

**OSTEOPOROSE EM MENOPAUSA EXPERIMENTAL: PAPEL DO  
EXERCÍCIO FÍSICO OU DO TRATAMENTO COM TELMISARTANA**

**ANTONIO MARCOS BIROCALE**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**VITÓRIA-ES, NOVEMBRO DE 2019.**

ANTONIO MARCOS BIROCALE

**OSTEOPOROSE EM MENOPAUSA EXPERIMENTAL: PAPEL DO EXERCÍCIO  
FÍSICO OU DO TRATAMENTO COM TELMISARTANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli

Vitória

2019



Birocale, Antonio Marcos, 1970

Osteoporose em menopausa experimental: papel do exercício físico ou do tratamento com telmisartana. Vitória – 2019.

XXII, 137 p., (UFES, D.Sc., Ciências Fisiológicas, 2019)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Telmisartana. 2. Microarquitetura óssea. 3. Ovariectomia. 4. Hipertensão. 5. Exercício Físico

***DEDICO ESTE TRABALHO***

*Aos meus filhos Maria Eduarda (Duda), Ana Clara (Cacá) e Lucas, aos meus pais, a toda minha família, aos meus amigos e a todos que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente em nossas vidas e por me ter conduzido até aqui.

À minha família, especialmente aos meus pais que me deram o suporte emocional e financeiro para enveredar pela carreira universitária, e hoje, depois de tantos anos, de eu poder concluir mais essa etapa de minha formação acadêmica.

*Ah minha Mãe amada, nunca vou esquecer a cena da senhora chorando à beira do fogão quando soube de minha aprovação para entrar na Universidade, pois sabia que dali eu ganharia o mundo e talvez não voltasse mais, como de fato se deu.*

Aos meus três amados filhos: minha primogênita Duda, parecida comigo em seu jeitinho de ser, minha graciosa Cacá com suas tiradas e casos, e meu “moleque atrevido” e amoroso Lucas, sagaz e esperto, todos os quais muitas vezes tive que deixar ou trazer junto para cuidar dos ratinhos que tanto os fascinaram pela curiosidade.

Aos meus familiares que mesmo de longe sempre torceram por mim em todos os meus projetos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli, pela oportunidade, por sua confiança, pelos desafios propostos, pelo suporte ao longo do estudo, por sua liderança no laboratório e entusiasmo com o trabalho de todos seus orientandos. Por ser a mãe científica de todas e a orientadora amiga que sabe cobrar, mas que principalmente usa do humanismo no trato no dia a dia. Que Deus a conserve assim mesmo agora aposentada.

Às minhas amigas de vida e de laboratório Ana Raquel e Polyana Dalpiaz, um agradecimento muito especial pelo incentivo nos primeiros tempos do doutorado e por toda ajuda sob a forma de dicas, toques, conselhos e técnicas.

À minha querida amiga Verônica Lourenço Wittmer Pascoal, professora do Departamento de Educação Integrada em Saúde da UFES, pelo apoio na tradução dos textos para a publicação dos artigos. Sua paciência, disponibilidade e ajuda foram fundamentais minha grande amiga e colega de departamento para que minha pesquisa fosse publicada.

Aos meus queridos amigos professores, colegas de departamento, Diego França Pedrosa e Lisandra Vanessa Martins pela amizade, carinho e muitas risadas pelo caminho. Vocês são parceiros e tenham de mim o que precisarem. Grato sou por vocês nos meus dias aqui na UFES.

Às queridas amigas de laboratório Aline, Izabela e Karine pelos bons momentos vividos no laboratório e extramuros nas nossas confraternizações sempre regadas a boa conversa e boas risadas. O mesmo se aplica ao meu irmãozinho de laboratório Antonio Ferreira de Melo Jr, o fake rs, que além de parceiro no trabalho sempre me tratou com gentileza e companheirismo, técnica e pessoalmente falando.

Às Profs. Dra. Sônia Alves Gouvêa e Maria Teresa pelo interesse em saber sobre o estudo e sobre meu ânimo na batalha dos dias, meses e anos no programa. À aluna de pós-doutorado Fabiana Vasconcelos Campos pela ajuda providencial na correção do inglês para o artigo. À professora Dra. Alessandra Padilha e ao seu aluno Marito pela parceria.

Aos professores e técnicos dos laboratórios parceiros da UFSCar (Prof. Dra. Keico Okino Nonaka), USP (Prof. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira) e Universidade de Sorocaba (Prof. Dr. José Martins de Oliveira Jr.) pela cessão dos laboratórios, auxílio na obtenção e interpretação dos dados e na confecção dos artigos relacionados a esse estudo.

A todos os alunos de iniciação científica do laboratório, desde aqueles que passaram rápido, como Woldson, Krisley, Louise, etc., até aqueles que perseveraram e hoje são colegas de bancada como Phablo, Pollyana, Glauciene, Mariana, Silas e Tatiane, Edgar; e a última "leva" do laboratório representada por Leonardo, Felipe e Priscila, o futuro do laboratório...sem vocês ou algum de vocês esse trabalho não seria possível.

A aluna de pós-doutorado da UFSCar Carla Manuela Crispim Nascimento que chegou no final deste processo, me deu apoio e carinho como pessoa, e me ajudou infinitamente na revisão da escrita deste manuscrito. Serei eternamente grato pela sua presença agora e espero tê-la comigo pela vida afora: “tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”.

A todos meus colegas de hospital universitário que conviveram comigo durante este processo e que com certeza hoje se alegram pela minha vitória e encerramento.

Às agências nacionais, CAPES e CNPq, e estadual, FAPES, pelo apoio direto e indireto aos meus estudos e à pesquisa na UFES e no estado do Espírito Santo e no Brasil. Deve-se reconhecer o valor dessas Instituições para o avanço do conhecimento no Brasil.

A todos os meus amigos, que estão sempre torcendo por mim, mesmo que distantes.



*“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos”.*

*Albert Einstein*

## CONTEÚDO

RESUMO.....	18
ABSTRACT .....	20
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Contextualização do estudo.....	22
1.2. Caracterização da telmisartana e sua relação com osso .....	32
1.3. Exercício físico e sua relação com osso .....	37
1.4. Justificativa dos Estudos.....	39
2. OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivo Geral.....	40
2.2. Objetivos Específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Aprovação do Projeto .....	41
3.2. Delineamentos do Estudo .....	41
3.2.1. Estudo em ratas SHR submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou à ovariectomia tratadas com telmisartana .....	41
3.2.2. Estudo em ratas SHR submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou à ovariectomia submetidas a exercício físico em esteira.....	42
3.3. Procedimentos Metodológicos Comuns .....	43
3.3.1. Ovariectomia.....	43
3.3.2. Medida da pressão arterial.....	44
3.3.3. Análise de densitometria óssea por absorção dupla de raios-X (DEXA) .....	45
3.3.4. Parâmetros Biométricos.....	46
3.3.4.1. Peso Corporal, do Coração e dos Órgãos Acessórios Sexuais.....	46
3.3.4.2. Medidas femorais e tibiais.....	46
3.3.5. Análise Biomecânica.....	47
3.3.6. Análise Física.....	50
3.3.7. Mensuração de parâmetros arquiteturais da estrutura trabecular por microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT ou MicroCT).....	51
3.3.8. Análise da expressão proteica do PPAR $\gamma$ por Western Blotting .....	53
3.4. Análise Estatística.....	55
4. RESULTADOS .....	56
4.1. Ratas SHRs submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou à ovariectomia (OVX) que receberam telmisartana ou veículo .....	56
4.1.1. Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Parâmetros Ponderais.....	56
4.1.2. Parâmetros Biométricos, Biomecânicos e Físicos do Fêmur.....	60
4.1.3. Densidade Mineral Óssea Femoral e da Quinta Vértebra Lombar .....	64

4.1.4. Parâmetros da microarquitetura trabecular femural .....	68
4.1.5. Análise por Western Blot de PPAR $\gamma$ .....	76
4.2. Ratas SHRs submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou castradas que realizaram exercício físico de corrida em esteira .....	78
4.2.1. Pressão Arterial Sistólica e Parâmetros Ponderais .....	78
4.2.2. Parâmetros Biométricos, Biomecânicos e Físicos do Fêmur.....	81
4.2.3. Densidade Mineral Óssea Femoral e da Quinta Vértebra Lombar .....	85
4.2.4. Parâmetros da microarquitetura trabecular femural .....	88
5. DISCUSSÃO.....	96
6. CONCLUSÃO .....	114
6.1. PERSPECTIVAS CLÍNICAS .....	114
7. REFERÊNCIAS .....	115
8. ANEXOS.....	133
8.1. Métodos para avaliação óssea.....	133
8.2. Artigos publicados derivados dos estudos ao longo do doutorado .....	136

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Efeito to tratamento com telmisartana sobre o peso corporal, peso uterino, peso do coração, comprimento tibial, e razão peso do coração pelo comprimento da tibia.....	53
<b>Tabela 02:</b> Efeito do tratamento com telmisartana sobre parâmetros biométricos e biomecânicos do fêmur.....	55
<b>Tabela 03:</b> Efeito do tratamento com telmisartana sobre parâmetros físicos do fêmur.....	56
<b>Tabela 04:</b> Efeito do tratamento com telmisartana sobre parâmetros físicos da tibia.....	57
<b>Tabela 05.</b> Efeito treinamento físico sobre o peso corporal, peso do coração, comprimento tibial, e razão peso do coração pelo comprimento da tibia.....	68
<b>Tabela 06:</b> Efeito do treinamento com exercício (E) sobre parâmetros físicos do fêmur.....	69
<b>Tabela 07:</b> Efeito do treinamento com exercício (E) sobre parâmetros físicos do fêmur.....	70
<b>Tabela 08:</b> Efeito do treinamento com exercício sobre parâmetros físicos da tibia.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Esquema de sinalização RANKL-RANK para osteoclastogênese.....	24
<b>Figura 02:</b> Estrutura química da telmisartana e losartana.....	27
<b>Figura 03:</b> Esquema simplificado do sistema renina angiotensina e papel de bloqueio de AT <sub>1</sub> pela telmisartana.....	27
<b>Figura 04:</b> Esquema da ligação da telmisartana com o receptor PPAR $\gamma$ comparando com as glitazonas.....	27
<b>Figura 05:</b> Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos.....	43
<b>Figura 06:</b> Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas.....	45
<b>Figura 07:</b> Esquema global de uma eletroforese em gel.....	50
<b>Figura 08:</b> Valores de pressão arterial sistólica (PAS) após tratamento de 8 semanas com o uso de telmisartana (5mg/kg/dia) ou veículo.....	53
<b>Figura 09:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur e da quinta vértebra lombar avaliados por DEXA....	58
<b>Figura 10:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a densidade mineral óssea (DMO) da região proximal (R1) do fêmur avaliados por DEXA e por MicroCT.....	59
<b>Figura 11:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a densidade mineral óssea (DMO) das regiões média (R2) e distal (R3) do fêmur avaliados por DEXA.....	59

<b>Figura 12:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT.....	61
<b>Figura 13:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT.....	62
<b>Figura 14:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT.....	63
<b>Figura 15:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT.....	64
<b>Figura 16:</b> Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a expressão da proteína PPAR $\gamma$ no fêmur e imagens representativas da microarquitetura trabecular tridimensional por Micro-CT da região proximal do fêmur.....	65
<b>Figura 17:</b> Valores de pressão arterial sistólica (PAS) após tratamento de 8 semanas em animais realizando exercício físico em esteira.....	67
<b>Figura 18:</b> Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur e da quinta vértebra lombar avaliados por DEXA.....	71
<b>Figura 19:</b> Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre a densidade mineral óssea (DMO) da região proximal do fêmur avaliados por DEXA e por MicroCT.....	72
<b>Figura 20:</b> Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre a densidade mineral óssea (DMO) das regiões média e distal do fêmur avaliados por DEXA.....	72
<b>Figura 21:</b> Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT.....	73

**Figura 22:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT.....74

**Figura 23:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT.....75

**Figura 24:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT.....76

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ARA = antagonista/bloqueador do receptor do tipo I de angiotensina II
- AT1 = receptor do tipo I de angiotensina II
- BV/TV (%) = fração do volume osso
- CE = castradas realizando exercício
- CMC-Na = cARAoximetilcelulose de sódio
- CS = castradas sedentárias
- CT = castradas com uso de telmisartana
- DA = grau de anisotropia
- DCVs = doenças cardiovasculares
- DEXA = densitometria por absorciometria de dupla energia de raios X
- DM = densidade mineral (nas equações baseadas nos princípios de Arquimedes)
- DMO = densidade mineral óssea
- DO = densidade óssea (nas equações baseadas nos princípios de Arquimedes)
- IL1 e IL6 = interleucinas 1 e 6
- M-CSF = fator estimulante de colônias de macrófagos
- MicroCT = microtomografia computadorizada
- $m_{imm}$  e  $m_{wet}$  = massas imersa e úmida, respectivamente
- NFκB = fator nuclear κB
- OPG = osteoprotegerina
- OVX = ovariectomia
- PAS = pressão arterial sistólica
- $P_i$  = peso imerso ósseo
- $P_m$  = peso do material mineral (cinzas)
- PPARγ = receptor ativado por proliferador de peroxissomo tipo gamma
- $P_s$  = peso ósseo da amostra desidratada
- $P_u$  = peso úmido ósseo
- R1 = região proximal do fêmur
- R2 = região média do fêmur
- R3 = região distal do fêmur
- RANK receptor ativador do fator nuclear NFκB
- RANKL = ligante ao receptor ativador do fator nuclear NFκB



SE = SHAM realizando exercício

SHR = ratos espontaneamente hipertensos

SMI = índice de modelo estrutural

SRA = sistema renina angiotensina

SS = SHAM sedentárias

ST = SHAM com uso de telmisartana

Tb.N [1/mm] = número de trabéculas

Tb.Po [%] = porosidade trabecular

Tb.Sp [ $\mu\text{m}$ ] = separação trabecular

Tb.Th [ $\mu\text{m}$ ] = espessura trabecular

TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  = fatores de necrose tumoral  $\alpha$  e  $\beta$

TZD = tiazolidinedionas

VO = volume do osso

VOI = volume de interesse

$\rho$  = densidade da água

2D e 3D = bidimensional e tridimensional, respectivamente

## RESUMO

Telmisartana, um bloqueador do receptor do tipo I de angiotensina II e um agonista parcial de PPAR $\gamma$  tem sido usada para tratamento da hipertensão. É conhecido que a ativação do PPAR $\gamma$  induz perda óssea. O objetivo do presente trabalho foi avaliar duas intervenções distintas por um período de 8 semanas: o uso da telmisartana ou a corrida em esteira elétrica, sobre a densidade mineral óssea, microarquitetura óssea e sobre as propriedades mecânicas do fêmur de ratas espontaneamente hipertensas. As ratas com três meses de idade foram ovariectomizadas (OVX) ou SHAM operadas e distribuídas em 04 grupos para cada estudo, sendo que as ratas dos grupos SS e CS foram comuns aos estudos: 1) SHAM sedentárias (SS), SHAM com uso de telmisartana (ST), OVX sedentárias (CS) e OVX com uso de telmisartana (CT) e, 2) SHAM sedentárias (SS), SHAM realizando exercício (SE), OVX sedentárias (CS) e OVX realizando exercício (CE). Os tratamentos com telmisartana e com a substância veículo foram feitos por gavagem oral. Foram avaliados parâmetros de pressão sanguínea e, após a eutanásia, os ossos (fêmur e a quinta vértebra lombar) foram analisados por DEXA e/ou, MicroCT. Foi mensurado o nível de expressão proteica de PPAR $\gamma$  no fêmur por meio de *western blotting* nas ratas do estudo com telmisartana. A pressão sanguínea foi reduzida tanto nos animais que fizeram uso da telmisartana quanto naqueles que foram exercitados. Os dados ponderais indicaram que a OVX foi realizada com sucesso e o peso corporal final, peso do coração e a razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia também foram reduzidos pelo uso da droga, enquanto o exercício aumentou os parâmetros reduzidos com a droga no estudo 1. Em relação aos parâmetros ósseos propriamente ditos, houve redução no tamanho do fêmur, carga máxima, rigidez e resiliência e carga de fratura com a telmisartana. A DMO diminuiu no fêmur e na quinta vértebra lombar com a telmisartana. A integridade da microarquitetura trabecular por MicroCT também sofreu comprometimento pela droga nas ratas OVX. Os níveis de expressão de PPAR $\gamma$  aumentaram pela OVX e pela OVX associada a telmisartana. O exercício também reduziu a força máxima, a rigidez e a resiliência, e aumentou o tamanho do fêmur nas ratas OVX. Os parâmetros físicos do fêmur e da tíbia foram pouco alterados pelo exercício. A DMO reduzida pela OVX no fêmur e vértebra foi restaurada pelo exercício. Os parâmetros microarquiteturais no geral também foram alterados pela atividade

física. Os resultados demonstraram que o uso da telmisartana em ratas OVX, reduziu a massa óssea e desestruturou as trabéculas e demonstraram que a atividade física modificou positivamente a organização dos ossos avaliados. Em perspectiva clínica sugere-se acompanhamento de mulheres hipertensas em uso de telmisartana a fim de se avaliar os efeitos desta droga no osso e deve-se indicar exercício tipo corrida para se estimular a manutenção dos ossos.

Palavras Chave: Telmisartana, Exercício, Perda óssea, PPAR $\gamma$ , Hipertensão Arterial, Ovariectomia

## ABSTRACT

Telmisartan is a type I angiotensin receptor blocker and a partial PPAR $\gamma$  agonist that have been used to treat hypertension. PPAR $\gamma$  activation is known to act inducing bone loss. The aim of the present study was to evaluate two distinct interventions: use of telmisartan or treadmill running, under bone mineral density, bone microarchitecture, and the mechanical properties in the femur of spontaneously hypertensive rats. Three-month-old rats were ovariectomized (OVX) or SHAM operated were distributed into 06 groups: 1) sedentary SHAM (SS); 2) SHAM using telmisartana (ST); 3) SHAM exercised (SE); 4) sedentary castrated (CS); 5) OVX using telmisartana (CT) and; 6) OVX exercised (EC). Treatment with telmisartan or vehicle substance were performed by oral gavage for 8 weeks. Blood pressure measures were taken and, after euthanasia, bones (femur and a fifth lumbar vertebra) were analyzed by dual energy X-ray and/or computed microtomography. Protein expression levels of PPAR $\gamma$  were measured in the femur by western blotting. Results showed that blood pressure was reduced in both groups of animals using telmisartan, with a greater reduction in values in the CT group compared to the ST group. Final body weight, heart weight, and ratio of heart weight to tibial length were also reduced by 8-week drug use when compared to their respective controls. Regarding biometric and biomechanical parameters there were reduction in femur size, reduction in maximum load, stiffness and reduction in resilience and fracture load. Bone mineral density decreased in both total femur and fifth lumbar vertebra in animals treated with telmisartan. Bone parameters related to the integrity of trabecular microarchitecture by microtomography also deteriorated by the use of telmisartan in OVX rats groups. Protein expression levels of PPAR $\gamma$  were increased by ovariectomy alone and by treatment with telmisartana. Considering the effects of exercise practice, main results indicated a reduction in blood pressure in both groups of exercised animals. Final body weight was increased while uterus weight was reduced by ovariectomy per se, and exercise did not have influenced this result. Heart weight, tibial length and ratio heart weight were increased by physical activity. As for biometric and biomechanical modifications, there was an increase in maximum strength, and a reduction in stiffness and resilience. There was also an increase in femur size in castrated and exercised rats when compared to SHAM rats. Few changes in physical parameters of femur and tibia were affected by exercise. Regarding mineral

density on femur and fifth lumbar vertebra, exercise was able to restore losses caused by castration itself. Microarchitectural parameters in general were also improved by physical activity. Results showed that the use of telmisartan in ovariectomized rats negatively impairs microarchitecture due to a reduction in bone mass and deterioration of trabecular structure. The treadmill physical activity had a positive impact to modify the organization of the evaluated bones. Thus, our findings suggested caution in the possible therapeutic applications of telmisartan in clinical practice, in order to protect bone health under hypertensive conditions. Moreover, running-type physical exercise seems to be an effective way to stimulate the maintenance of bone health. Further studies are needed to clarify the mechanisms by which telmisartan favors bone loss in these models.

