



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

VICTORIA PADULA DE QUADROS

EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE HORMÔNIOS SEXUAIS E MÁ NUTRIÇÃO (DIETA
CAFETERIA OU RESTRIÇÃO PROTEICA) SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO DE
RATAS WISTAR ADULTAS

CAMPINAS
2015

VICTORIA PADULA DE QUADROS

EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE HORMÔNIOS SEXUAIS E MÁ NUTRIÇÃO (DIETA CAFETERIA OU RESTRIÇÃO PROTEICA) SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO DE RATAS WISTAR ADULTAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador/Supervisor: MARIA CRISTINA CINTRA GOMES MARCONDES

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
VICTORIA PADULA DE QUADROS E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CINTRA GOMES MARCONDES.

CAMPINAS
2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131702/2014-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

P136e Padula de Quadros, Victoria, 1990-
Efeitos da deficiência de hormônios sexuais e má nutrição (dieta cafeteria ou restrição proteica) sobre o metabolismo ósseo de ratas Wistar adultas / Victoria Padula de Quadros. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Osteoporose. 2. Metabolismo. 3. Alimentação. 4. Terapia de reposição hormonal. 5. Menopausa. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of sexual hormone deficiency and malnourishment (cafeteria diet or protein restriction) on bone metabolism in adult female Wistar rats

Palavras-chave em inglês:

Osteoporosis

Metabolism

Feed

Hormonal reposition therapy

Menopause

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

Felix Guillermo Reyes Reyes

Miguel Arcanjo Areas

Data de defesa: 25-11-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 25 de Novembro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Marisa Padula, por ser meu maior e melhor exemplo de mãe, mulher e pesquisadora.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram para a construção e o desenvolvimento deste trabalho.

Em primeira lugar, agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes, por ter me orientado e acompanhado durante todo este período, sempre com muita disposição, disponibilidade, paciência e carinho. Foi um prazer ser sua aluna, trabalhar no seu laboratório e ter tido a oportunidade de aprender tanto com a sua experiência e conhecimento.

Agradeço também ao Hospital das Clínicas da Unicamp e à Ma. Natália Tobar por disponibilizar o uso do equipamento DEXA e por toda a assistência, disponibilidade e colaboração para a realização das análises de composição corpórea dos animais.

Agradeço à analista em estatística Srta Daisy Moitinho por toda a assistência e colaboração para a realização das análises estatísticas deste trabalho. Agradeço também à pesquisadora Sra. Claire Sarantopóulos e ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pelo empréstimo do equipamento MOCON Pack Check, para análise da taxa metabólica, e também à Prof^a Dr^a Miriam Hubinger por emprestar o mesmo equipamento quando necessário.

Agradeço à Ma. Lia Saito, amiga querida, pela colaboração para a realização da análise de resistência mecânica óssea.

Agradeço a todos os alunos do Laboratório de Nutrição e Câncer, por todo o apoio, a ajuda e amizade, e também à toda equipe de técnicos e funcionários do Departamento. Foi um prazer aprender com vocês!

Agradeço especialmente à minha mãe, Marisa Padula, por toda a assistência como mãe e como pesquisadora, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua contribuição foi fundamental, e foi um prazer trabalhar ao seu lado! Obrigada por todo o seu apoio e amor!

Agradeço, por fim, o apoio fundamental do meu pai, Waldir José de Quadros, como pai e pesquisador; aos meus irmãos, Daniel e Mariana; ao meu companheiro, Nicolò Giangrande; e aos meus queridos amigos por todo o suporte oferecido durante este período. Sou eternamente grata pelo carinho e pela assistência de todos vocês!

RESUMO

A osteoporose é caracterizada pela diminuição da massa óssea normal, aumentando a fragilidade óssea e com isso o risco de fraturas, afetando principalmente mulheres adultas após a menopausa, devido à deficiência dos hormônios sexuais. A terapia de reposição hormonal trata e previne os sintomas da menopausa, incluindo a osteoporose. A alimentação também possui papel importante no metabolismo ósseo, sendo que a reduzida ingestão de cálcio e também de proteínas têm papel significativo na perda de massa óssea. Além disso, atualmente o elevado consumo de alimentos ricos em calorias, bem como na ingestão de bebidas gaseificadas, alimentos industrializados e *fast-food*; traz como consequência elevado índice de desenvolvimento de patologias relacionadas à doenças metabólicas como obesidade e diabetes tipo 2. Considerando que o término do ciclo reprodutivo nas mulheres está associado a estes transtornos, é de fundamental importância o estudo da reposição hormonal influenciada e modulada pela dieta e quais os efeitos que poderiam ser positivos para conter a perda da massa óssea. O presente estudo avaliou esses efeitos através da administração de doses fisiológicas de 17β -estradiol em ratas Wistar ovariectomizadas na presença de dietas de cafeteria e hipoproteica, comparando-as com fêmeas ovariectomizadas ou não, que receberam dieta normoproteica. Nossos resultados mostraram que a deficiência hormonal na fase de desenvolvimento do organismo (grupo de ratas ovariectomizadas) prejudicou consideravelmente o crescimento, aumentando o ganho de peso, a porcentagem de gordura corporal, diminuindo a massa muscular e a densidade e resistência ósseas. A terapia de reposição hormonal foi eficiente na recuperação desses parâmetros. Com relação à restrição proteica, a deficiência proteica imposta foi suficiente para gerar alterações no crescimento e na composição muscular, diminuindo esses parâmetros. Além disso, o grupo ovariectomizado hipoproteico foi mais afetado, porém a reposição hormonal associada com esta dieta mostrou efeitos mais moderados em relação aos controles. Com relação à dieta cafeteria, a alimentação rica em energia e gorduras também foi suficiente para gerar alterações no crescimento, aumentando o ganho de peso e porcentagem de gordura corporal, diminuindo a massa muscular e a densidade e resistência ósseas. Neste caso, a dieta também impôs prejuízos aos animais ovariectomizados e reposição hormonal foi muito menos eficiente. Desta forma, concluímos que, no caso da mulher menopausada com síndrome metabólica ou deficiência nutricional de proteínas, a terapia de reposição hormonal pode ser efetiva para melhorar o seu quadro, mas deve ser acompanhada também de mudança no padrão alimentar.

ABSTRACT

Osteoporosis is a pathology characterized by loss of bone mass leading to bone fragility, which increases the risk of fractures. It affects mainly post-menopause women due to the decrease in sexual hormones; the hormone reposition therapy (TRH) treats and prevents the menopause symptoms, including osteoporosis. The diet also has a central role in bone metabolism, as a low ingestion of calcium and proteins can significantly diminish the bone mass. Besides, nowadays there is a high consumption of high caloric foods, carbonated drinks, industrialized food and fast-food, leading to obesity, diabetes type 2 and other metabolic alterations. Considering these points are highly associated with menopause conditions, it is necessary to study whether the diet can modulate the sexual hormone deficiency and also the reposition therapy and which effects might have a positive influence preventing the bone mass loss. This study analyses the control, ovariectomized and 17β -estradiol-treated ovariectomized adult female Wistar rats fed with control, low-protein or cafeteria diet, evaluating the relationship among hormone deficiency, hormonal reposition, and diet on bone metabolism. Our results demonstrate that the hormonal deficiency during the development (ovariectomized group) affected the growth process, increasing the weight gain, the body fat percentage and diminishing the muscular mass, the bone density and the bone strenght. The HRT was efficient, restoring the observed parameters to the control levels. Regarding the protein restriction, the protein deficiency of this study was sufficient to cause alterations in growth and muscular mass, diminishing those parameters. Besides, the low-protein ovariectomized group was more affected compared to the controls, and the HRT associated with this diet had a reduced effect compared to the control groups. Regarding the cafeteria diet, the high caloric and saturated fat-rich diet was sufficient to cause alterations in growth, increasing the weight gain, the body fat percentage and diminishing the muscular mass, the body density and the bone strenght. Also in this situation the diet negatively affected the ovariectomized and HRT animals. Thus, we concluded that the HRT can be effective to improve the condition of a post-menopause women with metabolic syndrome or a protein deficiency, but should be associated with a healthy nutritional pattern.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Efeitos da deficiência de estrógeno na perda de massa óssea (adaptada de Riggs et al, 1998).....	19
Figura 2: Organograma do protocolo experimental.....	29
Figura 3: Ingestão alimentar (g/dia/100g de peso corpóreo) dos diferentes grupos submetidos às dietas controle, hipoproteica, e cafeteria.....	35
Figura 4: Morfologia do útero dos diferentes grupos experimentais.....	36
Figura 5: Evolução do peso absoluto (A ; g) e relativo (B ; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento.....	38
Figura 6: Evolução da taxa metabólica (A ; %) e taxa metabólica final (B ; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento.....	40
Figura 7. Parâmetros morfométricos: Ganho de peso relativo final (A ; %), peso relativo do fêmur direito (B ; %), músculo gastrocnêmio direito (C ; %) e fígado (D ; %) em relação ao peso corporal dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento.....	42
Figura 8. Composição corpórea: massa óssea (A ; g), densidade óssea (B ; g/cm ²) e porcentagem de gordura corporal (C ; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento.....	44
Figura 9. Perfil dos hormônios LH (A ; pg/mL), FSH (B ; pg/mL), Progesterona (C ; pg/mL), Estradiol (D ; ng/mL), PRL (E ; ng/mL), Leptina (F ; pg/mL), GH (G ; pg/mL) e TSH (H ; pg/mL) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento.....	51
Figura 10. Concentrações de insulina (A ; pg/mL) e de glicose (B ; mg/mL) séricas dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento.....	52
Figura 11. Propriedades mecânicas do fêmur: diâmetro do osso (A ; mm), módulo de elasticidade do osso (B ; MPa), tensão de escoamento do osso (C ; MPa) e tensão máxima do osso (D ; MPa) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento.....	54
Figura 12. Evolução do peso absoluto (A ; g) e do peso relativo (B ; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....	56

Figura 13: Evolução da taxa metabólica (A ; %) e taxa metabólica final (B ; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....	57
Figura 14. Parâmetros morfométricos: Ganho de peso relativo final (A ; %), peso relativo do fêmur direito (B ; %), músculo gastrocnêmio direito (C ; %) e fígado (D ; %) em relação ao peso corporal dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....	59
Figura 15. Composição corpórea: massa óssea (A ; g), densidade óssea (B ; g/cm ²) e porcentagem de gordura corporal (C ; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....	61
Figura 16. Perfil dos hormônios LH (A ; pg/mL), FSH (B ; pg/mL), Progesterona (C ; pg/mL), Estradiol (D ; ng/mL), PRL (E ; ng/mL), Leptina (F ; pg/mL), GH (G ; pg/mL) e TSH (H ; pg/mL) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....	66
Figura 17. Concentrações de insulina (A ; pg/mL) e de glicose (B ; mg/mL) séricas dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....	67
Figura 18. Propriedades mecânicas do fêmur: diâmetro do osso (A ; mm), módulo de elasticidade do osso (B ; MPa), tensão de escoamento do osso (C ; MPa) e tensão máxima do osso (D ; MPa) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....	69
Figura 19. Resumo das alterações que ocorreram em situação de ovariectomia e reposição hormonal em modelo experimental de ratas em relação às fêmeas controle submetidas à dieta normoproteica.....	75
Figura 20. Resumo das alterações que ocorreram na situação de restrição de proteínas em modelo experimental de ratas com e sem ovariectomia e reposição hormonal.....	80
Figura 21. Resumo das alterações que ocorreram na situação de dieta cafeteria em modelo experimental de ratas com e sem ovariectomia e reposição hormonal.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas controle, hipoproteica e cafeteria (g/Kg)**28**

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos (proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, cálcio e glicose séricos) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento**46**

Tabela 3: Parâmetros bioquímicos (proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, cálcio e glicose séricos) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento.....**63**

LISTA DE ABREVIATURAS

- **TRH** - Terapia de Reposição Hormonal
- **C** - Grupo Controle
- **H** - Grupo Hipoproteica
- **CAF** - Grupo Cafeteria
- **O** - Grupo Ovariectomizadas Controle; Ovariectomizadas
- **O-H** - Grupo Ovariectomizadas Hipoproteica
- **O-CAF** - Grupo Ovariectomizadas Cafeteria; Cafeteria Ovariectomizadas
- **R** - Grupo Ovariectomizadas com Reposição Hormonal; Reposição
- **R-H** - Grupo Ovariectomizadas Hipoproteica com Reposição
- **R-CAF** - Grupo Ovariectomizadas Cafeteria com Reposição;
- **O₂** - Oxigênio
- **CO₂** - Gás carbônico
- **VCO_{2f}** - Volume de gás carbônico final
- **VCO_{2i}** - Volume de gás carbônico inicial
- **VO_{2i}** - Volume de oxigênio inicial
- **VO_{2f}** - Volume de oxigênio final
- **n** - Número amostral
- **GnRH** - Hormônio Liberador de Gonadotropinas
- **FSH** - Hormônio Folículo Estimulante
- **LH** - Hormônio Luteotrófico
- **GH** - Hormônio de Crescimento
- **TSH** - Hormônio Tireoestimulante
- **PRL** - Prolactina
- **IGF-1** - *Insulin-like growth factor-1*
- **HDL** - *High-density lipoprotein*
- **LDL** - *Low-density lipoprotein*
- **E₂** - Estrógeno
- **SERM** - Modulador seletivo de estrógeno
- **CEE** - Estrógeno equino conjugado

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	14
1.1 Menopausa, Osteoporose e Terapia de Reposição Hormonal...17	
1.2 Restrição Proteica.....	22
1.3 Dieta Cafeteria.....	24
2. Objetivos Gerais.....	26
2.1 Objetivos Específicos.....	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Dietas.....	27
3.3 Protocolo Experimental.....	28
3.4 Ovariectomia.....	30
3.5 Terapia de Reposição Hormonal.....	30
3.6 Taxa Metabólica.....	31
3.7 Ingestão Alimentar.....	31
3.8 Composição Corpórea.....	32
3.9 Perfil Bioquímico.....	32
3.10 Resistência Mecânica Óssea.....	33
3.11 Análise Estatística.....	33
4. Resultados.....	35
4.1 Restrição Proteica.....	37
4.2 Dieta Cafeteria.....	55
5. Discussão.....	70
6. Conclusões.....	86
7. Referências Bibliográficas.....	88
8. Anexos.....	100

1. Introdução Geral

A alimentação humana gradualmente passa pelo processo de mudança chamado de “Transição de Nutrição” (*Nutrition transition*). Este processo é composto por diversas fases, nas quais são observados diferentes padrões alimentares, desde os nossos ancestrais caçadores-coletores, até os padrões presentes na nossa sociedade atual (Popkin 2006). Hoje em dia, 3 padrões alimentares são predominantes: o padrão “recuo da fome” (*receding famine*), caracterizado por alimentação pobre em gorduras e com pouca variedade de alimentos, rica em fibras, associada a atividades de trabalho e lazer com grande esforço físico; o padrão “doença degenerativa” (*degenerative disease*), caracterizado por aumento no consumo de alimentos processados, ricos em gordura e açúcar, associado a atividades de menor gasto energético, elevando o índice de obesidade, doenças metabólicas e distúrbios de densidade óssea; e o padrão “mudança comportamental” (*behavioral change*), caracterizado por mudanças comportamentais que começam a reverter os aspectos negativos dos padrões anteriores, com aumento no consumo de frutas, vegetais, grãos integrais e gorduras de melhor qualidade e diminuição do consumo de carboidratos refinados, levando a redução no peso corporal, melhora da saúde óssea e aumento da expectativa de vida (Popkin 2006).

Esta mudança tem-se acentuado nas últimas décadas devido a diversos fatores, sendo os principais: o aumento da urbanização; o aumento do processamento de alimentos de baixa qualidade e de calorias vazias, estimulados pelo baixo preço dos óleos vegetais comestíveis; aumento da tecnologia no trabalho e nas atividades de lazer, diminuindo o gasto energético dos indivíduos; mudança no sistema de distribuição de alimentos com aumento de grandes supermercados em detrimento de mercados e feiras locais, que aumentam o acesso da população aos alimentos processados ricos em gordura, açúcar e sal; mudança nas políticas globais em agricultura, que favorecem a produção de óleos comestíveis, açúcar e alimentos de origem animal (Popkin 2006; Popkin et al. 2012).

A transição do padrão “recuo da fome” para o padrão “doença degenerativa” tem sido rápida não apenas em países de alta renda, como Estados Unidos, Reino Unido e Austrália, mas também em países de média e baixa renda, como Brasil, China, Chile e México (Popkin 2006; Popkin et al. 2012; Popkin 2011). Principalmente nos países de média e baixa renda, onde as desigualdades sociais

são muito altas apesar do crescimento econômico, existe o chamado “fardo duplo” (*dual burden*) de subnutrição e obesidade, no qual se observam deficiências de micronutrientes, nanismo e pessoas abaixo do peso, concomitante com aumento das taxas de obesidade (Popkin et al. 2012). Nestas condições, estratégias tradicionalmente voltadas para combater a fome e a insegurança alimentar obtêm sucesso em minimizar a subnutrição, mas também acabam por aumentar a obesidade (Popkin et al. 2012). O desafio em lidar com este problema é o preço relativamente baixo de alimentos ricos em energia, mas pobres em micronutrientes em relação ao preço de frutas, verduras e cereais (Popkin et al. 2012).

No caso do Brasil, um país em desenvolvimento entre as maiores economias do mundo, ainda temos uma parcela significativa da população em condições de subnutrição e parcela ainda maior e crescente que sofre de obesidade (Conde & Monteiro 2014). Este “fardo duplo” é observado principalmente nos setores mais pobres da sociedade, e afeta tanto crianças e adolescentes quanto adultos (Conde & Monteiro 2014). A prevalência de pessoas abaixo do peso no Brasil é de 2,7% da população total, ao passo que a de obesidade é de 14,8%. Em relação às mulheres mais pobres, a parcela abaixo do peso é de 5,7% e de obesidade de 15,1%, enquanto para os homens mais pobres, 2,7% abaixo do peso e 5,5% que apresentam obesidade (Conde & Monteiro 2014). Estima-se que, em 2050, aproximadamente 70% da população brasileira estará acima do peso, se as tendências atuais se mantiverem (Conde & Monteiro 2014).

Além da obesidade e síndrome metabólica associada, má nutrição também compreende a falta ou restrição de proteína na dieta. A desnutrição proteico-calórica, além de induzir prejuízos bastante severos ao organismo em crescimento (Prentice et al. 2006; Rizzoli et al. 2007; Rizzoli 2008), também afeta o organismo adulto e pode, principalmente, trazer consequências drásticas aos idosos (Kawao & Kaji 2014; Heaney & Layman 2008; Rizzoli et al. 2001).

A expectativa de vida da população idosa brasileira tem aumentado nas últimas décadas, mudando a epidemiologia de algumas doenças (Baccaro et al. 2015). Desta forma, torna-se vital compreender não apenas como a má nutrição afeta crianças e adultos, mas também como pode estar influenciando o metabolismo senil e suas particularidades.

Um dos aspectos mais marcantes da senilidade para as mulheres é a menopausa, na qual a cessação da secreção dos hormônios esteroides sexuais

femininos acarreta mudanças físicas, fisiológicas e psicológicas importantes (Mcaverry & Santoro 2013). A falta de estrogênio aumenta o risco de desenvolver osteoporose, devido ao aumento da reabsorção óssea e da perda de massa óssea (Mcaverry & Santoro 2013; Warren et al. 2015; Cauley 2014; Garner et al. 1996; Riggs et al. 1998).

Atualmente, o risco de fraturas em mulheres de 50 anos é de 50% (Maeda & Lazaretti-Castro 2014). No Brasil, a prevalência de osteoporose pós-menopausa é muito variada devido às diferenças no número de amostras, critérios de elegibilidade e de metodologias, variando de 15% a 33% (Maeda & Lazaretti-Castro 2014; Baccaro et al. 2015). O custo de tratamento para mulheres pós-menopausadas com osteoporose no Brasil é equivalente a 775 dólares por paciente por ano (Maeda & Lazaretti-Castro 2014; Pinheiro & Eis 2010), e custos diretos de hospitalização por fraturas de quadril no Brasil são calculados em 3,9 mil dólares por 11 dias de internação para hospitais públicos e 12 mil dólares por 9 dias de internação para hospitais particulares (Maeda & Lazaretti-Castro 2014). Estes custos representam grande ônus para os sistemas de saúde, que tende a aumentar ainda mais, levando em consideração o envelhecimento da população (Maeda & Lazaretti-Castro 2014). Além disso, a osteoporose leva ao aumento da mortalidade e queda na qualidade de vida (Maeda & Lazaretti-Castro 2014; Pinheiro & Eis 2010). Considerando este quadro, é fundamental tratar e prevenir a osteoporose pós-menopausa e estudar formas de melhorar esta condição.

A terapia de reposição hormonal (TRH) com estrogênio é usada para minimizar os sintomas da menopausa, e para tratar e prevenir a osteoporose pós-menopausa (Mcaverry & Santoro 2013; Pardini 2014; Warren et al. 2015). A TRH é o tratamento mais recomendado para mulheres pós-menopausadas, que apresentam alto risco de fratura e tenham menos de 60 anos (Pardini 2014). Diversas formulações de estrogênios estão disponíveis no mercado e são efetivas na prevenção de fraturas, sendo indicados para prevenir a osteoporose (Warren et al. 2015).

Assim, acreditamos que é de fundamental importância o estudo da reposição hormonal influenciada e modulada pela dieta e quais os efeitos que poderiam ser positivos para conter a perda da massa óssea.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da má nutrição, trabalhando com dietas ricas em carboidratos e gorduras ou pobres em

proteínas, sobre o estado de instabilidade hormonal que ocorre com o avançar da idade, neste caso a menopausa, e sobre as alterações ósseas que ocorrem neste quadro, na possibilidade de futuramente extrapolar para pesquisa translacional.

1.1 Menopausa, Osteoporose e Terapia de Reposição Hormonal

O envelhecimento é caracterizado por perda na manutenção da homeostase do organismo devido a alterações complexas dos eixos hormonais que regulam o metabolismo, o crescimento e a reprodução, levando a mudanças na função e composição corpórea, com aumento do risco de doenças e morte (Barzilai et al. 2012; Jones & Boelaert 2014). Com o envelhecimento, a secreção e o controle hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-glândulas diminuem, e além disso há diminuição da sensibilidade dos tecidos aos hormônios e perdas de função, como ocorre na menopausa (Jones & Boelaert 2014). Além disso, mudanças metabólicas como resistência à insulina, diminuição dos níveis de hormônio do crescimento (GH), do *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) e dos hormônios esteroides levam à diminuição da massa óssea e muscular, aumento do tecido adiposo, risco aumentado de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (Jones & Boelaert 2014; Barzilai et al. 2012).

A menopausa é definida como a cessação da menstruação por 12 meses em mulheres acima de 45 anos, com média de 51 anos, e é um evento natural caracterizado pela cessação da ovulação e das capacidades reprodutivas (Mcavary & Santoro 2013; Warren et al. 2015). Nesta condição, há perda permanente da função ovariana e folicular, o que faz com as células granulosas parem de produzir estradiol e as células da teca parem de produzir andrógenos, acabando com a produção de estradiol e progesterona pelo ovário (Mcavary & Santoro 2013). Os níveis diminuídos de inibina e de estradiol produzidas pelas células granulosas levam ao aumento da secreção adenohipofisária do hormônio folículo estimulante (FSH) (Warren et al. 2015). Além disso, pequenas quantidades de estrona, um dos três estrógenos, com baixa potência, continua a ser produzido a partir da androstenediona, produzida pela córtex da glândula adrenal e por células intersticiais ovarianas, podendo ser transformado em estradiol nos tecidos periféricos como

tecido adiposo (Warren et al. 2015; Szymczak et al. 1998; Hershcopf 1987; Longcope et al. 1986).

A menopausa está associada a diversas mudanças no metabolismo e doenças (Mcavery & Santoro 2013). Algumas são associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas, e outras são diretamente associadas à falta de estrogênio, como as ondas de calor e a osteoporose (Mcavery & Santoro 2013). As doenças cardiovasculares estão associadas ao aumento do colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein*, LDL) na senilidade, intensificadas pela menopausa (Mcavery & Santoro 2013).

A massa óssea, por sua vez, está diretamente relacionada à produção de estrogênio na menopausa. O tecido ósseo não é apenas estrutural, sendo um tecido dinâmico que passa por renovação contínua chamada de remodelação óssea (Sharan & Yadav 2014), de forma que o osso antigo é reabsorvido por osteoclastos e o tecido ósseo novo é formado por osteoblastos (Sharan & Yadav 2014; Zhang et al. 2015; Ferron & Lacombe 2014). Esta remodelação demanda alto gasto energético e é controlada por diversos hormônios hipotalâmicos que regulam a massa óssea de forma direta ou indireta (Sharan & Yadav 2014). O hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que atua na hipófise, levando à liberação do hormônio luteinizante (LH) e do FSH; estes, por sua vez, atuam nos ovários levando à produção de estrogênios, progesteronas e inibinas (Sharan & Yadav 2014). O estrogênio é um potente regulador da massa óssea que atua diretamente no tecido ósseo aumentando a proliferação de osteoblastos e diminuindo a ação de osteoclastos (Sharan & Yadav 2014).

Desta forma, a falta de estrogênio na menopausa aumenta o risco de desenvolver osteoporose, devido ao aumento da reabsorção óssea e da atividade osteoclástica e diminuição da formação óssea, levando a acelerada perda de massa óssea e aumento do risco de fraturas (Mcavery & Santoro 2013; Warren et al. 2015; Cauley 2014; Garnero et al. 1996; Riggs et al. 1998; Sharan & Yadav 2014). A **Figura 1**, adaptada de Riggs et al (1998), resume os efeitos da deficiência de estrogênio na perda de massa óssea:

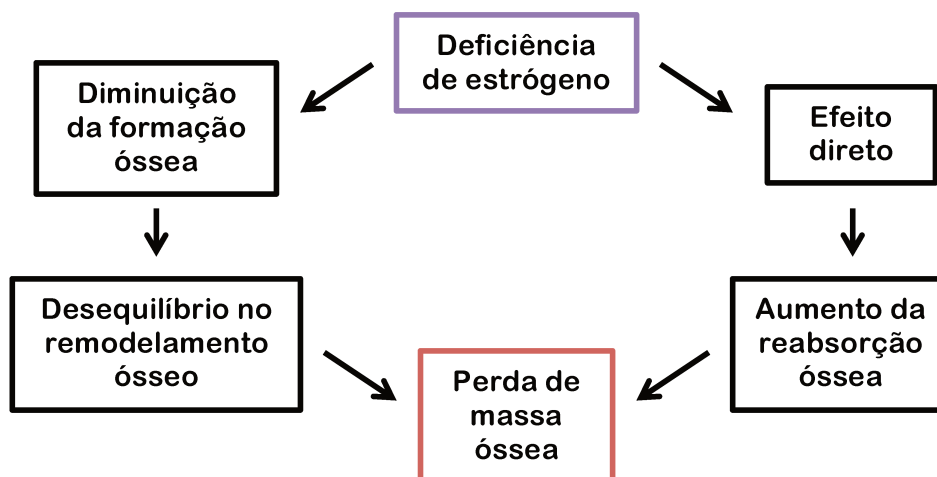


Figura 1. Efeitos da deficiência de estrógeno na perda de massa óssea (adaptada de Riggs et al, 1998).

A osteoporose é uma patologia caracterizada pela diminuição da massa óssea e por consequente aumento da fragilidade óssea, aumentando o risco de fraturas (Conference 2001). Ela pode ser diagnosticada por medição da densitometria óssea pelo equipamento *Dual Energy X Ray Absorptimetry* (DEXA), sendo um exame sensível e importante para determinação da densidade óssea (Mcaverty & Santoro 2013; Baccaro et al. 2015).

O tratamento não farmacológico para osteoporose inclui a realização de atividades físicas de impacto, mudanças na dieta e aumento da ingestão de cálcio com suplementação de vitamina D (Mcaverty & Santoro 2013; Baccaro et al. 2015; Maeda & Lazaretti-Castro 2014).

A terapia de reposição hormonal (TRH) com estrógeno é usada para minimizar os sintomas da menopausa, e para tratar e prevenir a osteoporose pós menopausa (Mcaverty & Santoro 2013; Pardini 2014; Warren et al. 2015). Em 2015, Warren et al publicou extensa revisão sobre o conhecimento atual da menopausa e da terapia de reposição hormonal e seus aspectos positivos e negativos (Warren et al. 2015). Além de melhorar sintomas vasomotores como os fogachos (*hot flushes*), ajudar com distúrbios de sono, melhorar o perfil lipoproteico - aumentando os níveis da lipoproteína de alta densidade (*high-density lipoprotein*, HDL) em 10 a 15% e diminuindo o LDL - e diminuir o risco de câncer de cólon em até 40%, a TRH é eficaz na prevenção da perda de massa óssea relacionada à menopausa, reduzindo a incidência de fraturas (Pardini 2014; Warren et al. 2015; Mcaverty & Santoro 2013). Apesar disto, diversos estudos apontaram para a relação positiva entre a administração de estradiol e o aumento do risco de cânceres de mama e endométrio (Mcaverty & Santoro 2013; Warren et al. 2015; Pardini 2014; Nelson 2004). A TRH

apenas com estrógeno aumenta o risco de câncer de endométrio, o que não é observado na TRH de estrógeno associado com progestinas, porém há dados contraditórios com relação ao aumento de risco de câncer de mama e ovário (Warren et al. 2015). O estudo controlado *Woman's Health Initiative*, publicado em 2002 e que foi realizado com mais de 16.000 mulheres pós-menopausadas saudáveis, demonstrou que a TRH de estrógeno combinada com progestina (derivado da progesterona) levou a maior risco de câncer de mama, apesar de outros estudos não demonstrarem correlação entre aumento do risco deste câncer com TRH comparado ao placebo (Nelson 2004), não demonstrando aumento significativo de risco de câncer de ovário (Warren et al. 2015). Considerando estes riscos, a recomendação hoje em dia é administrar a menor dose efetiva de estrógenos para alívio dos sintomas pelo menor tempo possível (Warren et al. 2015; Nelson 2004), e sempre associar estrógeno e progesterona para mulheres com útero intacto (Pardini 2014).

