, <https://doi.org/10.2522/ptj.20140271>.
- BOUILLON, Roger; OKAMURA, William H.; NORMAN, Anthony W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. **Endocrine reviews**, University of California, California, USA; v. 16, n. 2, p. 200-257, 1995.
- BRADBURN, Michael J.; et al. Survival analysis Part III: multivariate data analysis—choosing a model and assessing its adequacy and fit. **British journal of cancer**, Oxford, UK; v. 89, n. 4, p. 605-611, 2003.
- BROOKS, Garry A.; FAHEY, Tooddy D. Cardiovascular and metabolic function. **Exercise Physiology: Human Bioenergetics and Its Applications**. New York, USA: MacMillan Publishing Company, p. 673-736, 1985.
- CHORILLI, Marlus; MICHELIN, Daniel C.; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, SP, Brasil; v. 28, n. 1, 2007.
- CHUNG, Seok Won; et al. Effect of hypercholesterolemia on fatty infiltration and quality of tendon-to-bone healing in a rabbit model of a chronic rotator cuff tear: electrophysiological, biomechanical, and histological analyses. **The American journal of sports medicine**, Seoul. Korea; v. 44, n. 5, p. 1153-1164, 2016.
- CORDEY, Jan. Introduction: Basic concept and definitions in mechanics. **Injury**, Lausanne, Switzerland; v. 31, p. 1-84, 2000.
- DAMASO, Ana. Nutrição e exercício na prevenção de doenças. In: **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, Brasil; 2001. p. 433-433.
- DE FÁTIMA MONTEIRO, Maria; FILHO, Dário C. Sobral. Exercício físico e o controle da pressão arterial. **Rev Bras Med Esporte**, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil; v. 10, p. 89-95.
- DEVI, S. Asha; PRATHIMA, S.; SUBRAMANYAM, M. V. V. Dietary vitamin E and physical exercise: I. Altered endurance capacity and plasma lipid profile in ageing rats. **Experimental gerontology**, Bangalore University, India; v. 38, n. 3, p. 285-290, 2003.

DINIZ, Júlia S.; et al. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. **Encontro latino americano de iniciação científica**, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil; v. 9, 2005.

EVANGELISTA, Fábio S.; BRUM, Paulo C.; KRIEGER, Jorge E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Universidade de São Paulo, São Paulo. Brasil; v. 36, p. 1751-1759, 2003.

FERNANDES, Silvio Anderson Toledo; et al. Efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento aeróbico na aterosclerose em camundongos apoE^{-/-}. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Minas Gerais, Brasil; v. 19, p. 436-441, 2013.

FERRETTI, Joel L.; et al. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, Buenos Aires, Argentina; v. 1, n. 3, p. 263-74, 2001.

FORJAZ, Cláudia Lúcia de Moraes; et al. Exercício resistido para o paciente hipertenso: indicação ou contra-indicação. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Ribeirão Preto, Brasil; v. 10, n. 2, p. 119-124, 2003.

FRATESCHI, Maria Eloisa Borges Junqueira; de et al. **Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

GARCIA, José Antonio D.; et al. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by anti-inflammatory action. **Journal of cardiovascular pharmacology**, Unicamp, Campinas, Brasil; v. 51, n. 1, p. 78-85, 2008.

GOMES, Raul M; et al. Strength trainings reverse ovariectomy-induced bone loss and improve metabolic parameters in female Westar rats. **Life Sciences**, Universidade Federal de Goiania, Goiás, Brasil; p. 213: 134-141, 2018.

GUERINO, Marcelo R.; et al. Influence of ultrasound and physical activity on bone healing. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Unesp, Rio Claro, São Paulo, Brasil; v. 34, n. 9, p. 1408-1413, 2008.

HASSELBALCH, Alan L.; et al. Associations between dietary intake and body fat independent of genetic and familial environmental background. **International Journal of Obesity**, Copenhagen, Denmark; v. 34, n. 5, p. 892-898, 2010.

IWAMOTO, Jin; YEH, Jang K.; ALOIA, Jahfe F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. **Bone**, New York, USA; v. 24, n. 3, p. 163-169, 1999.

IWAMOTO, Jun; TAKEDA, Tsuyoshi; SATO, Yoshihiro. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. **Experimental animals**, New York, USA; v. 54, n. 1, p. 1-6, 2005.

JAN, Lin. Breslow. Mouse models of atherosclerosis. **Science**, New York, USA; v. 272, n. 5262, p. 685-688, 1996.

JEE, Wang S. S. Anabolic agents and osteoporosis: Quo vadis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA; v. 1, n. 2, p. 107-11, 2000.

JOHNSON, Jason Lee; JACKSON, Christopher Langdale. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. **Atherosclerosis**, Bristol, UK; v. 154, n. 2, p. 399-406, 2001.

KRAUS, William E.; et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **New England Journal of Medicine**, Duke University, USA; v. 347, n. 19, p. 1483-1492, 2002.

KRIEGER, M H. et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric oxide**, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil; v. 14, n. 1, p. 12-20, 2006.

KRUZIC, Jaïque J.; RITCHIE, Ranuam O. Fatigue of mineralized tissues: cortical bone and dentin. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, Oregon State University, Oregon, USA; v. 1, n. 1, p. 3-17, 2008.

MANFREDINI, Fara; et al. Influence of lifestyle measures on hypertriglyceridaemia. **Current drug targets**, university of Ferrara, Italy; v. 10, n. 4, p. 344-355, 2009.