Keywords: Telmisartan, Exercise, Bone Loss, PPAR $\gamma$ , Arterial Hypertension, Ovariectomy

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Contextualização do estudo

O envelhecimento é um fenômeno natural de múltipla natureza, no qual estão associados processos degenerativos que modificam as diversas vias metabólicas do organismo que frequentemente resultam em alterações celulares e teciduais (KIRKWOOD, 2005; BRATIC, LARSSON, 2013; WAGNER *et al*, 2016).

Especialmente nos países mais desenvolvidos, e conforme a expectativa de vida aumenta em todo o mundo, é observado um maior número de idosos na população em geral, e desde os anos de 1950 essa longevidade aumentou em 20 anos (ROBERTS, 2011). Esse processo de transição demográfica resultou em alterações no perfil epidemiológico, elevando a prevalência de doenças não transmissíveis (diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, etc) e modificando o perfil de morbimortalidade em decorrência do aumento da longevidade e dentre estas doenças destaca-se a alta prevalência da osteoporose (HUGHES *et al*, 2001; KALYANI *et al*, 2014; HITA-CONTRERAS *et al*, 2015).

Em relação à osteoporose, é bem conhecido que a integridade dos ossos durante a vida adulta ocorre em função de um balanço da atividade dos osteoclastos e osteoblastos, que removem e repõem o osso, respectivamente, num processo conhecido por remodelamento ósseo (MASI, 2008).

Ao longo do envelhecimento, ocorre comprometimento do equilíbrio deste processo, o qual passa a tender para a reabsorção/perda óssea pela maior atividade osteoclástica em relação à ação dos osteoblastos, e a partir da quinta década de vida, este desbalanço compromete e reduz a densidade mineral óssea (DMO), maior fator

de risco para fraturas ósseas (MASI, 2008). O desequilíbrio concomitante entre a atividade osteoclástica e osteoblástica é exacerbado na fase pós-menopausa e é um fator determinante de osteoporose durante esse período (KALPAKCIOGLU *et al*, 2008). Está bem estabelecido que nesta doença ocorre perda de massa óssea, reduzida conectividade pela descontinuidade tecidual (caracterizada pela ruptura da microarquitetura trabecular) com conseqüente aumento na fragilidade óssea, e aumentado risco de fratura (BRANDI, 2009).

A maior longevidade da população faz aumentar a perspectiva de os indivíduos desenvolverem a doença, com prevalência aumentada, tanto em mulheres no período da pós-menopausa quanto em homens idosos (HERNLUND *et al*, 2013; KUO, CHEN, 2017; MINISOLA *et al*, 2017). Em termos sexuais há diferenças na perda óssea ao longo do processo de envelhecimento, e aponta-se que as mulheres perdem aproximadamente 20% da massa óssea nos primeiros 5 a 7 anos após a menopausa, enquanto os homens têm perda na ordem de 0,5-1% ao ano em idade semelhante. As regiões mais propensas a fraturas por causa do desenvolvimento da osteoporose na população idosa são as vértebras, o quadril, o fêmur proximal e o antebraço distal (HERNLUND *et al*, 2013; MINISOLA *et al*, 2017).

A prevalência de fraturas vertebrais é tão alta em homens quanto em mulheres e está associada principalmente a traumas ocupacionais neles (SAMBROOK, COOPER, 2018). Não existe evidência de que as diferenças nas taxas de fraturas sejam derivadas das diferenças de sexo em termos de conteúdo mineral ou área de densidade mineral, mas sim pelas diversas características macro e microarquiteturais do osso, além de fatores hormonais e aspectos da sobrecarga sofrida pelo tecido de acordo as atividades executadas no dia a dia pelos indivíduos (KUDLACEK *et al*, 2000).

Quando se compara a largura de vértebras entre homens e mulheres percebe-se que ela é maior nos homens, o que dá a eles maior área de densidade mineral óssea, mas a isto não correspondem alterações no número e espessura das trabéculas (EBBESSEN *et al*, 1999). Com o envelhecimento, a região central da trabécula e suas superfícies degeneram e isto faz com que regiões dependentes das trabéculas para a força óssea, tais como o corpo vertebral e fêmur proximal, sejam comprometidas na fase de pós-menopausa nas mulheres e com o envelhecimento nos homens (KUDLACEK *et al*, 2000).

A conservação e integridade da massa óssea e, assim do esqueleto, dependem de vários fatores, e dentre estes a presença do estrogênio tem peso significativo para o sexo feminino. Como citado anteriormente, os estrogênios estão relacionados à manutenção do equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, especialmente suprimindo esta última por agir sobre os osteoclastos (MANOLAGAS, 2000). Sabe-se que o hormônio masculino, a testosterona, também e da mesma forma, reduz a reabsorção óssea, mas essa ação normalmente é indireta, via aromatização deste hormônio à estrogênio (FALAHATI-NINI *et al*, 2000). A reposição hormonal estrogênica ou androgênica tem sido capaz de suprimir essa maior reabsorção óssea (LAURENT *et al*, 2016; SATO *et al*, 2017; ACKERMAN *et al*, 2019). Como consequência da queda nos níveis estrogênicos na mulher na fase pós-menopausa, ocorre um aumento na taxa de renovação óssea associada a uma diminuição na formação do tecido, e com rápida perda óssea (COMPSTON, 1994).

O mecanismo envolvido na influência dos estrogênios sobre a aumentada atividade osteoclástica é complexo e envolve uma série de fatores e a via de sinalização RANKL-RANK (ligante e receptor ativador do fator nuclear NFκB, respectivamente) (NAGY, PENNINGER, 2015), conforme esquema apresentado na figura 01.



Os estrogênios inibem a ligação RANKL-RANK e osteoprotegerina (OPG) regulando vários hormônios e citocinas, incluindo o paratormônio, o hormônio esteroide 1,25(OH)2D3, prostaglandinas, TNF- $\alpha$ , interleucina 6 (IL6) e o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), que ativam ou bloqueiam a diferenciação dos osteoclastos (TAKAHASHI *et al*, 1988, EVELY *et al*, 1991; AKATSU *et al*, 1989; AKATSU *et al*, 1991).

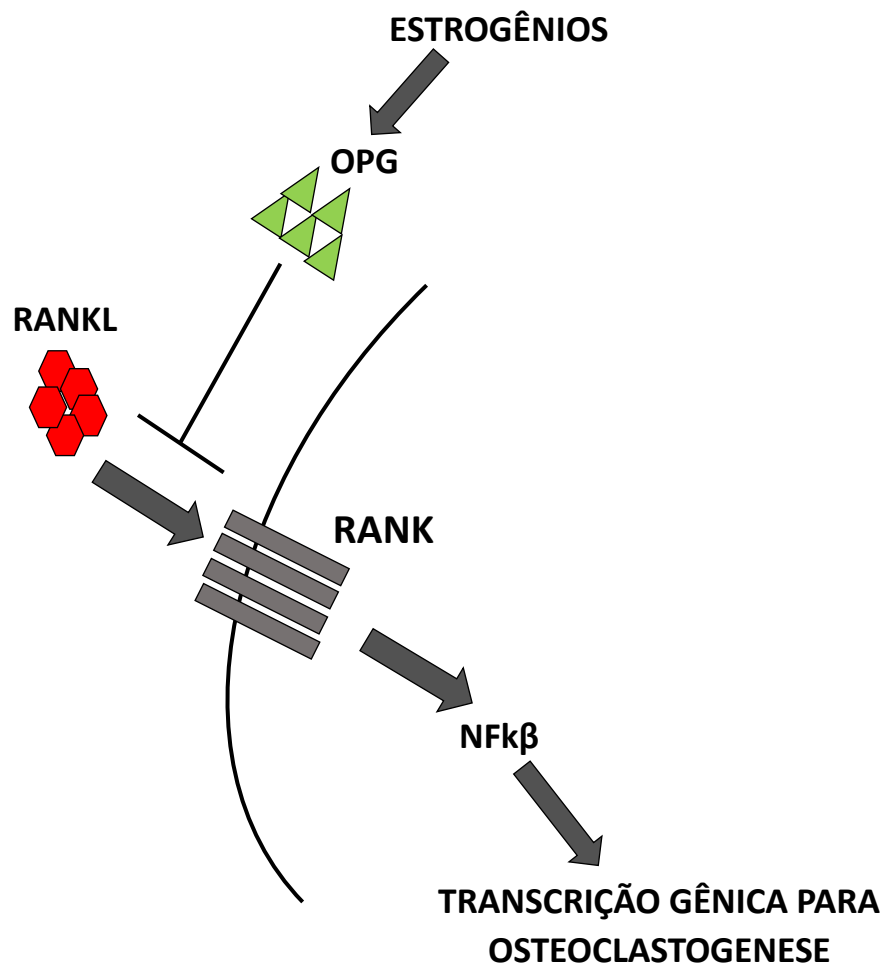


Figura 1: Esquema de sinalização RANKL-RANK para osteoclastogênese. Adaptado de Nagy & Penninger em *The RANKL-RANK Story*. *Gerontology* 2015, 61:534-542.

Dessa forma, a queda dos hormônios femininos durante a menopausa, ou após ovariectomia (OVX) em modelos experimentais em animais, leva a aumentados níveis de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e TNF- $\alpha$ , e reduzidos níveis de TNF- $\beta$

e osteoprotegerina, que em conjunto aumentam os níveis de RANKL com consequente aumento na atividade osteoclástica (NAGY, PENNINGER, 2015).

A terapia de reposição hormonal com estrógeno e/ou progesterona é capaz de inibir a atividade osteoclástica e aumentar a ação osteoblástica, e assim restaurar a massa óssea (ZALLONE, 2006).

Desde há alguns anos, vários estudos mostraram que a regulação do remodelamento ósseo, do risco e da consolidação de fraturas, tem associado o tecido ósseo com o sistema cardiovascular (KADO *et al*, 2000; HAUGE *et al*, 2001; HULLEY *et al*, 2002; ERIKSEN *et al*, 2007). Estes estudos mostraram que em indivíduos com comprometimento de determinados vasos (como por exemplo, a calcificação da aorta), com desenvolvimento de doença arterial coronária, com insuficiência cardíaca congestiva e naqueles com maior risco para eventos cardiovasculares, todos apresentaram maiores níveis de perda óssea e osteoporose.

Indivíduos com hipertensão arterial também têm mostrado alterações no metabolismo do cálcio com redução da Densidade Mineral Ossea (DMO), e assim enfraquecimento dos ossos CAPUCCIO *et al* (1999). Sabe-se que indivíduos hipertensos apresentam alterações no metabolismo do cálcio, com aumento da excreção urinária de cálcio, aumento secundário na atividade da glândula paratireoide, uma tendência a baixos níveis séricos de cálcio ionizado e aumentado “movimento” do cálcio do osso para o sangue favorecendo as fraturas (MCCARRON *et al*, 1980; STRAZZULLO *et al*, 1983; HVARFNER *et al*, 1987; GROBBEE *et al*, 1988; BRICKMAN *et al*, 1990; GADALLAH *et al*, 1991; YOUNG *et al*, 1992). Esta associação entre acometimentos do sistema cardiovascular e a possibilidade de fraturas osteoporóticas pode comprometer a qualidade de vida e a longevidade da população devido à sua associação com alta morbi-mortalidade.

Homens e mulheres com fraturas osteoporóticas têm um risco maior de mortalidade quando comparados àqueles sem fraturas tem em vista o acometimento geral da saúde do indivíduo pelos longos períodos de imobilização (BLIUC *et al*, 2009). Pode haver aumentos nas taxas de perda óssea, e assim tornar o indivíduo propenso à osteoporose pelo aumento na excreção urinária do íon, e assim maior saída dos ossos para o sangue afim de equilibrar os níveis séricos (STRAZZULLO, 1991; MACGREGOR, CAPPuccio, 1993). Nakagami *et al* (2013) confirmara a existência da associação entre comprometimento do sistema cardiovascular pela hipertensão e a osteoporose, representada por baixa DMO, em seres humanos.

A osteoporose é uma doença com prevalência mundial, na qual ocorre redução da massa óssea e alteração na organização microarquitetural do osso, com conseqüente redução na força para suportar as cargas impostas a ele, o que leva a maior fragilidade dos ossos, com conseqüente aumento no risco de fraturas (DUNNEWIND *et al*, 2017; ENSRUD, CRANDALL, 2017; FUKUMOTO, MATSUMOTO, 2017; QASEEM *et al*, 2017).

Osteoporose de acordo com o “*National Institutes of Health Consensus Development Panel on Osteoporosis*” é definida como uma “desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da força óssea com conseqüente aumento no risco de fratura” (LORENTZON, CUMMINGS, 2015). As fraturas osteoporóticas em humanos dependem, da força óssea, da taxa de quedas dos indivíduos e da DMO; além de outras características esqueléticas, tais como, macroarquitetura (forma e geometria), microarquitetura (organização do osso cortical e do trabecular), composição mineral, grau de desmineralização, acúmulo de microdanos, e *turnover* ósseo. Em conjunto estes parâmetros estabelecem a qualidade do osso, a qual tem se tornado cada vez

mais importante de se avaliar para estimar a ocorrência das fraturas (CURREY, 2003; HEANEY, 2003; COOPER *et al*, 2005).

Ainda que a osteoporose normalmente tenha sido considerada uma doença feminina sabe-se que homens apresentam perda óssea significativa com o envelhecimento (KUDLACEK *et al*, 2000). De acordo com SEEMAN (1999), e MANOLAGAS (2000) e como já destacado acima, a perda óssea feminina tem relação direta com a deficiência de estrogênio, enquanto no sexo masculino não se reconhece um mecanismo claro. Ao que parece a DMO se correlaciona melhor com os níveis de estrogênio do que com os níveis de testosterona e a redução nos níveis de hormônio masculino com menor aromatização da testosterona à estrogênio, pode levar a perda óssea em homens (KUDLACEK *et al*, 2000).

Um modelo animal para estudo da hipertensão pós menopausal (FORTEPIANI *et al*, 2003), os ratos SHR apresentaram desordens ósseas osteoporóticas pré-existentes quando comparados aos animais Wistar (IZAWA *et al*, 1995). Como ocorre na osteoporose a prevalência da hipertensão aumenta com a idade, sendo uma doença crônica complexa que envolve múltiplos órgãos, considerada fator de risco para doença cardíaca, e causa principal de mortes em homens e mulheres (GILLIS, SULLIVAN, 2016). Até por volta da sexta década de vida os indivíduos do sexo masculino tem maior propensão à hipertensão e, a partir daí, há um aumento nos níveis de pressão nas mulheres, que tendem a igualar ou mesmo ultrapassar os níveis de hipertensão encontrados nos homens (YOON *et al*, 2003, MOZAFFARIAN *et al*, 2016).

Em mulheres idosas, a redução de hormônios sexuais femininos nesta fase é considerada um fator de risco para pressão arterial mais alta (WENGER, 1995; RAJKUMAR *et al*, 1997; STAESSEN *et al*, 1997; GIERACH *et al*, 2006; NINIOS *et al*,

2008). Apesar das diferenças sexuais quanto ao desenvolvimento da hipertensão humana, as linhas de tratamento não diferem pelo sexo (JAMES *et al*, 2014).

Embora tenha sido previamente documentada a associação entre hipertensão, DMO reduzida e osteoporose em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (SATO *et al*, 2010; USHIJIMA *et al*, 2010; ARAI *et al*, 2013), os mecanismos celulares e moleculares que entrelaçam essas doenças geralmente não são reconhecidos e as duas condições são tratadas separadamente (CAPPUCCIO *et al*, 1999; ASABA *et al*, 2009).

A exacerbação da atividade do SRA é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, desencadeando mecanismos que levam a aumentada resistência vascular, e tendo por isso um importante papel no desenvolvimento da hipertensão arterial e, como consequência disso, drogas que atuam neste sistema têm sido usadas para tratamento da hipertensão (ZHAO *et al*, 2019).

Estudos mostraram que drogas anti-hipertensivas, como tiazidas (SCHOOFS *et al*, 2003), betabloqueadores e inibidores da enzima conversora de angiotensina (SCHLIENGER *et al*, 2004) reduzem o risco de fraturas osteoporóticas. Em relação ao efeito deste último grupo de drogas, dados sugerem que o sistema renina-angiotensina (SRA) pode estar envolvido no metabolismo ósseo (SHIMIZU *et al*, 2008) regulando aspectos ultraestruturais e metabólicos deste tecido, pela ação direta da angiotensina II (MASI, 2008; KALPAKCIOGLU *et al*, 2008). A angiotensina II é capaz de agir sobre as células envolvidas no metabolismo ósseo por meio de receptores nos osteoblastos e osteoclastos (NAKAGAMI *et al*, 2013), bem como estimular a reabsorção óssea pela maior atividade osteoclástica (HATTON *et al*, 1992; ZHAO *et al*, 2019) e também estimular a proliferação de osteoblastos (HIRUMA *et al*, 1997).

Porém os estudos quanto ao papel do SRA na regulação do remodelamento ósseo são contraditórios.

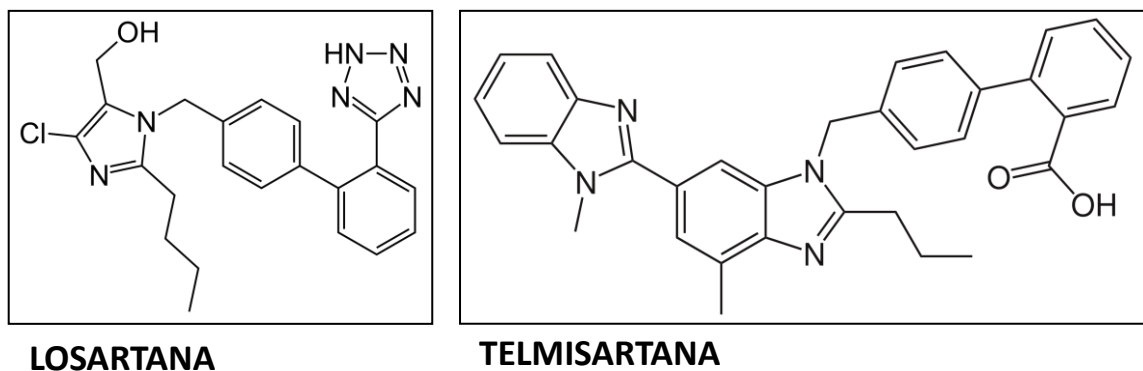
Especificamente, a respeito do uso dos bloqueadores de receptores do tipo I de angiotensina II (ARAs da sigla em inglês angiotensin receptor blockers) os dados são controversos e inconclusivos (SHIMIZU *et al*, 2008; ZHANG *et al*, 2013; BIROCALE *et al*, 2016; AYDOĞAN *et al*, 2019). Alguns autores reforçaram o potencial de bloqueio dos receptores do tipo I de angiotensina II em reduzir a perda óssea (NAKAGAMI *et al*, 2013).

SHIMIZU *et al* (2008) demonstraram em ratas ovariectomizadas, que a angiotensina II aumentou o RANKL em osteoblastos, e isto estimulou indiretamente a ativação de osteoclastos pela interação com seu receptor de membrana (RANK) levando à reabsorção óssea e reduzida DMO; entretanto, o uso de olmesartan, um ARA, impediu esse efeito. Em contraste a esses resultados, o uso de telmisartana, outro ARA, causou efeitos diferentes em um estudo realizado em nosso laboratório com ratos SHR machos, em que foram observadas perdas na DMO e pior resposta em parâmetros biomecânicos no tecido ósseo (BIROCALE *et al*, 2016). Em um estudo clínico em pacientes com hipertensão leve, nos quais não foram alterados os marcadores de *turnover* ósseo (AYDOĞAN *et al*, 2019) e estes achados confirmam a controvérsia sobre o uso de ARAs e seus efeitos sobre o tecido ósseo. Do mesmo modo, o losartana foi incapaz de prevenir deterioração óssea causada pela orquidectomia em ambos os ratos, normotensos e hipertensos machos, sugerindo uma menor participação de receptores do tipo 1 de angiotensina II (AT1) sobre o tecido ósseo (ZHANG *et al*, 2013). Esses resultados controversos de diferentes ARAs podem ser devidos ao modo de ação de cada um deles, as doses experimentais e/ou aos desenhos experimentais utilizados.