A TRH é o tratamento mais recomendado para mulheres pós-menopausadas que apresentam alto risco de fratura e tenham menos de 60 anos (Pardini 2014), e diversos estrógenos disponíveis no mercado são efetivos na contenção da perda de massa óssea (por diminuição da atividade osteoclástica) e na redução de incidência de fraturas (até 65%), sendo indicados para tratar a osteoporose (Warren et al. 2015; Pardini 2014). Os estrógenos mais usados são o 17β -estradiol e o estrógeno equino conjugado (CEE), que podem ser associados ou não à progestina no caso de mulheres com útero intacto (Mcaverry & Santoro 2013; Warren et al. 2015; Nelson 2004).

Além da TRH, outras medicações anti-reabsortivas são indicadas, como o raloxifeno e os bisfosfonatos. O raloxifeno é um modulador seletivo de estrógeno (SERM) que age como agonista nos sistemas cardiovascular e ósseo e como antagonista nas mamas e no endométrio, aumentando a massa óssea sem aumentar o risco de câncer nestes tecidos (Maeda & Lazaretti-Castro 2014). Ele reduz a incidência de fratura vertebral, mas não possui o mesmo efeito sobre as fraturas não vertebrais, como as de quadril (Pardini 2014). Além disso, o raloxifeno piora o sistema cardiovascular e não melhora os sintomas da menopausa como os fogachos, não sendo indicado para mulheres sintomáticas (Maeda & Lazaretti-Castro 2014). Os bisfosfonatos são ainda mais anti-reabsortivos e melhoram a massa óssea, diminuindo a reabsorção óssea causando a apoptose de osteoclastos

(Maeda & Lazaretti-Castro 2014; Murphy-Menezes 2015), mas possuem questões de segurança associados por serem compostos que se acumulam nos ossos, formando estoques e continuando a serem liberados por meses a anos após a interrupção do tratamento (Maeda & Lazaretti-Castro 2014; Reginster et al. 2014). Por causa disso, tratamentos a longo prazo com bisfosfanatos tem o potencial de atrapalhar o remodelamento e o reparo ósseo, levando à mineralização excessiva (Maeda & Lazaretti-Castro 2014).

Atualmente também utilizam-se fitoestrógenos como tratamento alternativo aos sintomas da menopausa e osteoporose. Estes são compostos polifenólicos não esteroides derivados de plantas, que possuem grande semelhança estrutural e de atividade biológica aos estrógenos, podendo ser isoflavonas, cumestanos, lignanas ou o resveratrol, e estão presentes em cereais, verduras, frutas e leguminosas, como na soja (Fu et al. 2014). Os fitoestrógenos se ligam aos receptores de estrógeno e previnem a perda de massa óssea, provavelmente por inibição reabsorção óssea, além de mostrarem efeitos positivos sobre sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e cânceres de ovário e endométrio (Fu et al. 2014). Apesar dos benefícios, a efetividade e a segurança destes compostos ainda não são claras (Fu et al. 2014).

A partir destes dados, verificamos que, embora a reposição hormonal seja utilizada para o tratamento da menopausa e osteoporose, trazendo benefícios ao metabolismo ósseo e a outros sintomas da menopausa, ainda traz altos riscos associados, e portanto deve sempre ser avaliada de acordo com a relação risco/benefício para cada mulher (Warren et al. 2015).

Levando em consideração seu uso elevado e os efeitos da TRH no metabolismo, consideramos importante avaliar os efeitos da TRH na presença da má nutrição e qual pode ser a influência da alimentação neste tratamento.

O modelo experimental mais utilizado para simular a osteoporose pós-menopáusia é a ovariectomia em ratas, pois possuem a maioria das características desta condição (Turner 2001; Lelovas et al. 2008; Liu et al. 2015; Wronski et al. 1989; Govindarajan et al. 2013). Turner (2001) revisou os principais modelos animais para osteoporose pós-menopáusia, com foco em ratas adultas ovariectomizadas, que se mostraram vantajosas por serem animais comumente utilizados em pesquisa e possuírem padrão muito semelhante ao humano em relação à densidade mineral óssea, deficiência de estrógeno e reposição hormonal (Turner 2001). Além disso,

este trabalho apresenta a força mecânica da cabeça de fêmur da rata como um indicador sensível à perda de massa óssea associada à ovariectomia (Turner 2001). Desta forma, a administração de estrógenos a ratas ovariectomizadas simula o mesmo padrão da reposição hormonal em mulheres pós-menopausadas (Turner 2001; Ibrahim et al. 2011).

1.2 Restrição Proteica

A ingestão adequada de proteínas é determinante para o crescimento ósseo de crianças e adolescentes, sendo importante tanto como fonte de energia, como de aminoácidos (Rizzoli 2008; Prentice et al. 2006; Rizzoli et al. 2007). Desta forma, a desnutrição proteico-calórica pode prejudicar e retardar o crescimento (Prentice et al. 2006), e a baixa ingestão de proteínas pode ser particularmente prejudicial para a aquisição e manutenção da massa óssea (Rizzoli et al. 2007).

Além disso, a ingestão adequada de proteínas é fundamental para a manutenção óssea no adulto, sendo fonte de matriz estrutural para o osso e compondo cerca de 50% do seu volume (Heaney & Layman 2008). Muitos trabalhos apresentam relação positiva entre ingestão de proteínas e massa óssea (Rizzoli 2008; Ammann et al. 2002; Rizzoli et al. 2001; Rizzoli et al. 2007; Kerstetter et al. 2011). A massa óssea do indivíduo normal atinge o seu máximo (*peak bone mass*) na terceira década de vida, e a partir deste ponto começa a diminuir gradualmente (Rizzoli et al. 2007). O “máximo de massa óssea” é determinante para os riscos de fraturas no envelhecimento e é influenciado por fatores genéticos, ambientais, endócrinos e, como também apontado, a constituição óssea é afetada por fatores nutricionais (Rizzoli et al. 2007). A genética contribui em aproximadamente 70% desta variação, mas aspectos nutricionais podem influenciar o potencial genético desde a vida uterina (Rizzoli et al. 2007).

Em idosos, há diminuição das massas muscular e óssea, que podem levar à sarcopenia e osteoporose, respectivamente (Genaro et al. 2014; Kawao & Kaji 2014). A manutenção da densidade óssea adequada durante este período é dependente da massa muscular funcional (Heaney & Layman 2008), sendo a massa muscular positivamente relacionada à massa óssea, e desse modo, as alterações

que ocorrem na senilidade indicam relação direta da sarcopenia relacionada à osteoporose (Kawao & Kaji 2014; Heaney & Layman 2008).

A proteína ingerida também é importante para a formação e manutenção da massa muscular, aumentando a absorção de aminoácidos que estimulam a síntese de proteínas musculares (Genaro et al. 2014). Além disso, pacientes idosos que ingerem baixa quantidade e qualidade de proteínas apresentam espoliação muscular causada pela diminuição da síntese proteica e maior perda de massa óssea (Kawao & Kaji 2014). Estes dados demonstram que a ingestão insuficiente de proteínas afeta a manutenção da muscular e consequentemente da massa óssea (Kawao & Kaji 2014), aumentando o risco de fraturas osteoporóticas em indivíduos idosos por perda de massa óssea e fraqueza muscular (Bonjour 2005; Rizzoli et al. 2001).

Ademais, a ingestão de proteínas aumenta a produção de IGF-1, principalmente pelo eixo GH/IGF-1, aumentando o anabolismo ósseo (Rizzoli 2008; Ammann et al. 2000; Rizzoli et al. 2001). A restrição proteica, por sua vez, diminui os níveis plasmáticos de IGF-1, induzindo resistência hepática ao GH, diminuindo a produção de IGF-1 (Rizzoli 2008; Rizzoli et al. 2001; Ammann et al. 2000). Sendo o IGF-1 importante para a reabsorção renal de fosfato e síntese de calcitriol, o metabólito ativo da vitamina D, ele também controla indiretamente a absorção intestinal de cálcio e a concentração extracelular de cálcio e fosfato, os dois elementos minerais do osso (Rizzoli 2008). Desta forma, a ingestão de dieta pobre em proteínas diminui a absorção de cálcio pelo intestino, diminuindo a massa óssea (Kerstetter et al. 2003). O cálcio é fundamental para a formação óssea porque compõe os cristais de hidroxiapatita do osso (Beto 2015), e a ingestão adequada de cálcio é necessária para manter a homeostase sérica do cálcio, impedindo que haja reabsorção óssea para o equilíbrio deste cátion no soro (Rizzoli 2008).

Para estudar os efeitos específicos da deficiência de proteínas na osteoporose em ratas Wistar adultas, o modelo experimental utilizado neste trabalho foi baseado na dieta hipoproteica isocalórica, que possui as mesmas quantidades de vitaminas, minerais e de energia da dieta normoproteica, mas com baixo teor de caseína, o que leva à diminuição na massa óssea (Rizzoli 2008; Bourrin et al. 2000; Ammann et al. 2002; Mekraldi et al. 2005).

Considerando que tanto a deficiência hormonal na menopausa quanto a dieta com restrição de proteínas levam à diminuição da massa óssea e muscular (Kawao & Kaji 2014), podendo levar à osteoporose e aumentando o risco de fraturas, é de

suma importância compreender como estes dois fatores combinados influenciam o organismo (Bourrin et al. 2000). Além disso, considerando o uso da TRH para prevenir os sintomas da menopausa e da osteoporose, é de suma importância avaliar as possíveis influências da dieta restrita em proteínas associada à TRH.

1.3 Dieta Cafeteria

Vários modelos de dietas manipuladas experimentalmente visam mimetizar os padrões da má nutrição humana para que possamos estudar e caracterizar propostas de melhora às consequências dessa má nutrição. A dieta de cafeteria é um modelo experimental proposto para estudar a obesidade e síndrome metabólica, que consiste em associar a ração comercial do animal com comidas humanas altamente palatáveis, calóricas e não saudáveis, simulando parte dos hábitos alimentares das pessoas dos países ocidentais (Sampey et al. 2011; Bazzano et al. 2015). Em ratos, a dieta cafeteria promove o aumento de peso, hiperfagia, quadro pré-diabético, resistência periférica à insulina, aumento dos níveis de leptina, colesterol total e triacilgliceróis séricos, além de inflamação dos tecidos adiposo e hepático, sendo um bom modelo utilizado para o estudo de obesidade e síndrome metabólica (Sampey et al. 2011; Andrade et al. 2013; Lanza et al. 2014; Goularte et al. 2012; Vanzela 2010; Brandt et al. 2010).

Além disto, a dieta de cafeteria também pode incluir a oferta de bebidas gaseificadas e calóricas como refrigerantes (*soft drinks*) (Vanzela 2010; Goularte et al. 2012; Sagae et al. 2012), correlacionada à diminuição da massa óssea pelo fato da excreção excessiva de cálcio em adolescentes e adultos (Heaney & Rafferty 2001; Sámano et al. 2013). Esta elevada excreção de cálcio seria devido ao aumento da ingestão de ácidos associada à ingestão de fósforo e cafeína, normalmente presentes em refrigerantes, que afetam negativamente o metabolismo ósseo (Ogur et al. 2007; Heaney & Rafferty 2001). Porém, outro fator importante encontrado nestes estudos é que o aumento do consumo de *soft drinks* é acompanhado de redução no consumo de leite, o que pode contribuir para o aumento de excreção do cálcio e diminuição da massa óssea (McGartland et al. 2003; Sámano et al. 2013; Heaney & Rafferty 2001). Estes dados demonstram que

ainda são necessários estudos que avaliem melhor a influência do consumo de bebidas gaseificadas sobre o metabolismo ósseo.

A dieta cafeteria difere do modelo de dieta hiperlipídica usada normalmente para induzir a obesidade, que simplesmente aumenta a proporção de calorias providas da gordura em relação aos carboidratos (Sampey et al. 2011). Desta forma, a dieta de cafeteria é utilizada para induzir a obesidade e simular melhor os hábitos humanos.

A síndrome metabólica é definida como o grupo de anormalidades metabólicas inter-relacionadas, caracterizadas por obesidade, hipertensão, altos níveis de triacilgliceróis, baixos níveis de HDL, resistência à insulina, disfunções no metabolismo da glicose e estado pró-inflamatório (Rodriguez-Cano et al. 2015; Faulds et al. 2012).

A obesidade, um dos principais fatores da síndrome metabólica, já foi vista como fator positivo para manutenção da massa óssea devido ao efeito positivo que a carga mecânica da massa corporal exerce sobre a formação óssea, diminuindo a apoptose e aumentando a proliferação de osteoblastos, mas atualmente esta premissa tem sido questionada (Liu et al. 2014; Cao 2011). A relação entre massa gorda e massa óssea ainda deve ser melhor estudada e compreendida, pois alguns fatores indicam que o acúmulo de gordura desfavorece a massa óssea, como: adipócitos e osteoblastos derivam do mesmo tipo celular mesenquimal, de forma que o aumento da diferenciação de adipócitos diminui a diferenciação de osteoblastos e vice-versa; a produção de citocinas inflamatórias pelos adipócitos aumentam a atividade de osteoclastos e a reabsorção óssea; a ingestão de gorduras pode afetar a absorção intestinal de cálcio, afetando a formação óssea (Cao 2011). Além disso, a leptina, que é produzida pelos adipócitos, apresenta efeitos positivos ou negativos sobre a manutenção da massa óssea dependendo da sua quantidade: tanto a falta quanto a superprodução de leptina mostraram-se negativas, ao passo que a secreção normal é necessária para a manutenção do tecido ósseo (Cao 2011; Upadhyay et al. 2015). Todos estes dados indicam que há relação bastante estreita entre os tecidos adiposo e ósseo e que precisa ser melhor estudada (Liu et al. 2014; Cao 2011).

Na menopausa, além dos efeitos negativos sobre a massa óssea, a deficiência de estrógenos piora a disfunção metabólica, aumentando a massa corporal e o acúmulo de tecido adiposo visceral (Rodriguez-Cano et al. 2015;

Ventura et al. 2014). Este aumento na adiposidade é acompanhado de alterações nos níveis de colesterol total, LDL, HDL e insulina (Rodriguez-Cano et al. 2015; Mcavery & Santoro 2013). Além disso, a deficiência de estrógenos pode levar à disfunção das células beta pancreáticas, resistência à insulina, excesso de gordura no fígado e aterosclerose, aumentando assim o risco de obesidade, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Mauvais-Jarvis et al. 2013; Rodriguez-Cano et al. 2015).

Em mulheres com TRH, a reposição de estrógeno contribui para melhorar este quadro (Faulds et al. 2012; Mauvais-Jarvis et al. 2013; Mcavery & Santoro 2013). Considerando estes efeitos, a TRH vem sendo pensada não apenas como um tratamento dos sintomas clássicos da menopausa, mas também visa prevenir e minimizar a síndrome metabólica associada a esta condição (Mauvais-Jarvis et al. 2013; Faulds et al. 2012).

Com base nos efeitos sobre o organismo que a má nutrição baseada em alimentos ricos em energia e gorduras possui, levando à obesidade e síndrome metabólica, consideramos importante estudar os efeitos desta alimentação sobre o metabolismo ósseo de mulheres menopausadas, submetidas ou não à terapia de reposição hormonal. (Kerstetter et al. 2011)

2. Objetivos Gerais:

Considerando que a menopausa, em função da deficiência hormonal, causa consequências ao metabolismo corpóreo como um todo e mais especificamente ao metabolismo ósseo, e que a má nutrição contribui em muito para agravar esses processos, o presente estudo visou avaliar os efeitos da deficiência dos hormônios sexuais femininos sobre o metabolismo corporal e ósseo em ratas Wistar adultas e qual a importância da alimentação e suplementação hormonal na modulação e manutenção destes parâmetros.

2.1. Objetivos específicos:

Avaliar o efeito da ovariectomia e da dieta sobre o metabolismo ósseo e quais as possíveis modulações quando associado à reposição hormonal:

- 1) Avaliar o crescimento, a composição corpórea, o metabolismo corpóreo e o metabolismo ósseo em ratas Wistar ovariectomizadas comparadas às controles;
- 2) Avaliar os efeitos da dieta hipoproteica sobre o crescimento, a composição corpórea, o metabolismo corpóreo e o metabolismo ósseo em ratas Wistar ovariectomizadas ou não, comparando-as com a condição da dieta normoproteica;
- 3) Verificar os efeitos da dieta de cafeteria sobre o crescimento, a composição corpórea, o metabolismo corpóreo e o metabolismo ósseo em ratas Wistar ovariectomizadas ou não, comparando-as a condição normoproteica;
- 4) Avaliar os efeitos da reposição hormonal com estrógeno sobre o crescimento, a composição corpórea, o metabolismo corpóreo e o metabolismo ósseo em ratas Wistar ovariectomizadas, submetidas ou não às dietas hipoproteica ou cafeteria.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratas Wistar de 28 dias, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB-UNICAMP). Todos os animais foram mantidos no biotério climatizado do Laboratório de Nutrição e Câncer do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da UNICAMP e alojados em gaiolas coletivas (quatro animais por gaiola), com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclos de claro/escuro de 12 horas, humidade de 50-60% e com dietas e água *ad libitum*.

3.2. Dietas

As dietas semipurificadas foram produzidas no laboratório de acordo com AIN-93 (Reeves et al. 1993), sendo isocalóricas e normolipídicas. A dieta controle é normoproteica, contendo 18% de proteína, e a dieta hipoproteica possui 6,6% de proteína.

A dieta cafeteria também foi produzida no laboratório, segundo a **Tabela 1**, baseada na dieta cafeteria dos estudos de Vanzela (Vanzela 2010). Esta dieta contém aproximadamente 13% de proteína, valor de manutenção de acordo com

AIN-93 (Reeves et al. 1993). Além da dieta e da água, os grupos de animais que receberam dieta cafeteria também receberam alimentos industrializados (salgadinho) e bebida gaseificada (refrigerante) *ad libitum*.

Tabela 1. Composição das dietas controle, hipoproteica e cafeteria (g/Kg):

	NORMOPROTEICA¹	HIPOPROTEICA¹	CAFETERIA²
Ingredientes	Peso (g)		
Amido	397,5	444,5	142,8
Caseína *	200	80	-
Dextrina	132	178	-
Fibra de Celulose	50	50	-
Açúcar	100	149	-
Mistura de Vitaminas	10	10	-
Mistura de Sais	35	35	-
Colina	2,5	2,5	-
Cistina	3	1	-
Óleo de Soja	70	70	-
Ração Comercial **	-	-	285,7
Bolo	-	-	142,8
Bolacha de Maizena	-	-	142,8
Bolacha Waffle	-	-	142,8
Amendoim Torrado	-	-	142,8
Refrigerante e Salgadinho***	-	-	<i>ad libitum</i>

¹, baseada na dieta semipurificada AIN-93 (Reeves et al. 1993)

², baseada na dieta cafeteria de Vanzela (2010)

*, caseína como fonte de proteína; 84% de proteína total (determinação colorimétrica método Kjeldahl (Albanese & Orto 1963)

** ração comercial contendo 22% de proteína (Nuvilab CR-1, Nuvital)

*** *ad libitum*

3.3 Protocolo Experimental

Ratas Wistar de 28 dias foram distribuídas inicialmente em 3 grupos experimentais de acordo com a dieta: controle (**C**), hipoproteica (**H**) e cafeteria (**CAF**). Após aproximadamente 30 dias de experimento, os animais (com 50 dias de idade) foram redistribuídos em 6 grupos, de acordo com a realização de ovariectomia e dos esquemas nutricionais: controle (**C**), hipoproteico (**H**), cafeteria (**CAF**), ovariectomizadas controle (**O**), ovariectomizadas hipoproteicas (**O-H**) e ovariectomizadas cafeteria (**O-CAF**). Quando essas fêmeas atingiram a idade de

aproximadamente 120 dias, os animais foram novamente redistribuídos em 9 grupos, de acordo com o tratamento de reposição hormonal (TRH), ovariectomia e dieta: controle (**C**), hipoproteico (**H**), cafeteria (**CAF**), ovariectomizadas controle (**O**), ovariectomizadas hipoproteicas (**O-H**), ovariectomizadas cafeteria (**O-CAF**), ovariectomizadas com reposição (**R**), ovariectomizadas hipoproteicas com reposição (**R-H**) e ovariectomizadas cafeteria com reposição (**R-CAF**) (**Figura 2**).

Os animais foram pesados regularmente, três vezes por semana, durante todo o experimento, para avaliação da massa corpórea e a evolução de ganho de peso dos diferentes grupos. Com aproximadamente 220 dias idade, os animais sofreram eutanásia por decapitação e foram coletados: sangue (para obtenção de soro para análises bioquímicas e hormonais) e tecidos (coração, fígado, adrenais, útero, músculo gastrocnêmico direito e fêmures).

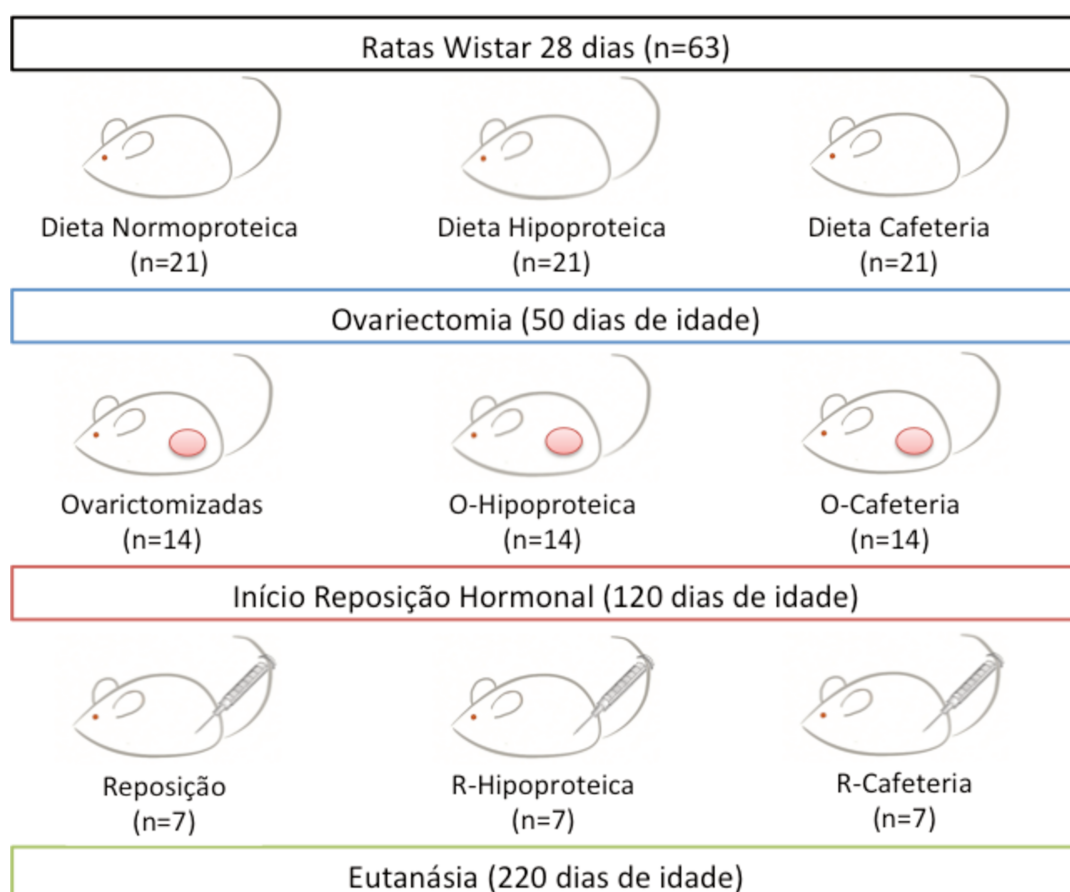


Figura 2. Organograma do protocolo experimental. Ratas Wistar foram distribuídas de acordo com o esquema nutricional, posteriormente, por dieta e ovariectomia (50 dias de idade), e, por fim, por dieta, ovariectomia e reposição hormonal (120 dias de idade), com 9 grupos finais de n=7. Todos os grupos sofreram eutanásia com 220 dias de idade. (Legenda: **C**, Controle; **O**, Ovariectomizadas; **R**, Reposição; **H**, Hipoproteica; **O-H**, Hipoproteica Ovariectomizadas; **R-H**, Hipoproteica Reposição; **CAF**, Cafeteria; **O-CAF**, Cafeteria Ovariectomizadas; **R-CAF**, Cafeteria Reposição).

3.4 Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada bilateralmente nos animais dos grupos **O**, **O-H**, **O-CAF**, **R**, **R-H** e **R-CAF** com aproximadamente 50 dias de idade.

O procedimento cirúrgico utilizado foi baseado na descrição a seguir: primeiramente, os animais foram pesados e anestesiados com Xilasina (10 mg/Kg) e Quetamina (80 mg/Kg) intraperitonealmente. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral e foi realizada a tricotomia e a assepsia bilateral com álcool 70° na região baixo-dorsal. O acesso aos ovários foi feita a partir de incisão na pele do animal, de aproximadamente 1 centímetro, que foi feita longitudinalmente na região que se localiza a aproximadamente 1 cm da coluna vertebral e 1 cm abaixo da última intercostal do animal. Em seguida, o músculo foi divulsionado com a tesoura até evidenciar a cavidade abdominal, onde, com uma pinça anatômica, foi possível localizar o corno uterino e o ovário. Foi feita uma laçadura na tuba uterina com linha cirúrgica e procedeu-se a retirada do ovário. O coto cirúrgico foi introduzido na cavidade abdominal, seguido da sutura da musculatura e pele. Por fim, foi feita assepsia externa do local suturado e os animais foram colocados em ambiente levemente aquecido para recuperação do procedimento anestésico. Nos 3 dias sucessivos à ovariectomia, os animais receberam água com analgésico, ácido acetilsalicílico (0,70 mg/mL), *ad libitum*.

3.5 Terapia de Reposição Hormonal

A terapia de reposição hormonal (TRH) foi feita nos grupos **R**, **R-H** e **R-CAF** através de injeções subcutâneas de 17 β -Estradiol (Sigma-Aldrich), na concentração de 0,1 μ g/Kg de peso corpóreo, diluído em óleo mineral (Nujol, Mantecorp). As injeções foram aplicadas três vezes por semana durante aproximadamente 100 dias, iniciando-se 70 dias após a ovariectomia, quando os animais tinham 120 dias de vida, e a terapia finalizou-se quando as ratas completaram aproximadamente 220 dias de idade e sofreram eutanásia.

3.6 Taxa Metabólica

Afim de analisar os efeitos dos tratamentos sobre o metabolismo dos animais, foram realizadas três mensurações de taxa metabólica ao longo do experimento, quando os animais tinham aproximadamente 80, 130 e 200 dias de idade. O equipamento utilizado foi o analisador de concentrações de O₂ e CO₂ (Oxygen/Carbon Dioxide Analyzer, Model 902D DualTrak, Quantek Instruments, EUA), que quantifica as porcentagens de oxigênio e de gás carbônico presentes na câmara utilizada para este ensaio. Para a avaliação da taxa metabólica dos animais, foi realizado o seguinte procedimento: os animais foram pesados e colocados em câmara hermética por três minutos e as concentrações de O₂ e CO₂ foram medidas nos tempos 0 (logo após colocar o animal na câmara, valor de calibração), 1, 2 e 3 minutos. A partir desses valores e do peso corpóreo dos animais, foi possível, através da fórmula abaixo, calcular a taxa metabólica destes, expressa em kcal x min⁻¹ x 100g⁻¹:

$$\frac{[(VCO_{2f} - VCO_{2i}) / (VO_{2i} - VO_{2f}) / \text{tempo}] \times 4,85 \text{ kcal}}{\text{Peso do animal (g)}} \times 100$$

3.7 Ingestão Alimentar

Foi realizado em paralelo experimento adicional para avaliar a ingestão alimentar para cada tipo de dieta utilizada neste trabalho (normoproteica, hipoproteica e cafeteria). Neste experimento, ratas Wistar adultas (n=9) foram distribuídas em 3 grupos de acordo com as 3 dietas (n=3). Foram mantidas em gaiolas individuais durante 45 dias recebendo as diferentes dietas e água *ad libitum*, e calculou-se quantos gramas de dieta ingeriam por dia. Além disso, os animais foram pesados regularmente para avaliação da quantidade de dieta ingerida por 100 gramas de peso corpóreo, segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{Consumo de dieta (g)} / 45 \text{ dias}) \times 100}{\text{Peso final do animal (g)}}$$

3.8 Composição Corpórea

Após a eutanásia, a composição corpórea dos animais foi determinada através do equipamento DEXA (dual-energy X-ray absorptimetry), gentilmente cedido pelo Serviço de Medicina Nuclear do HC/UNICAMP, de modelo Discovery, fabricado pela HOLOGIC, EUA.

O método consiste na análise de corpo inteiro do animal através da incidência de baixas doses de raio X (2 feixes colimados de 38 e 70 KeV de energia) que são absorvidos pelo corpo/ tecidos e órgãos do animal. As absorções diferenciadas dos raios pelas estruturas ósseas e pelos tecidos moles são posteriormente interpretadas pelo software para pequenos animais do equipamento, que determina: a densidade mineral óssea (g/cm^2), a massa óssea e a massa magra (absoluta, em gramas), além da massa gorda (g) e da porcentagem de gordura do animal.

3.9 Análises Bioquímicas

Após a eutanásia dos animais, o sangue foi coletado por punção cardíaca, sendo deixado à temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorresse a coagulação e submetido à centrifugação a $9.500\times G$ e 4°C , por 15 minutos, obtendo-se o soro que foi posteriormente utilizado nas seguintes análises séricas: concentração de proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, cálcio e glicose séricos. Todas as análises séricas foram realizadas através de método colorimétrico, utilizando-se kits comerciais (Laborclin, Brasil) e com leitura no equipamento espectrofotômetro (Hidex, Suíça).