MARTE, Ana Paula; SANTOS, Raul Dias. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, Universidade São Paulo, São Paulo, Brasil; v. 14, n. 4, p. 252-7, 2007.

MCARDLE, William D.; KATCH, Frank I.; KATCH, Victor L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 6a edição. **Traduzido por Giuseppe Taranto--Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2008.

MCKINLEY, E. Maria. **Basic Biomechanics of the Skeletal System**. Philadelphia, USA; 1981.

MITCHELL, Sarah L.; GRANT, Stan; AITCHISON, Tom. Physiological effects of exercise on post-menopausal osteoporotic women. **Physiotherapy**, Glasgow, Scotland; v. 84, n. 4, p. 157-163, 1998.

MORRIS, Jeremiah N.; CRAWFORD, Margaret D. Coronary heart disease and physical activity of work. **British medical journal**, London, England; v. 2, n. 5111, p. 1485, 1958.

MYERS, Jonathan. Exercise and cardiovascular health. **Circulation**, USA; v. 107, n. 1, p. e2-e5, 2003.

NORDSLETTEN, Lara; et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcified tissue international**, university of Oslo, Noruega; v. 55, n. 6, p. 436-442, 1994.

NUZZO, Vincenzo; et al. Analysis of skeletal status by quantitative ultrasonometry in a cohort of postmenopausal women with high blood cholesterol without documented osteoporosis. **Ultrasound in medicine & biology**, Naples, Italy; v. 35, n. 5, p. 717-722, 2009.

OLFERT, Ernest D.; et al. (Ed.). **Guide to the care and use of experimental animals**. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, University of Saskatchewan, Canadá; 1993.

PAFFENBARGER, Rana S.; I-MIN, Lara; KAMPERT, Johhna B. Changes in lifestyle affecting coronary heart disease mortality. **N Engl J Med**, Cambridge, Massachusetts, USA; v. 328, p. 538-545, 1993.

PRADO, Eduardo Seixas; DANTAS, Estélio Henrique Martin. Efeitos dos exercícios físicos aeróbio e de força nas lipoproteínas HDL, LDL e lipoproteína (a). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Brasil; v. 79, p. 429-433, 2002.

PREMAOR, Melissa Orlandin; FURLANETTO, Tania Weber. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; v. 50, p. 25-37, 2006.

RENNO, Ana Claudia Muniz; 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**, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil; v. 15, p. 276-279, 2007.

RUBENFIRE, Melvyn; BROOK, Robert D.; ROSENSON, Robert S. Treating mixed hyperlipidemia and the atherogenic lipid phenotype for prevention of cardiovascular events. **The American journal of medicine**, Michigan, USA; v. 123, n. 10, p. 892-898, 2010.

SANBE, Toshihiro; et al. Oral administration of vitamin C prevents alveolar bone resorption induced by high dietary cholesterol in rats. **Journal of periodontology**, Okayama, Japan; v. 78, n. 11, p. 2165-2170, 2007.

SCHWARZ, Pamela D. Biomecânica das fraturas do esqueleto apendicular: causas e avaliação. **BOJRAB, MJ Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**, USA; v. 2, p. 1161-1181, 1996.

SINAKI, Mehrsheed et al. The role of exercise in the treatment of osteoporosis. **Current osteoporosis reports**, Mayo Clinic, MN, USA; v. 8, n. 3, p. 138-144, 2010.

SMITHIES, Oliver; MAEDA, Nobuyo. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, university of North Carolina, Chapel hill, USA; v. 92, n. 12, p. 5266-5272, 1995.

SOARES, Evelise Aline; et al. Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice. **Journal of bone and mineral metabolism**, Unifenas, Alfenas e Unicamp, Campinas; Brasil; v. 30, n. 4, p. 419-425, 2012.

SOARES, Evelise Aline; et al. Metabolic and structural bone disturbances induced by hyperlipidic diet in mice treated with simvastatin. **International Journal of Experimental Pathology**, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil; v. 96, n. 4, p. 261-268, 2015.

SOARES, Evelise V.; et al. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. **Journal of bone and mineral metabolism**, Unifenas, Alfenas, Brasil; v. 28, n. 1, p. 101-107, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq bras cardiol**, Brasil; v. 101, n. 4 Supl 1, p. 1-20, 2013.

TERRA, Gersa Dias Siqueira Vilela; et al. Efeito do treinamento aquático no perfil lipídico e na hipertrofia ventricular esquerda de camundongos hiperlipidêmicos. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, Unifenas, Alfenas, Brasil; v. 18, n. 4, p. 453-453, 2013.

TOMOFUJI, Takaaki; et al. Effects of a high-cholesterol diet on cell behavior in rat periodontitis. **Journal of dental research**, Okayama, Japan; v. 84, n. 8, p. 752-756, 2005.

YAMASHITA, Shinji; et al. Oral administration of ethanolamine glycerophospholipid containing a high level of plasmalogen improves memory impairment in amyloid β -infused rats. **Lipids**, Tohoku University, Sendai, Japan; v. 52, n. 7, p. 575-585, 2017.

ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética



PARECER N° 189/2010A

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da UNIFENAS, Setor de Experimentação Animal, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado EFEITOS DA NATAÇÃO E DO SEDENTARISMO SOB AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DE FÊMURES, OSTEOGÊNESE E REMODELAÇÃO ÓSSEA EM CAMUNDONGOS (LDLR-/-), de autoria da Profa. Evelise Aline Soares, revolve enquadrá-lo na categoria de aprovado para fins de início da pesquisa.

Alfenas, 20 de novembro de 2010.