Em nosso estudo escolhemos utilizar o ARA telmisartana, tendo em vista que estudos têm demonstrado efeitos ósseos satisfatórios pelo uso de ARAs (aumento na DMO e diminuição na ativação osteoclástica) (Nakagami *et al*, 2013; ZHANG *et al*, 2013). Desse modo, o tratamento da hipertensão pela telmisartana poderia potencialmente prevenir a perda óssea e ter um papel positivo neste tecido (GUAN *et al*, 2011).

## 1.2. Caracterização da telmisartana e sua relação com osso

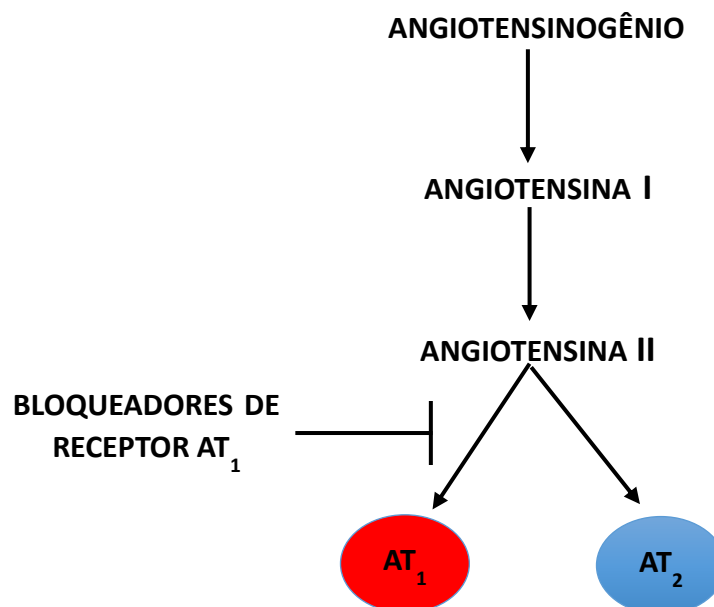
Como citado anteriormente, SHIMIZU *et al* (2008) e ZHAO *et al* (2019) demonstraram que a angiotensina II pode acelerar a perda óssea em função de seu papel estimulador sobre a atividade osteoclástica (via de sinalização RANKL-RANK), e tendo em vista isto, o bloqueio da ação da angiotensina II sobre o receptor AT1 pode se configurar como uma alternativa terapêutica para a perda óssea em pacientes hipertensos. Diante desse cenário, o uso de drogas com ação inibitória sobre a via clássica do sistema renina-angiotensina ou porções dessa via, pode atenuar a perda óssea induzida por hipertensão arterial. KANG *et al* (2013) citam vários estudos e análises epidemiológicas que demonstram uma associação entre drogas anti-hipertensivas e função óssea e, drogas anti-hipertensivas acabam por impactar o metabolismo, a força e a densidade óssea de modo direto ou indireto, o que aponta para um estímulo pró ou anti-osteoporótico (OTT *et al*, 2008).



**Figura 02:** Estrutura química da losartana e da telmisartana. Adaptado de “A Systematic Comparison of the Properties of Clinically Used Angiotensin II Type I Receptor Antagonists (MICHEL *et al*, 2013)”.



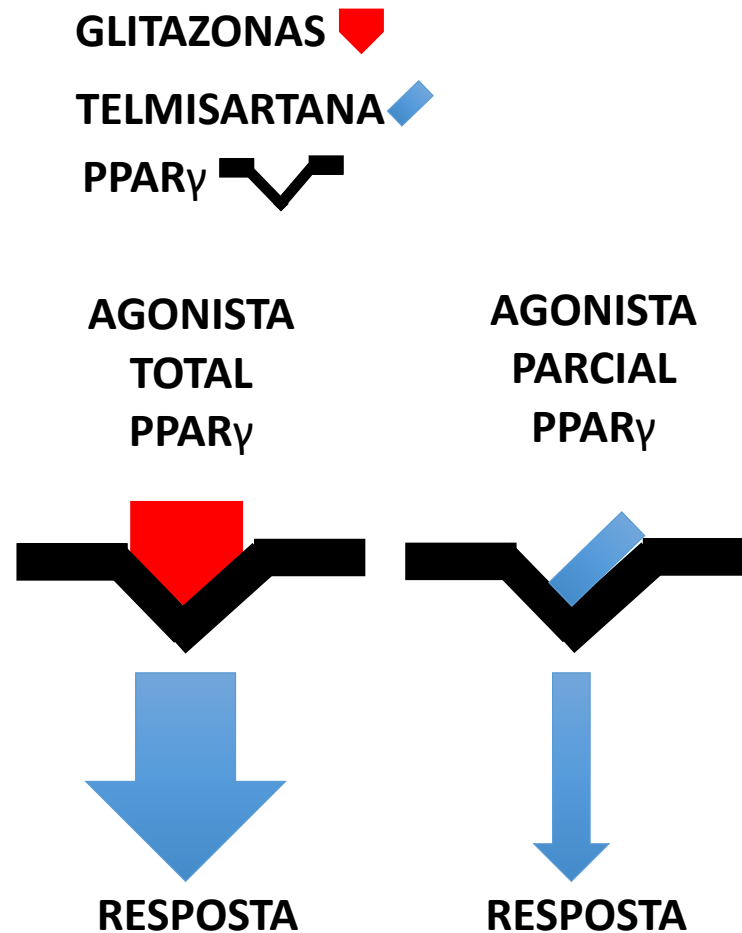
A telmisartana é um ARA (figura 02) com características únicas, pois, além de atuar bloqueando os receptores do tipo I da angiotensina II (figura 03), possui capacidade de ativar, como agonista parcial, o receptor ativado por proliferador de peroxissomo do tipo gama (PPAR $\gamma$ ) (figura 04), uma superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição ativados por ligantes, que atuam na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos, melhorando a sensibilidade à insulina, reduzindo os níveis de triglicerídeos e os riscos para aterosclerose (BENSON *et al* 2004).



**Figura 03:** Esquema simplificado do sistema renina-angiotensina e papel de bloqueio de AT<sub>1</sub> pela telmisartana. Adaptado de “Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders (SAAVEDRA, 2012)”.

Existe uma semelhança estrutural entre telmisartana utilizado no tratamento da hipertensão e a pioglitazona (tiazolidinediona - TZD) um potente ligante para PPAR $\gamma$  aprovado para o tratamento da diabetes tipo II (PERSHADSINGH *et al*, 2003). Assim, a telmisartana é uma droga única em sua classe, pois, além dos efeitos clássicos sobre o receptor do tipo I de angiotensina II, possui habilidade de ativar PPAR $\gamma$  (BENSON *et al*, 2004).

Como citado anteriormente o PPAR $\gamma$  faz parte de uma superfamília de receptores nucleares expressos em vários tecidos com funções regulatórias no metabolismo e homeostasia de lipídeos e glicose (MOSTI *et al*, 2014).



**Figura 04:** Esquema da ligação da telmisartana e das glitazonas com o receptor PPAR $\gamma$  comparando suas magnitudes de respostas (agonismo parcial versus agonismo total, respectivamente).

DUBOIS *et al* (2017) apontaram que o PPAR $\gamma$  mobiliza os lipídeos armazenados no fígado e no músculo esquelético direcionando-os para o tecido adiposo branco, assim indiretamente aumentando a utilização da glicose no fígado e tecidos periféricos; essa redução na lipotoxicidade melhora a sensibilidade à insulina do fígado e tecidos periféricos.

A despeito desse importante papel regulador do metabolismo energético, agonistas PPAR $\gamma$  têm sido associados ao comprometimento ósseo com perda tecidual, por promoverem diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas derivadas da medula óssea à adipócitos com redução da osteoblastogênese (LECKA-CZERNIK *et al*, 2002; LAZARENKO *et al*, 2007; SATO *et al*, 2013) e por aumentarem a diferenciação de osteoclastos (WU *et al*, 2010).

Embora os mecanismos envolvidos nesses achados não sejam totalmente compreendidos, sabe-se que os agonistas do PPAR $\gamma$  podem causar perda óssea *in vitro* e em modelos *in vivo* (MA *et al*, 2010; WAN, 2010; STUNES *et al*, 2011; WU *et al*, 2013; MOSTI *et al*, 2014; BILLINGTON *et al*, 2015). O tratamento com agonistas de PPAR $\gamma$  - tiazolidinedionas - apresenta um risco significativo devido aos efeitos adversos no osso humano, e a ativação do PPAR $\gamma$  por TZDs causa perda óssea, pela supressão na diferenciação e atividade dos osteoblastos, reduzindo a formação óssea e aumentando a diferenciação dos osteoclastos (MA *et al*, 2010; BILLINGTON *et al*, 2015). Outro possível mecanismo subjacente à perda óssea relacionado à ação dos agonistas do PPAR $\gamma$  envolve a diferenciação de células adipogênicas a partir das células-tronco mesenquimais à custa da osteoblastogênese (SOTTILE *et al*, 2004; BRAGDON *et al*, 2015). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que os agonistas do PPAR $\gamma$  podem aumentar o risco de perda óssea.

Dados da literatura a respeito dos efeitos da telmisartana no osso são escassos e, em um estudo em ratas espontaneamente hipertensas e ovariectomizadas, MA *et al* (2010), mostraram que a telmisartana reduziu a perda óssea decorrente do uso de um agonista total de PPAR $\gamma$ , a rosiglitazona (tiazolidinediona ou glitazona) pelo aumento na relação volume ósseo/tecido ósseo, número de trabéculas e espessura trabecular. Diante do exposto a telmisartana parece poder tanto proteger (efeito antagonista ao

SRA) quanto prejudicar a qualidade da arquitetura óssea (papel agonista de PPAR $\gamma$ ). Diante deste contexto surge a pergunta “de fato, qual o efeito da telmisartana no osso de ratas espontaneamente hipertensas OVX ou não OVX?”

### 1.3. Exercício físico e sua relação com osso

A revisão de evidências epidemiológicas sobre os benefícios preventivos e terapêuticos do exercício e dos principais mediadores biológicos envolvidos demonstra que o exercício pode ser considerado uma "polipílula" para melhorar a qualidade de vida da população (FIUZA-LUCES *et al*, 2013).

A atividade física pode ser uma ferramenta eficaz na abordagem não farmacológica de doenças cardiovasculares (DCVs) e osteoporose, pois pode promover adaptações fisiológicas que induzem a redução da pressão sanguínea e promove síntese de tecido ósseo, o que apresenta um impacto positivo na prevenção das perdas relacionadas à idade (GUADALUPE-GRAL *et al*, 2009). Além disso, intervenções com exercícios físicos demonstraram ser eficientes e eficazes, com menor impacto econômico e efeitos colaterais em comparação com os métodos farmacológicos (CHEN *et al*, 2011).

Sabe-se que agentes farmacológicos podem reduzir os riscos de fraturas ósseas associadas à osteoporose pela inibição das vias de perda tecidual e estimulação daquelas associadas à formação de novo osso (NEER *et al*, 2001; BAGGER *et al*, 2004; CHESNUT *et al*, 2004). Entretanto, é muito atrativa a ideia de inibir a perda óssea sem os efeitos colaterais do uso sistêmico de drogas, preservando a massa, arquitetura e a força ósseas, e assim aumentando a resistência às fraturas.

Vários tipos de exercício físico, tais como, corrida, salto, vibração, natação, levantamento de peso, dentre outros, podem ser utilizados e têm sido vistos melhorar as características ósseas (GUADALUPE-GRAL *et al*, 2009). Modelos com o uso de sobrecarga mecânica cíclica aumentam a cascata de remodelação óssea, melhorando o aproveitamento mineral no osso esponjoso durante o crescimento pré-púbere

(FUCHS *et al*, 2001) e oferecem um tratamento alternativo para prevenir perda óssea em indivíduos idosos (SNOW *et al*, 2000; KERR *et al*, 2001; FRITTON *et al*, 2008).

O mecanismo exato pelo qual o exercício físico previne a osteoporose ainda não está completamente esclarecido (PIGOZZI *et al*, 2009), mas os dados sugerem que o exercício pode ter um efeito positivo no esqueleto, e a sobrecarga mecânica gerada pela atividade física foi citada como o principal meio de preservar e melhorar a massa e, conseqüentemente, a força óssea (OCARINO, SERAKIDES, 2006; SIEGRIST, 2008).

O exercício físico é capaz de alterar o metabolismo ósseo diretamente por meio da tensão (HENDERSON *et al*, 1998; CHERIAN *et al*, 2003). A força mecânica a partir do exercício físico é transformada em sinais que regulam o *turnover* ósseo com formação deste tecido (CHERIAN *et al*, 2003; NOMURA & YAMAMOTO, 2000). Segundo VERHAEGHE *et al* (2000) a força mecânica aplicada ao osso produz estimulação imediata e tardia para formação óssea e com isso há melhora do tecido para o suporte de cargas estressantes pela formação do osso. Sabe-se que os estrógenos melhoram a sensibilidade destes mecanorreceptores às cargas mecânicas, e sua perda leva a diminuição desta sensibilidade, o que aponta para uma piora nessa resposta com o envelhecimento (LEE, LANYON, 2004).

## 1.4. Justificativa dos Estudos

Tendo em vista o papel da telmisartana sobre o tecido ósseo, atuando como ARA e/ou ativando o PPAR $\gamma$  de forma parcial, concomitantemente, reduzindo ou aumentando potencialmente a atividade osteoclástica e, considerando que não existem estudos, associando o uso da telmisartana em um modelo de osteoporose menopausal e hipertensão, avaliou-se o efeito do uso desta droga sobre o tecido ósseo no fêmur e vértebra lombar em ratas SHR, as quais apresentam desordens ósseas osteoporóticas pré-existentes, na presença (condição SHAM) e ausência de variabilidade fenotípica decorrente dos hormônios sexuais (ovariectomia).

Além disso, tendo em vista que o exercício físico é uma ferramenta não farmacológica considerada eficiente para o tratamento de doenças cardiovasculares e osteoporose, avaliou-se o efeito desta intervenção nos mesmos ossos de um protocolo de corrida em esteira por 8 semanas no modelo de deprivação hormonal e hipertensão (ratas SHR SHAM ou OVX).

Nossa hipótese foi que a telmisartana e o exercício físico em esteira, influenciam as condições hipertensivas das ratas SHR reduzindo a pressão arterial, e ainda, que ambas as abordagens alteram parâmetros densitométricos, biomecânicos e microarquiteturais dos ossos avaliados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com telmisartana e do exercício físico de corrida em dois estudos diferentes num modelo de osteoporose e hipertensão menopausal em ratas espontaneamente hipertensas (SHRs) ovariectomizadas ou não.

### 2.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do uso de telmisartana ou da realização de exercício físico nos diferentes grupos estudados, sobre:

- Parâmetros ponderais peso corporal, peso do coração, comprimento tibial e razão peso do coração e comprimento da tibia.
- Os níveis de pressão arterial.
- A densidade mineral óssea de fêmur e vértebra lombar.
- Aspectos estruturais e/ou microestruturais no tecido ósseo.
- Os parâmetros biomecânicos do fêmur em testes de flexão de 3 pontos.
- Índices morfométricos da estrutura trabecular da região proximal do fêmur.
- A expressão proteica de PPAR $\gamma$  no fêmur.



## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Aprovação do Projeto

O comitê de ética em Pesquisa com Animais, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES - avaliou e aprovou o referido estudo sob o Protocolo CEUA número 64/2012.

### 3.2. Delineamentos do Estudo

Para observar a importância da presença ou redução drástica dos hormônios sexuais femininos, e ainda, os efeitos associados disso a uma abordagem farmacológica ou a uma não farmacológica, foram realizados dois estudos experimentais:

- 1) Estudo em ratas SHR submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou ovariectomia tratadas com telmisartana.
- 2) Estudo em ratas SHRs submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou ovariectomia que realizaram exercício físico de corrida em esteira.

#### 3.2.1. Estudo em ratas SHR submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou à ovariectomia tratadas com telmisartana

Ratas espontaneamente hipertensas adultas (3 meses de idade) foram colocadas em um ambiente com controle de temperatura e umidade, e ciclos de 12 horas de claro e escuro. Os animais receberam água e uma ração padrão para ratos (Purina Labina, SP-Brasil) à vontade (*ad libitum*). Todos os procedimentos foram realizados de acordo

com as diretrizes de pesquisa biomédica para o cuidado ético e uso de animais em pesquisas científicas, e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFES para uso em animais. Após 14 dias do procedimento de ovariectomia ou da cirurgia simulada (SHAM), os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes seis grupos seguintes: 1) ratas SHAM que receberam veículo (SS), 2) ratas SHAM com uso de telmisartana (ST), 3) ratas ovariectomizadas/castradas que receberam veículo (CS), e 4) ratas ovariectomizadas/castradas com uso de telmisartana (CT).

Todas as ratas dos grupos SS e CS receberam gavagem oral diária durante 8 semanas com veículo (carboximetilcelulose de sódio-CMC-Na a 0,5%) e aquelas dos grupos ST e CT receberam uma dose de telmisartana dissolvido em veículo (5 mg/kg/dia). Todos os animais foram pesados semanalmente para medir a massa corporal em uma balança digital para ajustar a dose da droga e do veículo e para análise biométrica.

### 3.2.2. Estudo em ratas SHR submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou à ovariectomia submetidas a exercício físico em esteira

Ratas espontaneamente hipertensas adultas (3 meses de idade) foram colocadas em um ambiente com controle de temperatura e umidade, e ciclos de 12 horas de claro e escuro. Os animais receberam água e uma ração padrão para ratos (Purina Labina, SP-Brasil) à vontade (*ad libitum*). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica para o cuidado ético e uso de animais em pesquisas científicas, e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFES para uso em animais. Após o procedimento de ovariectomia ou da cirurgia simulada (SHAM), os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes seis

grupos seguintes: 1) ratas SHAM que receberam veículo (SS), 2) ratas SHAM submetidas a exercício físico em esteira elétrica (SE), 3) ratas ovariectomizadas/castradas que receberam veículo (CS), e 4) ratas ovariectomizadas/castradas submetidas a exercício físico em esteira elétrica (SE).

Todas as ratas dos grupos SS, SE, CS e CE receberam gavagem oral diária durante 8 semanas com veículo (carboximetilcelulose de sódio-CMC-Na a 0,5%) e, além disso, as ratas dos grupos SE e CE foram submetidos a sessões diárias de exercício físico em esteira. As ratas exercitadas foram aclimatadas na esteira (EP131, Insight, São Paulo, Brasil) pela corrida numa intensidade progressiva (15-18 m/min de velocidade em inclinação de 0% por 15-60min/dia) por uma semana e, então, rreinaram regularmente na velocidade de 18 m/min de velocidade por 60 minutos, 5 dias por semana por 8 semanas. Todos os animais foram pesados semanalmente para medir a massa corporal em uma balança digital para ajustar a dose do veículo e para análise biométrica.

### 3.3. Procedimentos Metodológicos Comuns

#### 3.3.1. Ovariectomia

Após a anestesia intraperitoneal (i.p.) com mistura de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), os animais tiveram a região dos flancos tricotomizados e assepsiados com álcool iodado. As ratas então foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular até o alcance da cavidade peritoneal, seguida da exteriorização dos ovários e trompas. Após abrir a cavidade peritoneal ma linha de sutura absorvível foi

passada ao redor dos ovários para posterior ligadura da tuba uterina e remoção dos ovários. Após a retirada da trompa uterina, foi realizada sutura da musculatura e pele, a região foi limpa e o procedimento foi repetido no lado oposto, realizando-se a ovariectomia bilateral. Os animais submetidos à cirurgia fictícia (SHAM) tiveram uma incisão feita na pele e musculatura com posterior exposição dos ovários, porém sem remoção dos mesmos. Todos os animais foram operados durante o mesmo período e começaram a receber por gavagem doses de 5ml/kg/dia de veículo ou telmisartana após catorze dias de recuperação.

### 3.3.2. Medida da pressão arterial

Para a determinação da pressão arterial sistólica (PAS) final foi utilizado o método de pletismografia de cauda, usando um gravador de electro-esfigmomanômetro (IITC Life Science - 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA) 48 horas após o final do período de tratamento. Os ratos foram acondicionados em tubo cilíndrico de acrílico, no qual a região proximal da cauda se encaixa a um manguito de borracha ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 40 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captou os sinais a serem enviados e registrados no computador. As medidas de pressão utilizadas neste estudo só tiveram início após um período de aclimatação, onde os animais por três vezes, em dias diferentes, por dez minutos foram inseridos no aparelho da mesma forma que foram submetidos para medida de PAS, entretanto a pressão não foi registrada. O objetivo deste procedimento foi adaptar os animais a situação da medida de pressão, de maneira a evitar ao máximo sua movimentação durante o registro. Todas as medidas foram realizadas pela manhã

e três leituras foram realizadas para cada animal, e os resultados foram expressos como uma média (Endlich *et al*, 2017).