A partir do soro sanguíneo também foi realizados o perfil hormonal dos animais, utilizando-se kits comerciais Milliplex (Millipore, EUA) para ensaio de citometria de fluxo por fluorescência no equipamento Luminex (Millipore, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os hormônios analisados foram: hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), prolactina (PRL), estradiol, progesterona, leptina, hormônio de crescimento (GH), hormônio tireoestimulante (TSH) e insulina.

3.10 Resistência Mecânica Óssea

O fêmur direito dos animais foi submetido ao ensaio de compressão com o servo hidráulico para ensaios mecânicos MTS, modelo 180 Flex Test 40 (MTS Systems Corporation, EUA), no Laboratório de Ensaios Mecânicos (LEM) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp. Os ossos foram posicionados verticalmente no equipamento e a força de compressão foi aplicada até ocorrer fratura do osso. A partir das medidas de diâmetro do osso, previamente obtidas com paquímetro eletrônico, o ensaio de compressão forneceu os valores de força e tensão máxima suportados pelo fêmur antes da fratura, além do módulo de elasticidade e da força e tensão de escoamento do osso. A partir destes valores, foi possível avaliar a resistência mecânica dos fêmures dos animais dos diferentes grupos.

3.11 Análises Estatísticas

Para melhor verificação dos efeitos das duas dietas usadas no trabalho (cafeteria e hipoproteica) os resultados para cada dieta foram analisados separadamente e comparados aos grupos com dieta controle. Os grupos **C**, **O** e **R** foram divididos aleatoriamente em dois grupos para comparação com as duas diferentes dietas.

Os dados obtidos foram analisados através do software Prism 5 (GraphPad Software, EUA) através de métodos estatísticos adequados. Foram calculadas as médias e erro padrão das médias e foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (com P valor de Dallal-Wilkinson-Lilliefor) para todos os dados obtidos. Em seguida, foi realizado o teste de homocedasticidade Bartlett dos diferentes grupos através do software Action (Versão 2.9.29.368.534, Estatcamp, Brasil). Por fim, foi realizada a comparação das médias dos diferentes grupos por análise de variância de dois fatores (*Two-Way* ANOVA), sendo um fator a Dieta (Controle x Cafeteria ou Controle x Hipoproteica) e o outro o Estado do animal (Controle, Ovariectomizadas ou Reposição), com detecção de diferenças significativas para probabilidade menor que 5%. As análises de *Two-Way* ANOVA foram seguidas do teste de Bonferroni de comparação múltipla para detecção de

diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos, para probabilidade menor que 5% (Gad & Weil 1994).

Os dados de composição corpórea foram analisados com assessoria da analista em estatística Srta Daisy Moitinho. Após o teste de normalidade e homocedasticidade foi realizada a comparação das médias dos diferentes grupos pelo método estatístico Planejamento e Experimento, que, como o *Two-Way* ANOVA, avalia a influência dos dois fatores (Dieta e Estado) e a interação entre eles para as diferenças entre as médias, com detecção de diferenças significativas para probabilidade menor que 5%. Em seguida, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das médias dos diferentes grupos, com detecção de diferenças significativas para probabilidade menor que 5%. Para estas análises foram utilizados os *softwares* Action (Versão 2.9.29.368.534, Estatcamp, Brasil), XLSTAT (Versão 2015.4.01.20780, Addinsoft, EUA) e Minitab (Versão 16.1.0, Minitab Inc., EUA)

Neste trabalho, as diferenças estatísticas detectadas pelos métodos *Two-Way* ANOVA e Planejamento e Experimento foram assinaladas nos gráficos do seguinte modo: quando o fator Dieta mostrou-se significativo para as diferenças entre as médias, colocou-se asterisco (*) sobre as barras do gráfico dos grupos alimentados com a dieta hipoproteica ou de cafeteria, indicando que a dieta utilizada influenciou o parâmetro analisado; quando o fator Estado mostrou-se significativo, colocou-se o símbolo “#” ao lado da legenda dos estados, indicando que o estado do animal influenciou o parâmetro analisado; e, quando a interação entre os fatores Dieta e Estado mostrou-se significativa para a diferença entre as médias, colocou-se o símbolo “&” sobre as barras dos gráficos em que a interação entre os fatores influenciou o parâmetro analisado. As letras colocadas sobre as barras dos gráficos correspondem aos pós-testes realizados, Bonferroni e Kruskal-Wallis, sendo que letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam significância estatística para $P < 0,05$. Desta forma, o uso dos testes *Two-Way* ANOVA e Planejamento e Experimento permitiu detectar diferenças adicionais às detectadas pelo Bonferroni e Kruskal-Wallis, aprofundando a análise dos resultados.

4. Resultados

Ingestão Alimentar

A avaliação da ingestão alimentar para cada dieta utilizada neste trabalho (normoproteica, hipoproteica e cafeteria) mostrou que, independente do tipo de esquema nutricional, não houve diferenças significativas entre a quantidade de dieta ingerida por 100 gramas de peso corpóreo dos diferentes grupos (**Figura 3**).

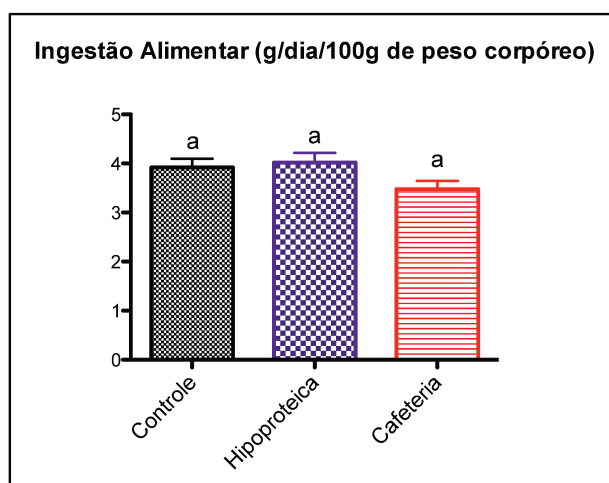


Figura 3. Ingestão alimentar (g/dia/100g de peso corpóreo) dos diferentes grupos submetidos às dietas controle, hipoproteica, e cafeteria. (Legenda: letras iguais indicam valores semelhantes entre as médias dos grupos).

Parâmetros Morfológicos

Com relação ao procedimento cirúrgico de ovariectomia, foi possível observar diferenças morfológicas macroscópicas de tamanho e aspecto funcional do útero dos animais ovariectomizados (grupos **O**, **O-CAF** e **O-H**), em relação ao útero das fêmeas intactas (que não foram ovariectomizadas) (grupos **C**, **CAF** e **H**). Verificou-se, ainda, que o tratamento com reposição hormonal com estrógeno proporcionou recuperação do tecido uterino quanto ao tamanho e aspecto funcional nas fêmeas dos grupos **R**, **R-CAF** e **R-H** (**Figura 4**). Os animais que não foram ovariectomizados

apresentaram útero intacto e bem vascularizado (**Figura 4A, 4D e 4G**), os animais ovariectomizados sem reposição apresentaram útero atrofiado, com tamanho e vascularização bastante reduzidos (**Figura 4B, 4E e 4H**) e os animais ovariectomizados com TRH apresentaram útero de tamanho e vascularização normais, semelhante aos animais não ovariectomizados (**Figura 4C, 4F e 4I**), para todas as dietas. É interessante observar que o útero das ratas do grupo **O-CAF** mostrou-se ainda mais atrofiado e menos vascularizado que os outros grupos ovariectomizados (**Figura 4H**).

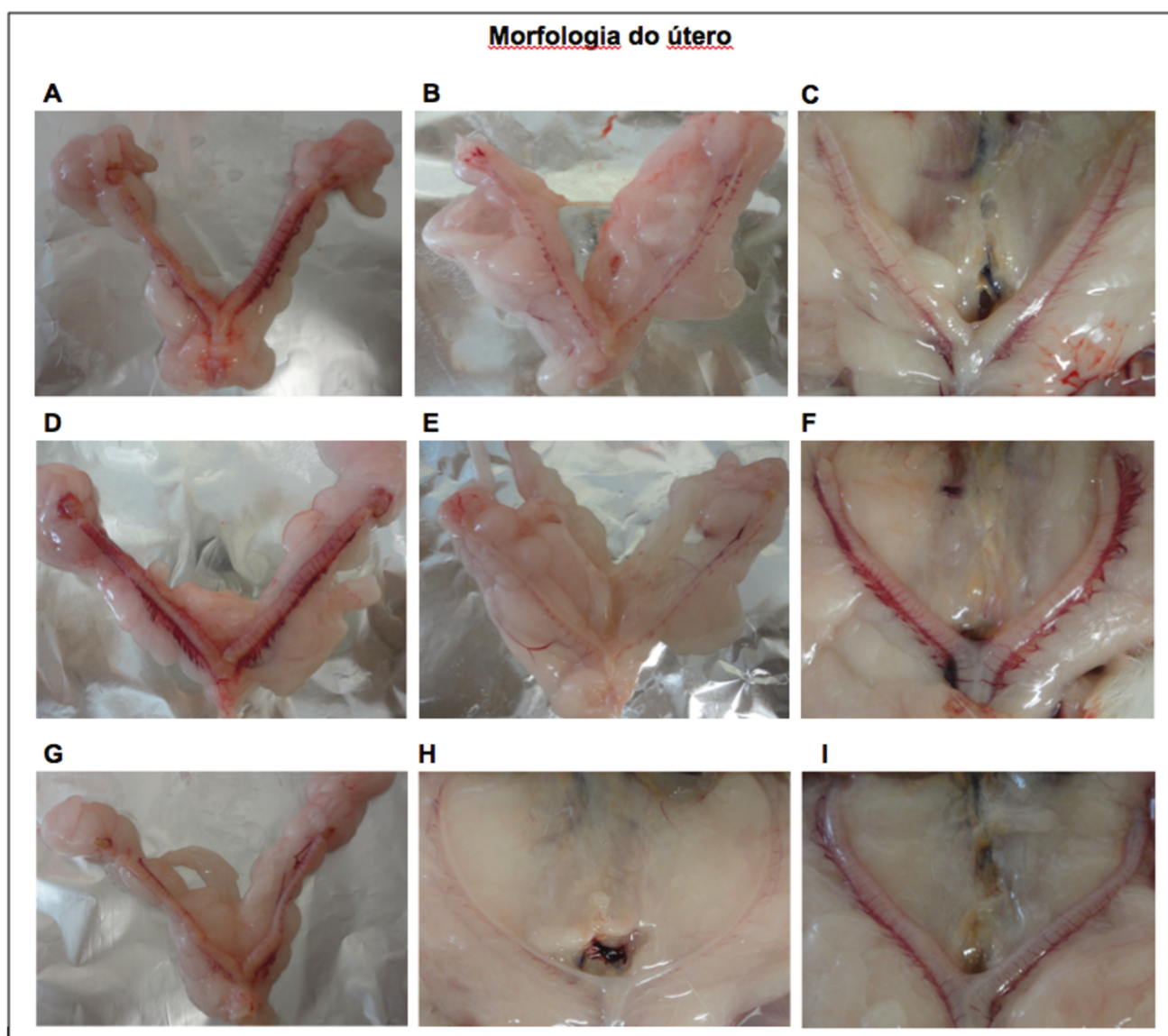


Figura 4. Morfologia do útero dos diferentes grupos experimentais: Grupo controle (**A**); ovariectomizadas (**B**); ovariectomizadas com reposição hormonal (**C**); hipoproteica intacta (**D**); ovariectomizadas hipoproteicas (**E**); ovariectomizadas hipoproteicas com reposição hormonal (**F**); cafeteria intacta (**G**); ovariectomizadas cafeteria (**H**) e ovariectomizadas cafeteria com reposição hormonal (**I**).

O presente trabalho compreende dois tratamentos experimentais – dieta com restrição de proteínas e dieta cafeteria – os quais optamos por analisar separadamente. Tanto os resultados referentes à restrição proteica, como os resultados referentes à dieta cafeteria, mostraram alterações importantes quanto ao ganho de peso relativo, taxa metabólica, parâmetros morfométricos, composição corpórea, perfil bioquímico e hormonal e à resistência mecânica do fêmur.

4.1 Efeitos da Restrição Proteica na Dieta sobre Ratas Wistar.

A análise dos resultados referente aos animais submetidos à dieta hipoproteica mostraram alterações importantes quanto ao peso corpóreo, composição corpórea, parâmetros bioquímicos e resistência mecânica do osso quando comparados aos animais dos grupos controle, que receberam dieta normoproteica.

Evolução do Peso Corporal

As curvas de evolução dos pesos corpóreos e também dos pesos relativos, dos diferentes animais experimentais estão apresentadas nas **Figuras 5A e 5B**, abrangendo todo o período experimental de aproximadamente 200 dias.

Analisando-se a evolução do peso absoluto (**Figura 5A**) dos animais dos grupos **C**, **O**, **R**, **H**, **O-H** e **R-H** ao longo do experimento, observou-se que todos os grupos de animais apresentaram curva de ganho de peso dentro do esperado, ou seja, crescimento acentuado na primeira metade do tratamento, com posterior estabilização da curva na segunda metade do experimento. Além disso, foi possível observar que os grupos **H**, **O-H** e **R-H** apresentaram menor peso em relação aos respectivos grupos alimentados com dieta controle, no início do tratamento. Ao final do experimento, verificou-se que os grupos com dieta hipoproteica apresentaram equiparação da evolução de peso corpóreo (**Figura 5A**). A análise do percentual de ganho de peso corpóreo em relação ao peso inicial (**Figura 5B**) mostrou que, à partir da ovariectomia (20 dias de experimento), o peso relativo dos animais ovariectomizados (**O**, **O-H**, **R** e **R-H**) aumentou acima do peso do grupo **C**. A partir do início da terapia de reposição hormonal (90 dias de experimento), porém, os

pesos do grupo **R** mantiveram-se estáveis, à medida que o do grupo **O** continuou a evoluir, sendo que ao final do experimento os pesos do grupo **R** foram muito próximos aos do **C**. O mesmo padrão ocorreu entre os grupos **O-H** e **R-H**, sendo que o peso final do grupo **R-H** foi ainda menor que os dos grupos **C** e **H**. Em relação à dieta, foi possível observar que os animais alimentados com dieta hipoproteica possuíram peso absoluto (**Figura 5A**) menor em relação àqueles alimentados com dieta controle, apesar de possuírem peso relativo maior (**Figura 5B**).

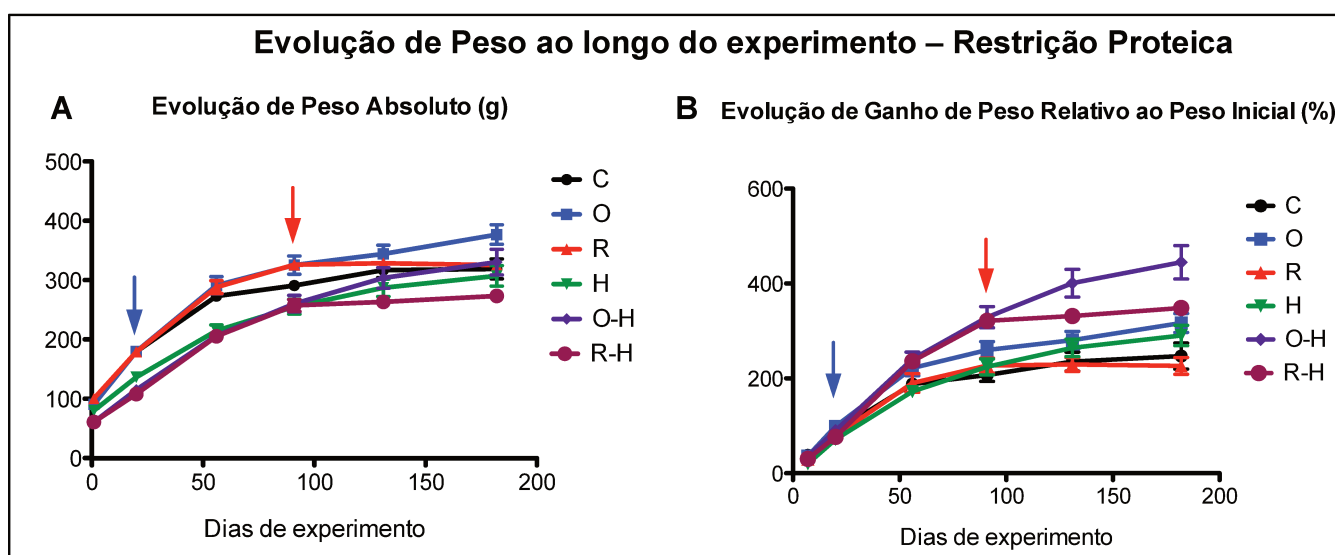


Figura 5. Evolução do peso absoluto (**A**; g) e relativo (**B**; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento (Legenda: Seta azul: procedimento cirúrgico de castração (ovariectomia); Seta vermelha: início da reposição hormonal; C, Controle; O, Ovariectomizadas; R, Reposição; H, Hipoproteica; O-H, Hipoproteica Ovariectomizadas; R-H, Hipoproteica Reposição).

Esses dados sugerem que a dieta hipoproteica prejudicou o crescimento normal do indivíduo, apresentando reduzida evolução do peso corporal absoluto em relação à dieta controle. Além disso, os dados indicam que a ovariectomia possuiu efeito sobre o ganho de massa corporal, aumentando a massa do indivíduo independente da sua dieta. Os grupo tratados com estrógeno não apresentaram o mesmo ganho de massa, mantendo o peso estável até a recuperação do padrão semelhante ao do controle, independente da dieta. Esses resultados sugerem que houve modulação importante no controle de peso por parte dos hormônios sexuais, principalmente o estrógeno.

Taxa Metabólica

A medida de taxa metabólica analisa as variações do metabolismo do indivíduo. Normalmente, o metabolismo de um indivíduo aumenta durante o período de crescimento devido principalmente ao dispêndio energético envolvido na duplicação celular, atividade celular e intenso processo de síntese, garantindo o crescimento; ao aumento de massa corporal e, principalmente, do tecido metabolicamente mais ativo (massa magra); e da modulação endócrina neste período. Quando o indivíduo entra na fase adulta ocorre o balanço dos processos de síntese e catabólicos, e desse modo o dispêndio energético reflete o gasto de energia incorporada para a manutenção das atividades celulares. Neste caso, a taxa metabólica é reduzida em relação a fase anterior de crescimento. Por outro lado, na fase de senilidade, o organismo apresenta redução dos processos de síntese e aumento dos processos catabólicos, assim o dispêndio energético é ainda mais reduzido em relação à fase adulta. Nesse momento, em função dos diversos processos fisiológicos, há prevalência maior dos tecidos metabolicamente menos ativos – massa de tecido gorduroso, proporcionalmente aumentada, – seguido da redução da massa magra e da secreção de hormônios específicos, principalmente dos esteroides gonadais.

A **Figura 6A** apresenta a evolução das taxas metabólicas dos grupos **C**, **O**, **R**, **H**, **O-H** e **R-H** ao longo dos meses de experimento, sendo 3 mensurações correspondentes ao período em que os animais tinham aproximadamente 80, 130 e 200 dias de idade. Os valores foram apresentados como porcentagem em relação à medida inicial (80 dias).

A partir desses resultados foi possível observar que a evolução da taxa metabólica dos animais **C** e **O** foi estável durante a primeira parte do experimento, até quando os animais atingiram aproximadamente 130 dias de idade, e que a taxa metabólica do grupo **R** apresentou-se aumentada nesse período (**Figura 6A**). Já a terceira medição mostrou que em todos esses grupos a taxa metabólica foi decrescente como esperado para o avançar da idade cronológica. Os animais do grupo **H** apresentaram leve decaimento da taxa metabólica, ao passo que os grupos **O-H** e **R-H** já apresentaram taxa metabólica consideravelmente reduzida neste período (**Figura 6A**). Quando os animais atingiram 200 dias de idade, a taxa

metabólica de todos os grupos apresentou decaimento de aproximadamente 50% em relação à taxa inicial.

Com relação à taxa metabólica final (200 dias de idade) dos diferentes grupos (**Figura 6B**), o estado do animal (ovariectomizado ou ovariectomizado com reposição hormonal) mostrou efeito significativo para a diferença entre as médias dos grupos ($P<0,05$). A média da taxa metabólica do grupo **R** foi significativamente maior em relação aos grupos **C** e **O** ($P<0,05$) e a média do grupo **O**, apesar de não ser estatisticamente diferente, foi 20% menor em relação ao grupo **C**.

Estes dados demonstraram que houve efeito da dieta hipoproteica na diminuição da taxa metabólica, principalmente dos animais ovariectomizados, ao longo do experimento. Esta diminuição está relacionada ao maior ganho de peso observado nestes animais neste período, demonstrando que houve um aumento do tecido metabolicamente menos ativo (tecido adiposo) em detrimento de massa magra.

Além disto, verificou-se que a reposição hormonal modulou o metabolismo, compensando a queda normal da secreção endócrina e melhorando as proporções de massa magra e adiposa observada nos animais ovariectomizados.

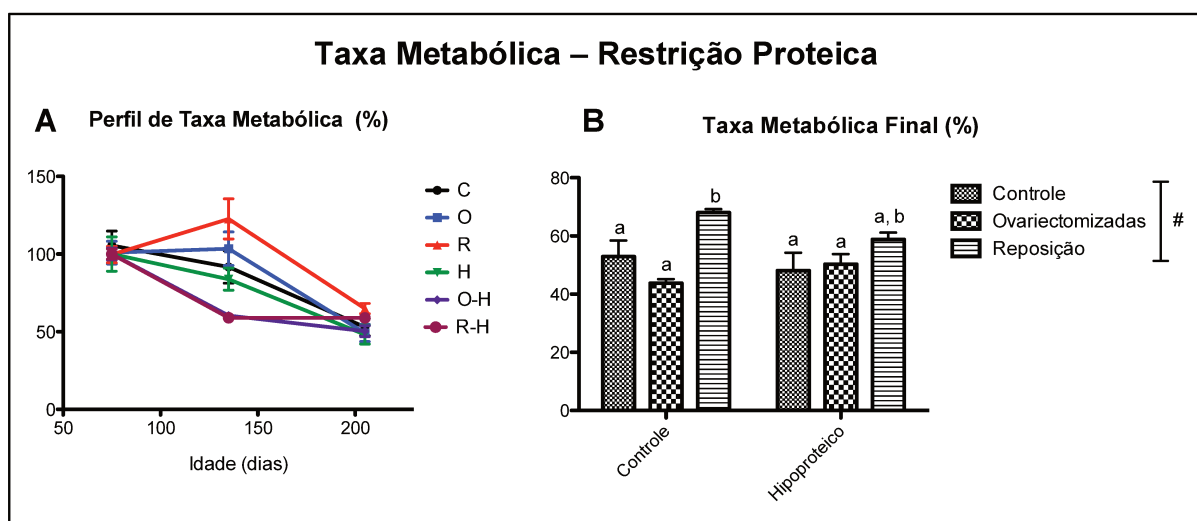


Figura 6. Evolução da taxa metabólica (A; %) e taxa metabólica final (B; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento (Legenda: **C**, Controle; **O**, Ovariectomizadas; **R**, Reposição; **H**, Hipoproteica; **O-H**, Hipoproteica Ovariectomizadas; **R-H**, Hipoproteica Reposição; #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para $P<0,05$; Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam significância estatística para $P<0,05$).

Parâmetros morfométricos

A **Figura 7** apresenta os dados de parâmetros morfométricos avaliados no presente estudo: ganho de peso corpóreo relativo final e peso relativo dos tecidos e órgãos – fêmur direito, músculo gastrocnêmio direito e fígado – de todos os animais, no momento da eutanásia dos grupos **C**, **O**, **R**, **H**, **O-H** e **R-H**.

Com relação ao ganho de peso relativo final, tanto a dieta hipoproteica quanto o estado do animal (ovariectomizado ou ovariectomizado com reposição hormonal) mostraram-se significativos para a diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 7A**). As médias dos grupos alimentados com dieta hipoproteica foram maiores em relação às fêmeas controles, sendo que as médias dos grupos **O-H** e **R-H** foram significativamente maiores que as dos grupos **O** e **R**, respectivamente ($P < 0,05$). Além disso, o grupo **O-H** apresentou a maior média de ganho de peso final em relação ao grupo **H** ($P < 0,05$) e os grupos **R** e **R-H** apresentaram médias significativamente menores que os grupos **O** e **O-H**, respectivamente ($P < 0,05$; **Figura 7A**). Estes dados demonstraram que a ovariectomia realizada, simulando a menopausa, possuiu efeito significativo para um maior ganho de peso, e que o a TRH promoveu modulação significativa deste quadro, mantendo o ganho de peso menor e mais próximo dos controles. Além disto, demonstrou que a associação da dieta hipoproteica com a ovariectomia aumentou ainda mais o ganho de peso, e que a reposição hormonal neste caso ajudou a melhorar este quadro porém aquém ao observado nos animais controles com reposição.

Com relação ao peso relativo do fêmur, o estado do animal – ovariectomia/reposição hormonal – mostrou ser efetivo para promover significativa diferença entre as médias entre os grupos ($P < 0,05$; **Figura 7B**), demonstrando que houve efeito da ovariectomia e da reposição hormonal sobre a massa óssea.

Com relação ao peso relativo do músculo, a dieta hipoproteica mostrou ser efetiva na indução de diferenças entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$), sendo que os animais alimentados com dieta hipoproteica apresentaram menor peso do músculo do que os animais alimentados com dieta controle (**Figura 7C**). Isto indica que a dieta hipoproteica prejudicou o ganho e manutenção da massa magra muscular.

Com relação ao peso relativo do fígado, tanto a dieta hipoproteica quanto o estado (ovariectomia/reposição hormonal) mostraram-se significativos na indução de

diferença entre as médias entre os grupos ($P < 0,05$; **Figura 7D**). Os animais alimentados com a dieta hipoproteica apresentaram médias dos pesos relativos do fígado menores em relação aos animais alimentados com dieta controle. Além disso, os grupos **O** e **R** apresentaram redução do peso hepático em relação às médias do grupo **C** ($P < 0,05$). Nesse mesmo padrão, o grupo **O-H** apresentou peso do fígado menor do que o grupo **H**. Estes dados indicam que a ovariectomia possuiu efeito negativo sobre o metabolismo hepático e que a TRH não contribuiu para melhorar este quadro. Além disto, estes resultados indicam que a dieta hipoproteica prejudicou ainda mais este parâmetro (**Figura 7D**).

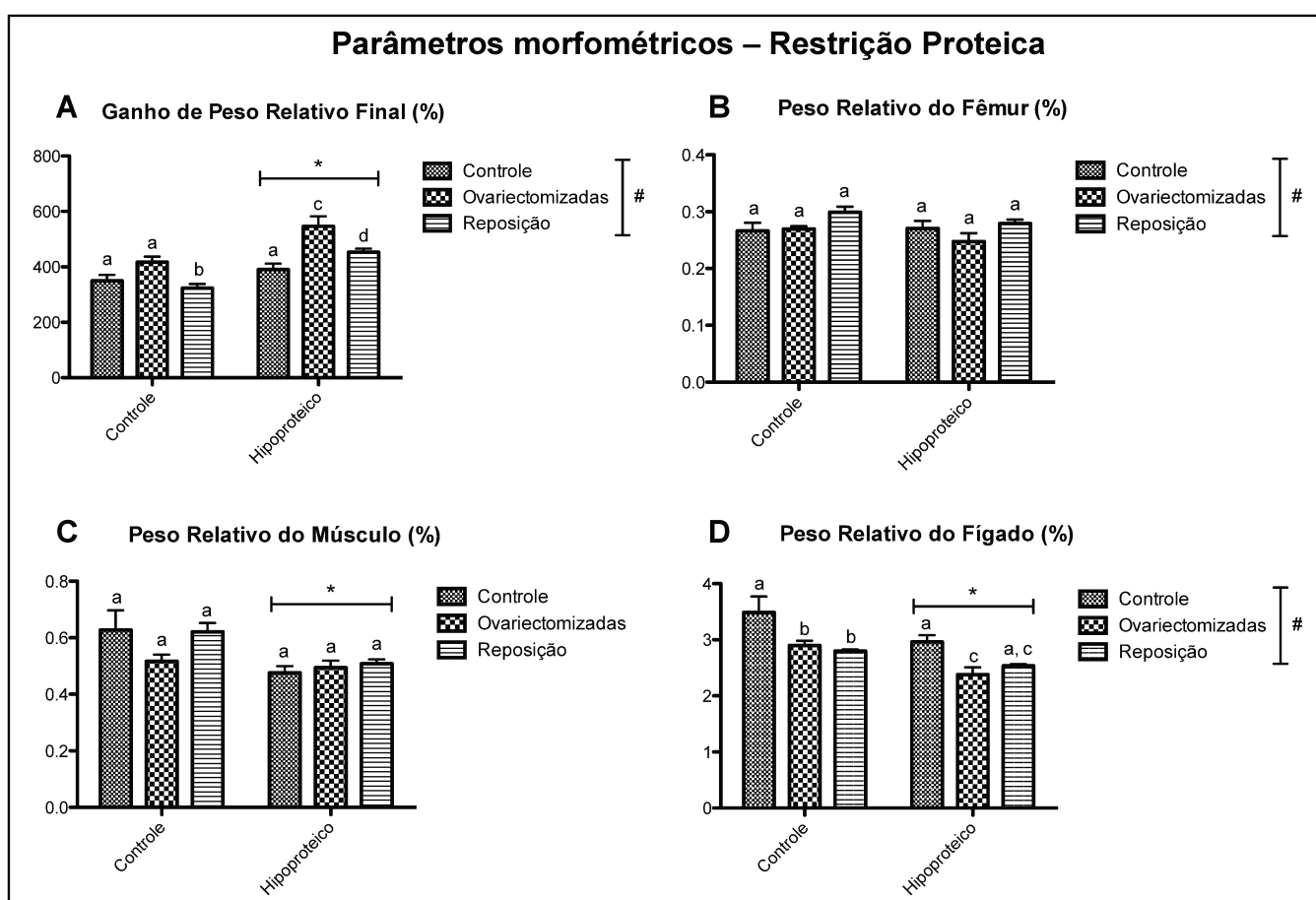


Figura 7. Parâmetros morfométricos: Ganho de peso relativo final (**A**; %), peso relativo do fêmur direito (**B**; %), músculo gastrocnêmio direito (**C**; %) e fígado (**D**; %) em relação ao peso corporal dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento. Legenda: *: Fator dieta significativo ($P < 0,05$); #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para $P < 0,05$; Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam significância estatística para $P < 0,05$).

Composição corpórea

A análise da composição corpórea é uma ferramenta bastante importante para este trabalho na medida em que avaliou as porcentagens relativas dos tecidos muscular, adiposo e ósseo em relação ao peso absoluto do animal, aprofundando a análise dos tratamentos realizados.

A **Figura 8** apresenta os dados de massa óssea, densidade óssea e porcentagem de gordura corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais (**C**, **O**, **R**, **H**, **O-H** e **R-H**).

Com relação à massa óssea dos animais alimentados com dieta controle e hipoproteica, os dados mostraram que a redução de proteína na dieta (dieta hipoproteica) produziu diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$), reduzindo a massa óssea em relação a dos animais alimentados com dieta controle (**Figura 8A**). Isto demonstra que a dieta hipoproteica possui efeito negativo sobre a manutenção da massa óssea independente do estado do animal.

Com relação à densidade óssea, o estado do animal – ovariectomia/reposição hormonal – foi efetivo em alterar significativamente as médias desse parâmetro dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 8B**). Embora não tenha havido diferenças estatísticas entre as médias de cada grupo, é interessante observar que, como esperado, os animais ovariectomizados, em ambos os grupos **O** e **O-H**, apresentaram menor densidade óssea em relação aos animais não ovariectomizados respectivos, dos grupos controles **C** e **H** (**Figura 8B**). Além disso, também nesta situação, pôde-se observar que os animais com terapia de reposição apresentaram médias maiores de densidade óssea do que os ovariectomizados, aproximando seus valores à densidade óssea dos grupos controles.

As médias de porcentagem de gordura corporal dos animais alimentados com dieta controle e hipoproteica não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (**Figura 8C**). Apesar disto, a média do grupo **O** foi 29% mais alta do que a média do grupo **C** e os valores de gordura corporal para o grupo **O-H** foram 24% maior do que a do grupo **H**, enquanto nos grupos **C**, **R**, **H** e **R-H** as médias foram semelhantes. Esses dados demonstraram que a ovariectomia levou ao aumento da proporção de tecido adiposo em relação ao tecido muscular, e que a reposição hormonal modulou o metabolismo, compensando a queda normal da secreção

endócrina, melhorando as proporções de massa magra e gorda observada nos animais ovariectomizados.

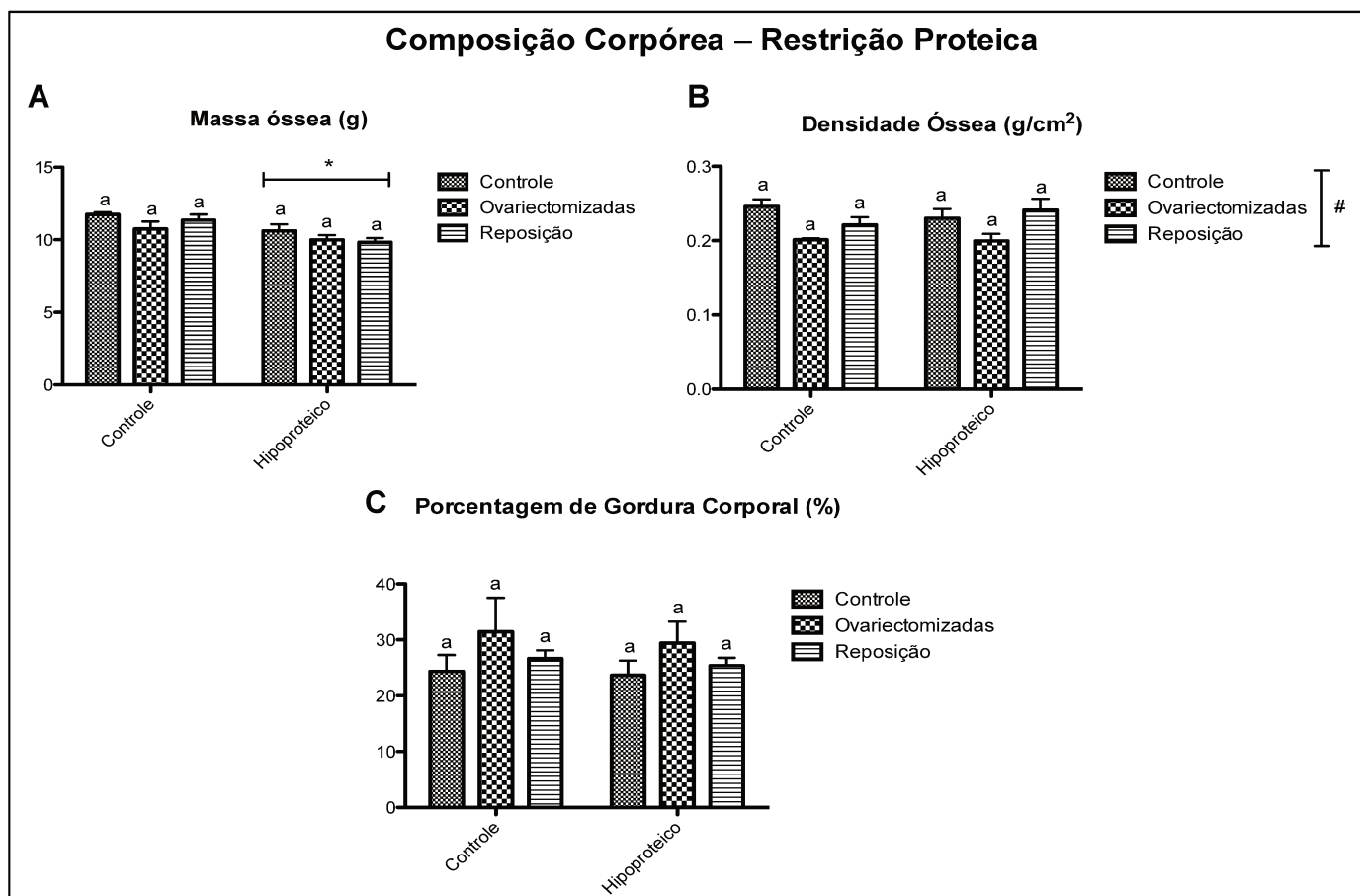


Figura 8. Composição corpórea: massa óssea (A; g), densidade óssea (B; g/cm²) e porcentagem de gordura corporal (C; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento. Legenda: *: O Fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para $P < 0,05$. Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam significância estatística para $P < 0,05$).

Análises Bioquímicas

A análise de parâmetros bioquímicos pode ajudar a compreender melhor alguns efeitos dos diferentes tratamentos sobre o metabolismo dos animais. Os dados sobre esses parâmetros estão apresentados na **Tabela 2**, compreendendo os valores de proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, cálcio e glicose séricos dos grupos **C**, **O**, **R**, **H**, **O-H** e **R-H**.

Com relação aos valores de proteínas totais séricas, que é o indicativo do estado estrófico dos animais, a dieta hipoproteica mostrou ser efetiva na indução de diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$. Desse

modo, os animais alimentados com dieta hipoproteica apresentaram médias menores do que os animais alimentados com dieta controle (**Tabela 2**).

Para os valores de albumina sérica, a principal proteína circulante e que também reflete o estado estófrico do animal, o estado do animal se mostrou significativo para a diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Tabela 2**), sendo que as médias de albumina no grupo **O-H** foram significativamente menores que as do grupo **H** ($P < 0,05$).

Estes dados demonstraram que a restrição proteica realizada foi efetiva, mas não foi extremamente severa a ponto de influenciar os valores de albumina do grupo **H** em relação ao **C**. A associação da restrição proteica com a ovariectomia, porém, potencializou o efeito da dieta e estado, reduzindo estes parâmetros.

Com relação ao colesterol total e os triacilgliceróis séricos, que refletem o metabolismo de lipídeos, o estado – ovariectomia/reposição hormonal - dos animais mostrou que o teor de colesterol total sérico foi significativamente alterado para os diferentes grupos ($P < 0,05$; **Tabela 2**), sendo que as médias do colesterol sérico no grupo **O** foram significativamente maiores que as do grupo **C** e **R** ($P < 0,05$).

Por sua vez, com relação aos valores de triacilgliceróis séricos, o estado e a interação entre o estado e a dieta mostraram influências significativas para a diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,0001$ e $P < 0,05$, respectivamente; **Tabela 2**). As médias dos grupos **O** e **O-H** foram significativamente menores que as médias dos grupos **C** e **H**, respectivamente ($P < 0,05$). Com relação aos grupos **R**, a reposição hormonal promoveu média significativamente maior do que as dos grupos **C** e **H** e também do que os valores do grupo **R-H**. A interação do estado com a dieta (grupo **R-H**) não foi efetiva em recuperar o valor de triacilgliceróis semelhante ao grupo **R**. Desta forma, a interação entre a reposição hormonal com a dieta hipoproteica levou ao menor valor sérico de triacilgliceróis no **R-H** em relação a **R** ($P < 0,05$), não sendo diferente da média do grupo **O-H**.

Estes dados demonstram que a ovariectomia teve influência sobre o metabolismo de lipídeos dos animais, provocando aumento do colesterol total e diminuição dos triacilgliceróis séricos. Além disto, demonstrou que a TRH possuiu efeito sobre este quadro, diminuindo o colesterol total e recuperando os valores dos triacilgliceróis circulantes.

Com relação aos valores de cálcio sérico, não houve diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos analisados.

Por fim, com relação aos valores de glicose sérica, que reflete o metabolismo de carboidratos do organismo, a dieta hipoproteica e a interação entre o estado e a dieta mostraram-se efetivos em produzir diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,0001$ e $P < 0,05$, respectivamente; **Tabela 2**). As médias de glicose sérica dos grupos alimentados com dieta hipoproteica foram maiores do que a dos grupos alimentados com dieta controle, sendo que os grupos **O-H** e **R-H** apresentaram valores da glicemia significativamente maiores que os grupos **O** e **R**, respectivamente ($P < 0,05$). A interação entre os fatores – dieta e estado – deu-se na medida em que a média da glicemia do grupo **R-H** foi significativamente maior do que as médias dos grupos **H** e **O-H** ($P < 0,05$), indicando que a dieta hipoproteica associada à reposição hormonal levou ao aumento da glicose sérica, fato esse não observado no grupo **R**.

Estes dados demonstraram que a dieta hipoproteica induziu alterações no metabolismo de carboidratos, aumentando a disponibilidade de glicose sérica circulante, na medida em que possui maior teor de carboidratos em relação à normoproteica. Além disto, demonstrou que a associação da dieta com a ovariectomia aumentou esta disponibilidade, e que a TRH com a dieta prejudicou ainda mais este quadro.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos (proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, cálcio e glicose séricos) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento:

Parâmetros Bioquímicos	C	O	R	H	O-H	R-H	Two-Way ANOVA		
							Interação	Estado	Dieta
Proteínas Totais (g/dL)	8,40 ± 0,91	8,03 ± 1,15	8,21 ± 1,15	8,11 ± 1,15	7,05 ± 0,49	7,17 ± 1,03	ns	ns	$P < 0,05$
Albumina (g/dL)	1,48 ± 0,16	1,43 ± 0,16	1,49 ± 0,20	1,52 ± 0,14	1,27 ± 0,11	1,35 ± 0,11	ns	$P < 0,05$	ns
Colesterol Total (mg/dL)	93,81 ± 8,34	111,00 ± 21,00	86,04 ± 10,03	91,11 ± 13,49	95,24 ± 10,70	91,45 ± 8,83	ns	$P < 0,05$	ns
Triacilgliceróis (mg/dL)	17,97 ± 1,85	14,59 ± 0,85	19,07 ± 1,36	17,91 ± 2,01	14,90 ± 1,31	15,76 ± 2,30	$P < 0,05$	$P < 0,0001$	ns
Cálcio (mg/dL)	11,99 ± 0,83	12,23 ± 1,38	11,85 ± 0,72	11,87 ± 0,96	11,92 ± 0,56	11,08 ± 0,59	ns	ns	ns
Glicose (mg/dL)	106,40 ± 17,34	91,77 ± 22,93	89,22 ± 15,21	125,20 ± 27,08	132,50 ± 20,40	169,90 ± 46,71	$P < 0,05$	ns	$P < 0,0001$

Resultados apresentados como médias e desvios padrões das médias, analisados através de análise de variâncias por *two-way* ANOVA, seguido de *pos-test* Bonferroni. Legenda: **C**, Controle; **O**, Ovariectomizadas; **R**, Reposição; **H**, Hipoproteica; **O-H**, Hipoproteica Ovariectomizadas; **R-H**, Hipoproteica Reposição; **ns**: diferenças entre as médias dos grupos não foram significativas; $P < 0,05$ e $P < 0,0001$: diferenças entre as médias dos grupos foram significativas.

Perfil Hormonal

Este trabalho propôs avaliar os efeitos da nutrição e também da deficiência hormonal sobre parâmetros metabólicos e também alterações relacionadas à fisiologia da massa óssea. Assim, avaliou-se o perfil de determinados hormônios, que foi de especial importância para entender quais foram as possíveis modulações endócrinas que ocorreriam nos diferentes tratamentos.

A **Figura 9** apresenta os valores séricos dos seguintes hormônios analisados: hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), progesterona, estradiol, prolactina (PRL), leptina, hormônio de crescimento (GH) e hormônio tireoestimulante (TSH) dos diferentes grupos experimentais (**C**, **O**, **R**, **H**, **O-H** e **R-H**).

O LH e o FSH são hormônios gonadotróficos hipotalâmicos, que têm sua liberação inibida pelo estrógeno e progesterona, exercendo o controle pela retroalimentação negativa. Em animais não ovariectomizados, portanto, os valores de LH e FSH são baixos, devido ao estrógeno circulante, ao passo que nos animais ovariectomizados espera-se que a deficiência de estrógeno leve ao bloqueio da retroalimentação negativa, produzindo níveis aumentados destes hormônios.

Com relação aos valores séricos de LH, tanto a dieta hipoproteica quanto o estado (ovariectomia) foram significativos para produzir importante alteração significativa entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9A**). As médias do hormônio luteinizante dos grupos **O** e **R** foram significativamente maiores do que a média do grupo **C** ($P < 0,05$), e as médias dos grupos **O-H** e **R-H** foram significativamente maiores do que a média do grupo **H**. Além disto, as concentrações de LH dos grupos alimentados com dieta hipoproteica foram menores do que as médias dos grupos alimentados com dieta controle (**Figura 9A**).

Com relação aos valores séricos de FSH, novamente tanto a dieta hipoproteica quanto o estado induziram alterações significativas para as diferenças entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9B**). As concentrações médias de FSH dos grupos **O** e **R** foram significativamente maiores do que a média do grupo **C** ($P < 0,05$) e as médias de FSH dos grupos alimentados com dieta hipoproteica foram menores do que as médias dos grupos alimentados com dieta controle. Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas devido à alta distribuição dos valores dentro de cada grupo, a média de FSH sérico do grupo **O-H**

foi 28,8 vezes maior, e do grupo **R-H** foi 35,5 vezes maior que o grupo **H** (**Figura 9B**).

O fato dos valores de LH e FSH serem aumentados nos grupos ovariectomizados em relação aos não ovariectomizados demonstrou que o processo cirúrgico da ovariectomia foi preciso e que induziu ao estado caracterizado como menopausa, similar ao quadro das mulheres ao final do ciclo reprodutivo. O fato dos valores de LH e FSH continuarem aumentados nos animais tratados com estrógeno sugere que o tratamento com estrógeno exógeno, diferente da frequência de liberação fisiológica, não foi efetiva para realizar o controle de retroalimentação negativa (*feedback* negativo) sobre a adenohipófise ou ao nível hipotalâmico, como ocorreu nos grupos não ovariectomizados (**C** e **H**). Para ambos os hormônios, as médias dos grupos alimentados com dieta hipoproteica foram menores em relação aos controles, indicando que houve modulação dos hormônios sexuais por parte da dieta.

Com relação aos níveis de progesterona séricos, a dieta e a interação entre a dieta e o estado produziram diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9C**). A concentração de progesterona no grupo **O-H** foi significativamente maior do que as médias dos grupos **H**, **R-H** e **O** ($P < 0,05$), demonstrando que a interação entre a dieta hipoproteica e a ovariectomia promoveu aumento destes níveis.

Com relação aos níveis de estradiol séricos, a dieta hipoproteica, o estado e a interação entre estes dois fatores foram significativos para produzir diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9D**). A concentração de estradiol do grupo **R-H** foi significativamente maior do que os valores médios dos grupos **H**, **O-H** e **R** ($P < 0,05$). Como não houve diferença significativa entre as médias dos grupos **C** e **R**, o aumento significativo de **R-H** demonstrou que a dieta hipoproteica interagiu em determinado modo com a reposição hormonal, levando a este aumento. Os valores de estrógeno circulantes foram muito baixos para quase todos os grupos, com exceção de **R-H**, sugerindo, possivelmente, a atuação do fator idade para todas as fêmeas ou também fatores específicos do método de quantificação.

Também para os valores de PRL, a dieta hipoproteica e o estado foram significativos para produzir diferenças entre as médias de prolactina dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9E**). A concentração média de PRL do grupo **R** foi significativamente maior do que as médias dos grupos **C**, **O** e **R-H** ($P < 0,05$). Além

disso, as médias de PRL dos grupos alimentados com dieta hipoproteica foram menores do que as médias dos grupos alimentados com dieta controle.

A leptina é um hormônio liberado pelo tecido adiposo que atua no hipotálamo, modulando diversas funções metabólicas e endócrinas. Apesar de estar relacionado à quantidade de tecido adiposo, também tem sua liberação estimulada por estrógenos. Com relação aos níveis de leptina séricos, a dieta hipoproteica, o estado e a interação entre estes dois fatores mostraram ser efetivos em alterar significativamente as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9F**). A concentração de leptina do grupo **R** foi significativamente maior do que as concentrações médias dos grupos **C**, **O** e **R-H** ($P < 0,05$). A interação entre a reposição hormonal e a dieta hipoproteica deu-se na medida em que a média do grupo **R-H** não foi aumentada como a do grupo **R**, sendo semelhante às dos grupos **H** e **O-H**, indicando que a dieta influenciou a terapia de reposição hormonal.

O GH e o TSH são hormônios hipotalâmicos que modulam o metabolismo corporal do indivíduo. Níveis elevados de GH e diminuídos de TSH refletem um metabolismo mais ativo, ao passo que níveis diminuídos de GH e aumentados de TSH refletem metabolismo menos ativo. Assim, em relação aos níveis de GH séricos, o estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para a diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9G**). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos diferentes grupos, mas foi possível perceber que as médias dos animais ovariectomizados (**O** e **O-H**) foram menores em relação ao controle. Com relação aos níveis de TSH séricos, a dieta hipoproteica e o estado também mostraram efeitos significativos para alterar as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 9H**). A concentração média do TSH no grupo **O** foi significativamente maior do que as médias dos grupos **C** e **R** ($P < 0,05$) e o valor de TSH do grupo **H** foi significativamente menor do que nos grupos **C** e **O-H** ($P < 0,05$). Além disso, o TSH dos grupos alimentados com dieta hipoproteica foi menor que as dos grupos alimentados com dieta normoproteica.

Estes dados demonstraram que o metabolismo dos animais alimentados com dieta hipoproteica foi menos ativo do que nos animais alimentados com dieta normoproteica. Além disto, demonstrou que a ovariectomia promoveu metabolismo menos ativo e que a reposição hormonal (TRH) recuperou a atividade metabólica dos animais não ovariectomizados. Associada a dieta hipoproteica, porém, a

reposição hormonal melhorou o metabolismo, mas não foi efetiva quanto nos animais alimentados com dieta normoproteica.

Perfil Hormonal – Restrição Proteica

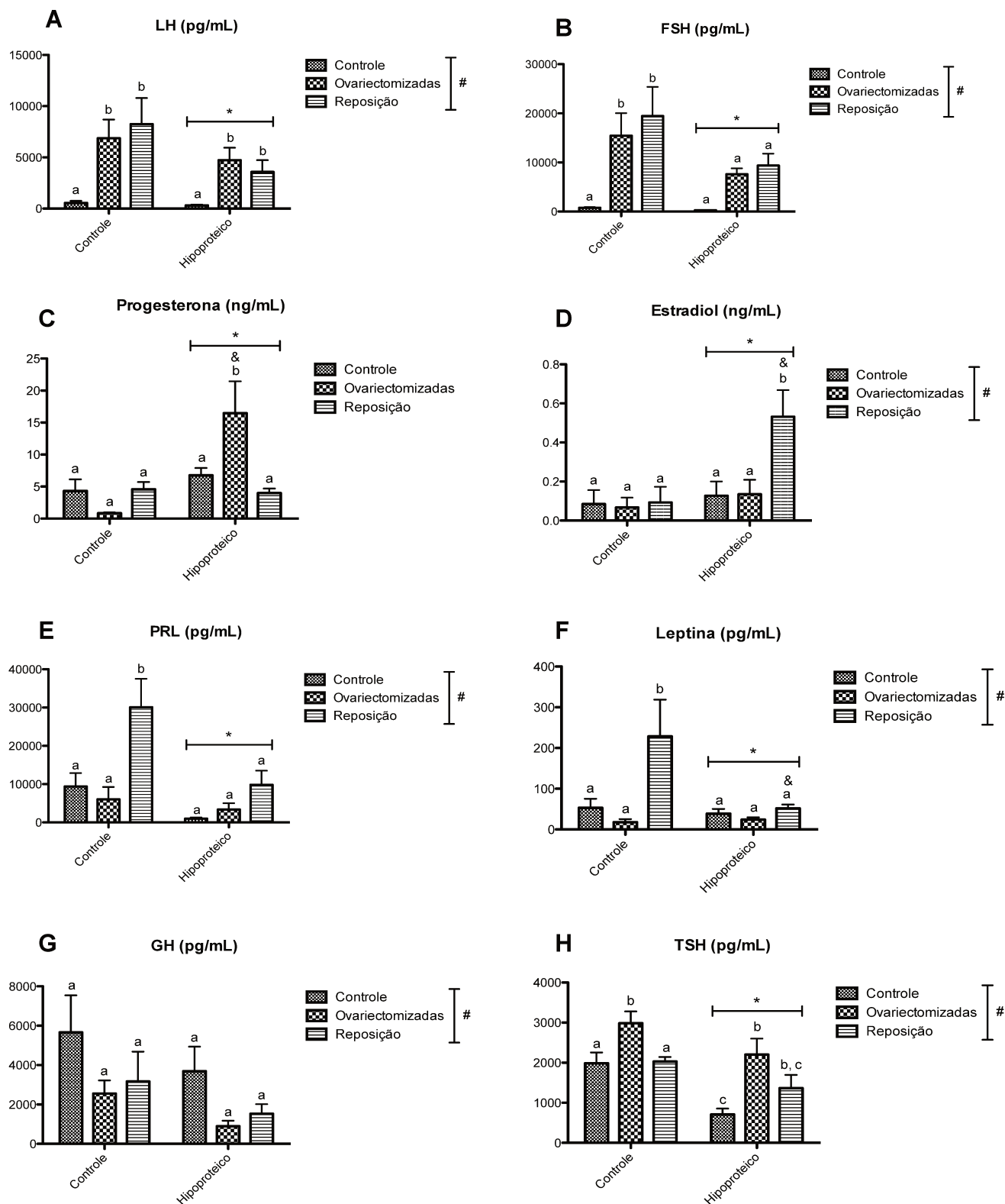


Figura 9. Perfil dos hormônios LH (A; pg/mL), FSH (B; pg/mL), Progesterona (C; pg/mL), Estradiol (D; ng/mL), PRL (E; ng/mL), Leptina (F; pg/mL), GH (G; pg/mL) e TSH (H; pg/mL) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento. (Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo ($p < 0,05$); &: A interação entre o estado e a dieta hipoproteica se mostrou significativa ($P < 0,05$); Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

A **Figura 10A** apresenta os valores séricos de insulina dos grupos **C**, **O**, **R**, **H**, **O-H** e **R-H**. Verificou-se que a dieta hipoproteica mostrou ser efetiva em produzir alteração significativa para as diferenças entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 10A**); os valores de insulina sérica nos grupos alimentados com dieta hipoproteica foram menores do que nos grupos alimentados com dieta controle. Confrontando com os valores de glicose séricos previamente apresentados na **Tabela 2**, pôde-se perceber relação inversa entre estes dois fatores, demonstrando que nos grupos onde a insulina estava diminuída e glicose sérica foi aumentada. Isto sugere que provavelmente houve resistência periférica à insulina nos grupos alimentados com dieta hipoproteica, particularmente no grupo **R-H**.

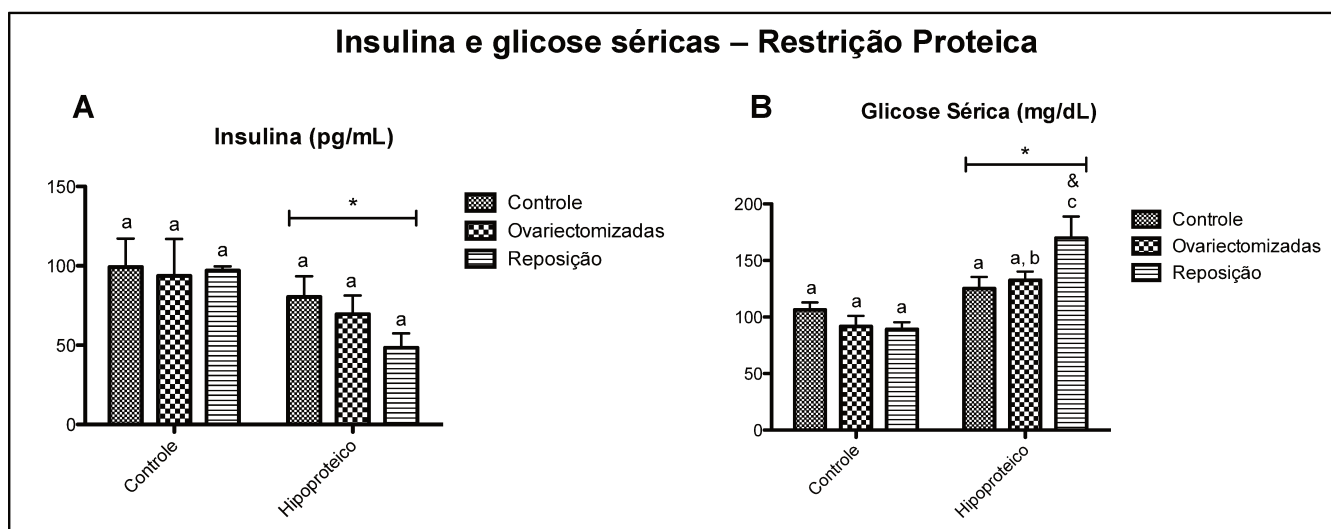


Figura 10. Concentrações de insulina (A; pg/mL) e de glicose (B; mg/mL) séricas dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento (Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); &: A interação entre o estado e a dieta hipoproteica foi significativa ($P < 0,05$); Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$)).

Resistência Mecânica Óssea

O ensaio de compressão realizado com os fêmures direito dos animais dos diferentes grupos experimentais permitiu avaliar propriedades mecânicas do osso que refletiram na sua resistência. Segundo a literatura, grupos ovariectomizados tendem a apresentar osteoporose e, portanto, ossos mais frágeis e de menor resistência mecânica, ao passo que o tratamento com reposição hormonal pode induzir melhora neste quadro, apresentando ossos menos frágeis e com resistência mecânica mais alta.

O ensaio de compressão mecânica consistiu em aplicar força constante sobre o material e avaliar o quanto de carga (energia) e tensão (energia/área) este material suportava. No primeiro momento, o material sofre deformação elástica, que corresponde à deformação não permanente, não alterando as características do material. Em seguida, o material atinge a força ou tensão de escoamento, a partir do qual entra em deformação plástica, ou seja, deformação permanente, até que ocorra a ruptura do material.

No presente estudo foram avaliados quatro aspectos relacionados à resistência mecânica a partir do ensaio de compressão: o diâmetro do osso, que se relaciona à área do osso; o módulo de elasticidade do osso, que reflete a rigidez intrínseca do osso e relaciona-se ao quanto de tensão o osso suporta antes de sofrer deformação permanente; a tensão de escoamento, que reflete o momento em que o osso deixa de sofrer deformação elástica e passa a sofrer deformações permanentes; e a tensão máxima, que reflete o máximo de tensão suportada pelo osso até o momento da sua ruptura.

Com relação ao diâmetro do osso, a dieta hipoproteica e o estado mostraram efeitos significativos em promover diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 11A**). Os diâmetros médios dos grupos **O** e **R** foram maiores do que a média do grupo **C** e as médias dos grupos **H**, **O-H** e **R-H** foram menores do que o diâmetro médio dos fêmures dos grupos **C**, **O** e **R**, respectivamente ($P < 0,05$).

Com relação ao módulo de elasticidade do osso, o estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para a diferença entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$ (**Figura 11B**), sendo que a média desse parâmetro no grupo **O-H** foi significativamente menor do que a média do grupo **H**.

Também com relação à tensão de escoamento do osso, que é a força de escoamento dividida pela área do osso, o estado ovariectomia/reposição hormonal promoveu alteração desse parâmetro, sendo significativo para a diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 11C**), sendo que a tensão média do grupo **O** foi significativamente menor que a média do grupo **C**.

Por fim, a tensão máxima suportada pelo osso não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos (**Figura 11D**).

Estes dados indicaram que a ovariectomia provocou resistência mecânica diminuída do osso, sugerindo quadro de osteoporose, simulando o mesmo quadro

de osteoporose menopáusica em mulheres. Além disto, estes dados demonstraram que a TRH contribuiu para modular a fragilidade óssea, não havendo diferenças significativas entre as médias dos grupos tratados com estrógeno e os grupos não ovariectomizados, mostrando de certo modo recuperação dos parâmetros observados, independente do tipo de dieta a que essas fêmeas foram submetidas.