### 3.3.3. Análise de densitometria óssea por absorção dupla de raios-X (DEXA)

Após o período de 8 semanas das intervenções, os animais foram eutanasiados, e os ossos, fêmur e tíbia da pata esquerda, e a quinta vértebra lombar foram retiradas com instrumentos cirúrgicos, limpos de partes moles, imersos em solução salina e congelados a -20°C para posterior análise. Para análise subsequente, os fêmures e as vértebras foram lentamente descongelados e mantidos imersos em solução salina até o teste. Para as análises de densidade mineral óssea (DMO) os ossos foram posicionados no plano frontal e anteroposterior na mesa do escâner orientados da mesma forma e foram escaneados de acordo com o protocolo padrão de acordo com as instruções do fabricante. A densitometria óssea (absorciometria radiológica de dupla energia - DEXA) foi utilizada para avaliar a densidade mineral óssea (DMO) e o conteúdo mineral óssea (CMO) da quinta vértebra da coluna (L5), do fêmur total (comprimento total do fêmur incluindo diáfise e epífises) e regiões proximal (R1), média (R2) e distal (R3) do fêmur. Utilizou-se o dispositivo Discovery-A SN: 80999 Hologic (Bedford, MA, EUA) do Laboratório de Metabolismo Ósseo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no modo de alta resolução, com o auxílio do software para pequenos animais, fornecido pelo mesmo fabricante. A precisão do DEXA para avaliar a DMO foi previamente analisada medindo o coeficiente de variação, expresso como uma porcentagem da média. O coeficiente de variação foi

de 1,9% para a coluna vertebral e 0,6% para o fêmur total. Juntos, esses dados indicam alta precisão das medidas (Paniagua *et al*, 1998; Patullo *et al*, 2009).

### 3.3.4. Parâmetros Biométricos

#### 3.3.4.1. Peso Corporal, do Coração e dos Órgãos Acessórios Sexuais

Durante as 8 semanas de tratamento, os animais foram pesados semanalmente com o intuito de adequação da dose individual utilizada no tratamento (veículo ou telmisartana) em balança digital de precisão (KERNs, modelo 573, Balingen, Alemanha) para acompanhamento longitudinal. Após a eutanásia dos animais, os pesos do coração e do útero (em gramas) foram obtidos por meio de uma balança eletrônica.

#### 3.3.4.2. Medidas femorais e tibiais

As análises biométricas e biomecânicas foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia da Universidade Federal de São Carlos.

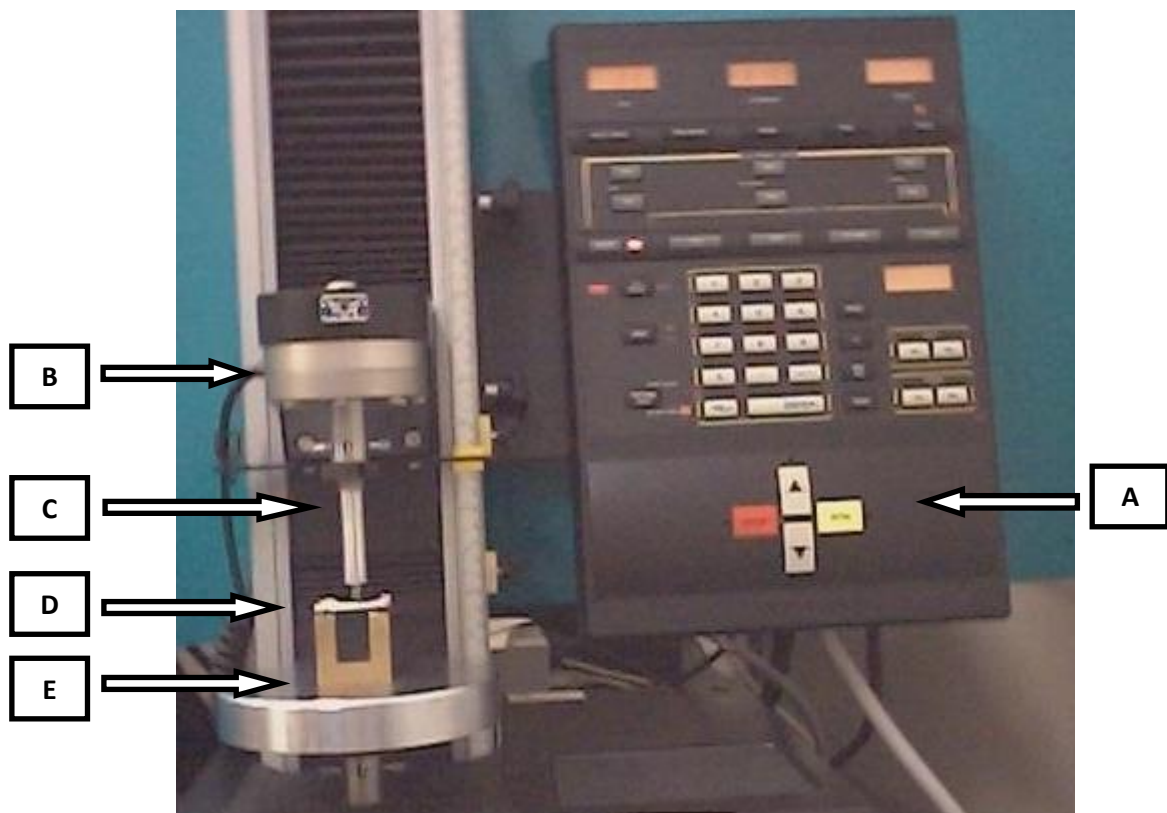
**Comprimento do fêmur esquerdo:** Esta mensuração foi realizada com um paquímetro (precisão de 0,05 mm) seguindo a padronização referencial: região distal dos côndilos femorais (face articular com a tibia) e saliência óssea mais proximal do trocânter maior.

**Comprimento da tibia esquerda:** as medidas foram realizadas com auxílio de paquímetro (precisão de 0,05 mm), tendo como referência o platô tibial e o maléolo medial.

### 3.3.5. Análise Biomecânica

Após a análise biométrica, os ossos foram mantidos em um dessecador por 24h, de modo a remover o ar presente nos poros ósseos. Posteriormente, a massa imersa ( $m_{imm}$ ) e a massa úmida ( $m_{wet}$ ) foram obtidas e, em seguida, a análise biomecânica foi iniciada.

As propriedades biomecânicas foram mensuradas pelo teste de flexão em três pontos usando uma máquina de teste universal Instron, modelo 4444, Canton, Massachusetts/EUA (figura 05) com uma célula de carga com capacidade de 100 kgf. As extremidades dos ossos foram apoiadas em dois cilindros com 3 mm de diâmetro e a uma distância de 21,70 mm. A carga foi aplicada na região central de cada osso (Trebacz, Zdunek, 2006).



**Figura 05:** Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **E:** suporte.

No início do teste, uma pré-carga de 10N foi aplicada na direção póstero-anterior (perpendicular ao eixo longitudinal) para estabilizar o fêmur. Após acomodação de 1 min e período de estabilização, aplicou-se uma força da mesma maneira, a uma velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento da fratura. Como resultado da força aplicada ao fêmur, o software Instron (série IX) gerou um gráfico sobrecarga versus deformação (figura 06). A análise das curvas nos permitiu obter as seguintes propriedades biomecânicas: deformação (deslocamento) máxima, deformação (deslocamento) no ponto da fratura, carga (força) máxima e carga (força) de fratura, resiliência, tenacidade e rigidez. Para definição destes parâmetros e como estes são demonstrados na curva sobrecarga deformação temos:

**Deformações (mm):** distâncias movidas pelo cilindro de carga registrada pelo equipamento: no limite elástico, no ponto de carga máxima e de fratura ( $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_3$  respectivamente, figura 05).

**Carga no Limite Elástico (N):** carga que separa a fase elástica da plástica ( $C_1$ , na figura 2). Para o tecido ósseo a fase elástica corresponde à porção linear da curva e a fase plástica, a parte não linear da mesma. O ponto de união das duas corresponde ao limite elástico.

**Carga Máxima (N):** Corresponde a maior carga suportada pela amostra (fêmur) durante o ensaio ( $C_2$ , figura 05).

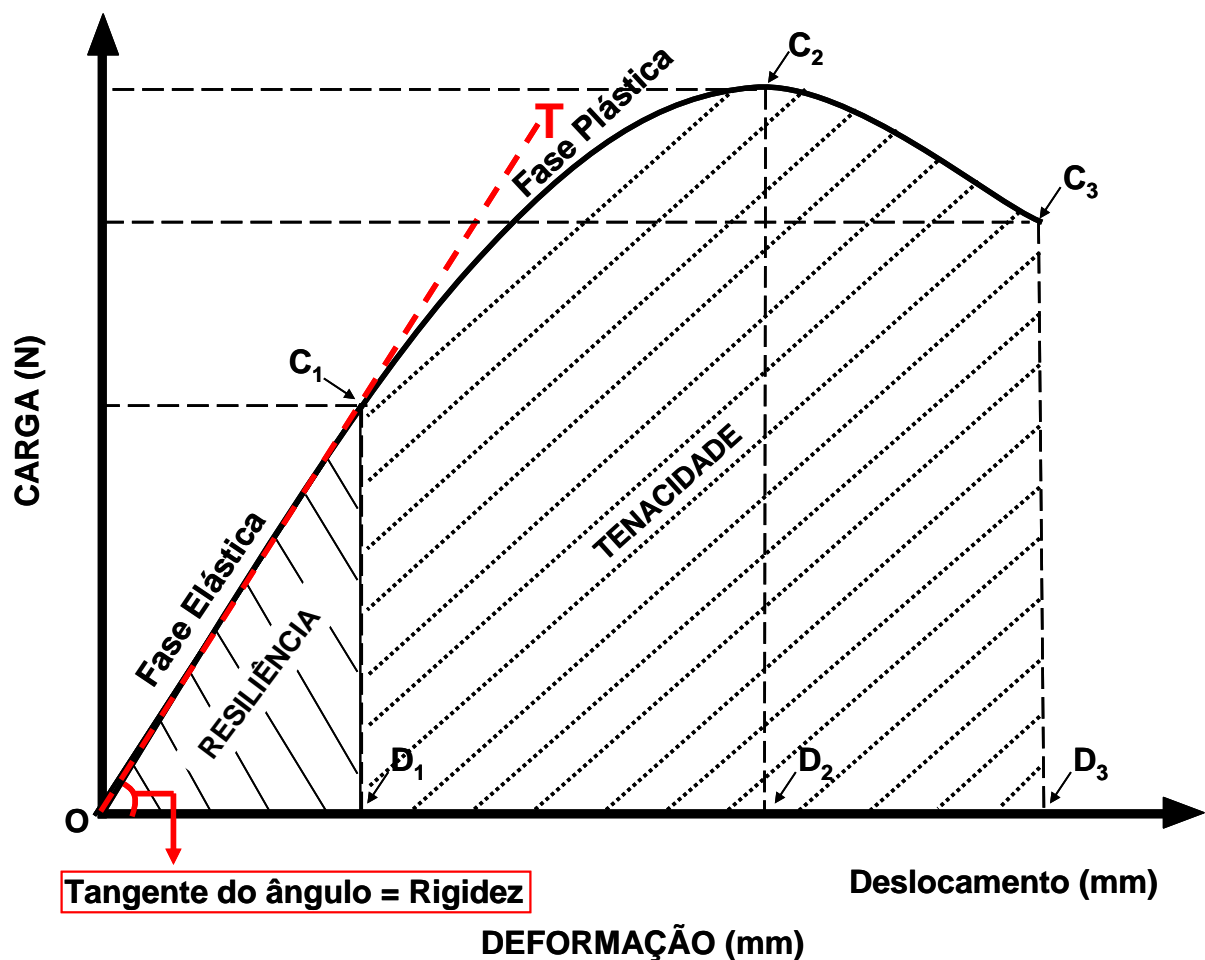
**Carga de Fratura (N):** Corresponde a carga aplicada no momento da fratura da amostra (fêmur) ao longo do ensaio ( $C_3$ , na figura 05).

**Resiliência (J):** Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o limite elástico. Representa a energia absorvida pelo tecido ósseo durante a fase elástica, ou seja, o impacto que a amostra suporta sem deformar-se permanentemente.



**Tenacidade (J):** Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o ponto de ruptura. Representa a energia necessária para provocar a ruptura do material, ou seja, a capacidade de uma estrutura resistir a uma força de impacto depende da tenacidade do material.

**Rigidez (N/mm):** Determinada por meio da inclinação da reta (T) ajustada aos pontos da curva carga x deformação na fase elástica (SOGAARD *et al.*, 1997). Representa a capacidade de resistir a deformações.



**Figura 06:** Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas: C<sub>1</sub>: Carga no Limite Elástico; D<sub>1</sub>: Deformação (deslocamento) no Limite Elástico; C<sub>2</sub>: Carga Máxima; D<sub>2</sub>: Deformação (deslocamento) na Carga Máxima; C<sub>3</sub>: Carga de Fratura; D<sub>3</sub>: Deformação (deslocamento) na Carga de Fratura (máxima); O/C<sub>1</sub>/D<sub>1</sub>: a área desta região corresponde a Resiliência (a energia absorvida na fase elástica); C<sub>1</sub>/C<sub>3</sub>/D<sub>1</sub>/D<sub>3</sub>: a área desta região corresponde à tenacidade (energia

absorvida até a carga máxima); T: tangente da região O/C<sub>1</sub> da curva, sendo o ângulo desta correspondente a Rigidez.

### 3.3.6. Análise Física

Após análise biométrica, os ossos foram mantidos em um dessecador por 24h com o objetivo de retirada do ar presente nos poros ósseos, e neste momento, foi obtida o peso seco (Ps). Em seguida obtiveram-se os pesos imerso (Pi) e peso úmido (Pu). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras foram armazenadas em uma estufa na temperatura de 100° C durante 24 horas com o intuito de desidratação e, posteriormente, obteve-se o peso seco (Ps). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral - Pm), os ossos foram colocados em uma mufla na temperatura de 800° C por um período de 24 horas (NORDSLETTEN *et al.*, 1994). Todas as medidas citadas foram obtidas por meio de uma balança eletrônica (Chyo, modelo JEX 200, Instruchem Inc., Manila, Filipinas). Usando o princípio de Arquimedes, o volume do osso (VO) foi obtido; então, a densidade óssea (DO) e a densidade mineral (DM), percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, foram obtidas por meio das fórmulas citadas abaixo (MARTIN, 1990):

$$VO = \frac{(Pu - Pi)}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$DO = \frac{Pu}{VO} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$DM = \frac{Pm}{VO} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100 \times (Pu - Ps)}{Pu} \%$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100 \times (P_s - P_m) \%}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100 \times P_m \%}{P_u}$$

Onde:

$P_u$  = peso úmido ósseo

$P_s$  = peso ósseo da amostra desidratada

$P_i$  = peso imerso ósseo

$P_m$  = peso do material mineral (cinzas)

$\rho$  = densidade da água

### 3.3.7. Mensuração de parâmetros arquiteturais da estrutura trabecular por microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT ou MicroCT)

A análise dos parâmetros microarquiteturais do fêmur proximal foram realizadas no laboratório de Física Nuclear Aplicada da Universidade de Sorocaba, São Paulo, Brasil.

A avaliação da microestrutura trabecular do fêmur foi feita usando um equipamento para microtomografia computadorizada da Bruker (modelo SkyScan 1174, Kontich, Belgium). As imagens tomográficas foram coletadas colocando as amostras do fêmur no interior da câmara tomográfica. Cortes de imagem foram obtidos utilizando as seguintes configurações do sistema tomográfico: tensão operacional de 45 kV e corrente elétrica de 730  $\mu$ A. A técnica empregada para a obtenção de uma imagem tomográfica envolveu a aquisição de diversas radiografias do objeto (cortes de imagens), obtidas pela mensuração da intensidade dos raios X transmitidos através da amostra, em diferentes posições angulares. As amostras de fêmur foram giradas

180 graus, com cada posição angular variando 0,8 graus em relação a anterior, produzindo 225 radiografias (projeções) por imagem, cada uma contendo  $1024 \times 1024$  pixels com uma resolução espacial de  $9,8 \mu\text{m}$ . Na saída da fonte de raios X, utilizou-se um filtro de Al com 0,5 mm de espessura.

O osso cortical e trabeculado do colo do fêmur foram obtidos quantificando o volume de interesse (VOI) de estruturas tridimensionais (3D) de todos os animais e extraíndo medições de cada grupo de dados no software NRecon™ da Bruker (versão 1.6.9.4, Kontich, Bélgica). Utilizando a ferramenta de seleção de polígonos, foram definidas a área do osso cortical e trabeculado circundando a margem externa (cortical) e interna (trabecular) do colo do fêmur. Consequentemente, maior fidelidade para a área selecionada foi adquirida utilizando ferramenta de interpolação dinâmica.

Para as imagens binárias, foi assegurado o uso apropriado do limiar dos valores de osso cortical e trabecular, os quais foram utilizados para todas as análises morfométricas subsequentes. O processamento da imagem foi necessário para a análise 3D dos parâmetros morfométricos que influenciam nas propriedades mecânicas e estruturais. Estes parâmetros foram calculados utilizando o mesmo software baseado em modelo de volume e a segmentação de cada colo femoral foi realizada utilizando o referido programa. Algoritmos matemáticos apropriados foram posteriormente utilizados para reconstruir a imagem tomográfica tridimensional (3D) das amostras de fêmur, através de composição adequada de imagens bidimensionais (2D). As imagens tridimensionais possuíam  $1024 \times 1024 \times 1024$  pixels e a mesma resolução espacial das imagens 2D, e assim o volume de dados gerado para cada amostra de fêmur foi isotrópico em relação à resolução espacial. Depois de reunir todas as projeções (radiografias reunidas em cada posição angular), utilizamos o

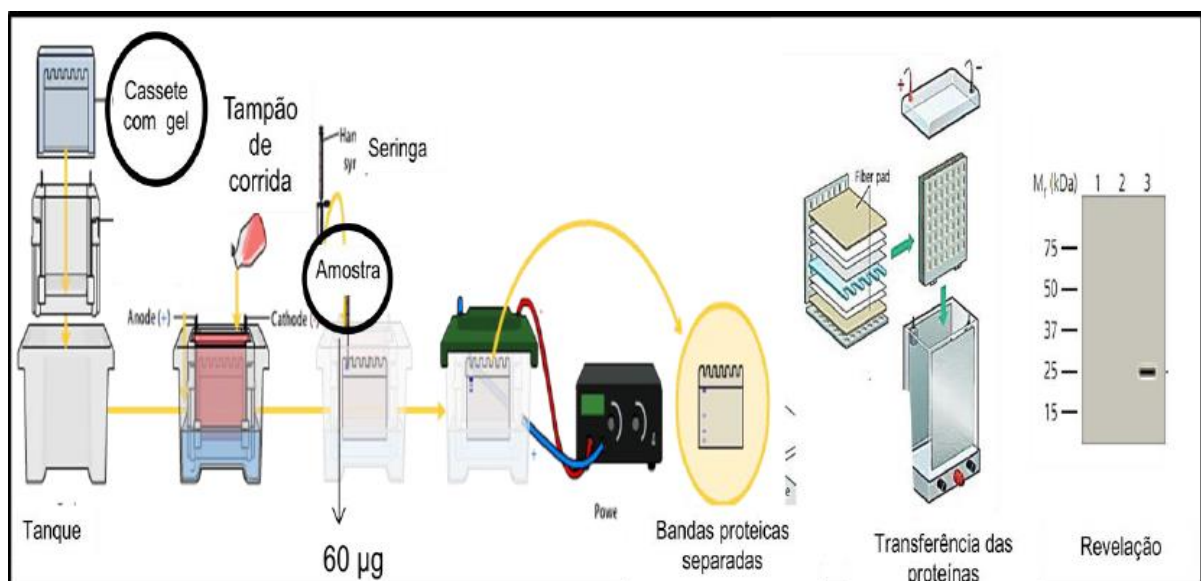
software acima referido que utiliza um algoritmo para reconstruir as imagens tomográficas (Feldkamp LA, Davis LC, 1984).