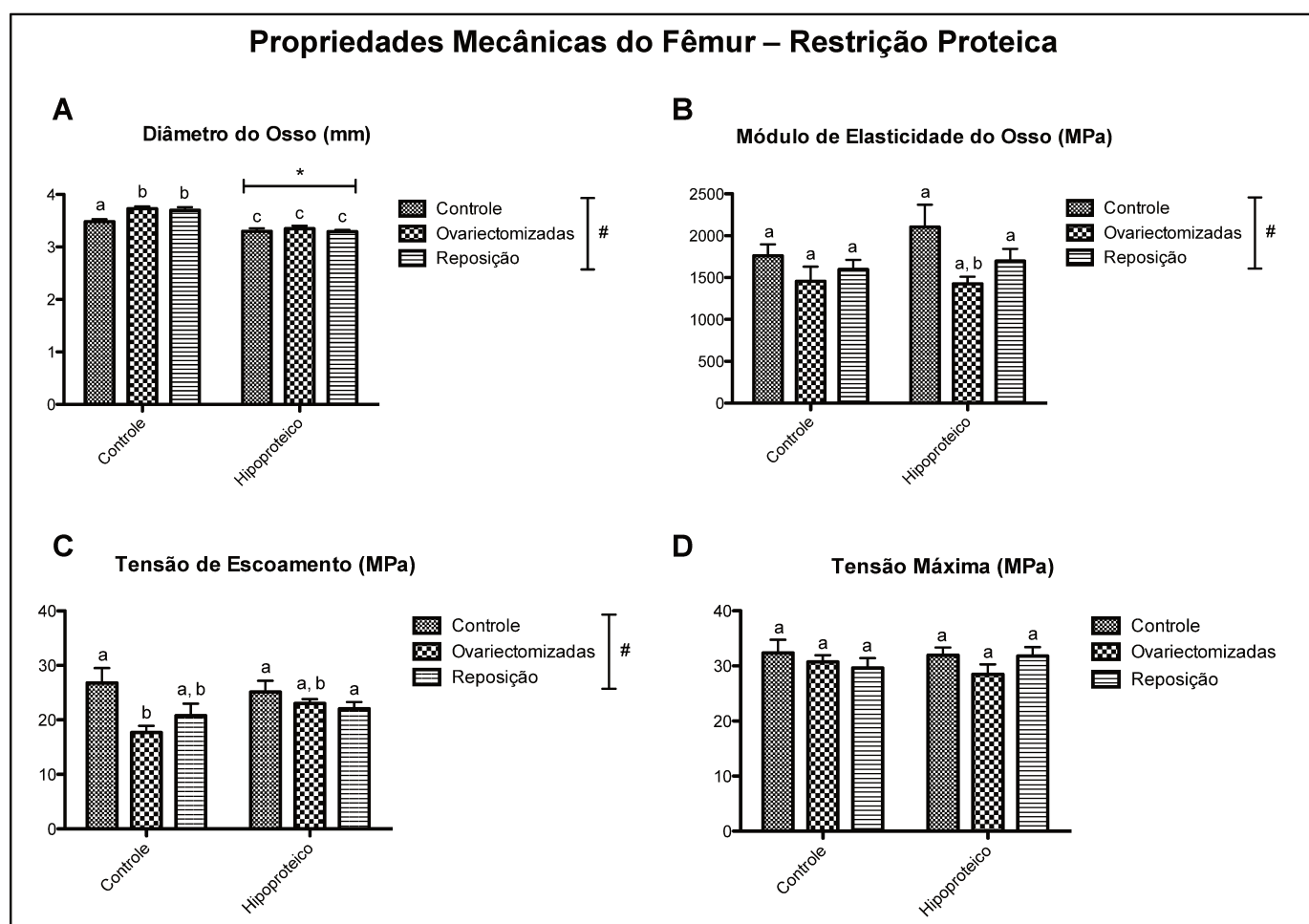


Figura 11. Propriedades mecânicas do fêmur: diâmetro do osso (**A**; mm), módulo de elasticidade do osso (**B**; MPa), tensão de escoamento do osso (**C**; MPa) e tensão máxima do osso (**D**; MPa) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e hipoproteica ao longo do experimento. (Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para $P < 0,05$); Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

4.2 Efeitos da Dieta Cafeteria sobre Ratas Wistar.

Como mencionado anteriormente, optamos por separar o presente trabalho em duas análises, relacionando-as ao prejuízo imposto pela má nutrição. Assim, nossos resultados referente aos animais submetidos à dieta de cafeteria mostraram alterações importantes quanto ao peso corpóreo, composição corpórea e parâmetros bioquímicos, quando comparados aos animais dos grupos controle, que receberam dieta normoproteica.

Evolução do Peso Corporal

A análise da evolução de peso corpóreo (**Figura 12 A e B**) mostrou que a evolução do peso absoluto e relativo dos animais dos grupos **C**, **O**, **R**, **CAF**, **O-CAF** e **R-CAF** ao longo do experimento foi crescente e progressiva. Avaliando-se o efeito da dieta cafeteria, foi possível observar que o peso absoluto dos grupos com a dieta foi menor no início do experimento em relação ao controle. Na segunda metade do experimento, o grupo **CAF** apresentou peso absoluto semelhante ao do grupo **C** (**Figura 12A**), e não apresentou variação importante nos grupos ovariectomizados com dieta (**O-CAF** e **R-CAF**; **Figura 12A**).

Com relação à análise do percentual de ganho de peso corpóreo em relação ao peso inicial (**Figura 12B**), foi possível observar que, a partir da ovariectomia (50 dias de idade), o ganho de peso relativo dos grupos **O-CAF** e **R-CAF** foi maior do que o do grupo **C** (**Figura 12B**). A partir do início da terapia de reposição hormonal (120 dias de idade), o peso relativo os grupos **O-CAF** e **R-CAF** foi muito maior do que o do grupo **CAF**. Isso demonstra que a dieta cafeteria possuiu efeito sobre o ganho de peso na presença da ovariectomia, e que a TRH modulou este quadro levando a estabilização do peso relativo do grupo **R-CAF** na segunda metade do experimento.

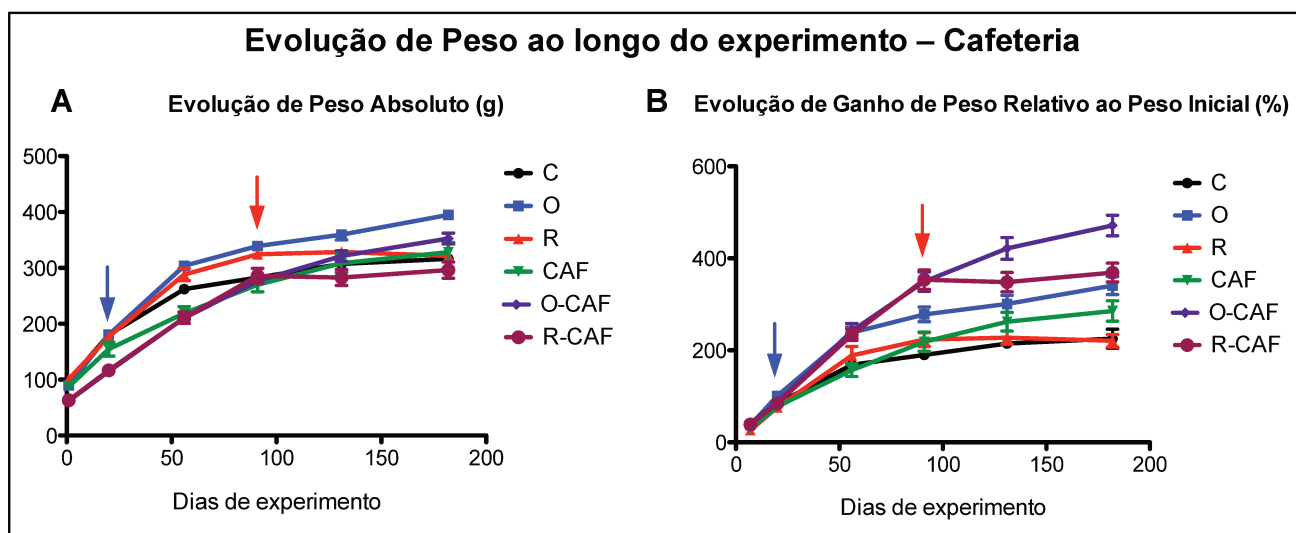


Figura 12. Evolução do peso absoluto (A; g) e do peso relativo (B; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento (Legenda: Seta azul: ovariectomia; Seta vermelha: início da reposição hormonal; C, Controle; O, Ovariectomizadas; R, Reposição; CAF, Cafeteria; O-CAF, Cafeteria Ovariectomizadas; R-CAF, Cafeteria Reposição).

Estes dados demonstraram que a deficiência hormonal provocada pela ovariectomia promoveu aumento no ganho de peso absoluto e relativo e que a TRH com estrógeno utilizada modulou este parâmetro, estabilizando este ganho de peso. Além disso, demonstrou que a dieta cafeteria afetou o crescimento normal dos indivíduos, além de influenciar a deficiência e a reposição hormonal.

Taxa Metabólica

A **Figura 13** apresenta a evolução das taxas metabólicas dos grupos cafeteria comparados aos grupos alimentados com dieta normoproteica (**CAF, O-CAF e R-CAF vs C, O, R**) ao longo dos meses de experimento, a partir de 3 mensurações, quando os animais tinham aproximadamente 80, 130 e 200 dias de idade. Os valores apresentados foram calculados como porcentagem em relação à medição inicial (80 dias).

A partir da análise da **Figura 13A**, foi possível observar que os animais do grupo **CAF** apresentaram média de taxa metabólica com 130 dias mais alta, apesar do alto valor para o desvio padrão da média. Os grupos **O-CAF** e **R-CAF** apresentaram taxa metabólica consideravelmente reduzida neste período (**Figura 13A**). Estes dados demonstraram que a dieta cafeteria modulou o metabolismo dos

indivíduos e que, na presença de ovariectomia, houve diminuição acentuada na atividade do metabolismo corporal.

Com relação à taxa metabólica final (200 dias de idade), a dieta cafeteria e o estado do animal (ovariectomizado ou ovariectomizado com reposição hormonal) mostraram ser efetivos produzindo diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 13B**). A média da taxa metabólica do grupo **R-CAF** foi significativamente menor em relação ao grupo **R** ($P < 0,05$), demonstrando que a reposição hormonal associada à dieta cafeteria (grupo **R-CAF**) não foi efetiva para manutenção da atividade do metabolismo como no grupo **R**.

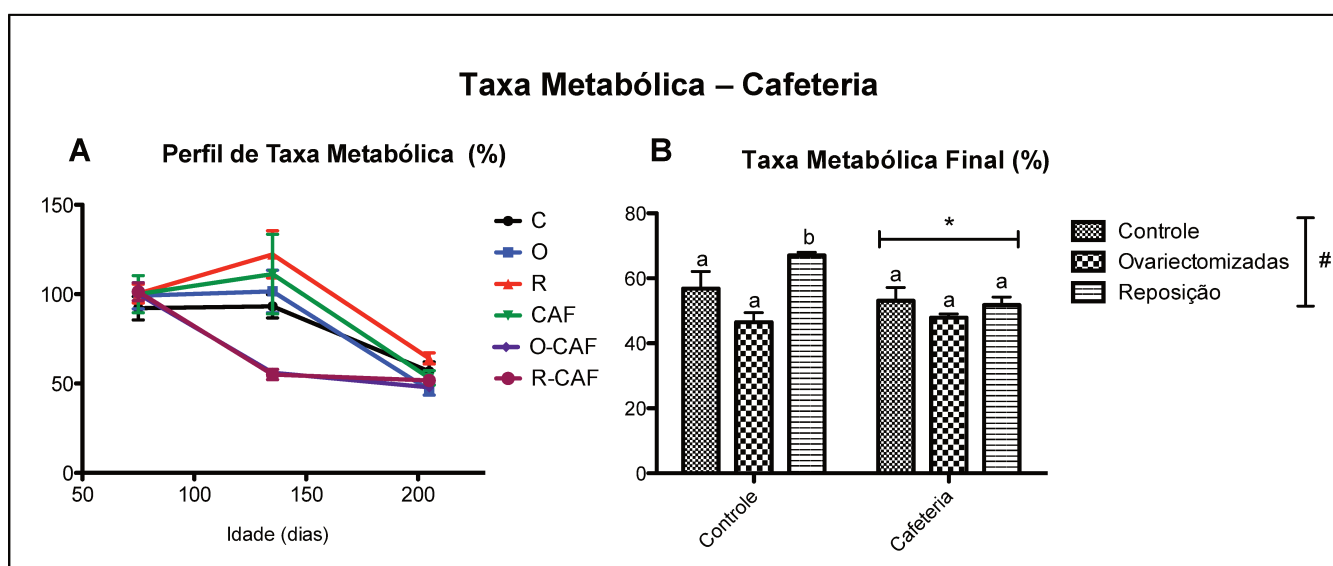


Figura 13. Evolução da taxa metabólica (**A**; %) e taxa metabólica final (**B**; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento (Legenda: **C**, Controle; **O**, Ovariectomizadas; **R**, Reposição; **CAF**, Cafeteria; **O-CAF**, Cafeteria Ovariectomizadas; **R-CAF**, Cafeteria Reposição; *: O fator dieta promoveu diferença significativa para $P < 0,05$; #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para $P < 0,05$; Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam significância estatística para $P < 0,05$).

Parâmetros morfométricos

A **Figura 14** apresenta os dados de parâmetros morfométricos avaliados no presente estudo, como ganho de peso relativo final, peso relativo do fêmur direito, músculo gastrocnêmio direito e fígado dos animais em relação ao peso corporal no momento da eutanásia dos grupos **C**, **O**, **R**, **CAF**, **O-CAF** e **R-CAF**.

Com relação ao ganho de peso relativo final, tanto a dieta cafeteria quanto o estado do animal mostraram-se significativos para produzir diferença entre as

médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 14A**). As médias dos grupos alimentados com dieta cafeteria foram maiores em relação aos alimentados com dieta controle, sendo que as médias dos grupos **O-CAF** e **R-CAF** foram significativamente maiores que as dos grupos **O** e **R**, respectivamente ($P < 0,05$). Além disso, o grupo **O-CAF** apresentou maior média de ganho de peso final em relação ao grupo **CAF** ($P < 0,05$), e o grupo **R-CAF** apresentou média significativamente menor que a do grupo **O-CAF** ($P < 0,05$; **Figura 14A**). Estes dados demonstraram que a ovariectomia associada a dieta cafeteria produziu efeito significativo aumentando o ganho de peso; porém a associação da reposição hormonal com dieta cafeteria não contribuiu tanto para melhorar esse quadro, como observado nos animais controles com reposição.

Com relação ao peso relativo do fêmur, (**Figura 14B**), as médias do grupo **R-CAF** foram significativamente maiores que as médias dos grupos **O-CAF**, ($P < 0,05$), demonstrando que a TRH atuou de forma positiva sobre a massa óssea. Além disso, as médias dos grupos **CAF**, **O-CAF** e **R-CAF** foram significativamente menores que as médias dos grupos **C**, **O** e **R**, respectivamente, demonstrando que a dieta cafeteria apresentou efeito negativo sobre a massa óssea, levando à diminuição desta em todos os estados.

Com relação ao peso relativo do músculo, tanto a dieta cafeteria quanto o estado do animal foram significativos para alterar as médias entre os diferentes grupos ($P < 0,05$), sendo que os animais alimentados com dieta cafeteria apresentaram médias menores do que os animais alimentados com dieta controle (**Figura 14C**). Além disso, apesar de não haver diferenças significativas entre as médias de cada grupo, percebeu-se que os pesos relativos musculares dos grupos com TRH foram maiores em relação às médias dos grupos ovariectomizados (**Figura 14C**). Estes dados demonstraram que houve efeito do estado do animal sobre o ganho e a manutenção da massa magra muscular e que a dieta cafeteria prejudicou este parâmetro.

Com relação ao peso relativo do fígado, tanto a dieta cafeteria quanto o estado produziram diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 14D**). Os animais alimentados com a dieta cafeteria apresentaram médias menores em relação aos animais alimentados com dieta controle. Além disso, o grupo **O-CAF** apresentou média do peso hepático menor do que os grupos **CAF** e **R-CAF** ($P < 0,05$; **Figura 14D**). Estes dados demonstraram que a dieta

cafeteria prejudicou o metabolismo hepático dos animais e que a ovariectomia associada com a dieta possui efeito negativo ainda mais marcante. Além disso, demonstrou que a reposição hormonal associada a dieta cafeteria foi efetiva para melhorar este parâmetro em relação aos animais com dieta controle.

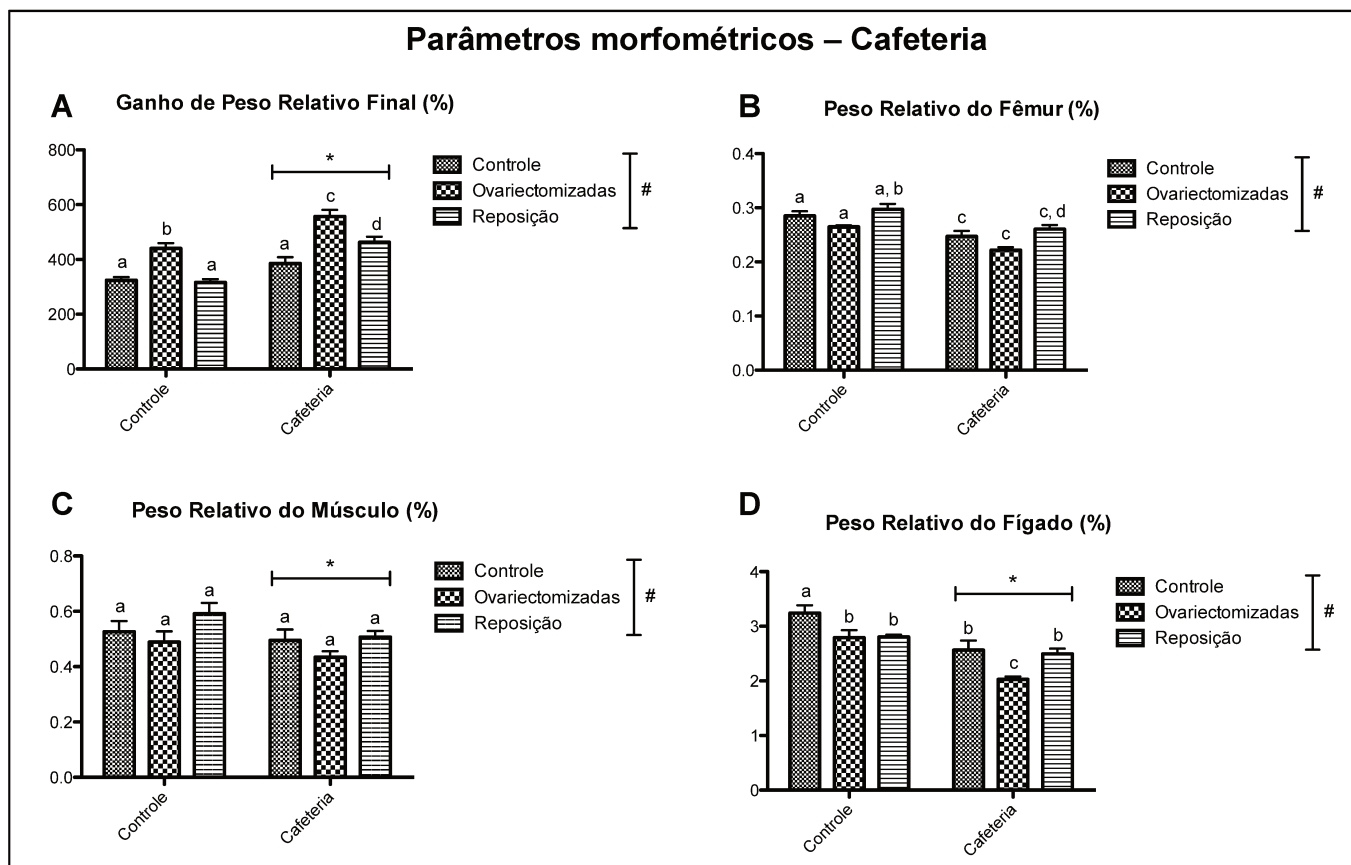


Figura 14. Parâmetros morfométricos: Ganho de peso relativo final (**A**; %), peso relativo do fêmur direito (**B**; %), músculo gastrocnêmio direito (**C**; %) e fígado (**D**; %) em relação ao peso corporal dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento. Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo ($P < 0,05$); Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam significância estatística para $P < 0,05$.

Composição corpórea

A **Figura 15** apresenta a composição corpórea dos diferentes grupos alimentados com dieta cafeteria em comparação aos normoproteicos (C, O, R, CAF, O-CAF e R-CAF).

Com relação à massa óssea, a dieta cafeteria e o estado do animal mostraram-se significativos em promover a diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 15A**). Os animais alimentados com dieta cafeteria

apresentaram médias menores do que os animais alimentados com dieta controle (**Figura 15A**), demonstrando que a dieta cafeteria afetou negativamente a manutenção da massa óssea. Além disto, a média do grupo **R-CAF** foi significativamente menor do que a média do grupo **R** ($P<0,05$; **Figura 15A**), indicando que a reposição hormonal associada à dieta cafeteria não promoveu benefícios em relação à manutenção da massa óssea.

Também com relação à densidade óssea, tanto a dieta cafeteria quanto o estado do animal foram significativos para produzir diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P<0,05$; **Figura 15B**). As médias da densidade óssea dos animais alimentados com dieta cafeteria foram menores do que as dos animais alimentados com dieta controle (**Figura 15B**), mostrando que a dieta cafeteria afetou negativamente a densidade óssea. Além disto, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas entre as médias de cada grupo, observou-se que associado a dieta cafeteria, como esperado, as médias dos animais ovariectomizados foram menores em relação aos animais não ovariectomizados e que os animais com TRH apresentaram médias levemente maiores de densidade óssea do que os ovariectomizados, mas ainda assim menores que as dos não castrados.

Com relação à porcentagem de gordura corporal, a dieta cafeteria foi efetiva em alterar significativamente as médias dos diferentes grupos ($P<0,05$; **Figura 15C**), sendo que a gordura corporal dos animais alimentados com dieta cafeteria foi maior do que nos animais alimentados com dieta controle. Além disto, apesar de não haver diferenças estatísticas entre as médias de cada grupo, a porcentagem de gordura corporal dos animais ovariectomizados se mostrou maior que a dos não ovariectomizados, enquanto as médias dos grupos **CAF** e **R-CAF** foram muito próximas aos grupos alimentados com dieta controle (**C** e **R**). Isto demonstrou que a ovariectomia promoveu aumento da proporção de tecido adiposo em relação ao tecido muscular e que a reposição hormonal melhorou esta proporção, em ambas as dietas.

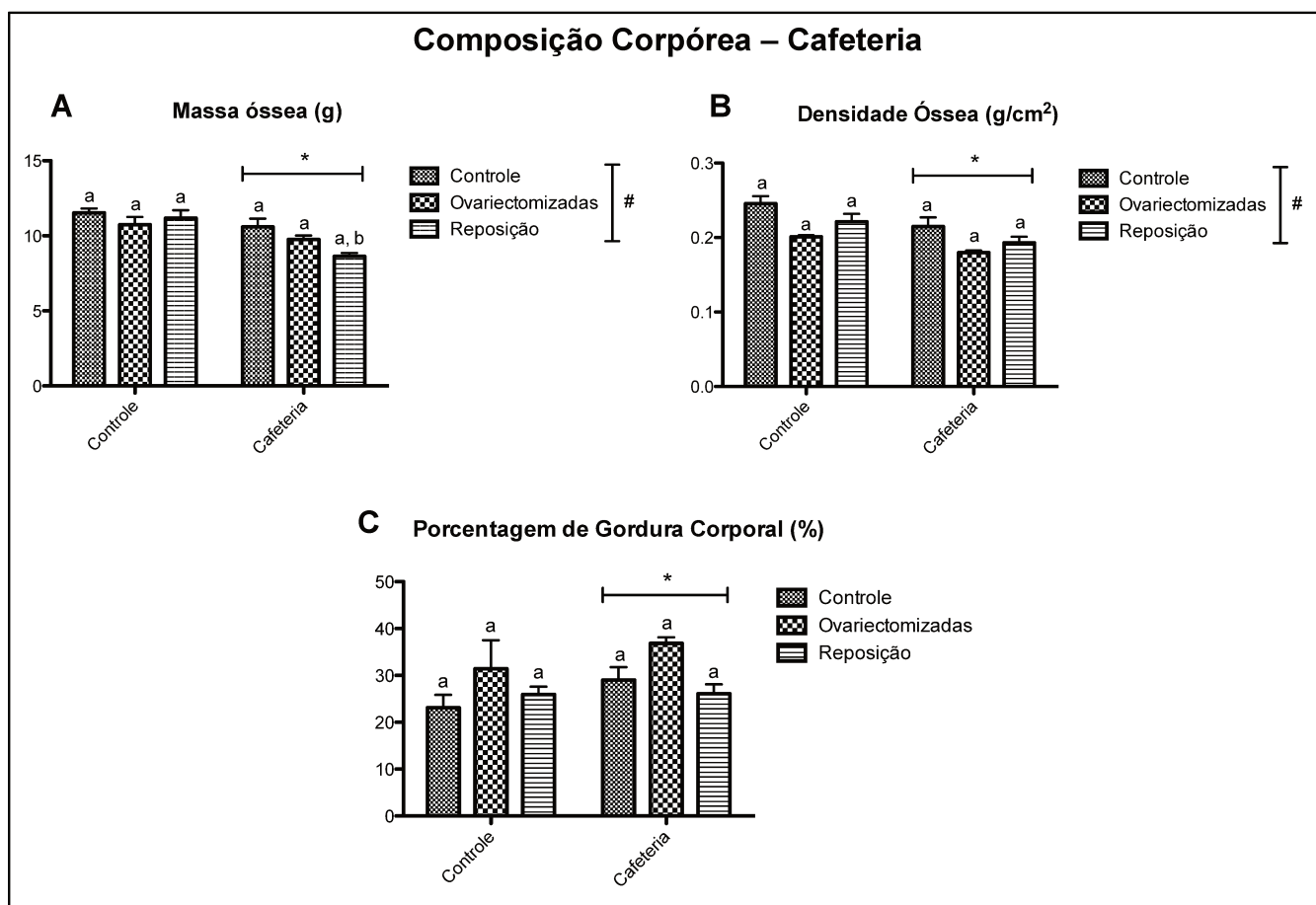


Figura 15. Composição corpórea: massa óssea (**A**; g), densidade óssea (**B**; g/cm²) e porcentagem de gordura corporal (**C**; %) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento. Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa para $P < 0,05$; #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para $P < 0,05$; Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Análises Bioquímicas

Semelhantemente ao que foi avaliado na primeira parte desse trabalho, a análise de parâmetros bioquímicos podem ajudar a compreender melhor alguns efeitos dos diferentes tratamentos, neste caso da dieta cafeteria, sobre o metabolismo dos animais.

A **Tabela 3** apresenta os dados de proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, cálcio e glicose séricos dos grupos cafeteria **CAF**, **O-CAF** e **R-CAF**, em relação aos grupos normoproteicos.

Com relação aos valores de proteínas totais séricas, tanto o estado do animal quanto a interação entre o estado e a dieta cafeteria foram significativos em alterar

as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$ (**Tabela 3**). A proteína total do grupo **CAF** foi significativamente maior o que as médias dos grupo **C**, **O-CAF** e **R-CAF** ($P < 0,05$), demonstrando que a dieta cafeteria promoveu aumento do nível de proteínas totais nos animais não ovariectomizados, não se observando o mesmo padrão para os animais ovariectomizados.

Para os valores de albumina sérica, também observou-se que o estado do animal e a interação entre o estado e a dieta cafeteria mostraram-se significativos para proporcionar diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Tabela 3**). A concentração de albumina do grupo **O-CAF** foi menor em relação à média do grupo **CAF** ($P < 0,05$).

Estes dados indicaram que a dieta cafeteria associada à ovariectomia possuiu efeito sobre a concentração de proteínas totais e albumina séricos, e que a associação com a reposição hormonal melhorou esta condição, modulando estes parâmetros.

Com relação ao colesterol total sérico, a interação entre o estado e a dieta cafeteria foi efetiva em promover significativa diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Tabela 3**), sendo que a concentração média de colesterol do grupo **CAF** foi significativamente maior que a do grupo **C** ($P < 0,05$).

Os valores de triacilgliceróis séricos foram influenciados pela dieta cafeteria, o estado (ovariectomia/reposição hormonal) e a interação entre estes dois fatores (diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$, $P < 0,0001$ e $P < 0,05$, respectivamente; **Tabela 3**). A média da concentração de triacilgliceróis do grupo **O-CAF** foi significativamente menor que a média de **CAF** ($P < 0,05$). Além disso, o grupo **R-CAF** apresentou média significativamente menor que o grupo **R**. A interação do estado com a dieta deu-se no grupo **R-CAF**, no qual o fator estado aumentaria sua média para valor de triacilgliceróis semelhante ao **R** se não houvesse a influência do fator dieta. Desta forma, a interação entre a reposição hormonal com a dieta cafeteria promoveu menor média de **R-CAF** em relação a **R** ($P < 0,05$), não sendo diferente da média do grupo **O-CAF**. Estes dados demonstraram que a associação entre dieta cafeteria e ovariectomia influenciou o metabolismo de lipídeos dos animais e que essa associação com reposição hormonal também possuiu efeito modulatório sobre este quadro.

Com relação aos valores de cálcio sérico, a interação entre o estado e a dieta cafeteria foi efetiva em produzir diferença entre as médias dos diferentes grupos

para $P < 0,05$ (**Tabela 3**), sendo que a concentração média de cálcio sérico do grupo **CAF** foi significativamente maior que as médias dos grupos **C**, **O-CAF** e **R-CAF** ($P < 0,05$). Esses dados podem sugerir que possivelmente houve alteração na homeostase do cálcio, principalmente pelo efeito da dieta cafeteria caracterizada por alimentação rica em carboidratos e gorduras saturadas associada à bebida gaseificada.

Os valores de glicose sérica também sofreram influência do efeito da dieta cafeteria, sendo significativa para produzir diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Tabela 3**). A glicemia dos grupos alimentados com dieta cafeteria foram maiores do que as dos grupos alimentados com dieta controle, sendo que a média do grupo **O-CAF** foi significativamente maior que a do grupo **O** ($P < 0,05$). Estes dados demonstraram que a dieta cafeteria induziu alterações no metabolismo de carboidratos, aumentando a disponibilidade de glicose sérica circulante, na medida em que possui maior teor de carboidratos em relação à normoproteica. Além disto, demonstrou que a associação da dieta cafeteria com a ovariectomia aumentou esta glicemia, e que a TRH não melhorou este quadro.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos (proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, cálcio e glicose séricos) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento:

Parâmetros Séricos	C	O	R	CAF	O-CAF	R-CAF	Two-Way ANOVA		
							Interação	Estado	Dieta
Proteínas Totais (g/dL)	7,84 ± 1,00	7,75 ± 1,22	8,55 ± 0,79	9,36 ± 0,84	7,25 ± 0,71	8,09 ± 0,62	$P < 0,05$	$P < 0,05$	ns
Albumina (g/dL)	1,44 ± 0,15	1,36 ± 0,15	1,57 ± 0,10	1,61 ± 0,13	1,27 ± 0,15	1,41 ± 0,07	$P < 0,05$	$P < 0,05$	ns
Colesterol Total (mg/dL)	87,91 ± 9,90	108,40 ± 21,30	89,48 ± 8,08	118,70 ± 29,29	101,60 ± 11,11	95,97 ± 19,38	$P < 0,05$	ns	ns
Triacilgliceróis (mg/dL)	17,83 ± 1,10	14,41 ± 0,92	19,13 ± 1,30	17,37 ± 2,06	14,34 ± 1,41	15,70 ± 1,47	$P < 0,05$	$P < 0,0001$	$P < 0,05$
Cálcio (mg/dL)	11,14 ± 1,27	11,94 ± 1,40	12,11 ± 0,93	13,51 ± 0,74	11,39 ± 0,77	11,60 ± 0,47	$P < 0,05$	ns	ns
Glicose (mg/dL)	118,70 ± 32,08	90,52 ± 21,52	90,08 ± 16,84	123,90 ± 30,87	127,90 ± 15,05	115,00 ± 31,33	ns	ns	$P < 0,05$

Resultados apresentados como médias e desvios padrões das médias, analisados através de análise de variâncias por *two-way* ANOVA, seguido de *pos-test* Bonferroni. Legenda: **C**, Controle; **O**, Ovariectomizadas; **R**, Reposição; **CAF**, Cafeteria; **O-CAF**, Cafeteria Ovariectomizadas; **R-CAF**, Cafeteria Reposição; **ns**: diferenças entre as médias dos grupos não foram significativas; $P < 0,05$ e $P < 0,0001$: diferenças significativas entre as médias dos grupos.

Perfil Hormonal

A **Figura 16** apresenta os valores séricos dos seguintes hormônios analisados, como hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), progesterona, estradiol, prolactina (PRL), leptina, corticosterona e hormônio tireoestimulante (TSH) dos diferentes grupos cafeteria (**CAF**, **O-CAF** e **R-CAF**), comparados com os normoproteicos.

Os valores séricos de LH foram influenciados pela ovariectomia e reposição hormonal (diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$; **Figura 16A**). As concentrações médias de LH do grupo **O-CAF** foi significativamente maior do que a média do grupo **CAF** ($P < 0,05$; **Figura 16A**).

Com relação aos valores séricos de FSH, novamente o estado foi efetivo em influenciar as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 16B**). A concentração de FSH do grupo **O-CAF** foi maior do que a média do grupo **CAF** ($P < 0,05$; **Figura 16B**). Além disso, a concentração média dessa gonadotrofina no grupo **R-CAF** foi significativamente menor que a média do grupo **R**, indicando influência da dieta cafeteria na reposição hormonal.

Novamente, o procedimento cirúrgico da ovariectomia foi efetivo promovendo o aumento dos valores de LH e FSH, induzindo o estado caracterizado como menopausa, similar às mulheres.

Com relação aos níveis de progesterona séricos, a dieta cafeteria foi efetiva na diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 16C**). As concentrações médias de progesterona dos animais alimentados com dieta cafeteria foram maiores em relação às médias dos animais alimentados com dieta normoproteica, sendo significativamente maior no grupo **CAF** do que as médias dos grupos **C** e **R-CAF** ($P < 0,05$) e a média do grupo **O-CAF** significativamente maior que a média do grupo **O** ($P < 0,05$; **Figura 16C**). Estes dados demonstraram efeito bastante importante da dieta cafeteria aumentando os níveis de progesterona, que foram diminuídos quando associados à reposição hormonal.

Os níveis de estradiol séricos foram alterados pelo fator dieta cafeteria (diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$; **Figura 16D**). Apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, as médias do grupo **CAF** (0,1343 ng/mL) foi semelhante aos grupos **C** (0,1229 ng/mL) e **R** (0,1850 ng/mL), ao passo que média do grupo **O-CAF** (0,3083 ng/mL) e **R-CAF**

(0,4183 ng/mL) foram aproximadamente 5 vezes maiores que o grupo **O** (0,0650 ng/mL). Isto demonstrou que houve queda no estrógeno dos animais controle ovariectomizados que não foi observada nos animais controles com TRH. Porém, contrariamente ao esperado, os animais ovariectomizados com dieta cafeteria apresentaram valores aumentados de estrógeno, que foram elevados ainda mais com a reposição hormonal. Estes dados da elevação de estrógenos e progesterona foram possivelmente decorrentes de aromatização periférica principalmente pelo tecido adiposo, aumentado nestes animais.

Para os valores de PRL, o estado e a interação entre o estado e a dieta cafeteria induziram alterações nas médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 16E**). A concentração de PRL do grupo **R-CAF** foi significativamente menor do que as médias dos grupos **C**, **O** e **R** ($P < 0,05$). A interação entre os fatores não promoveu recuperação da concentração de PRL no grupo **R-CAF** como verificada em **R** (**Figura 16E**). Estes dados demonstraram que a reposição hormonal promoveu aumento da PRL circulante, porém a associação com a dieta cafeteria modulou o sistema endócrino.

A concentração de leptina foi significativamente influenciada pela dieta cafeteria e o estado – ovariectomia/reposição hormonal – (diferença significativamente entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$; **Figura 16F**). A média do grupo **R-CAF** foi significativamente menor do que as médias dos grupos **C**, **O** e **R** ($P < 0,05$).

Com relação aos níveis de GH séricos, não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos (**Figura 16G**).

A concentração de TSH séricos foi alterada pelo fator estado – ovariectomia/reposição hormonal – com diferença significativa entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$ (**Figura 16H**). A média do grupo **O-CAF** foi significativamente menor do que as médias dos grupos **CAF** e **R-CAF** ($P < 0,05$). Estes dados demonstraram que a ovariectomia promoveu metabolismo menos ativo e que a reposição hormonal recuperou o nível do metabolismo dos animais não ovariectomizados, independente da dieta.

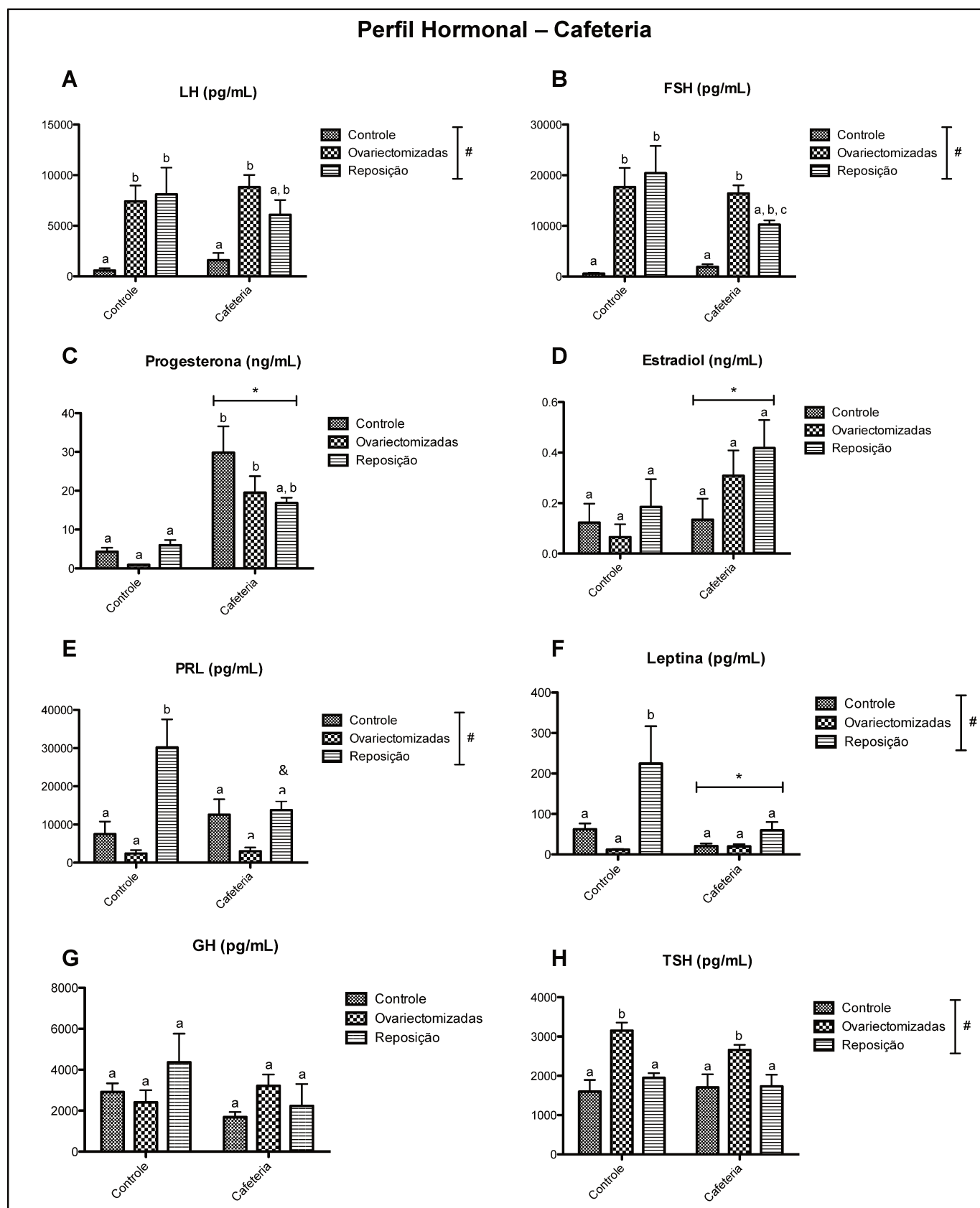


Figura 16. Perfil dos hormônios LH (A; pg/mL), FSH (B; pg/mL), Progesterona (C; pg/mL), Estradiol (D; ng/mL), PRL (E; ng/mL), Leptina (F; pg/mL), GH (G; pg/mL) e TSH (H; pg/mL) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento. (Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo ($p < 0,05$); &: A interação entre o estado e a dieta hipoproteica se mostrou significativa ($P < 0,05$); Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

A **Figura 17A** apresenta os valores séricos de insulina dos grupos cafeteria (**CAF**, **O-CAF** e **R-CAF**) comparados com os grupos normoproteicos. Para estes valores, o estado – ovariectomia/reposição hormonal – e a interação entre o estado e a dieta mostraram ser significativos para produzir diferenças entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 17A**), sendo a concentração média de insulina do grupo **CAF** significativamente maior que as médias dos grupos **O-CAF** e **R-CAF**. A interação dos fatores deu-se na medida em que houve diferença entre **CAF** e **O-CAF** não observada nos grupos controles, indicando que a dieta cafeteria influenciou o estado dos animais para este parâmetro.

Além disto, quando analisamos os valores de glicose séricos previamente apresentados na **Tabela 3**, pôde-se perceber relação inversa entre estes dois fatores, demonstrando que a glicose sérica aumentada estava relacionada com a insulina diminuída para os grupos **O-CAF** e **R-CAF** (**Figura 17B**). De forma similar ao exposto para os outros grupos estudados nesse trabalho, esses resultados sugerem resistência periférica à insulina neste grupo alimentado com dieta cafeteria. Para o grupo **CAF**, o padrão foi elevada insulina associada à elevada glicemia, sugerindo então eficiência na captação de glicose provavelmente pelos tecidos periféricos, confirmando assim o aumento da massa de tecido adiposo observado nessas fêmeas.

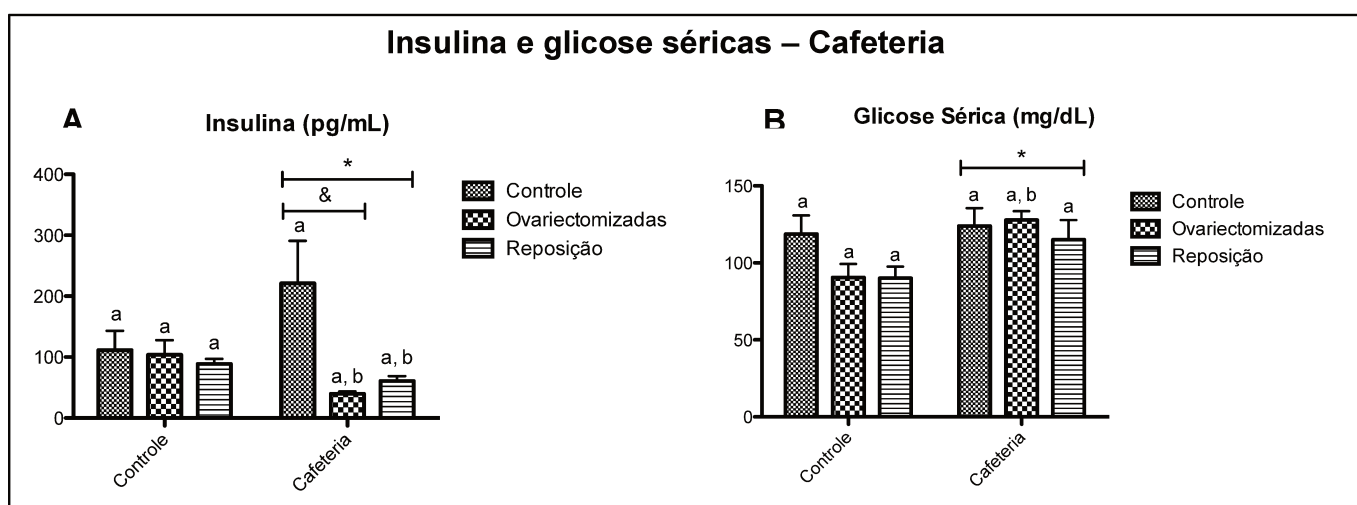


Figura 17. Concentrações séricas do hormônio insulina (A; pg/mL) e de glicose (B; pg/mL) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento (Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); &: A interação entre o estado e a dieta hipoproteica se mostrou significativa ($P < 0,05$); Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Resistência Mecânica Óssea

Como explicado na primeira parte deste trabalho, o ensaio de compressão realizado com os fêmures direito dos animais dos diferentes grupos experimentais permite avaliar propriedades mecânicas do osso que refletem a sua resistência.

Com relação ao diâmetro do osso, a dieta cafeteria mostrou ser efetiva em produzir diferença entre as médias dos diferentes grupos para $p < 0,05$; **Figura 18A**), sendo que essas médias dos grupos **CAF**, **O-CAF** e **R-CAF** foram significativamente menores do que as médias dos grupos **C**, **O** e **R**, respectivamente ($P < 0,05$).

O módulo de elasticidade do osso, que reflete a rigidez intrínseca do osso, relacionado à tensão que o osso suporta antes de sofrer ruptura, foi influenciado pelo estado – ovariectomia/reposição hormonal dessas fêmeas (diferença entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$; **Figura 18B**), sendo que a média da elasticidade do osso no grupo **O-CAF** foi significativamente menor do que a média do grupo **CAF**.

Por outro lado, a tensão de escoamento do osso, quando não há mais deformação elástica e o osso passa a sofrer deformações permanentes, não foi influenciada pelo fator dieta cafeteria. Embora o perfil do gráfico tenha mostrado média para o grupo **O-CAF** semelhante à média do grupo **CAF**, esses valores foram semelhantes ao grupo **O**, onde, para esse grupo, a tensão de escoamento mostrou ser influenciada pela castração e reposição hormonal (diferença entre as médias dos diferentes grupos para $P < 0,05$; **Figura 18C**).

Por fim, a tensão máxima suportada pelo osso, que reflete o momento da sua ruptura, mostrou que o estado – ovariectomia/reposição hormonal – associado à dieta cafeteria foi significativo para promover diferença entre as médias dos diferentes grupos ($P < 0,05$; **Figura 18D**), sendo que a média desse parâmetro no grupo **O-CAF** foi significativamente menor que a média do grupo **CAF**.

Todos estes dados indicaram que a ovariectomia promoveu resistência mecânica diminuída do osso, indicando quadro de osteoporose e simulando a osteoporose menopáusica em mulheres. Além disso, a dieta de cafeteria proporcionou influência negativa sobre a resistência óssea, principalmente sobre o diâmetro do osso, módulo de elasticidade do osso e sobre a tensão máxima, possivelmente em função do desbalanço da homeostase óssea decorrente da

associação de alimentação rica em energia e gorduras ao consumo de bebidas gaseificadas. Observou-se, também, que a reposição hormonal contribuiu para minimizar a fragilidade óssea, pois não houve diferenças significativas entre as médias dos grupos tratados com estrógeno e os grupos não ovariectomizados para os parâmetros observados, mas de forma menos efetiva quando associada à dieta cafeteria.

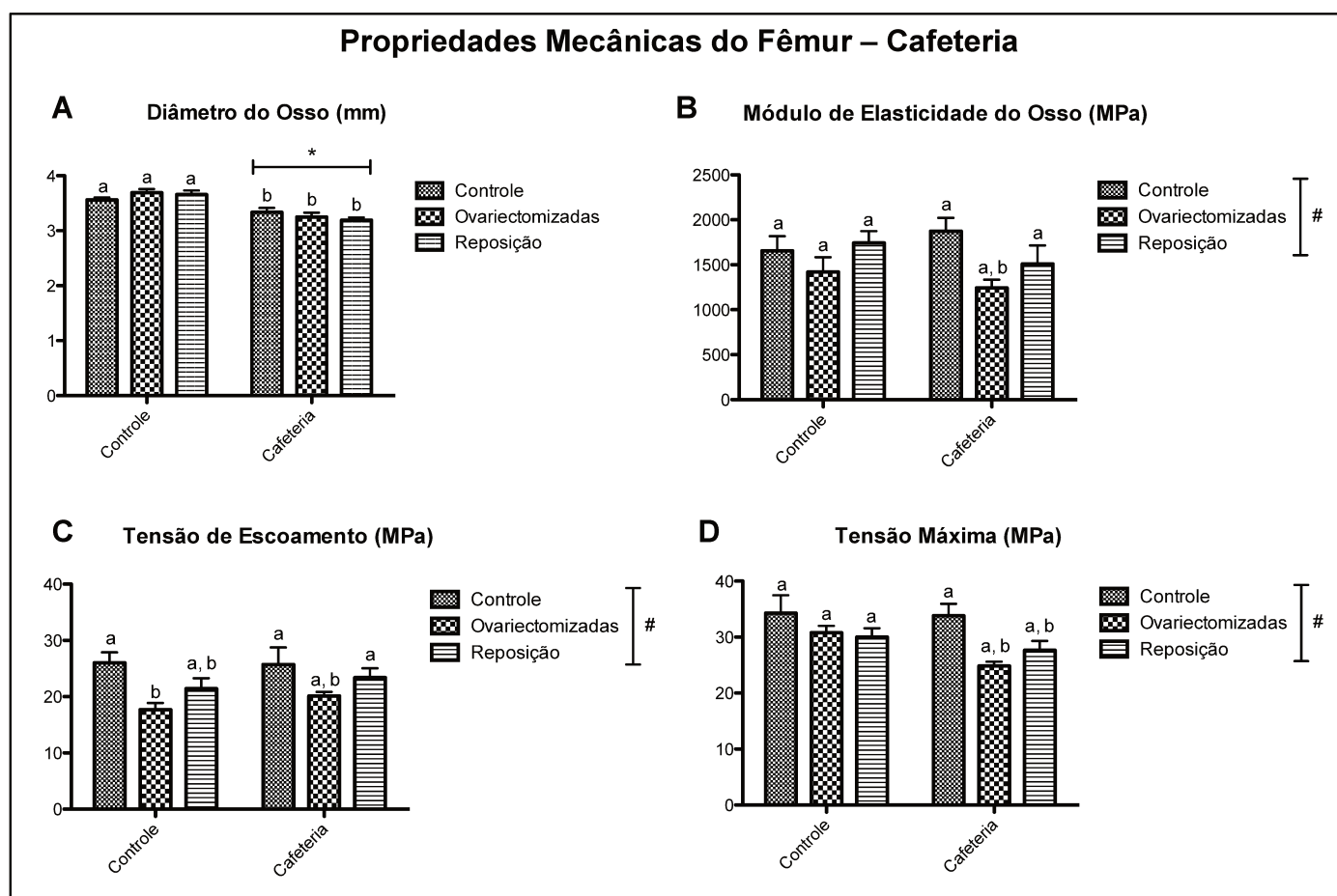


Figura 18. Propriedades mecânicas do fêmur: diâmetro do osso (A; mm), módulo de elasticidade do osso (B; MPa), tensão de escoamento do osso (C; MPa) e tensão máxima do osso (D; MPa) dos diferentes grupos experimentais submetidos às dietas normoproteica e cafeteria ao longo do experimento. (Legenda: *: O fator dieta promoveu diferença significativa ($P < 0,05$); #: O estado ovariectomia/reposição hormonal mostrou ser efetivo na alteração desse parâmetro, sendo significativo para $p < 0,05$. Letras iguais representam médias semelhantes e letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

5. Discussão

Nossos resultados indicaram que a ovariectomia realizada nas ratas foi efetiva e provocou deficiência de estrógeno, simulando a menopausa. Esta foi caracterizada, nesse experimento, pela atrofia do útero e pelo aumento significativo dos hormônios LH e FSH, indicando que os animais sem ovário não produziram estrógeno e progesterona para inibir, por *feedback* negativo, a secreção de LH e FSH pela adenohipófise. Além disso, a atrofia do útero relaciona-se a trabalhos na literatura nos quais também verificaram atrofia dos cornos uterinos (Wronski et al. 1989) e o peso do útero dos animais ovariectomizados foi significativamente menor que o dos animais controles (Barsalani et al. 2008; Liu et al. 2004; Zoth et al. 2010; Saengsirisuwan et al. 2009; Paquette et al. 2007; Latour et al. 2001), indicando a efetividade da deficiência dos hormônios sexuais, que atuam mantendo as características morfológicas e funcionais deste órgão. A **Figura 19** apresenta resumo dos principais resultados referentes à ovariectomia e reposição hormonal em animais alimentados com dieta normoproteica; estão representados os principais tecidos alvo dos hormônios ovarianos e também o controle do eixo hipotálamo-adenohipófise-ovário quanto a liberação dos hormônios gonadotróficos – LH e FSH – que estimulam o ovário a secretar estrógeno, e esse por sua vez atua por *feedback* negativo controlando a sua concentração sanguínea.

Assim, como verificado no presente trabalho, a ovariectomia provocou aumento de ganho de peso e da porcentagem de gordura corporal. O aumento de ganho de peso corporal e de adiposidade em ratas ovariectomizadas é extensamente demonstrado na literatura (Kimura et al. 2002; Liu et al. 2004; Saengsirisuwan et al. 2009; Paquette et al. 2007; Zoth et al. 2010; Vasconcellos et al. 2004; Mauvais-Jarvis et al. 2013; Latour et al. 2001), sendo atribuídos em parte à hiperfagia, mas principalmente à deficiência de estrógeno, que possui papel regular importante na manutenção dos depósitos de gordura e da homeostase energética do organismo (Vasconcellos et al. 2004; Liu et al. 2004; Kimura et al. 2002; Mauvais-Jarvis et al. 2013). Embora a atuação do estrógeno direcione para o estoque de gordura, há também o aumento do dispêndio energético e com isso balanço dos estoques de gordura; assim, com a ausência do estrógeno na menopausa, há o direcionamento para o aumento da porcentagem de tecido adiposo, principalmente pela diminuição do dispêndio energético. Estes dados se relacionam ao que é

observado na menopausa em mulheres, na qual a deficiência de estrógenos piora a disfunção metabólica que ocorre na senilidade, aumentando o peso corporal e o acúmulo de tecido adiposo visceral (Rodriguez-Cano et al. 2015; Ventura et al. 2014; Ignacio et al. 2009). Associa-se também a este efeito a perda de massa muscular que, apesar de não ter sido estatisticamente significativa neste trabalho, foi menor nos animais ovariectomizados em relação ao não ovariectomizados. Como na condição da castração, relaciona-se a diminuição de massa magra com aquela observada em mulheres menopausadas, demonstrando que níveis de estrógeno são importantes para a composição corporal (Kawao & Kaji 2014) .

A ovariectomia também influenciou negativamente o metabolismo lipídico, com diminuição do peso relativo do fígado, aumento dos níveis de colesterol total e redução dos triacilgliceróis séricos. O aumento dos níveis de colesterol total em ratas ovariectomizadas também foi verificado na literatura (Saengsirisuwan et al. 2009; Zoth et al. 2010), assim como a diminuição nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, que foi relacionada a um maior acúmulo de triacilgliceróis no fígado (Paquette et al. 2007). Estes dados também se alinham com o que é observado na menopausa, em que o aumento na adiposidade é acompanhado de alterações nos níveis de colesterol total e excesso de gordura no fígado (Mauvais-Jarvis et al. 2013; Rodriguez-Cano et al. 2015).

Além disso, ao produzir efeito negativo sobre o metabolismo corporal, a ovariectomia se associou à diminuição dos níveis de GH e a elevados níveis de TSH séricos em relação aos controles. A diminuição dos níveis de GH relaciona-se à queda deste hormônio verificada em mulheres menopausadas (Locatelli & Bianchi 2014) e pode influenciar a manutenção das massas óssea e muscular (Kawao & Kaji 2014). O aumento nos níveis de TSH reflete queda na produção dos hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que, por sua vez, não realizaram *feedback* negativo a nível hipofisário, aumentando a secreção de TSH e caracterizando menor atividade da tireóide (Sharan & Yadav 2014; Jones & Boelaert 2014). Este aumento relaciona-se com o aumento da incidência de hipotireoidismo em mulheres idosas (Sharan & Yadav 2014; Jones & Boelaert 2014) e reflete atividade reduzida do metabolismo. Corroborando com os fatos da literatura, os dados aqui apresentado podem refletir a menor atividade tireoidiana já que a taxa metabólica final das ratas ovariectomizadas, apesar de não serem estatisticamente

diferentes, foi menor do que a dos animais não ovariectomizados, sugerindo assim padrão muito semelhante à menopausa nas mulheres.

Como demonstra a literatura, a falta dos hormônios gonadais, tanto em mulheres como em animais experimentais, leva a intenso prejuízo para o tecido osseo (Samnegård et al. 2001; Iwaniec et al. 2001; Smith et al. 2014; Lelovas et al. 2008; Turner 2001; Yamaguchi 2006; Geng et al. 2013). Assim, no presente estudo, a ovariectomia realizada também afetou negativamente o metabolismo ósseo, diminuindo a densidade óssea e a resistência mecânica do fêmur, caracterizando osteoporose (**Figura 19**). Estudos recentes de Smith e col (2014) e Turner et al (2001) mostraram que a diminuição da densidade óssea de ratas ovariectomizadas é um modelo adequado para simulação da osteoporose pós-menopáusica (Turner 2001; Lelovas et al. 2008), sendo extensamente verificada na literatura (Samnegård et al. 2001; Iwaniec et al. 2001; Smith et al. 2014; Lelovas et al. 2008; Turner 2001; Yamaguchi 2006; Geng et al. 2013). Além disso, estudos verificaram resistência mecânica óssea diminuída em ratas ovariectomizadas (Turner 2001; Geng et al. 2013) e Geng e col (2013) verificaram diferenças significativas no ensaio de compressão com a vértebra lombar de ratas ovariectomizadas, que apresentaram ossos com menores força e tensão máxima e elasticidade (Geng et al. 2013). Estes dados corroboram os sintomas verificados na menopausa em mulheres, em que há aumento do risco de desenvolver osteoporose devido à elevada reabsorção óssea (em função do aumento da atividade osteoclástica que não é mais prevenida pela falta dos hormônios gonadais), levando à diminuição da formação óssea, pois osteoblastos deixam de ser estimulados pela atuação principal do estrógeno, levando à acelerada perda de massa óssea e aumento da fragilidade óssea (Mcaverry & Santoro 2013; Warren et al. 2015; Cauley 2014; Garnerio et al. 1996; Riggs et al. 1998).

Os fatos acima podem ser explicados pelo fato dos níveis séricos de estrógeno, encontrados aqui neste trabalho, terem sido muito reduzidos para o grupo ovariectomizados, embora não apresentando diferenças significativas entre os grupos ovariectomizados e não-ovariectomizados. Os valores elevados de LH e FSH, porém, refletem a falta do controle de *feedback* nas ratas não ovariectomizadas, em comparação com as ratas controles, que ainda apresentaram o eixo hipotálamo-hipófise e gônada intactos com variações hormonais dentro dos parâmetros esperados. Portanto, elevados níveis de LH e FSH correspondem à

falência ovariana (no caso a remoção pela castração) e, assim, níveis muito reduzidos de estrógenos, como verificado nas ratas ovariectomizadas.