Os parâmetros de mensuração e abreviações para análise morfométrica 3D do MicroCT foram: volume tecidual, volume ósseo, fração do volume osso (BV/TV (%), razão superfície óssea pelo volume ósseo, densidade da superfície óssea (superfície óssea pelo volume tecidual), índice de modelo estrutural, grau de anisotropia [DA]), espessura trabecular (Tb.Th [ $\mu\text{m}$ ]), número de trabéculas (Tb.N [1/mm]), separação trabecular (Tb.Sp [ $\mu\text{m}$ ]), número de poros fechados, porosidade trabecular (Tb.Po [%]), volume total de espaço poro, conectividade trabecular, densidade de conectividade.

### 3.3.8. Análise da expressão proteica do PPAR $\gamma$ por Western Blotting

Os fêmures foram dissecados, limpos de todo tecido muscular e conectivo ao redor, e foram mantidos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento. Os ossos foram acoplados a uma haste de metal e imersos em nitrogênio líquido por 1 min e 30 seg e imediatamente macerados em tampão de lise (100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-base, 5 mmol/L de EDTA, 2 Na, 50 mmol / L de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 1 mmol / L de  $\text{MgCl}_2$ , 1% de Nonidet P40, 0,3% de Triton x-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio, pH = 8), contendo inibidor de protease (Sigma Fast, Sigma, EUA) e inibidores de fosfatase (20 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) e posteriormente sonicados por 5 vezes. O tecido lisado foi centrifugado por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  à 20.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford.

Sessenta microgramas de proteína foram diluídos em tampão (5x - 2M Tris, pH = 6,8, 20% glicerol, 30% SDS, 25% mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue) e foram separados por eletroforese usando SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Biorad). Após incubação com solução de bloqueio (Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,6, Tween a 0,05% e albumina a 4%), as membranas foram incubadas a 4°C, durante a noite com anticorpos específicos primários: PPAR $\gamma$  anti mouse ([1:200], Santa Cruz, Inc., USA) ou para  $\beta$ -actina anti mouse ([1:5000], Santa Cruz, Inc., USA). Em seguida, as membranas foram lavadas (5 min três vezes) e incubadas durante uma hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) [1:5.000]: anti-IgG *mouse* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As bandas imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimioluminescência utilizando substrato de peroxidase (*Luminata HRP Substrate-Millipore*) e a reação foi captada e quantificada pelo software Bio-rad Image Lab 5.2.1 (figura 07). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização com a proteína controle  $\beta$ -actina visando diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas.



**Figura 07:** Esquema global de uma eletroforese em gel. Adaptado de <http://www.creative-diagnostics.com/Sample-Gel-Preparation.htm>

### 3.4. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados utilizando-se os valores da média  $\pm$  EPM e as comparações múltiplas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de pós-teste de Fisher. O nível de significância utilizado foi de  $p < 0,05$  para todas as comparações e as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism (versão 6.01, GraphPad Software, Inc.)

## 4. RESULTADOS

Para estudar os efeitos do uso de telmisartana e do exercício físico de corrida em esteira sobre vários parâmetros da estrutura óssea do fêmur e quinta vértebra lombar, utilizamos um modelo experimental no qual a ovariectomia de animais SHR para mimetizar a situação humana de redução na produção de hormônios sexuais associada à hipertensão arterial (como ocorre na pós-menopausa). A apresentação dos resultados das duas intervenções delineadas no presente estudo foi realizada em sessões distintas, uma vez que o tratamento estatístico dos dados foi feito em separado, em coerência com os objetivos do estudo, que não foi comparar as duas intervenções.

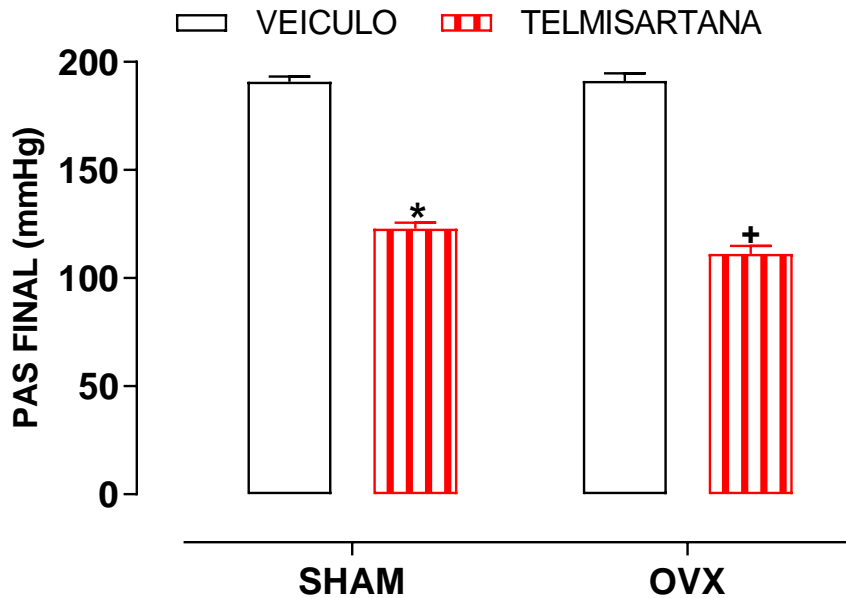
### 4.1. Ratas SHRs submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou à ovariectomia (OVX) que receberam telmisartana ou veículo

#### 4.1.1. Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Parâmetros Ponderais

Os valores de PAS foram reduzidos nas ratas SHAM tratadas com telmisartana (ST) quando comparadas às ratas do seu respectivo grupo controle não tratado que recebeu veículo (grupo SS), e as ratas do grupo OVX que recebeu telmisartan (grupo CT) tiveram redução na PAS quando comparadas com as ratas dos demais grupos (SS, ST e, as ratas OVX que receberam veículo, CS). Os valores encontrados assim como as comparações entre os grupos foram as seguintes: 1) ST:  $122,8 \pm 2,81$  mmHg versus SS:  $190,8 \pm 2,3$  mmHg; e 2) CT:  $111,2 \pm 3,70$  versus SS:  $190,8 \pm 2,3$  mmHg



ou versus ST:  $122,8 \pm 2,81$  mmHg ou versus CS:  $191,2 \pm 3,44$  mmHg e estão representados na figura 08.



**Figura 08:** Valores de pressão arterial sistólica (PAS) após tratamento de 8 semanas com o uso de telmisartana (5mg/kg/dia) ou veículo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). Diferenças são como se segue: \* p < 0.05 vs. grupo SS, + p < 0.05 vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

Na tabela 01 apresentam-se os parâmetros fisiológicos ponderais iniciais e os efeitos da telmisartana nas ratas SHAM e ovariectomizadas. A ovariectomia (grupo CS) por se promoveu alterações esperadas em relação aos parâmetros avaliados comparando-se ao grupo SS: aumentou o peso corporal final e reduziu o peso do útero, e ainda, aumentou o peso do coração e, esses dados apontaram para eficiência da cirurgia de OVX.

Nas ratas SHAM tratadas com telmisartana (ST) houve redução no peso corporal final, no peso do coração, no comprimento da tíbia e na razão entre o peso do coração pelo comprimento da tíbia quando comparado com o grupo SS e, o uso de telmisartana

pelas ratas OVX (grupo CT) também causou alterações em relação às ratas do grupo CS: redução do peso corporal, redução do peso do coração e redução da razão peso do coração pelo tamanho da tíbia (tabela 1).

**Tabela 01.** Efeito do tratamento com telmisartana sobre o peso corporal, peso uterino, peso do coração, comprimento tibial, e razão peso do coração pelo comprimento da tibia. Grupos de animais: SS (SHAM), ST (SHAM com uso de telmisartana) CS (OVX veículo), CT (OVX com uso de telmisartana).

Variável	SS	ST	CS	CT
Peso Inicial (g)	160 ± 1.48	162,36 ± 1,78	164,52 ± 2,83	163,20 ± 2,22
Peso Final (g)	199,66 ± 3,87	186,85 ± 3,70 <sup>a</sup>	245,64 ± 5,55 <sup>a</sup>	215,82 ± 3,09 <sup>b</sup>
Peso Uterino (g)	0,426 ± 0,035	0,360 ± 0,038	0,122 ± 0,032 <sup>a</sup>	0,093 ± 0,004
Peso do Coração (g)	0,830 ± 0,022	0,692 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,900 ± 0,019 <sup>a</sup>	0,689 ± 0,098 <sup>b</sup>
Comp. da Tibia (cm)	3,65 ± 0,033	3,59 ± 0,021	3,71 ± 0,024 <sup>a</sup>	3,72 ± 0,024
Coração/Tibia (g/cm)	0,2289 ± 0,006	0,1926 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,2427 ± 0,051	0.1852± 0,054 <sup>b</sup>

Valores representam a média ± EPM ( $n = 7$ ): <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. grupo SS, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. grupo CS, (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

#### 4.1.2. Parâmetros Biométricos, Biomecânicos e Físicos do Fêmur

Em relação aos efeitos da telmisartana sobre os parâmetros biométricos e biomecânicos o uso da droga, nas ratas SHAM e OVX, causou danos em geral no tamanho do fêmur, na carga máxima, rigidez, resiliência, e carga de fratura. As tabelas 02 e 03 apresentam os efeitos biométricos, biomecânicos e físicos no fêmur esquerdo das ratas SHAM ou OVX, tratadas ou não com telmisartana (SS, ST, CS e CT).

A OVX (ratas CS) levou a aumento no tamanho do fêmur (versus SS) e o uso da telmisartana pelas ratas SHAM (ST) causou redução no tamanho do fêmur, força máxima, rigidez, resiliência e força máxima para fratura quando se comparando com as ratas do grupo SS. O uso de telmisartana pelas ratas OVX (grupo CT) aumentou o deslocamento na força máxima (CS).

Ainda que o teste biomecânico tenha demonstrado tais diferenças, quando foram avaliados os parâmetros físicos nenhuma das características estruturais do fêmur demonstrou qualquer diferença entre os grupos experimentais quando esses parâmetros foram avaliados indiretamente (método direto versus indireto).

Em relação à tibia, tabela 04, os parâmetros da análise física também não diferiram entre os grupos, exceto para o peso imerso da tibia em que as ratas que usaram telmisartana (ST), tiveram menor valor comparando-se com as ratas do grupo SS, além disso, o conteúdo mineral foi reduzido com uso do telmiartan em relação ao grupo SHAM (ST versus SS).

**Tabela 02:** Efeito do tratamento com telmisartana sobre parâmetros biométricos e biomecânicos do fêmur. Grupos de animais: SS (SHAM veículo), ST (SHAM com uso de telmisartana), CS (OVX veículo), CT (OVX com uso de telmisartana).

Variável	SS	ST	CS	CT
Fêmur, cm	3,28 ± 0,01	3,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,32 ± 0,01
Força Máxima (N)	0,092 ± 0,003	0,080 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,091 ± 0,002	0,087 ± 0,002
Desloc. na Força Máx. (mm)	0,879 ± 0,035	0,853 ± 0,033	0,847 ± 0,051	0,996 ± 0,050 <sup>b</sup>
Rigidez (N/mm)	227,52 ± 20,51	192,67 ± 7,38 <sup>a</sup>	208,01 ± 7,99	173,83 ± 12,74
Resiliência (J)	0,048 ± 0,006	0,034 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,042 ± 0,003	0,046 ± 0,003
Tenacidade (J)	0,076 ± 0,005	0,069 ± 0,008	0,073 ± 0,006	0,076 ± 0,05
Força Máxima para Fratura (N)	0,076 ± 0,004	0,054 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,072 ± 0,004	0,070 ± 0,003
Desloc. no Ponto de Fratura (mm)	1,255 ± 0,053	1,392 ± 0,169	1,288 ± 0,101	1,335 ± 0,068

Valores representam a média ± EPM (n = 7): <sup>a</sup> p<0.05 vs. grupo SS, <sup>b</sup> p<0.05 vs. grupo CS (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

**Tabela 03:** Efeito do tratamento com telmisartana sobre parâmetros físicos do fêmur. Grupos de animais: SS (SHAM veículo), ST (SHAM com uso de telmisartana), CS (OVX veículo), CT (OVX com uso de telmisartana).

Variável	SS	ST	CS	CT
Volume do Fêmur (cm <sup>3</sup> )	0,374 ± 0,011	0,363 ± 0,010	0,404 ± 0,012	0,390 ± 0,010
Peso Úmido do Fêmur (g)	0,645 ± 0,016	0,638 ± 0,016	0,679 ± 0,018	0,654 ± 0,014
Peso Imerso do Fêmur (g)	0,270 ± 0,006	0,267 ± 0,004	0,275 ± 0,007	0,264 ± 0,005
Peso Seco do Fêmur (g)	0,376 ± 0,011	0,359 ± 0,006	0,387 ± 0,011	0,368 ± 0,009
Peso Cinzas do Fêmur (g)	0,305 ± 0,012	0,296 ± 0,011	0,293 ± 0,012	0,297 ± 0,007
Densidade Mineral (g/cm <sup>3</sup> )	0,822 ± 0,041	0,825 ± 0,040	0,726 ± 0,026	0,767 ± 0,022
Densidade Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	1,725 ± 0,014	1,771 ± 0,057	1,684 ± 0,015	1,681 ± 0,011
Conteúdo de H <sub>2</sub> O (%)	41,82 ± 0,697	42,98 ± 1,978	43,09 ± 0,767	43,75 ± 0,631
Conteúdo Orgânico (%)	10,60 ± 2,290	10,30 ± 2,069	13,81 ± 1,292	10,61 ± 1,572
Conteúdo Mineral (%)	47,56 ± 2,146	46,70 ± 1,973	43,09 ± 1,382	45,62 ± 1,262

Valores representam a média ± EPM (n = 7): <sup>a</sup> p<0.05 vs. grupo CS. (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

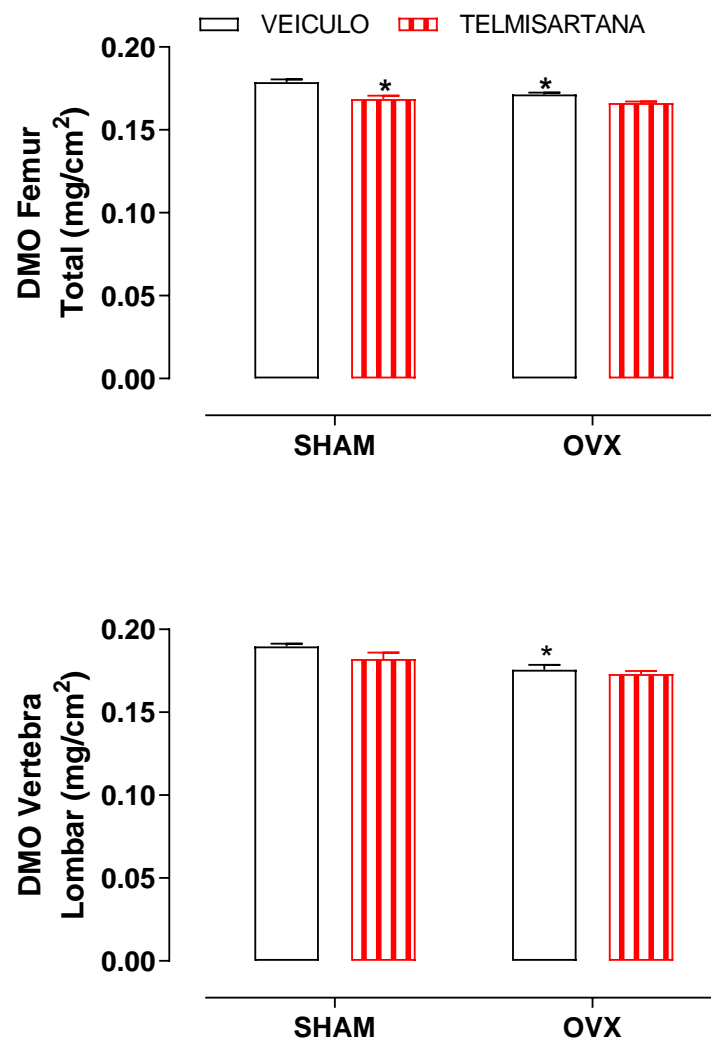
**Tabela 04:** Efeito do tratamento com telmisartana sobre parâmetros físicos da tíbia. Grupos de animais: SS (SHAM veículo), ST (SHAM com uso de telmisartana), CS (OVX veículo), CT (OVX com uso de telmisartana).

Variavel	SS	ST	CS	CT
Volume (cm <sup>3</sup> )	0,288 ± 0,011	0,289 ± 0,011	0,311 ± 0,012	0,302 ± 0,006
Peso Úmido (g)	0,511 ± 0,015	0,506 ± 0,014	0,544 ± 0,015	0,525 ± 0,009
Peso Imerso (g)	0,229 ± 0,004	0,217 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,232 ± 0,004	0,222 ± 0,002
Peso Seco (g)	0,313 ± 0,009	0,300 ± 0,006	0,327 ± 0,011	0,324 ± 0,006
Peso das Cinzas (g)	0,192 ± 0,005	0,180 ± 0,003	0,199 ± 0,005	0,192 ± 0,003
Densidade Mineral (g/cm <sup>3</sup> )	0,673 ± 0,019	0,637 ± 0,023	0,643 ± 0,015	0,636 ± 0,006
Densidade Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	1,782 ± 0,023	1,793 ± 0,060	1,752 ± 0,028	1,738 ± 0,008
Conteúdo de H <sub>2</sub> O (%)	38,60 ± 1,03	40,71 ± 1,72	39,84 ± 0,86	38,20 ± 0,48
Conteúdo Orgânico (%)	23,69 ± 0,57	23,60 ± 0,74	23,47 ± 0,59	25,16 ± 0,64
Conteúdo Mineral (%)	37,70 ± 0,62	35,67 ± 1,03 <sup>a</sup>	36,68 ± 0,44	36,63 ± 0,31

Valores representam a média ± EPM ( $n = 7$ ): <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. grupos SS, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. grupos CS. (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

### 4.1.3. Densidade Mineral Óssea Femoral e da Quinta Vértebra Lombar

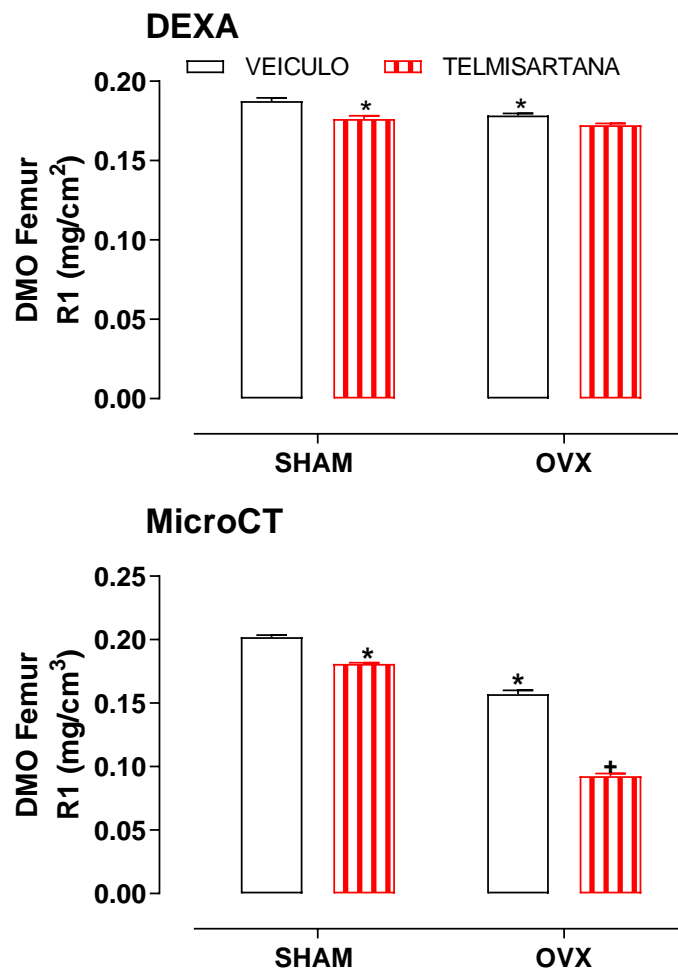
Nas figuras 09 e 10, quando a DMO do fêmur total, regiões proximal, média e distal, e a quinta vértebra lombar foram avaliadas por DEXA, foi observada uma redução da densidade nos ossos das ratas que fizeram uso da telmisartana (ST ou CT) quando foram comparadas as suas respectivas contrapartes (SS ou CS).