Nossos resultados também mostraram que a terapia de reposição com 17 β -estradiol foi eficaz na modulação do metabolismo, restaurando diversos parâmetros aos níveis do controle. O útero dos animais com reposição hormonal não se apresentou atrofiado, com tamanho e vascularizações semelhantes ao controle, corroborando dados da literatura nos quais o peso do útero de animais tratados com 17 β -estradiol foi significativamente maior que o de animais ovariectomizados, sendo iguais ou maiores que os do controle (Liu et al. 2004; Saengsirisuwan et al. 2009; Paquette et al. 2007; Zoth et al. 2010). Além disso, a reposição hormonal proporcionou a recuperação dos parâmetros quanto ao ganho de peso, porcentagem de gordura corporal e dos níveis de colesterol total e triacilgliceróis séricos, dados esses que corroboram a literatura, em que também foram verificados parâmetros corporais semelhantes às fêmeas controles em ratas ovariectomizadas com reposição de 17 β -estradiol (Liu et al. 2004; Saengsirisuwan et al. 2009; Paquette et al. 2007; Zoth et al. 2010). Ademais, no presente estudo, também verificamos que a reposição hormonal também foi importante para a massa magra, já que o peso relativo do músculo teve média semelhante à do controle e maior do que a dos animais ovariectomizados (Paquette et al. 2007).

Por outro lado, a elevação da taxa metabólica destes animais em relação aos controles também demonstrou a ação da reposição hormonal sobre o metabolismo, já que o estrógeno participa também da manutenção do dispêndio energético (Mauvais-Jarvis et al. 2013). Provavelmente esta melhora na atividade metabólica corporal dos animais tratados com 17 β -estradiol estava relacionado ao aumento da função tireoidiana (visto aqui pelo menor concentração de TSH séricos), associada ao aumento da leptina, pois apesar da porcentagem de gordura destes animais ter sido menor, resultados da literatura mostram que a elevação de leptina pode ocorrer pois esta também é estimulada por estrógenos, havendo uma co-localização extensa de receptores de leptina e de estrógenos no hipotálamo (Caprio et al. 2001; Moschos et al. 2002). Enquanto altos níveis de estradiol aumentam a sensibilidade dos receptores cerebrais à leptina, baixos níveis de estrógenos, como na menopausa, diminuem essa sensibilidade, sendo que a reposição hormonal de estradiol restaura esta condição (Caprio et al. 2001; Moschos et al. 2002). Houve também aumento significativo na secreção de prolactina nos animais com TRH, que pode estar

associado ao aumento dos níveis de leptina, pois na literatura é relatado que leptina em altas concentrações pode estimular a secreção de prolactina (Casanueva & Dieguez 1999).

Por fim, de um modo geral a terapia de reposição hormonal nos casos de menopausa trazem benefícios, favorecendo especificamente o metabolismo ósseo. Como apresentado aqui neste trabalho, os animais tratados com estrógeno apresentaram maior peso relativo de fêmur, maior densidade mineral óssea e maior resistência mecânica óssea (**Figura 19**), dados esses que corroboram a literatura (Samnegård et al. 2001; Iwaniec et al. 2001). Estes dados experimentais mimetizam aqueles encontrados na literatura, que mostram que a terapia de reposição hormonal utilizada em mulheres na menopausa é eficaz na prevenção de perda de massa óssea, reduzindo a incidência de fraturas (Pardini 2014; Warren et al. 2015; Mcavery & Santoro 2013).

Paralelamente, no presente trabalho, a terapia de reposição hormonal utilizada foi administrada em doses próximas à fisiológica, porém a frequência de administração foi diferente do estado fisiológico (contínuo), provavelmente não sendo suficiente para realizar o efeito de controle por *feedback* dos hormônios LH e FSH, diferentemente de como normalmente é observado no caso do uso de anticoncepcional, que exerce o *feedback* negativo a estes hormônios hipofisários (**Figura 19**). Apesar disso, todos os outros resultados indicam que houve ação positiva do estrógeno exógeno sobre todos os parâmetros analisados.

Desta forma, o procedimento de ovariectomia realizado e a terapia de reposição hormonal utilizados nesse trabalho caracterizaram modelo experimental de quadro de menopausa e de terapia de reposição hormonal, como o observado em mulheres.

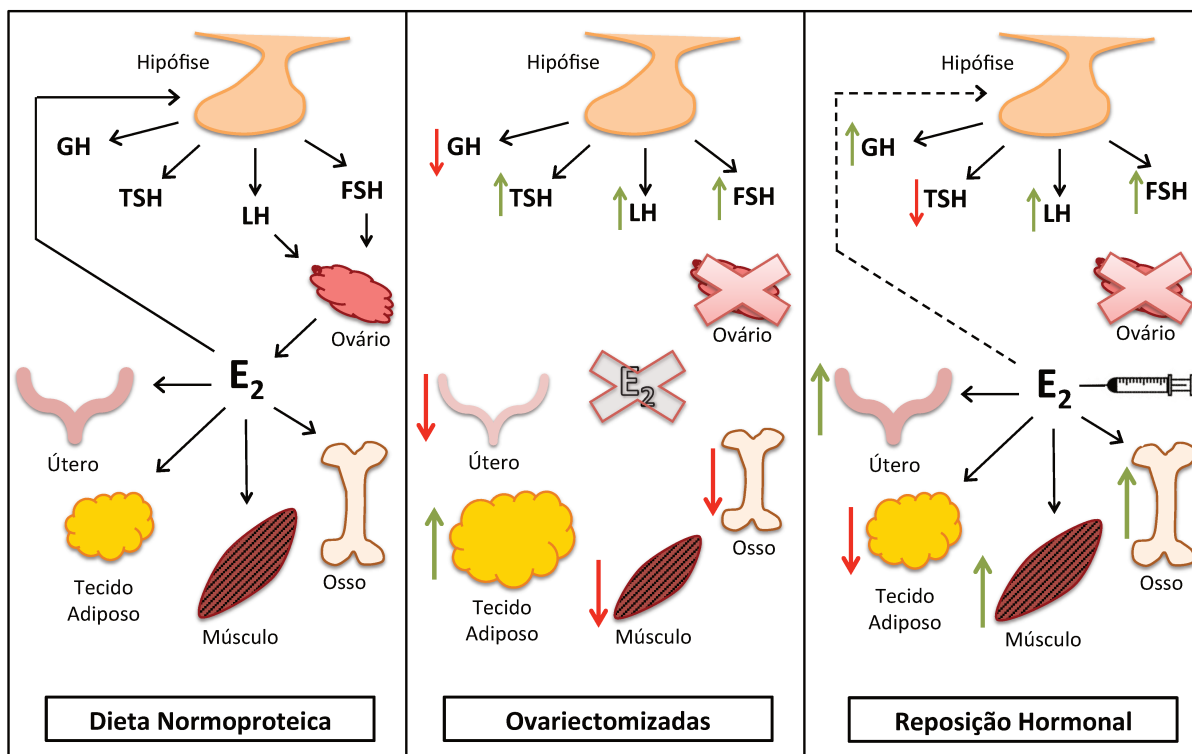


Figura 19. Resumo das alterações que ocorreram em situação de ovariectomia e reposição hormonal em modelo experimental de ratas em relação às fêmeas controle submetidas à dieta normoproteica. Na situação controle, o estrogênio secretado pelo ovário modulou os tecidos uterino, adiposo, muscular e ósseo, além de exercer controle por retroalimentação da secreção hipofisária de FSH e LH, associado à baixa secreção de TSH. Na situação de ovariectomia, a falta de estrogênio endógeno promoveu atrofia do útero, aumento do tecido adiposo e diminuição dos tecidos muscular e ósseo, além da não modulação da secreção de FSH e LH hipofisários, aumentando também o TSH. A terapia com estrogênio exógeno recuperou o padrão do controle, diminuindo o tecido adiposo e aumentando os tecidos uterino, muscular e ósseo, sem porém inibir adequadamente a secreção de LH e FSH, mas diminuindo TSH. (Legenda: E₂, Estrogênio; Setas vermelhas, diminuição em relação ao controle; Setas verdes, aumento em relação ao controle; Seta preta, estímulo; Seta tracejada, estímulo parcial; Setas mais grossas indicam efeito mais acentuado).

De acordo com a literatura, ocorrem diversas adaptações funcionais no desenvolvimento da desnutrição, visando preservar a homeostase de meio interno. Os estudos das alterações que mantêm fenômenos fisiológicos no organismo desnutrido têm contribuído de forma bastante importante para o estudo de fisiologia, bioquímica e outros ramos das ciências fisiológicas (Bourrin et al. 2000; Ammann et al. 2000; Ammann et al. 2002; Mekraldi et al. 2005; Latorraca et al. 1998).

Nosso modelo experimental de restrição proteica baseou-se em dieta hipoproteica isocalórica, que possui as mesmas quantidades de vitaminas, minerais e energia que a dieta normoproteica, porém contém baixo teor de caseína, como fonte de proteína (Rizzoli 2008; Bourrin et al. 2000; Ammann et al. 2002; Mekraldi et al. 2005; Latorraca et al. 1998). A dieta hipoproteica utilizada continha 6,6% de

proteína, valor considerado muito abaixo para os padrões considerados de manutenção (12% de proteína) e de crescimento (18% de proteína), como postulado pela *American Institute of Nutrition* (AIN-93) (Reeves et al. 1993). Assim, a baixa oferta de proteína para os animais causa prejuízos bastante severos como aqueles observados para humanos que desenvolvem características da desnutrição proteica como ocorre no Kwashiorkor. As principais características deste quadro são atrofia muscular marcante e gordura corporal total normal ou aumentada, pois tem como causa a ingesta inadequada de proteínas, associada à adequada incorporação de calorias, vitaminas e minerais. Estes efeitos foram também verificados nos animais que receberam a dieta com restrição de proteína, em que houve aumento do ganho de peso final sem haver alteração da ingestão, comparada com as fêmeas com dieta normoproteica. Além disso, a dieta hipoproteica provocou menor peso relativo no início do experimento, e, apesar de não haverem diferenças estatísticas entre as médias, apresentou menor peso relativo muscular em relação ao controle (Resumo dos resultados observados apresentado na **Figura 20**). Estes dados são condizentes com a literatura em humanos, sendo que a ingestão adequada de proteínas é determinante para o crescimento ósseo de crianças e adolescentes e a desnutrição proteico-calórica prejudica o crescimento (Prentice et al. 2006; Rizzoli et al. 2007; Rizzoli 2008), além de agravar ainda mais a espoliação do tecido muscular em idosos (Kawao & Kaji 2014). Além disso, outros trabalhos na literatura demonstraram que ratos alimentados com dietas hipoproteicas apresentaram crescimento prejudicado no início do experimento (Ammann et al. 2015; Bourrin et al. 2000).

Nos animais não ovariectomizados e com dieta hipoproteica, também foram observados menores níveis de glicose, TSH e GH séricos, associado ao aumento de insulina sérica, demonstrando que essa dieta hipoproteica afetou parâmetros metabólicos e hormonais (**Figura 20**). Os níveis diminuídos de GH correlacionam-se com a diminuição do eixo GH/IGF-1 que ocorre na restrição proteica, sendo observado em ratos sob restrição proteica em outros estudos (Bourrin et al. 2000; Ammann et al. 2000; Ammann et al. 2015; Rizzoli 2008). Além disso, a queda de GH também está diretamente relacionada à perda de massa óssea (Bourrin et al. 2000; Ammann et al. 2000; Ammann et al. 2015; Rizzoli 2008). Os níveis alterados de glicose e insulina, por sua vez, indicam quadro de resistência periférica à insulina, provavelmente devido à maior proporção de carboidratos presentes na dieta hipoproteica, levando a redução da secreção de insulina, como observado na

literatura em ratos submetidos a deficiência de proteína (Latorraca et al. 1998). Por outro lado, condizente com os dados aqui apresentados, a diminuição nos níveis de TSH refletem alterações no metabolismo corporal do animal, e pode ser associado à osteoporose pós-menopausa (Sharan & Yadav 2014), demonstrando assim a proposta inicial do presente trabalho de ser importante estudar os efeitos da dieta sobre as alterações fisiológicas que ocorrem na menopausa.

Neste trabalho, a restrição proteica imposta aos animais foi de 7,8% de caseína, que corresponde a 6,6% de proteína. Em trabalhos anteriores e na literatura, verificamos que dieta hipoproteica com 6% de proteína foi bastante severa para o ganho de peso, como também para o crescimento, alterando parâmetros bioquímicos (proteína total e albumina sérica) bastante importantes para a homeostase do animal (Latorraca et al. 1998; de Mello et al. 1989; de Mello & Cury 1989; De Mello & Cury n.d.; De Mello & Cury 1988; Gomes 1985). Entretanto, no presente trabalho, dados controversos foram encontrados para os animais não ovariectomizados submetidos à dieta hipoproteica, pois os mesmos apresentaram valores semelhantes de proteínas séricas, albumina, ganho de peso final, porcentagem de gordura corporal, densidade óssea e resistência mecânica ao grupo controle correspondente (**Figura 20**). Provavelmente, para este trabalho, a restrição proteica imposta não foi severa o suficiente para alterar esses parâmetros pontuais. Ammann e colaboradores (2000) (Ammann et al. 2000) mostraram que efeitos deletérios de desnutrição em ratos foram observados em animais alimentados com dieta contendo menos de 5% de caseína. Apesar disso, no presente trabalho, os resultados em geral indicam que a restrição proteica realizada, apesar de não ter sido extrema, foi suficiente para causar alterações metabólicas, hormonais e de crescimento do animal.

Paralelamente, a dieta hipoproteica imposta na situação de deficiência de estrógenos (ovariectomia), com ou sem reposição hormonal, promoveu prejuízos ao metabolismo dos animais em relação aos controles. Porém, demonstramos que a associação da restrição de proteínas à deficiência de hormônios foi ainda mais prejudicial e que a reposição com estrógeno, neste caso, não foi tão efetiva para recuperar os parâmetros estudados da mesma forma que foi observado no grupo com reposição e dieta normoproteica (**R** - Grupo Ovariectomizadas com Reposição Hormonal).

Assim, com relação ao grupo castrado, a dieta hipoproteica provavelmente proporcionou desbalanço energético que alterou ainda mais a composição corporal destes animais, aumentando a porcentagem de gordura corporal e diminuindo a massa muscular e óssea. A perda de massa muscular está diretamente relacionada ao estado fisiológico de senilidade, deficiência hormonal (principalmente dos hormônios sexuais) e também com a má nutrição. Nesse caso, demonstramos que a perda de massa muscular foi imposta pela restrição proteica e pela deficiência hormonal, e que associada a essa perda de massa muscular houve perda de massa óssea, condizendo com os estudos que apontam que essa alteração corresponde ao estado de sarcoosteopenia (Ormsbee et al. 2014; Kawai et al. 2012)(Rizzoli et al. 2001; Ammann et al. 2000).

Os dois grupos castrados (**O-H e R-H**) também apresentaram menor concentração sérica de proteínas totais, evidenciando assim os efeitos da restrição proteica. Além disso, esses dois grupos **O-H e R-H** apresentaram níveis ainda mais baixos de insulina associados à elevação da glicemia, demonstrando que a dieta afetou o metabolismo de carboidratos dos animais ovariectomizados de forma ainda mais intensa em relação aos controles, levando ao quadro de resistência periférica à insulina. Apesar da ovariectomia ser relacionada com resistência periférica à insulina e o tratamento com estradiol melhorar esta condição; Mauvais-Jarvis et al. (2013) (Mauvais-Jarvis et al. 2013) apontam que existem dados contrastantes na literatura a respeito deste efeito. Condizente com a interessante revisão de Mauvais-Jarvis e colaboradores (Mauvais-Jarvis et al. 2013), nossos dados revelaram resistência à insulina ainda mais evidente nos animais com dieta e com reposição hormonal, demonstrando que a interação entre estes fatores proporcionou piora dessa condição ao indivíduo. Além disto, as concentrações séricas de PRL, GH e TSH destes grupos castrados foram menores em relação aos respectivos grupos com dieta normoproteica (**Figura 20**), evidenciando a influência negativa sobre o metabolismo da restrição de proteínas associada à deficiência de estrógeno e à reposição hormonal.

A principal fonte de estrógeno em mulheres menopausadas é a aromatização periférica de andrógenos (androstenediona, provenientes da córtex da glândula supra-renal) pelo tecido adiposo, sendo este a maior fonte de síntese de estrógeno extra-glandular (Hershcopf 1987; Szymczak et al. 1998; Longcope et al. 1986). Desta forma, maiores depósitos de gordura, como ocorre na obesidade, têm sido

relacionados às maiores concentrações de hormônios sexuais (andrógenos e estrógenos) observadas (Hershcopf 1987; Szymczak et al. 1998; Longcope et al. 1986) e, além disso, a literatura também sugere que leve à maior probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama, endométrio e próstata (Nosratollah et al. 2011; Hershcopf 1987; Szymczak et al. 1998; Longcope et al. 1986). Como apresentado aqui, observamos aumento no ganho de peso dos animais alimentados com dieta hipoproteica e ovariectomizados, associado a maior proporção de gordura corpórea (verificado pela análise por raio X – DEXA), sendo portanto a explicação mais plausível para os níveis aumentados de progesterona neste grupo. Por outro lado, o estradiol aumentado significativamente no grupo de reposição hipoproteica provavelmente deu-se pela associação do estrógeno exógeno (reposição) com a aromatização periférica pelo tecido adiposo aumentado. Além disso, levantamos a hipótese de que a dieta hipoproteica, na medida em que aumenta os depósitos de gordura e diminui a massa muscular, possivelmente influenciou a regulação do eixo hipotálamo-hipófise da secreção dos hormônios gonadotróficos (LH e FSH ligeiramente reduzidos em relação ao grupo O; **Figura 20**).

Ressaltamos, assim, que o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos – positivos e/ou negativos – da terapia de reposição hormonal sobre os prejuízos impostos pela má nutrição durante a menopausa. Desta forma, nossos resultados demonstraram que a dieta possivelmente influenciou os efeitos do tratamento com hormônio sobre as alterações impostas pela ovariectomia, de forma que a terapia de reposição hormonal associada à restrição proteica não foi tão efetiva como aquela observada nos animais com reposição estrófica.

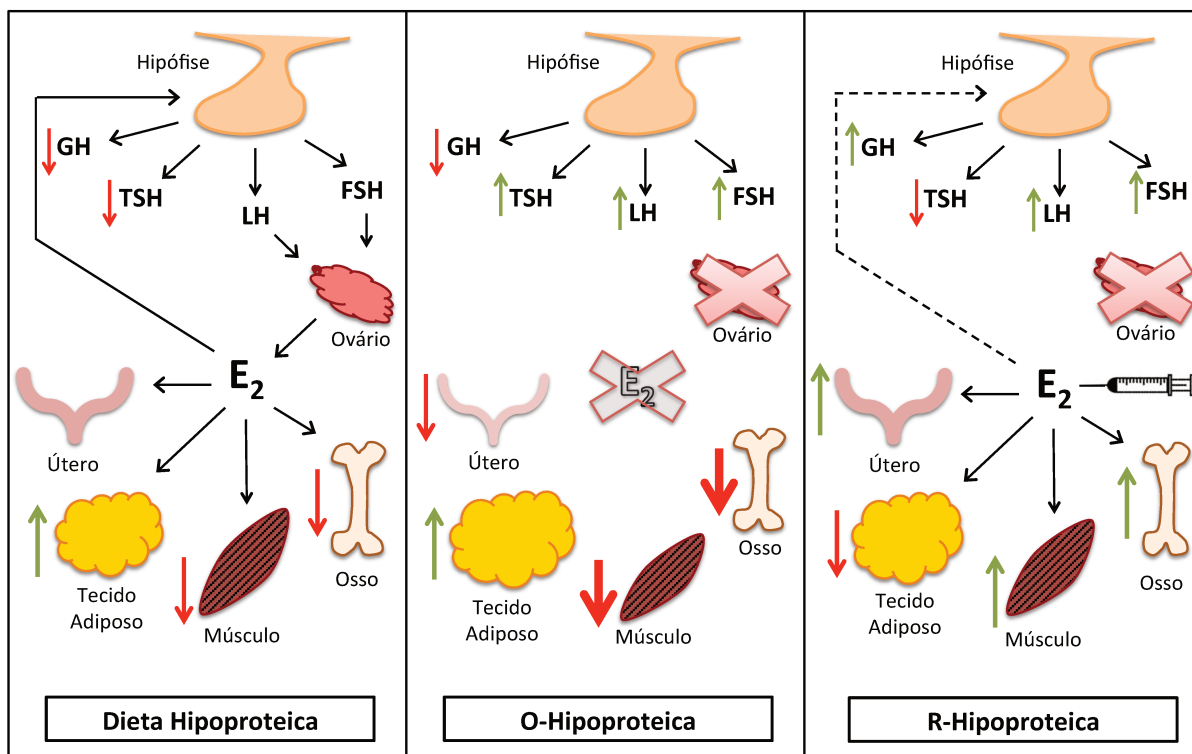


Figura 20. Resumo das alterações que ocorreram na situação de restrição de proteínas em modelo experimental de ratas com e sem ovariectomia e reposição hormonal. Na situação hipoproteica, o estrógeno secretado pelo ovário modulou os tecidos uterino, adiposo, muscular e ósseo, além de realizar controle de retroalimentação para a secreção hipofisária de FSH e LH. A dieta provocou diminuição dos tecidos muscular e ósseo, aumentando o tecido adiposo, associado à baixa secreção de GH e TSH em relação ao controle normoproteico (resumo apresentado na **Figura 19**). Na situação de ovariectomia, a falta de estrógeno promoveu aumento do tecido adiposo e diminuição dos tecidos uterino, muscular e ósseo, além de não exercer o controle de *feedback* sobre a secreção de FSH e LH hipofisários, levando ao aumento dessas gonadotrofinas, associado ao aumento também da liberação do TSH. A reposição hormonal com estrógeno exógeno melhorou a condição do ovariectomizado, diminuindo o tecido adiposo e aumentando os tecidos uterino, muscular e ósseo, porém sem exercer *feedback* negativo para adequação da secreção de LH e FSH, mas diminuindo a secreção de TSH e aumentando a de GH. Esta melhora, porém, foi menor do que aquela observada nos animais com reposição hormonal normoproteicos (**Figura 19**). (Legenda: E₂, Estrógeno; Setas vermelhas, diminuição em relação ao controle; Setas verdes, aumento em relação ao controle; Seta preta, estímulo; Seta tracejada, estímulo parcial; Setas mais grossas indicam efeito mais acentuado).

A mudança do padrão alimentar observado atualmente, caracterizado por aumento do consumo de alimentos processados ricos em gordura e açúcar, que são ricos em energia mas pobres em micronutrientes, leva ao aumento da obesidade, doenças metabólicas e distúrbios de densidade óssea (Popkin et al. 2012).

A dieta de cafeteria é um modelo experimental proposto para estudar a obesidade e síndrome metabólica, que consiste em associar a ração comercial do animal com comidas humanas altamente palatáveis, calóricas e não saudáveis, de forma a simular os hábitos normalmente encontrados nos humanos (Sampey et al. 2011)., pois atualmente a condição socioeconômica leva a maioria das pessoas a

trocaram hábitos saudáveis pela facilidade e disponibilidade de alimentos industrializados e *fast-foods*. A dieta cafeteria utilizada neste trabalho foi baseada em modelo descrito na literatura (Sagae et al. 2012; Vanzela 2010), onde a ração comercial foi associada a alimentos industrializados, com alto teor de gordura e calorias (bolo, wafer, amendoim, biscoito de maizena), e também ao oferecimento de bebidas gaseificadas e adoçadas (refrigerante - guaraná).

Assim, como apresentado pela literatura, os nossos resultados mostraram que a dieta cafeteria utilizada provocou alterações metabólicas semelhantes às aquelas verificadas em indivíduos, principalmente nas mulheres. Nossos ensaios experimentais com esta dieta mostraram maior ganho de peso, maior porcentagem de gordura e menor peso relativo muscular em relação aos animais controles, indicando que a dieta exerceu efeito negativo sobre a composição corpórea dos animais, aumentando a proporção de tecido adiposo e diminuindo a de tecido muscular. Estes dados condizem com a literatura, na qual estudos experimentais também mostram aumento do ganho de peso e de gordura em ratos alimentados com dieta cafeteria, sendo considerada modelo animal de obesidade (Cavagni et al. 2015; Romero et al. 2013; Bazzano et al. 2015; Macedo et al. 2012; Lanza et al. 2014; Brandt et al. 2010; Sampey et al. 2011; Sagae et al. 2012; Vanzela 2010).

Além disso, os animais alimentados com dieta cafeteria apresentaram menor peso relativo do fígado, valores de colesterol total séricos acima do controle, além da concentração sérica de insulina elevada associada à glicose sérica normal. Estes dados refletem a ingestão aumentada de gorduras e carboidratos, que estimulam muito a secreção de insulina e aumentam a quantidade de lipídeos circulantes. O aumento de colesterol total foi observado em outros estudos (Cavagni et al. 2015; Macedo et al. 2012; Lanza et al. 2014), associado à concentração sérica de glicose não alterada, indicando que não houve estabelecimento do quadro de resistência à insulina nestes animais. Recentemente, Cavagni e colaboradores observaram o mesmo resultado e propuseram que, apesar de ser surpreendente, nem todos os animais alimentados com dieta cafeteria desenvolvem necessariamente resistência à insulina ou diabetes (Cavagni et al. 2015).

Nossos achados mostraram que nestes animais também foi observada concentração de GH diminuída em relação aos controles, possivelmente indicando menor mobilização energética, condizente com o estoque de gordura aumentado nesses animais e de menor taxa metabólica ao final do período experimental. Assim,

o consumo de dieta cafeteria culminou em alterações metabólicas e hormonais bastante acentuadas e também refletiu em alteração da concentração do hormônio gonadal – progesterona – muito aumentada. Possivelmente, esta elevação pode estar associada à aromatização periférica de andrógenos pelo tecido adiposo, já que este estava aumentado nessas fêmeas (Hershcopf 1987; Szymczak et al. 1998; Longcope et al. 1986), e reflete a maior adiposidade destes animais.

Como já apontado anteriormente, a má nutrição também produz prejuízos bastante importantes não só no metabolismo lipídico ou no sistema endócrino, mas também afeta negativamente o metabolismo ósseo. Nossos resultados mostraram esses efeitos negativos da dieta cafeteria, pois os animais alimentados com essa dieta apresentaram menor peso relativo do fêmur, menor massa e densidade mineral ósseas, além de menor diâmetro do osso. Estes fatores refletem intensa perda de massa óssea, mostrando relação inversamente proporcional ao acúmulo de gordura com a manutenção da massa óssea. Esta relação condiz com trabalhos recentes da literatura que associam maior adiposidade à menor massa óssea e que se contrapõem à premissa de que maior peso corporal é positivo para a manutenção de massa óssea (Liu et al. 2014; Cao 2011; Upadhyay et al. 2015). Além disso, a maior concentração sérica de cálcio em relação aos controles pode estar relacionada à maior espoliação do cálcio da matriz óssea, indicando que associada à perda de massa óssea houveram também alterações da homeostase de cálcio, indicando possivelmente maior reabsorção óssea. Este fato pode ter sido influenciado pelo consumo de refrigerantes, já que estudos têm demonstrado que a diminuição da massa óssea pode ocorrer pelo aumento da ingestão de ácidos, fosfato e cafeína, levando à excreção excessiva de cálcio e com isso afetando negativamente o metabolismo ósseo (Ogur et al. 2007; Heaney & Rafferty 2001; Sámano et al. 2013). A **Figura 21** apresenta de modo esquemático os principais efeitos da dieta cafeteria sobre os órgãos e tecidos estudados no presente trabalho.

Novamente, uma das propostas iniciais do nosso trabalho era entender quais seriam os efeitos da má nutrição sobre o estado da menopausa. Assim, nesse estudo verificamos que a ovariectomia, simulando a menopausa, associada à dieta cafeteria provocou alterações metabólicas ainda mais severas em relação aos animais ovariectomizados com dieta controle. Estes animais apresentaram aumento ainda mais acentuado de ganho de peso e porcentagem de gordura e diminuição mais acentuada do peso relativo do músculo e da taxa metabólica, desde os 130

dias de idade. O maior depósito de gordura associado à sarcopenia, além de atividade metabólica tecidual direcionada ao estoque energético, possivelmente culminou com diminuição do processo anabólico. Além disso, os valores aumentados de glicose sérica associados às concentrações muito reduzidas de insulina sérica sugerem que houve alteração do metabolismo de glicose ainda mais severa nestes animais, em relação aos estróficos, levando ao quadro de resistência periférica à insulina e/ou disfunção das células beta da ilhota de Langerhans, que não foram observados nos animais do grupo **O** e **CAF**. Estes resultados são condizentes com os dados da literatura; além disso mimetizam aqueles observados em mulheres na menopausa, na qual a deficiência de estrógenos piora a disfunção metabólica, levando ao aumento do peso corporal, acúmulo de tecido adiposo visceral, alterações nos níveis de colesterol total, LDL, HDL e insulina e aumentando o risco de obesidade, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Mauvais-Jarvis et al. 2013; Rodriguez-Cano et al. 2015; Ventura et al. 2014). Desta forma, nossos resultados demonstraram que a associação da dieta cafeteria com a deficiência de estrógenos piorou ainda mais o perfil metabólico dos animais.

É interessante observar que, também nos animais com dieta cafeteria e ovariectomizados, as concentrações séricas de estrógeno e progesterona foram mais altas do que os valores nos animais com dieta normoproteica, apesar da cirurgia de castração. Esta é uma constatação curiosa que suporta a observação da literatura de que, na menopausa, a principal fonte de estrógeno em mulheres é a aromatização periférica de andrógenos em estrógenos pelo tecido adiposo e de que maiores depósitos de gordura podem levar a maiores concentrações de hormônios sexuais extra-glandulares (Hershcopf 1987; Szymczak et al. 1998; Longcope et al. 1986). Nos animais com reposição hormonal, esta concentração foi ainda mais alta, demonstrando a associação entre o estrógeno exógeno e o estrógeno extra-glandular produzido.

Paralelamente, a associação da ovariectomia com a dieta cafeteria impôs prejuízo ainda maior quanto à saúde óssea, levando à massa e densidade ósseas ainda mais reduzidas, peso relativo do fêmur ainda menor e menor resistência óssea em relação aos animais alimentados com dieta normoproteica. Nestes animais, a tensão de escoamento do osso e a tensão máxima suportada pelo osso até o momento da sua ruptura foram significativamente menores, além de apresentarem menor elasticidade, indicando características intrínsecas de maior fragilidade óssea.