**Figura 09:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur e da quinta vértebra lombar avaliados por DEXA. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 7$ ). As diferenças são como se segue: \* $p < 0.05$  vs. grupo SS (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).



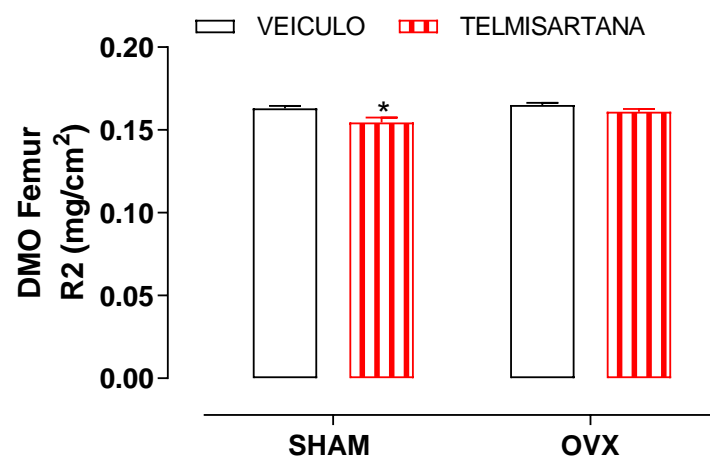
Especificamente na figura 09 o uso da telmisartana ou a OVX per se reduziram a DMO do fêmur em relação aos animais do grupo SHAM veículo (ST e CS versus SS) e, além disso, o uso da telmisartana pelo grupo CT acentuou a perda causada pela OVX (CT versus CS). Quanto a DMO da quinta vértebra lombar observou-se que foi reduzida pela OVX (CS versus SS).

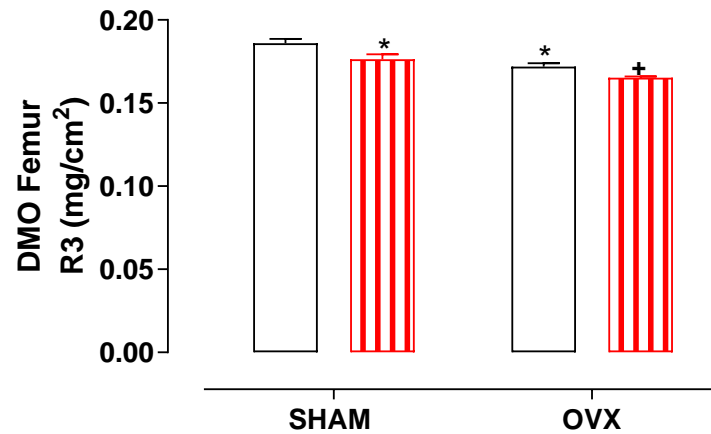


**Figura 10:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a densidade mineral óssea (DMO) da região proximal (R1) do fêmur avaliados por DEXA e por MicroCT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). As diferenças são como se segue: \*p < 0.05 vs. grupo SS, †p < 0.05 vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

Na figura 10 a região proximal do fêmur (R1), além de ter sido avaliada por DEXA para a densidade mineral óssea, também foi avaliada por microtomografia computadorizada (MicroCT) e mais uma vez as ratas que foram submetidas ao uso da telmisartana tiveram redução na DMO. Tanto a OVX quanto o uso da telmisartana reduziram esse parâmetro em relação ao grupo SHAM (ST, CS e CT versus SS). Seguindo o mesmo padrão de redução na DMO observado no fêmur total, o uso de telmisartana associado à OVX comprometeu a densidade quando se considerando a OVX per se (CT versus CS). A avaliação por MicroCT corroborou os dados de perda de DMO demonstrada pela análise por DEXA.

Nas regiões, média (R2) e distal (R3) do fêmur a OVX e o uso da telmisartana comprometeu a DMO da seguinte forma: 1) em R2 as ratas ST tiveram menor DMO que aquelas do grupo SHAM (SS) e, 2) em R3 o grupo CT reduziu a DMO em relação aos demais grupos e, a OVX per se reduziu a densidade quando comparada às ratas SHAM (CS versus SS) (figura 11).

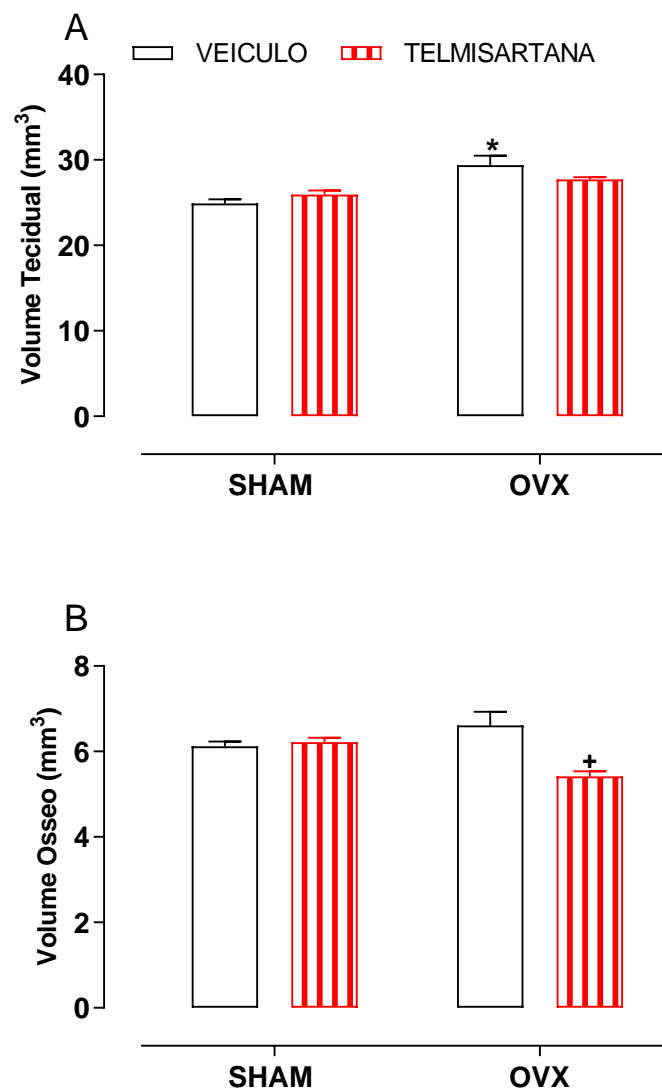


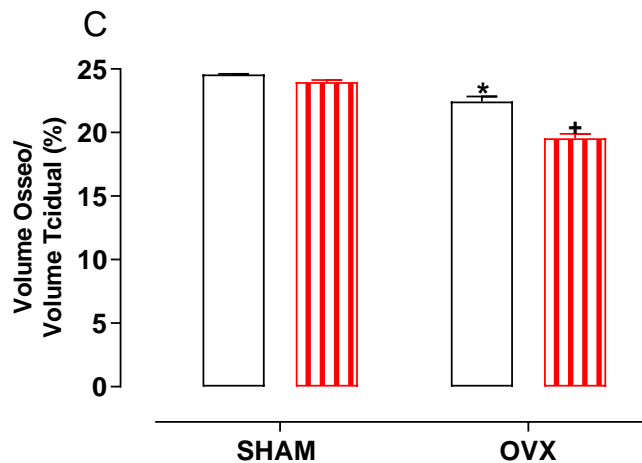


**Figura 11:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a densidade mineral óssea (DMO) das regiões média (R2) e distal (R3) do fêmur avaliados por DEXA. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). As diferenças são como se segue: \*p < 0.05 vs. grupo SS, †p < 0.05 vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

#### 4.1.4. Parâmetros da microarquitetura trabecular femural

Como ilustrado na figura 12, painéis de A até C, a análise pelo  $\mu$ CT em geral revelou que a ovariectomia (grupo CS) ou o uso da telmisartana pelas ratas OVX (grupo CT) causou alteração na microestrutura da região trabecular do fêmur proximal quando comparada aos animais intactos (grupo SS ou ST).

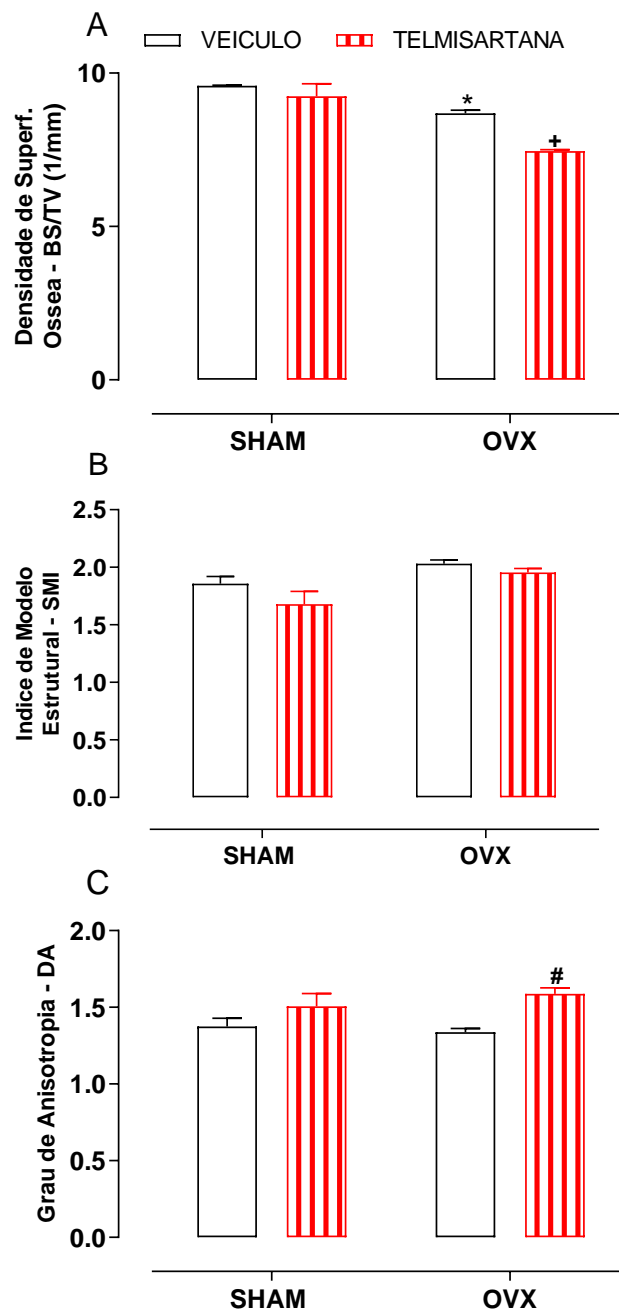




**Figura 12:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT. (A) Volume Tecidual, (B) Volume Ósseo, (C) Razão entre volume ósseo e volume tecidual. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). As diferenças são como se segue: \*p < 0.05 vs. grupo SS, +p < 0.05 vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

Na figura 12, painel A, o volume tecidual foi aumentado pela OVX (grupo CS) em relação ao grupo SHAM (SS). No painel B pode-se observar redução no volume ósseo nas ratas do grupo CT comparado aos demais grupos (SS, ST e CS). Os resultados do painel C, demonstram que razão entre o volume ósseo pelo volume tecidual, corroboram os resultados dos painéis A e B quanto aos efeitos da OVX e da OVX associada ao uso da telmisartana, isto é, a OVX reduziu (CS) e o uso concomitante de telmisartana (grupo CT) reduziu ainda mais a razão quando comparados aos seus controles (versus SS, e versus CS, respectivamente).

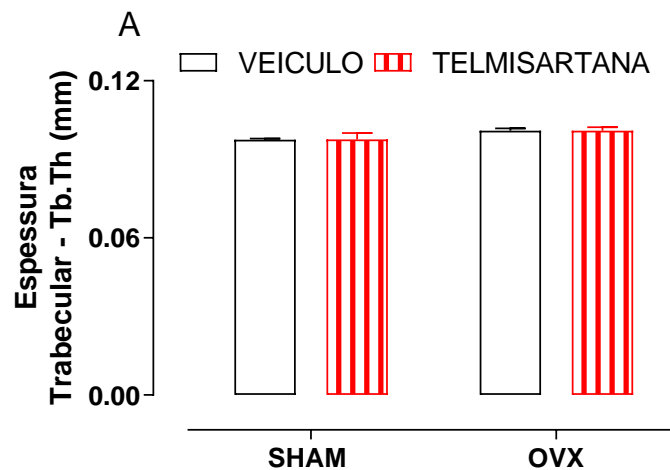
Na figura 13, painel A, a densidade de superfície óssea foi reduzida pela OVX (CS versus SS) e a telmisartana, no grupo castrado (CT), reduziu esse parâmetro ainda mais em comparação aos demais grupos (CT versus SS, ST e CS).

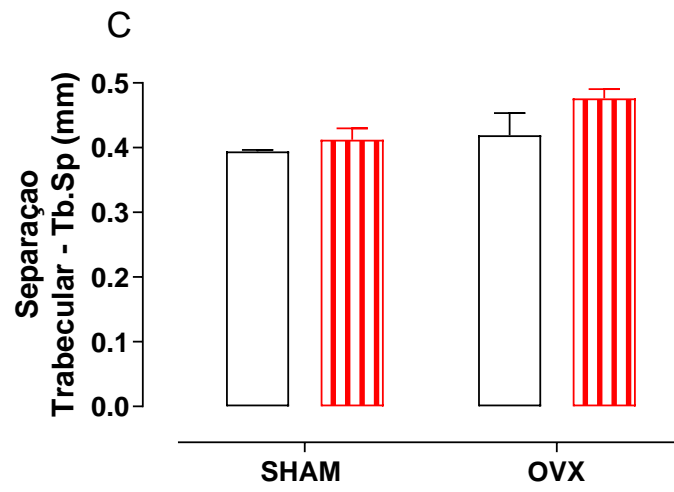
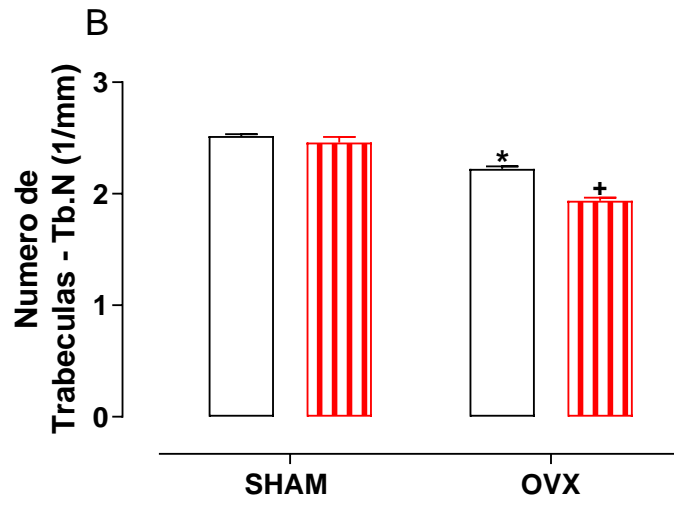


**Figura 13:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT. (A) Densidade de superfície óssea (superfície óssea pelo volume tecidual), (B) Índice de modelo estrutural, (C) Grau de Anisotropia. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). As diferenças são como se segue: \* $p < 0.05$  vs. grupo SS, #  $p < 0.05$  vs. grupo CS, † $p < 0.05$  vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

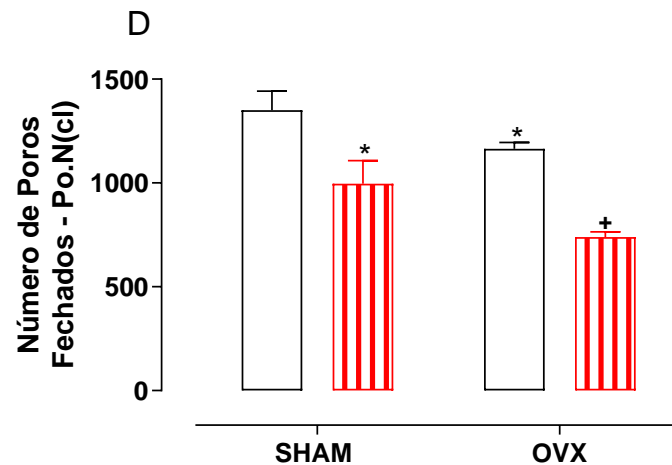
O índice de modelo estrutural (painel B) não foi alterado pelo tratamento com telmisartana nas ratas SHAM e nas ratas OVX. Em relação à anisotropia, as ratas OVX que receberam telmisartana (grupo CT) apresentaram aumento neste índice comparando-se com o grupo CS (painel C).

Na figura 14 quanto à estrutura trabecular vale ressaltar que a OVX per se reduziu o número de trabéculas (ratas do grupo CS versus SS), e este efeito foi piorado pelo uso da telmisartana (grupo CT versus demais grupos). Quanto ao número de poros trabeculares fechados, mais uma vez o uso da telmisartana pelas ratas SHAM que receberam telmisartana (ST) e as ratas somente OVX (grupo CS) tiveram redução quando comparadas com as ratas SHAM; as ratas OVX com uso de telmisartana (grupo CT) apresentaram redução em relação aos demais grupos (grupo CT versus grupos SS, ST e CS).



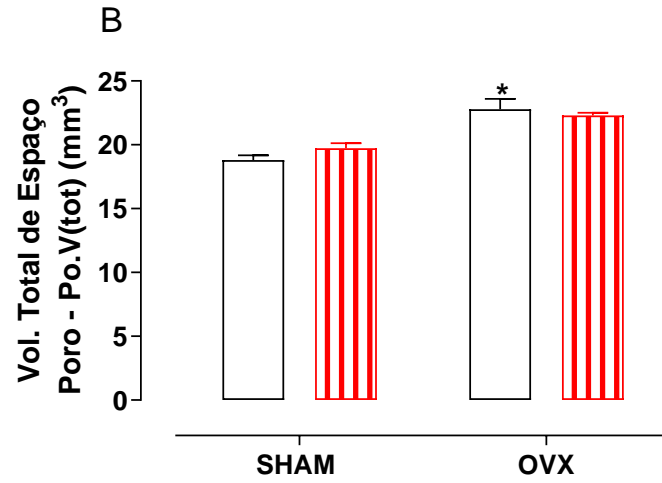
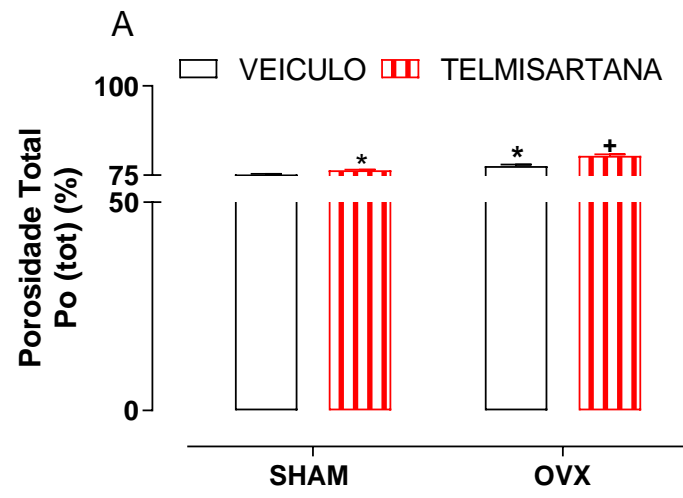


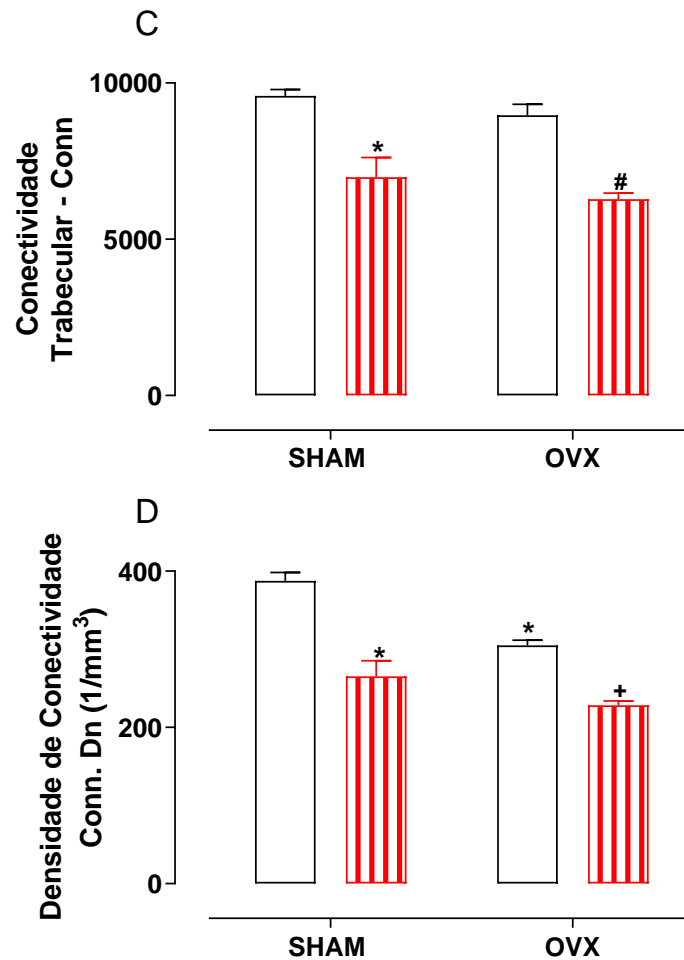




**Figura 14:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT. (A) Espessura trabecular, (B) Número de trabéculas, (C) Separação trabecular, (D) Número de poros fechados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). As diferenças são como se segue: \*  $p < 0.05$  vs. grupo SS, †  $p < 0.05$  vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

Na figura 15 são apresentados os dados de porosidade total, volume total de espaço poro e conectividade, e mais uma vez no geral houve prejuízo nos parâmetros pelo uso da telmisartana. Na figura 15, painel A, a OVX per se (grupo CS) aumentou a porosidade quando se comparando com as ratas SHAM (grupo SS) e o uso da telmisartana pelas ratas SHAM (grupo ST) teve resposta semelhante. Além disso, o uso da telmisartana pelas ratas OVX acentuou os efeitos da OVX (grupo CT versus demais grupos).