Estes dados demonstram que a associação da dieta cafeteria com a ovariectomia prejudicou ainda mais a manutenção de massa óssea destes animais, associando esse prejuízo aos outros efeitos negativos observados em outros tecidos (muscular e adiposo) produzidos pela baixa qualidade dos nutrientes ingeridos nesse modelo experimental de menopausa.

Por fim, uma das hipóteses iniciais desse trabalho foi como atuaria, ou de que modo poderia ser modulada ou potencializada a dieta cafeteria quando associada à reposição hormonal. Assim, nossos resultados demonstraram que essa associação teve efeitos positivos de melhora do quadro de deficiência hormonal, mas de forma muito menos eficiente do que foi observado nos animais submetidos à dieta normoproteica, de modo mais pontual para o metabolismo de glicose e para o metabolismo ósseo. Nos animais tratados com estrógeno e dieta de cafeteria, os perfis das concentrações séricas de glicose e de insulina foram semelhantes às aquelas verificadas nos animais ovariectomizados com a mesma dieta, indicando que a reposição não promoveu melhora deste quadro. Além disso, estes animais também não apresentaram melhora significativa quanto à massa e densidade ósseas e nem para os parâmetros de resistência mecânica do osso, indicando que este tratamento hormonal não trouxe os benefícios esperados para a manutenção da massa e da resistência óssea, como aqueles verificados no grupo eutrofico **R**.

Nossos resultados demonstraram, portanto, que apesar da reposição hormonal trazer benefícios aos sintomas clássicos da menopausa e ser considerada também como tratamento para a síndrome metabólica associada à esta condição (Faulds et al. 2012; Mauvais-Jarvis et al. 2013), o tratamento hormonal não foi tão eficiente quando associado à má alimentação rica em gorduras e energia. A **Figura 21** apresenta, de forma esquemática, os principais resultados observados com relação à dieta cafeteria, e principalmente seus efeitos quando associado à menopausa (castração) e à reposição hormonal. Deste modo, o presente trabalho traz a perspectiva de novos estudos e também da possível aplicabilidade do tratamento de reposição hormonal, direcionado à melhor eficiência deste, quando associado à ingestão de nutrientes de boa qualidade e hábitos saudáveis.

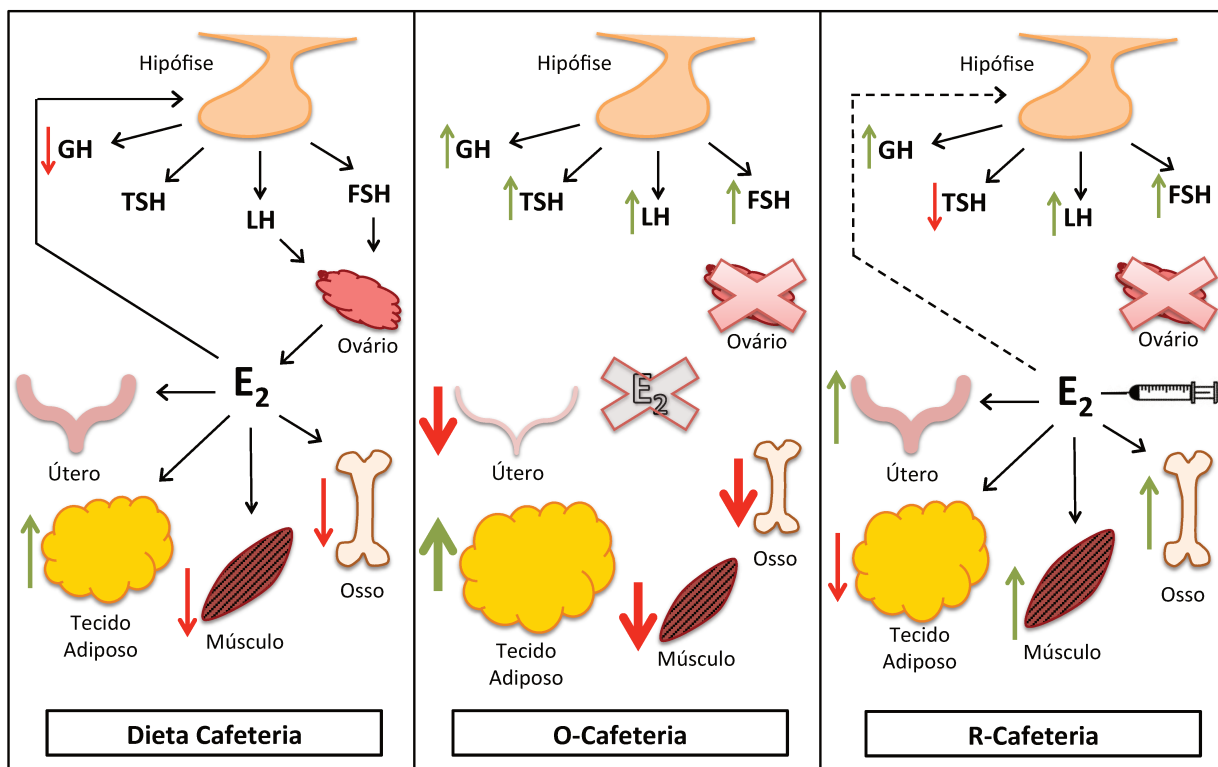


Figura 21. Resumo das alterações que ocorreram na situação de dieta cafeteria em modelo experimental de ratas com e sem ovariectomia e reposição hormonal. Na situação dieta cafeteria, o estrogênio secretado pelo ovário modulou os tecidos uterino, adiposo, muscular e ósseo, além de realizar controle de *feedback* sobre a secreção hipofisária de gonadotrofinas (FSH e LH). A dieta provocou diminuição dos tecidos muscular e ósseo, aumento do tecido adiposo, associado à baixa secreção de GH e TSH em relação ao controle normoproteico (**Figura 19**). Na situação de ovariectomia, a falta de estrogênio proporcionou aumento ainda maior do tecido adiposo e diminuição mais expressiva dos tecidos uterino, muscular e ósseo, além do não controle por retroalimentação da secreção de FSH e LH hipofisários, aumentando também o TSH. Na situação de reposição hormonal, a reposição com estrogênio exógeno melhorou a condição da ovariectomia, diminuindo o tecido adiposo, exercendo efeito trófico sobre os tecidos uterino, muscular e ósseo (porém em menor intensidade), sem controlar adequadamente a secreção de LH e FSH. Esses efeitos positivos da reposição hormonal foram menores do que aqueles encontrados nos animais com reposição normoproteicos (**Figura 19**). (Legenda: E₂, Estrogênio; Setas vermelhas, diminuição em relação ao controle; Setas verdes, aumento em relação ao controle; Seta preta, estímulo; Seta tracejada, estímulo parcial; Setas mais grossas indicam efeito mais acentuado).

Nossos resultados demonstraram, portanto, que a dieta cafeteria foi mais deletéria ao organismo do que a dieta hipoproteica, levando ao aumento ainda mais expressivo do tecido adiposo e diminuição dos tecidos muscular e ósseo. Além disso, a dieta cafeteria associada à ovariectomia possuiu efeitos negativos mais marcantes em relação à dieta hipoproteica, pois comparativamente promoveu maior atrofia do útero, provocando aumento ainda mais pronunciado do tecido adiposo e reduzindo de forma mais severa a densidade e a resistência óssea. Nesta condição, a terapia de reposição hormonal foi menos efetiva nos animais alimentados com

dieta cafeteria em relação à hipoproteica, de forma que o tratamento praticamente não minimizou a perda da massa, densidade e resistência ósseas.

Desta forma, a transição nutricional atual, que aumenta a oferta de alimentos ricos em energia e pobres em nutrientes, elevando o índice de obesidade, de doenças metabólicas e de distúrbios de densidade óssea (Popkin et al. 2012; Popkin 2006) possui efeitos negativos também sobre a saúde da mulher na menopausa, prejudicando o seu quadro e dificultando o seu tratamento de forma ainda mais marcante em relação a uma dieta pobre em proteínas. Considerando a porcentagem elevada (15%) e em crescimento das mulheres brasileiras obesas (Conde & Monteiro 2014), é importante que haja mudança no padrão alimentar destas pacientes para que este não agrave ainda mais o quadro da menopausa e que, no caso do tratamento hormonal, não prejudique a eficácia deste tratamento.

6. Conclusão

Através dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- A ovariectomia (castração) simula a condição de menopausa e provoca prejuízos ao metabolismo corporal e ósseo do indivíduo em relação ao indivíduo não ovariectomizado, piorando a composição corpórea, aumentando o tecido adiposo e diminuindo a densidade e resistência óssea, a massa muscular e o tecido uterino, além de prejudicar o perfil bioquímico e hormonal. Nesta situação, a reposição hormonal com 17β -estradiol simula a situação de reposição hormonal na menopausa em mulheres e modula o metabolismo corporal e ósseo do indivíduo, melhorando a sua composição corporal, a saúde óssea e perfil bioquímico e metabólico, diminuindo o tecido adiposo e mantendo os tecidos muscular, ósseo e uterino;
- Nas nossas condições experimentais, a restrição proteica realizada (6,6% de proteína) causa alterações no metabolismo corporal e ósseo dos animais, prejudicando sua composição corporal e perfil bioquímico em relação à condição da dieta normoproteica, fazendo com que estes animais possuam maior tecido adiposo, menor tecidos muscular e ósseo, além de menor densidade óssea e resistência periférica à insulina. Nesta condição, a situação de menopausa piora o quadro físico do indivíduo, piorando ainda mais a sua composição corpórea e perfil bioquímico,

aumentando ainda mais o tecido adiposo e prejudicando ainda mais os tecidos muscular e ósseo. A terapia de reposição hormonal em ratas ovariectomizadas com restrição proteica possui efeito, embora positivo, reduzido em relação à dieta normoproteica.

- A dieta de cafeteria simula padrão de má alimentação, correspondendo à ingestão alimentar rica em carboidratos e gorduras, e leva a alterações metabólicas típicas de síndrome metabólica, prejudicando a composição corporal, a densidade e resistência óssea e o perfil bioquímico dos indivíduos, aumentando o tecido adiposo, diminuindo os tecidos muscular e ósseo e levando à resistência periférica à insulina. Quando este tipo de alimentação é associado à situação de menopausa (castração) ocorre agravamento do quadro físico do indivíduo, aumentando muito o tecido adiposo, diminuindo ainda mais os tecidos muscular e ósseo e, também, diminuindo ainda mais o tecido uterino. Nesta condição, a reposição hormonal possui efeito positivo muito reduzido em relação à dieta normoproteica e à dieta hipoproteica, demonstrando que esta dieta prejudica o tratamento hormonal mais do que outra condição de má alimentação como a dieta hipoproteica.

Desta forma, conclui-se que a má nutrição, tanto sob a forma de restrição de proteínas, como o aumento de alimentos ricos em carboidratos e gorduras, possui efeito negativo sobre o metabolismo corporal e ósseo do indivíduo, prejudicando o quadro físico da menopausa, e que a reposição hormonal pode exercer efeitos positivos, porém de menor intensidade e qualidade quando associada à má alimentação. Além disto, conclui-se que a má alimentação rica em energia e gorduras (dieta cafeteria), comparativamente, é ainda mais prejudicial do que a restrição de proteínas, prejudicando de forma mais severa o quadro da menopausa e o tratamento hormonal.

No presente trabalho, então, temos como ponto mais relevante a verificação de que a terapia de reposição hormonal tem sua efetividade influenciada e, para determinados parâmetros, reduzida significativamente pela alimentação do indivíduo. Desta forma, no caso de uma mulher menopausada com deficiência de proteínas ou, principalmente, síndrome metabólica, a reposição hormonal deve ser acompanhada também da mudança no padrão alimentar, com aumento do teor de proteína na dieta mas principalmente de redução da ingestão excessiva de açúcares e carboidratos.

7. Referências Bibliográficas

- Albanese, A.A. & Orto, L.A., 1963. *Protein and aminoacids. Newer Methods of Nutritional Biochemistry*, New York: Academic Press.
- Ammann, P. et al., 2002. Dietary essential amino acid supplements increase bone strength by influencing bone mass and bone microarchitecture in ovariectomized adult rats fed an isocaloric low-protein diet. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(7), pp.1264–1272.
- Ammann, P. et al., 2015. Protein Malnutrition Attenuates Bone Anabolic Response to PTH in Female Rats. *Endocrinology*, 156(2), pp.419–428. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2014-1033>.
- Ammann, P. et al., 2000. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 15(4), pp.683–690.
- Andrade, G.F. et al., 2013. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. *Lipids in health and disease*, 12(1), p.145. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84885336365&partnerID=tZOtx3y1>.
- Baccaro, L.F. et al., 2015. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clinical interventions in aging*, 10, pp.583–591. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4374649&tool=pmcencetrez&rendertype=abstract> [Accessed April 11, 2015].
- Barsalani, R. et al., 2008. Liver of ovariectomized rats is resistant to resorption of lipids. *Physiology & behavior*, 95(1-2), pp.216–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590750>.
- Barzilai, N. et al., 2012. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*, 61(6), pp.1315–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3357299&tool=pmcencetrez&rendertype=abstract>

- trez&rendertype=abstract [Accessed December 19, 2014].
- Bazzano, M.V. et al., 2015. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reproductive BioMedicine Online*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380868> [Accessed October 9, 2015].
- Beto, J.A., 2015. The role of calcium in human aging. *Clinical nutrition research*, 4(1), pp.1–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4337919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 15, 2015].
- Bonjour, J.-P., 2005. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(6 Suppl), p.526S–36S. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373952> [Accessed May 18, 2015].
- Bourrin, S. et al., 2000. Dietary protein restriction lowers plasma insulin-like growth factor I (IGF-I), impairs cortical bone formation, and induces osteoblastic resistance to IGF-I in adult female rats. *Endocrinology*, 141(9), pp.3149–3155.
- Brandt, N. et al., 2010. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 299(2), pp.E215–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484011> [Accessed October 9, 2015].
- Cao, J.J., 2011. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 6(1), p.30. Available at: <http://www.josr-online.com/content/6/1/30>.
- Caprio, M. et al., 2001. Leptin in reproduction. , 12(2), pp.65–72.
- Casanueva, F.F. & Dieguez, C., 1999. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Frontiers in neuroendocrinology*, 20(4), pp.317–363.
- Cauley, J. a., 2014. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25555470> [Accessed March 30, 2015].
- Cavagni, J. et al., 2015. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in

- Wistar Rats. *Journal of periodontology*, pp.1–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26376945> [Accessed October 9, 2015].
- Conde, W.L. & Monteiro, C.A., 2014. Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil 1 – 4. *The American journal of clinical nutrition*, 100(1), pp.1617–1622. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411303> [Accessed April 21, 2015].
- Conference, N.C., 2001. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 285(6).
- Faulds, M.H. et al., 2012. The diversity of sex steroid action: Regulation of metabolism by estrogen signaling. *Journal of Endocrinology*, 212(1), pp.3–12.
- Ferron, M. & Lacombe, J., 2014. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys*, 561, pp.137–146. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24893146> \nhttp://ac.els-cdn.com/S0003986114001878/1-s2.0-S0003986114001878-main.pdf?_tid=523d4142-e2ba-11e4-865c-00000aacb35f&acdnat=1429025240_9510365459aa5022407fc7e0fe1fbaaf.
- Fu, S. et al., 2014. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. *Nutrition Research*, 34(6), pp.467–477. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026913> [Accessed April 23, 2015].
- Gad, S.C. & Weil, C.S., 1994. *Statistic for toxicologists, Principles and Methods of toxicology* Wallace H, ed., New York: Raven Press Ltda.
- Garnero, P. et al., 1996. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 11(3), pp.337–349.
- Genaro, P.D.S. et al., 2014. Dietary Protein Intake in Elderly Women: Association With Muscle and Bone Mass . *Nutrition in Clinical Practice* , 30(2), pp.283–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25107954> [Accessed May 18, 2015].
- Geng, W. et al., 2013. Immunization with FSH β fusion protein antigen prevents bone

- loss in a rat ovariectomy-induced osteoporosis model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(2), pp.280–286. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X13004725>.
- Gomes, M.C., 1985. *Desnutrição protéico-calórica, desenvolvimento corporal e crescimento do carcinossarcoma de Walker 256: Alterações metabólicas e morfológicas em ratos jovens*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo.
- Goularte, J.F., Ferreira, M.B.C. & Sanvitto, G.L., 2012. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *British Journal of Nutrition*, 108(08), pp.1511–1518. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114511006933 [Accessed September 23, 2015].
- Govindarajan, P. et al., 2013. Implications of combined Ovariectomy/Multi-Deficiency Diet on rat bone with age-related variation in Bone Parameters and Bone Loss at Multiple Skeletal Sites by DEXA. *Medical Science Monitor Basic Research*, 19, pp.76–86. Available at: <http://www.basic.medscimonit.com/abstract/index/idArt/883815>.
- Heaney, R.P. & Layman, D.K., 2008. Amount and type of protein influences bone health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), pp.1567–1570.
- Heaney, R.P. & Rafferty, K., 2001. Carbonated beverages and urinary calcium excretion. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(3), pp.343–347.
- Hershcopf, J., 1987. Obesity, diet, endogenous estrogens, and the risk of hormone-sensitive cancer.
- Ibrahim, Y.I. et al., 2011. Effect of Growth Hormone Releasing Hexapeptide-6 (GHRP-6) on Experimentally- Induced Bone Loss in Female Albino Rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 6.
- Ignacio, D.L. et al., 2009. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(3), pp.310–317.
- Iwaniec, U.T. et al., 2001. Maintenance of cancellous bone in ovariectomized, human parathyroid hormone [hPTH(1-84)]-treated rats by estrogen, risedronate, or

- reduced hPTH. *Bone*, 29(4), pp.352–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595618> [Accessed October 9, 2015].
- Jones, C.M. & Boelaert, K., 2014. The Endocrinology of Ageing: A Mini-Review. *Gerontology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471682> [Accessed January 26, 2015].
- Kawai, M., de Paula, F.J. a & Rosen, C.J., 2012. New insights into osteoporosis: The bone-fat connection. *Journal of Internal Medicine*, 272(4), pp.317–329.
- Kawao, N. & Kaji, H., 2014. Interactions Between Muscle Tissues and Bone Metabolism. *Journal of Cellular Biochemistry*, 695(November 2014), p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.25040>.
- Kerstetter, J.E., Kenny, A.M. & Insogna, K.L., 2011. Dietary protein and skeletal health: a review of recent human research. *Current opinion in lipidology*, 22(1), pp.16–20.
- Kerstetter, J.E., O'Brien, K.O. & Insogna, K.L., 2003. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *The Journal of nutrition*, 133(3), p.855S–861S.
- Kimura, M. et al., 2002. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(4), pp.1349–1353.
- Lalanza, J.F. et al., 2014. Effects Of A Post-Weaning Cafeteria Diet In Young Rats: Metabolic Syndrome, Reduced Activity And Low Anxiety-Like Behaviour N. Ashton, ed. *PLoS ONE*, 9(1), p.e85049. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3895047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 9, 2015].
- Latorraca, M.Q. et al., 1998. Descrição de dieta purificada para indução de quadro de desnutrição protéica em ratos. , 4, pp.9–12.
- Latour, M.G., Shinoda, M. & Lavoie, J.M., 2001. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(1), pp.235–241.
- Lelovas, P.P. et al., 2008. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis

- research. *Comparative medicine*, 58(5), pp.424–30. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2707131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2015].
- Liu, J. et al., 2015. Cognitive effects of long-term dydrogesterone treatment used alone or with estrogen on rat menopausal models of different ages. *Neuroscience*, 290, pp.103–14. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637796> [Accessed February 11, 2015].
- Liu, M.L. et al., 2004. Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int.J Cardiol.*, 97(0167-5273 (Print)), pp.485–493.
- Liu, P.-Y. et al., 2014. New insight into fat, muscle and bone relationship in women: determining the threshold at which body fat assumes negative relationship with bone mineral density. *International journal of preventive medicine*, 5(11), pp.1452–63. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4274553&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2015].
- Locatelli, V. & Bianchi, V., 2014. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *International Journal of Endocrinology*, 2014. Available at:
<http://www.hindawi.com/journals/ije/2014/235060/abs/>.
- Longcope, C., Baker, R. & Johnston, C., 1986. Androgen and Estrogen Metabolism. *Metabolism*, pp.235–237. Available at:
[http://www.smpdb.ca/view/SMP00068?highlight\[compounds\]\[\]=HMDB00234&highlight\[proteins\]\[\]=DB00624](http://www.smpdb.ca/view/SMP00068?highlight[compounds][]=HMDB00234&highlight[proteins][]=DB00624).
- Macedo, I.C. et al., 2012. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides*, 38(1), pp.189–96. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940203> [Accessed September 14, 2015].
- Maeda, S.S. & Lazaretti-Castro, M., 2014. An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 58(2), pp.162–71. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830593> [Accessed April 15, 2015].
- Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J. & Hevener, A.L., 2013. The role of estrogens in

- control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine Reviews*, 34(3), pp.309–338.
- Mcavery, B. & Santoro, N., 2013. The Postmenopausal Woman - PubMed - NCBI. , pp.1–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905354> [Accessed May 4, 2015].
- McGartland, C. et al., 2003. Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: the Northern Ireland Young Hearts project. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(9), pp.1563–1569.
- Mekraldi, S. et al., 2005. Pamidronate prevents bone loss and decreased bone strength in adult female and male rats fed an isocaloric low-protein diet. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(8), pp.1365–1371.
- de Mello, M. et al., 1989. Circulating thyroid hormone levels in young pregnant rats and their fetuses: effect of malnutrition. *Ann Nutr Metab.*, 33(3), pp.181–7.
- De Mello, M. & Cury, L., Effects of protein-calorie malnutrition on endocrine pancreatic function in young pregnant rats. *Braz J Med Biol Res.*, 22(6), pp.791–4.
- de Mello, M. & Cury, L., 1989. Influence of protein-calorie malnutrition on reproductive performance of young and mature rats. *Growth Dev Aging*, 53(4), pp.141–4.
- De Mello, M. & Cury, L., 1988. Maternal adaptations for fetal growth in young malnourished rats. *Braz J Med Biol Res.*, 21(5), pp.1053–6.
- Moschos, S., Chan, J.L. & Mantzoros, C.S., 2002. Leptin and reproduction: A review. *Fertility and Sterility*, 77(3), pp.433–444.
- Murphy-Menezes, M., 2015. Role of the Pharmacist in Medication Therapy Management Services in Patients With Osteoporosis. *Clinical therapeutics*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25913920> [Accessed May 4, 2015].
- Nelson, H.D., 2004. Commonly used types of postmenopausal estrogen for treatment

of hot flashes: scientific review. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 291(13), pp.1610–1620.

Nosratollah et al., 2011. The Possible Impact of Obesity on Androgen, Progesterone and Estrogen Receptors (ER α and ER β) Gene Expression in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, p.227. Available at: <http://www.la-press.com/the-possible-impact-of-obesity-on-androgen-progesterone-and-estrogen-r-article-a2917>.

Ogur, R. et al., 2007. Evaluation of the effect of cola drinks on bone mineral density and associated factors. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 100(5), pp.334–338.

Ormsbee, M.J. et al., 2014. Osteosarcopenic obesity: the role of bone, muscle, and fat on health. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, pp.183–192.

Paquette, A. et al., 2007. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas*, 58(2), pp.182–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889461>.

Pardini, D., 2014. Terapia de reposição hormonal na menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 58(2), pp.172–181. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830594> [Accessed May 4, 2015].

Pinheiro, M.D.M. & Eis, S.R., 2010. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 54(2), pp.164–170.

Popkin, B.M., 2011. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 70(1), pp.82–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3029493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 11, 2015].

Popkin, B.M., 2006. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 84(2), pp.289–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895874> [Accessed June 11, 2015].

Popkin, B.M., Adair, L.S. & Ng, S.W., 2012. Global nutrition transition and the

pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition reviews*, 70(1), pp.3–21.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3257829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 17, 2014].

Prentice, A. et al., 2006. Symposium on “Nutrition and health in children and adolescents” Session 1: Nutrition in growth and development: Nutrition and bone growth and development. *Proc Nutr Soc.*, 65(4), pp.348–360.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H. & Fahey, J., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.*, 123, pp.1939–1951.

Reginster, J.Y. et al., 2014. Antiresorptive Drugs Beyond Bisphosphonates and Selective Oestrogen Receptor Modulators for the Management of Postmenopausal Osteoporosis. *Drugs & Aging*, 31(6), pp.413–424. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4033814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 13, 2015].

Riggs, B.L., Khosla, S. & Melton, L.J., 1998. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13(5), pp.763–773.

Rizzoli, R., 2008. Nutrition: its role in bone health. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 22(5), pp.813–829.

Rizzoli, R. et al., 2001. Protein intake and bone disorders in the elderly. *Revue du Rhumatisme (Edition Francaise)*, 68(9), pp.813–823.

Rizzoli, R., Bonjour, J.P. & Chevalley, T., 2007. Dietary protein intakes and bone growth. *International Congress Series*, 1297, pp.50–59.

Rodriguez-Cano, A. et al., 2015. Dietary changes associated with improvement of metabolic syndrome components in postmenopausal women receiving two different nutrition interventions. *Menopause*, 22(7), p.1. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00>

042192-900000000-98248 [Accessed May 4, 2015].

- Romero, M. del M. et al., 2013. Modulation in Wistar rats of blood corticosterone compartmentation by sex and a cafeteria diet. *PLoS ONE*, 8(2), p.e57342. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3579843&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2015].
- Saengsirisuwan, V. et al., 2009. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 58(1), pp.38–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2008.08.004>.
- Sagae, S.C. et al., 2012. Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiology & behavior*, 105(5), pp.1104–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178647> [Accessed October 9, 2015].
- Sámano, R. et al., 2013. [Association of consumption of carbonated beverages and decalcification in woman on reproductive and non-reproductive age of Mexico City]. *Nutrición hospitalaria*, 28(5), pp.1750–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24160242>.
- Samnegård, E. et al., 2001. Maintenance of cortical bone in human parathyroid hormone(1-84)-treated ovariectomized rats. *Bone*, 28(3), pp.251–260. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328200004464>.
- Sampey, B.P. et al., 2011. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 19(6), pp.1109–1117. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.18/nature06264>.
- Sharan, K. & Yadav, V.K., 2014. Hypothalamic control of bone metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(5), pp.713–723. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X14000554>.
- Smith, B.J. et al., 2014. A comparative study of the bone metabolic response to dried plum supplementation and PTH treatment in adult, osteopenic ovariectomized rat. *Bone*, 58, pp.151–159. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.10.005> [Accessed October 9, 2015].
- Szymczak, J. et al., 1998. Concentration of sex steroids in adipose tissue after menopause. *Steroids*, 63(5-6), pp.319–321.
- Turner, a S., 2001. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *European cells & materials*, 1, pp.66–81.
- Upadhyay, J., Farr, O.M. & Mantzoros, C.S., 2015. The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism*, 64(1), pp.105–113. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049514003308>.
- Vanzela, E.C., 2010. *Dieta de cafeteria induz obesidade, resistência periférica à insulina, e reduz a secreção deste hormônio por ilhotas de ratas: restauração do processo secretório, mas não da sensibilidade à insulina durante a prenhez*. Universidade Estadual de Campinas.
- Vasconcellos, L.S. et al., 2004. Influência da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 48(2), pp.299–304.
- Ventura, D. de A. et al., 2014. Association between quality of the diet and cardiometabolic risk factors in postmenopausal women. *Nutrition journal*, 13(1), p.121. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4320572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2015].
- Warren, M., Shu, A. & Dominguez, J., 2015. Menopause and hormone replacement therapy.
- Wronski, T.J., Dann, L.M. & Scott, K.S., 1989. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton.pdf. , pp.360–366.
- Yamaguchi, M., 2006. Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 126(11), pp.1117–1137. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077614> [Accessed May 18, 2015].
- Zhang, Q., Riddle, R.C. & Clemens, T.L., 2015. Bone and the regulation of global energy balance. *Journal of Internal Medicine*, 277(6), pp.681–689. Available at:

<http://doi.wiley.com/10.1111/joim.12348>.

Zoth, N. et al., 2010. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1-3), pp.100–105. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.029>.

8. Anexos



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

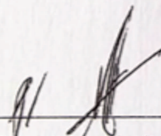
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos da deficiência de hormônios sexuais e dieta cafeteria e hipoproteica sobre o metabolismo ósseo de ratas Wistar adultas" (protocolo nº 3438-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes / Victoria Padula de Quadros, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

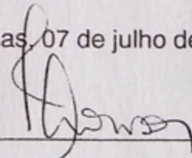
A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de julho de 2014.

Campinas, 07 de julho de 2014.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Atonso
Secretária Executiva



Departamento de Fisiologia e Biofísica
Unicamp – Telefones 3521.6184 – Fax 3521.6185.
Cep.13.083-970 ex. 6109

Campinas 25 de setembro de 2015

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos, fins que a dissertação de mestrado, da aluna Victoria Padula de Quadros, intitulada *“Efeitos da deficiência de hormônios sexuais e má nutrição (dieta cafeteria ou restrição proteica) sobre o metabolismo ósseo de ratas Wistar adultas”* corresponde na íntegra à todos os procedimentos previamente aprovados pelo Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp, protocolo nº 3438-1.

Campinas 25 de Setembro de 2015

Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
Laboratório Nutrição e Câncer – Fisiologia Digestiva e Nutrição
Depto Fisiologia e Biofísica

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **“Efeitos da deficiência de hormônios sexuais e má nutrição (dieta cafeteria ou restrição proteica) sobre o metabolismo ósseo de ratas Wistar adultas”**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 25 de Setembro de 2015

Assinatura : Victoria P. Quadros
Nome do(a) autor(a): **Victoria Padula de Quadros**
RG n.º 38.958.726-6

Assinatura : Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes
Nome do(a) orientador(a): **Profª Drª Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes**
RG n.º 10153517