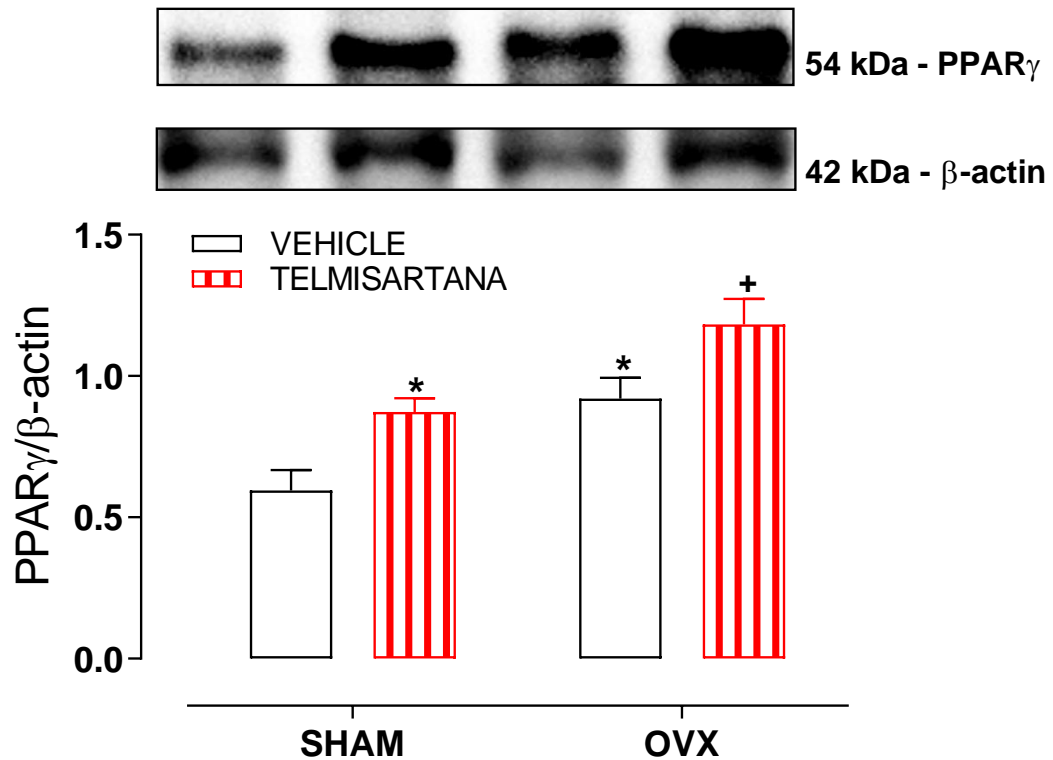


**Figura 15:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre as características microarquiteturais da região proximal por MicroCT. (A) Porosidade total, (B) Volume total de espaço poro, (C) Conectividade, (D) Densidade de conectividade. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). As diferenças são como se segue: \* $p < 0.05$  vs. grupo SS, # $p < 0.05$  vs. grupo CS, + $p < 0.05$  vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

O volume total de espaço poro (figura 15, painel B) aumentou nas ratas OVX versus aquelas SHAM (CS x SS). A conectividade foi reduzida especialmente pelo uso da telmisartana (grupos ST e CT) comparando-se com as respectivas ratas controles (ST x SS e, CT x CS) tendo, portanto, piorado a capacidade de absorver e dissipar as cargas impostas ao osso, isto é, diminuiu a resistência óssea do fêmur proximal.

#### 4.1.5. Análise por Western Blot de PPAR $\gamma$

A figura 16 mostra a análise da expressão da proteína PPAR $\gamma$ , quantificada por quimioluminescência e normalizada pela expressão de  $\beta$ -actina.



**Figura 16:** Efeitos do tratamento de 8 semanas com telmisartana sobre a expressão da proteína PPAR $\gamma$  no fêmur e imagens representativas da microarquitetura trabecular tridimensional por MicroCT da região proximal do fêmur. O sinal de cada proteína foi normalizado pela quantidade de  $\beta$ -actin mesmo antes de calcular a razão. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). As diferenças são como se segue: \*p < 0.05 versus grupo SS, +p < 0.05 versus demais grupos. (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

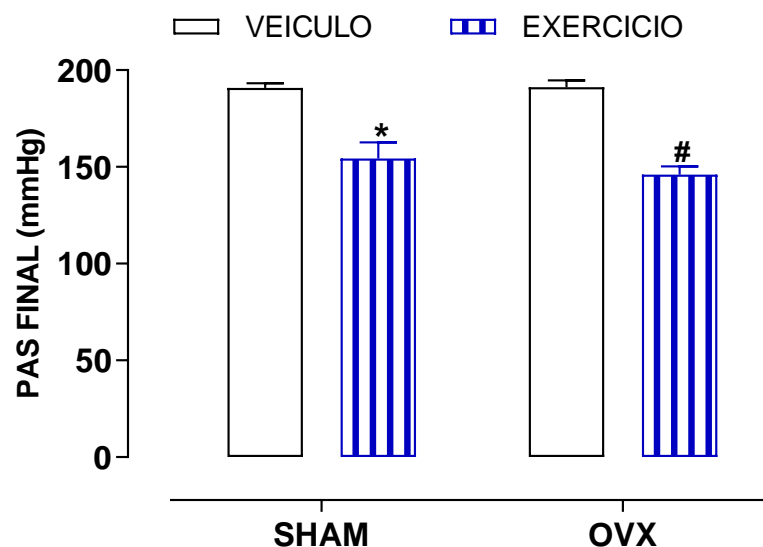
Verificou-se que os níveis de PPAR $\gamma$  foram aumentados nas ratas OVX (grupo CS) em relação às ratas SHAM (SS) e, o uso da telmisartana pelas ratas SHAM (grupo ST) do mesmo modo aumentou a proteína (ST x SS). Nesse sentido novamente as

ratas SHAM submetidas a tratamento com telmisartana (ST) apresentaram respostas semelhantes às daquelas OVX (grupo CS). A combinação da OVX com o uso da telmisartana produziu os maiores níveis de expressão de PPAR $\gamma$  observados (grupo CT versus demais grupos).

## 4.2. Ratas SHRs submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) ou castradas que realizaram exercício físico de corrida em esteira

### 4.2.1. Pressão Arterial Sistólica e Parâmetros Ponderais

Os valores de PAS foram reduzidos nas ratas SHAM submetidas ao exercício físico (SE) e naquelas OVX exercitadas (CE) quando comparadas aos animais SHAM (SS) ou castrados (CS), respectivamente.



**Figura 17:** Valores de pressão arterial sistólica (PAS) após tratamento de 8 semanas em animais realizando exercício físico em esteira. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). Diferenças são como se segue: \* p < 0.05 vs. grupos SS, # p < 0.05 vs. grupos CS (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

No grupo SE (ratas SHAM submetidas a exercício) a pressão foi reduzida quando se comparando às ratas do grupo SS (SE:154,3  $\pm$  8,3 mmHg versus SS:190,8  $\pm$  2,3 mmHg); o mesmo se deu quando se comparando as ratas OVX exercitadas (CE) com

as ratas OVX sedentárias (CS). Numericamente a pressão arterial das ratas CE foi em média  $145,9 \pm 4,2$  mmHg, enquanto nas ratas CS foi de  $191,2 \pm 3,4$  mmHg (figura 17).

Na tabela 05 apresentam-se os parâmetros fisiológicos ponderais iniciais e os efeitos do exercício físico em esteira em ratas SHAM ou ratas OVX. Em relação às ratas OVX, a OVX foi confirmada ao se comparar o peso final e o peso do útero entre os grupos SS e CS, tendo causado alterações esperadas no peso corporal total e no peso uterino no final do período de tratamento, com aumento significativo no peso corporal e redução no peso do útero nas ratas OVX (grupo CS). Note-se que o exercício nas ratas OVX (grupo CE) causou aumento no peso do coração e na razão peso do coração pelo tamanho da tíbia comparado-se a todos os outros grupos (grupo CE versus SS, SE e CS).

**Tabela 05.** Efeito treinamento físico sobre o peso corporal, peso do coração, comprimento tibial, e razão peso do coração pelo comprimento da tibia. Grupos de animais: SS (ratas SHAM), SE (ratas SHAM submetidas a exercício físico), CS (ratas castradas submetidas a exercício físico) e CE (ratas castradas realizando exercício em esteira).

Variável	SS	SE	CS	CE
Peso Corporal Inicial (g)	162,78 ± 1,48	160,52 ± 3,15	166,52 ± 2,83	164,58 ± 3,08
Peso Corporal Final (g)	201,73 ± 3,90	210,20 ± 3,69	245,64 ± 5,55 <sup>a</sup>	257,33 ± 5,88
Peso Uterino (g)	0,408 ± 0,057	0,463 ± 0,029	0,130 ± 0,048 <sup>a</sup>	0,080 ± 0,002
Peso do Coração (g)	0,830 ± 0,022	0,915 ± 0,017 <sup>a</sup>	0,869 ± 0,019	1,039 ± 0,027 <sup>b</sup>
Comp. da Tibia (cm)	3,65 ± 0,033	3,70 ± 0,022	3,71 ± 0,024	3,78 ± 0,038
Coração/Tibia (g/cm)	0,228 ± 0,006	0,246 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,234 ± 0,005	0,269 ± 0,007 <sup>b</sup>

Valores representam a média ± EPM ( $n = 7$ ): <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. grupo SS, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. grupo CS (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).



#### 4.2.2. Parâmetros Biométricos, Biomecânicos e Físicos do Fêmur

Quanto aos efeitos do exercício físico sobre os parâmetros biométricos e biomecânicos do fêmur das ratas SHAM ou OVX (tabela 06), houve aumento no tamanho do fêmur pela OVX (grupo CS) versus as ratas SHAM (SS), e redução na força máxima, na rigidez e na resiliência (SE versus SS).

Nas tabelas (07 e 08) quando avaliados os parâmetros físicos do fêmur e da tíbia com o exercício físico não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos, exceto para a densidade mineral no fêmur onde ocorreu redução nas ratas OVX versus ratas SHAM (CS x SS), enquanto na tíbia não se observou nenhuma alteração dos parâmetros avaliados.

**Tabela 06:** Efeito do treinamento com exercício (E) sobre parâmetros físicos do fêmur. Grupos de animais: SS (ratas SHAM), SE (ratas SHAM submetidas a exercício físico), CS (ratas castradas submetidas a exercício físico) e CE (ratas castradas realizando exercício em esteira).

Variável	SS	SE	CS	CE
Fêmur, cm	3,28 ± 0,01	3,30 ± 0,02	3,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,39 ± 0,02
Força Máxima (N)	0,092 ± 0,003	0,079 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,091 ± 0,002	0,093 ± 0,004
Desloc. na Força Máx.(mm)	0,879 ± 0,035	0,935 ± 0,086	0,847 ± 0,051	0,908 ± 0,046
Rigidez (N/mm)	227,52 ± 20,51	168,76 ± 13,27 <sup>a</sup>	208,01 ± 7,99	198,96 ± 11,23
Resiliência (J)	0,048 ± 0,006	0,031 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,042 ± 0,003	0,049 ± 0,003
Tenacidade (J)	0,076 ± 0,005	0,065 ± 0,008	0,073 ± 0,006	0,072 ± 0,009
Força Máx. para Fratura (N)	0,076 ± 0,004	0,062 ± 0,007	0,072 ± 0,004	0,083 ± 0,007
Desloc. no Ponto de Fratura (mm)	1,255 ± 0,053	1,470 ± 0,235	1,288 ± 0,101	1,197 ± 0,129

Valores representam a média ± EPM (n = 7): <sup>a</sup> p<0.05 vs. grupo SS (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

**Tabela 07:** Efeito do treinamento com exercício (E) sobre parâmetros físicos do fêmur. Grupos de animais: SS (ratas SHAM), SE (ratas SHAM submetidas a exercício físico), CS (ratas castradas submetidas a exercício físico) e CE (ratas castradas realizando exercício em esteira).

Variável	SS	SE	CS	CE
Volume do Fêmur (cm <sup>3</sup> )	0,374 ± 0,010	0,384 ± 0,004	0,404 ± 0,012	0,410 ± 0,013
Peso Úmido do Fêmur (g)	0,645 ± 0,017	0,671 ± 0,019	0,679 ± 0,018	0,676 ± 0,020
Peso Imerso do Fêmur (g)	0,270 ± 0,006	0,270 ± 0,007	0,275 ± 0,007	0,265 ± 0,010
Peso Seco do Fêmur (g)	0,376 ± 0,011	0,375 ± 0,011	0,387 ± 0,011	0,387 ± 0,014
Peso Cinzas do Fêmur (g)	0,305 ± 0,012	0,329 ± 0,013	0,293 ± 0,012	0,289 ± 0,013
Densidade Mineral (g/cm <sup>3</sup> )	0,822 ± 0,041	0,858 ± 0,038	0,726 ± 0,026 <sup>a</sup>	0,705 ± 0,024
Densidade Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	1,725 ± 0,014	1,752 ± 0,065	1,684 ± 0,015	1,647 ± 0,022
Conteúdo de H <sub>2</sub> O (%)	41,82 ± 0,697	43,76 ± 1,606	43,09 ± 0,767	42,79 ± 1,241
Conteúdo Orgânico (%)	10,60 ± 2,290	7,110 ± 2,227	13,81 ± 1,292	14,44 ± 1,467
Conteúdo Mineral (%)	47,56 ± 2,146	49,12 ± 2,009	43,09 ± 1,382	42,76 ± 1,157

Valores representam a média ± EPM (n = 7): <sup>a</sup> p<0.05 vs. grupo SS (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

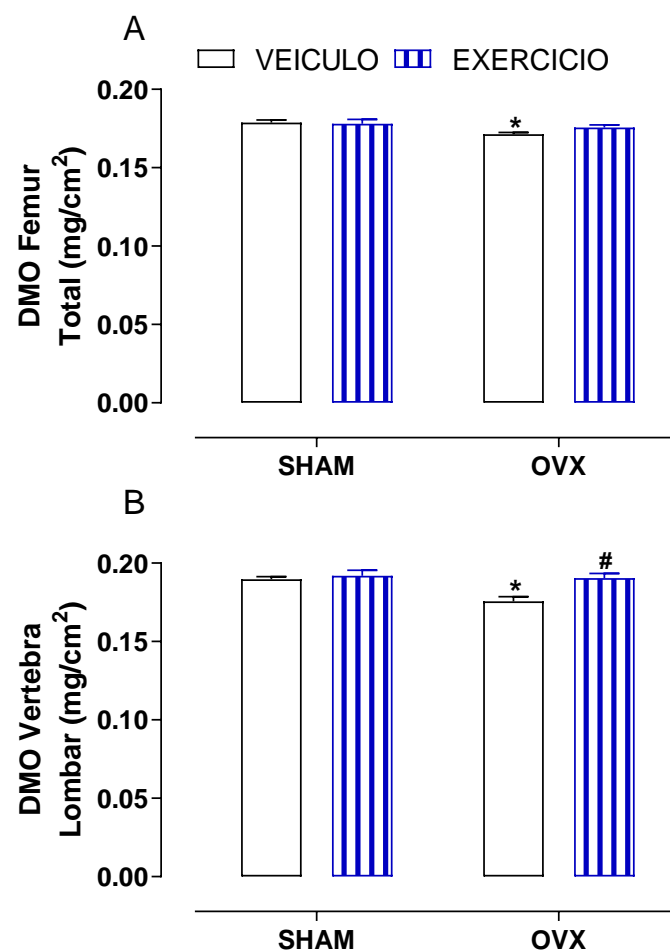
**Tabela 08:** Efeito do treinamento com exercício sobre parâmetros físicos da tíbia. Grupos de animais: SS (ratas SHAM), SE (ratas SHAM submetidas a exercício físico), CS (ratas castradas submetidas a exercício físico) e CE (ratas castradas realizando exercício em esteira).

Variavel	SS	SE	CS	CE
Volume da Tíbia (cm <sup>3</sup> )	0,288 ± 0,011	0,295 ± 0,011	0,311 ± 0,012	0,313 ± 0,007
Peso Úmido da Tíbia (g)	0,511 ± 0,015	0,522 ± 0,016	0,544 ± 0,015	0,547 ± 0,011
Peso Imerso da Tíbia (g)	0,223 ± 0,004	0,226 ± 0,008	0,232 ± 0,004	0,234 ± 0,006
Peso Seco da Tíbia (g)	0,313 ± 0,009	0,318 ± 0,015	0,327 ± 0,011	0,331 ± 0,011
Peso Cinzas da Tíbia (g)	0,192 ± 0,005	0,198 ± 0,009	0,199 ± 0,005	0,204 ± 0,006
Densidade Mineral (g/cm <sup>3</sup> )	0,673 ± 0,019	0,675 ± 0,025	0,643 ± 0,015	0,655 ± 0,019
Densidade Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	1,782 ± 0,023	1,774 ± 0,032	1,752 ± 0,028	1,751 ± 0,020
Conteúdo de H <sub>2</sub> O (%)	38,60 ± 1,03	39,08 ± 1,69	39,84 ± 0,86	39,55 ± 1,25
Conteúdo Orgânico (%)	23,69 ± 0,57	22,90 ± 0,91	23,47 ± 0,59	23,06 ± 0,56
Conteúdo Mineral (%)	37,70 ± 0,62	38,00 ± 1,04	36,68 ± 0,44	37,37 ± 0,68

Valores representam a média ± EPM ( $n = 7$ ). (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

### 4.2.3. Densidade Mineral Óssea Femoral e da Quinta Vértebra Lombar

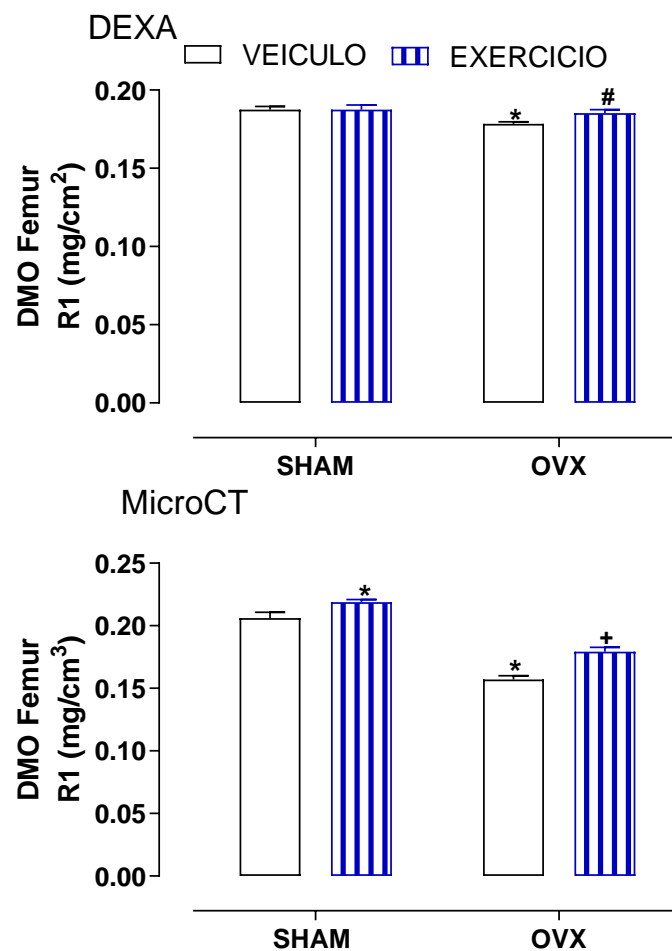
Nas ratas OVX, a avaliação por DEXA (figura 18) demonstrou redução na DMO do fêmur e da quinta vértebra lombar nos ossos quando se comparando com as ratas do grupo SHAM (ratas CS versus ratas SS).



**Figura 18:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur e da quinta vértebra lombar avaliados por DEXA. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 7$ ). As diferenças são como se segue: \* $p < 0.05$  vs. grupo SS, # $p < 0.05$  vs. grupo CS (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

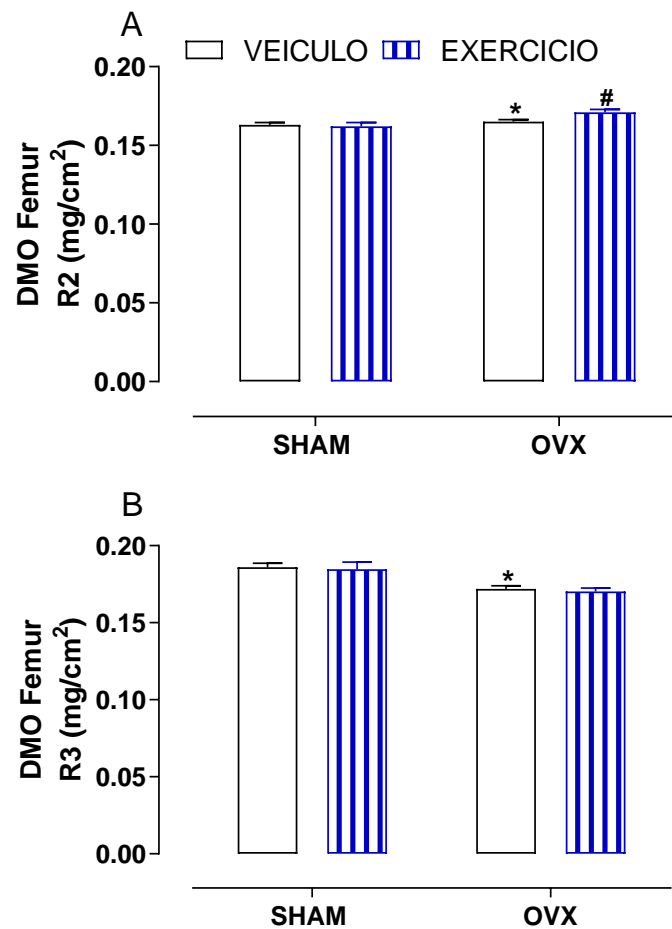
Na vértebra lombar o exercício físico nas ratas OVX (grupo CE) restaurou a densidade quando se comparando com a OVX (grupo CS).

Os resultados da avaliação da DMO do fêmur proximal (figura 19), por DEXA ou MicroCT, demonstrou o mesmo padrão de resposta, ou seja, a OVX (CS) per se reduziu a densidade e o exercício em ratas OVX (CE) melhora e corrige essa alteração.



**Figura 19:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre a densidade mineral óssea (DMO) da região proximal (R1) do fêmur avaliados por DEXA e por MicroCT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 7$ ). As diferenças são como se segue: \* $p < 0.05$  vs. grupo SS, # $p < 0.05$  vs. grupos CS, † $p < 0.05$  vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

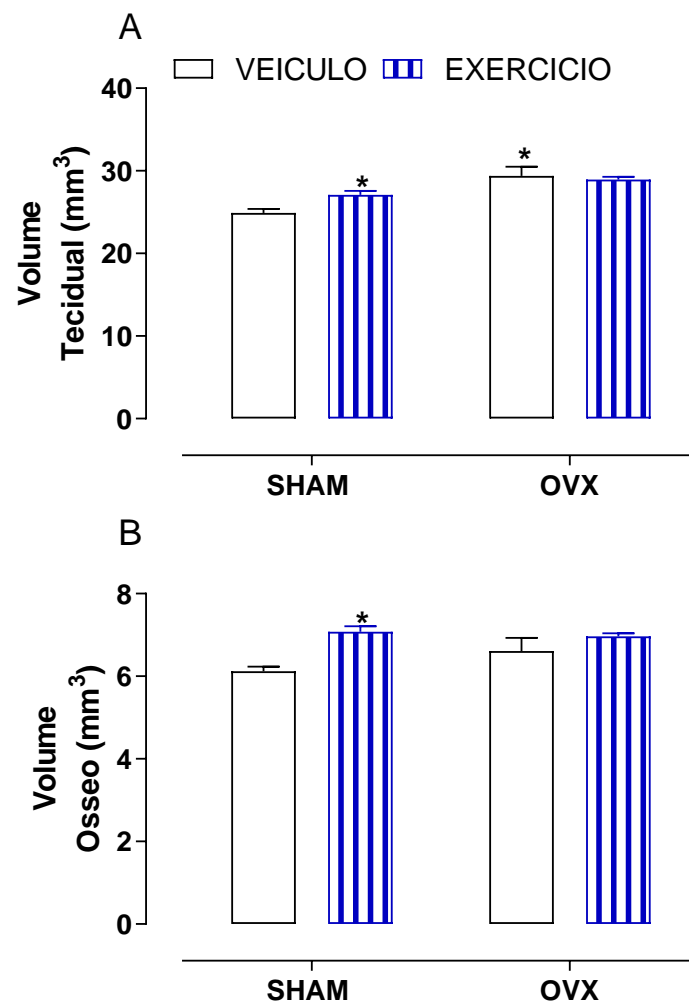
Na região média (figura 20A), a OVX (grupo CS) aumentou a densidade comparando-se com as ratas SHAM, e o exercício físico (grupo CE) aumentou a densidade comparando-se com as ratas OVX (CE versus CS). Finalmente na parte distal do fêmur (figura 20B) a OVX (CS) levou à redução na densidade em relação às ratas SHAM (SS).



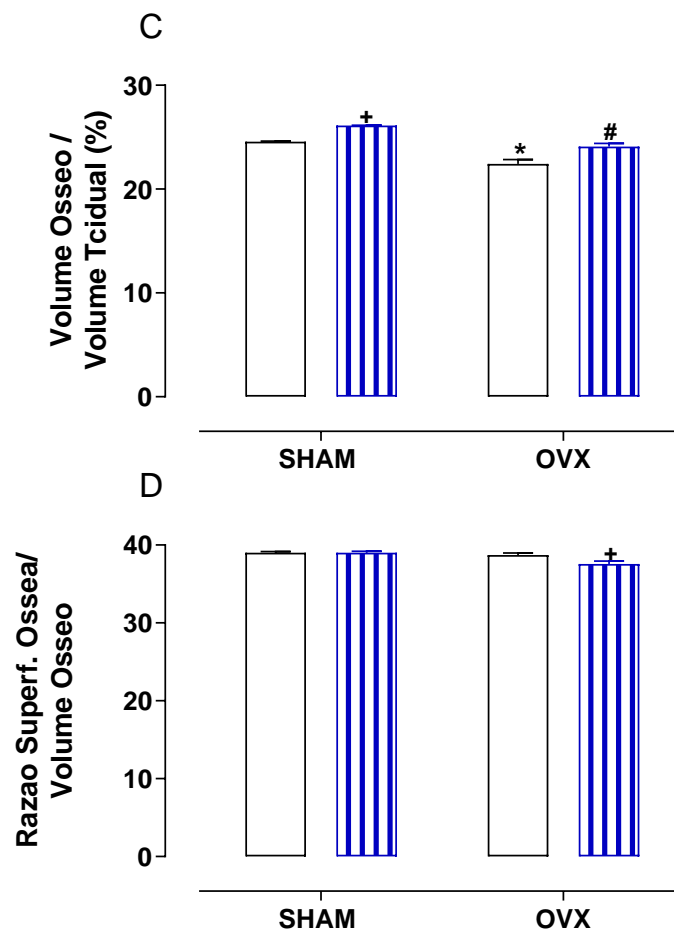
**Figura 20:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre a densidade mineral óssea (DMO) das regiões média (R2) e distal (R3) do fêmur avaliados por DEXA. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). As diferenças são como se segue: \* p < 0.05 vs. grupo SS, & p < 0.05 vs. grupos SE, # p < 0.05 vs. grupos CS (ANOVA de duas vias e teste post hoc de Fisher).

#### 4.2.4. Parâmetros da microarquitetura trabecular femural

Como ilustrado nas figuras 21, 22, 23 e 24, a análise pela MicroCT revelou várias alterações causadas pelo exercício físico nas ratas SHAM ou OVX (grupos SE e CE), e pela OVX per se só (grupo CS). Na figura 21, painel A, o volume tecidual foi aumentado nas ratas dos grupos CS e SE quando se comparando com as ratas SHAM (SS).





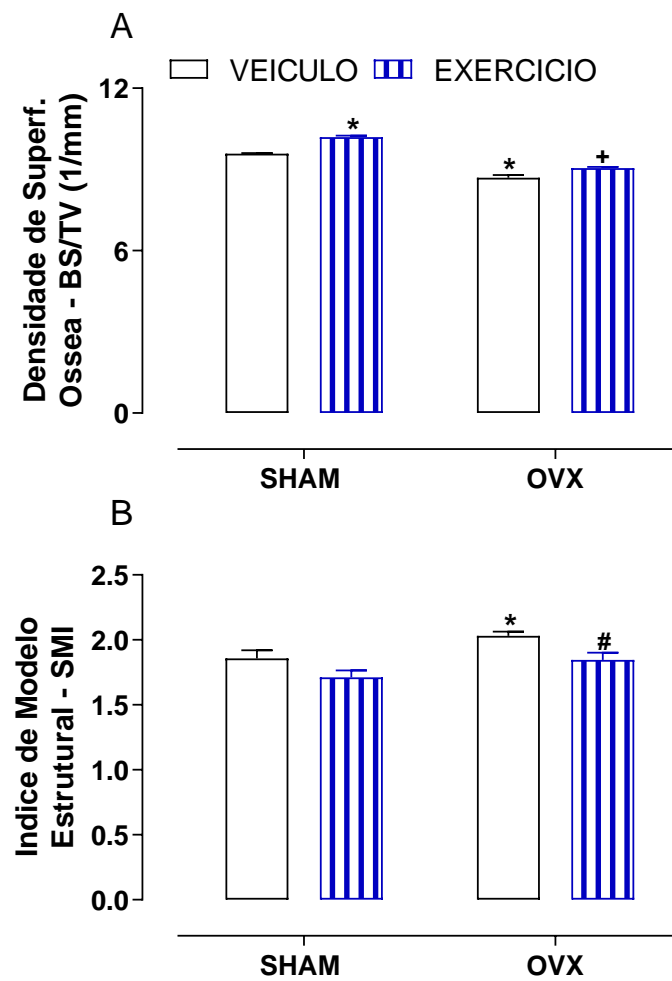


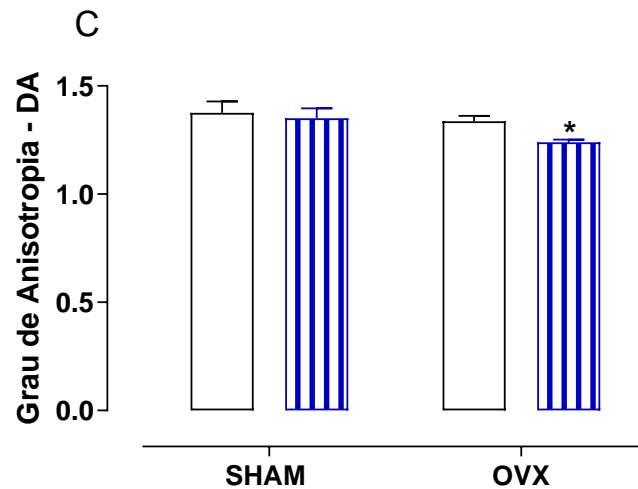
**Figura 21:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 7$ ). (A) Volume tecidual, (B) Volume ósseo, (C) Razão volume ósseo pelo volume tecidual, (D) Razão superfície óssea pelo volume tecidual. As diferenças são como se segue: \* $p < 0.05$  vs. grupo SS, # $p < 0.05$  vs. grupos CS, + $p < 0.05$  vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Fisher).

Na figura 21, painel B, O volume ósseo foi aumentado pela atividade física nas ratas SHAM (SE versus SS) e houve o mesmo resultado na razão entre volume ósseo e o

volume tecidual (painel C). A OVX reduziu essa razão (CS versus SS) e o exercício pelas ratas OVX (grupo CE) aumentou esse parâmetro (CE versus CS).

Na figura 21, painel D, quando avaliada a razão superfície óssea pelo volume tecidual, observou-se que o exercício nas ratas OVX (grupo CE) reduziu a mesma quando se comparando com as rats OVX (CS).



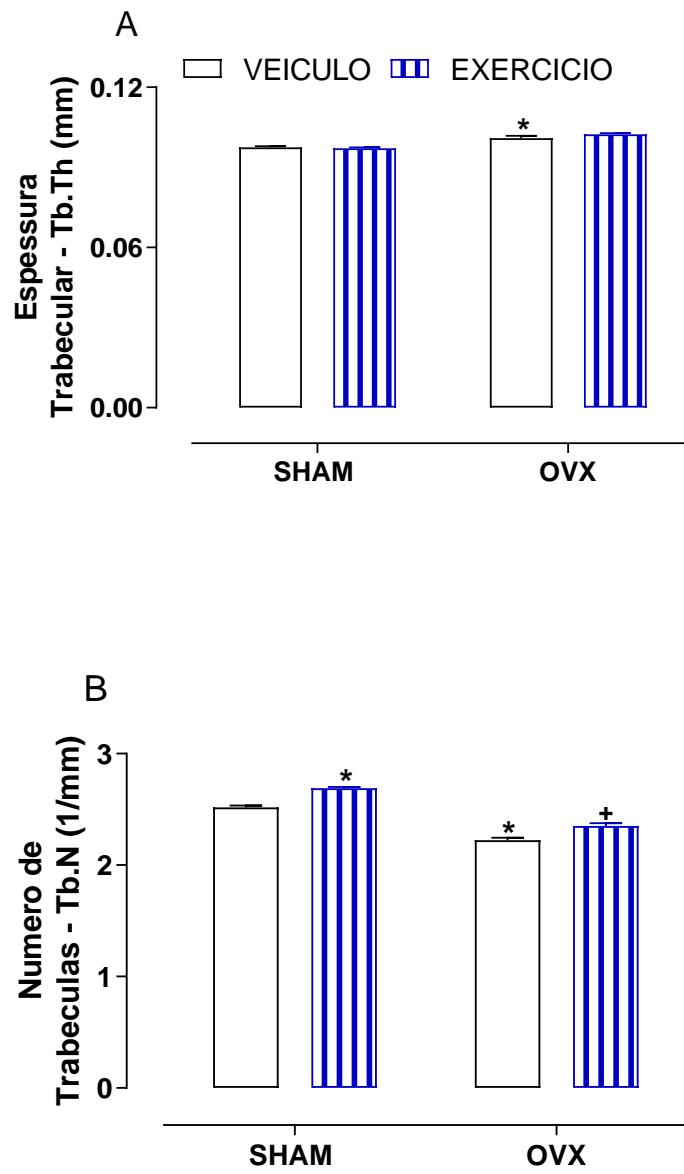


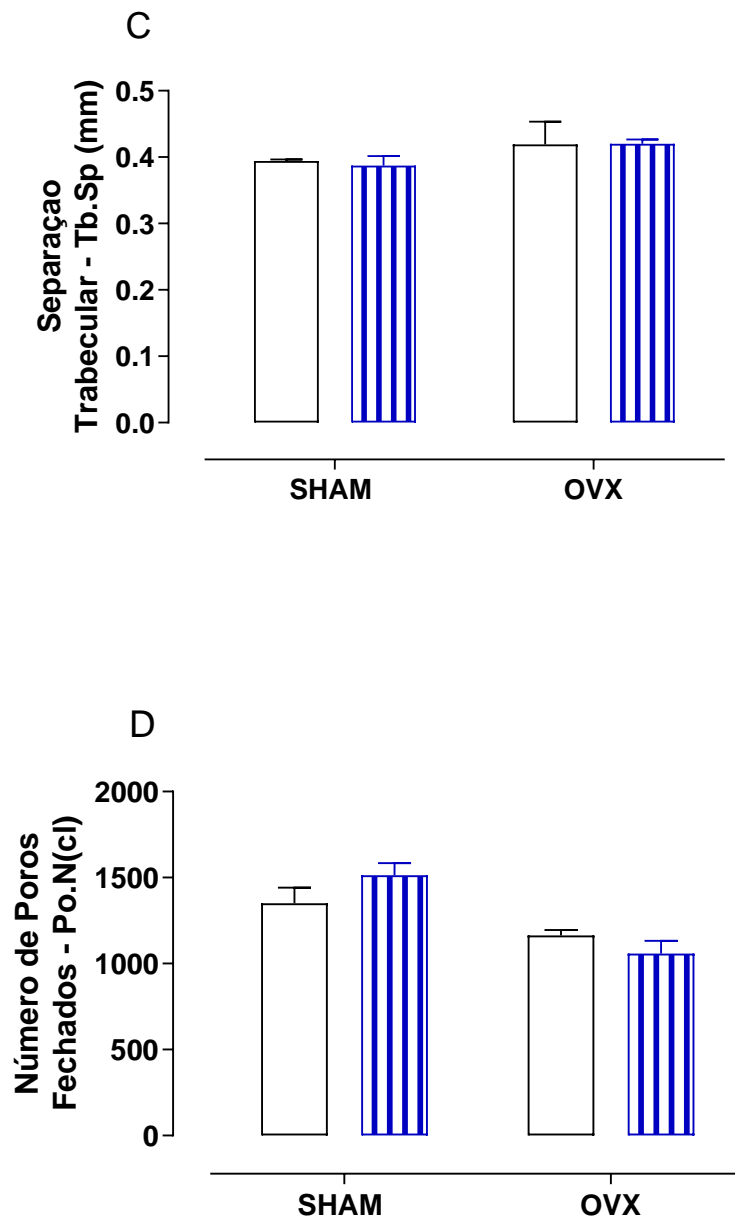
**Figura 22:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 7$ ). (A) Densidade de superfície óssea, (B) Índice de modelo estrutural, (C) Grau de anisotropia. As diferenças são como se segue: \* $p < 0.05$  vs. grupo SS, # $p < 0.05$  vs. grupos CS, + $p < 0.05$  vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste post hoc de Fisher).

Na figura 22, foram avaliadas a densidade de superfície óssea pôde-se observar que atividade física foi relevante tanto para as ratas SHAM (grupo SE) quanto para as ratas OVX (CE) em relação às suas contrapartes (SE versus SS e CE versus CS). A OVX per se (grupo CS) aumentou o índice de modelo estrutural (versus demais grupos) e o grau de anisotropia foi reduzido nas ratas OVX e exercitadas (grupo CE) quando se comparando com as ratas SHAM (SS e SE).

Em relação às trabéculas na figura 23, não houve alteração pelo exercício físico quanto à sua espessura (painel A). Em relação ao número de trabéculas (painel B), a OVX causou redução quando se comparando com as ratas SHAM, e tanto nas ratas SHAM quanto nas OVX que realizaram exercício em esteira (grupos SE e CE), pôde-

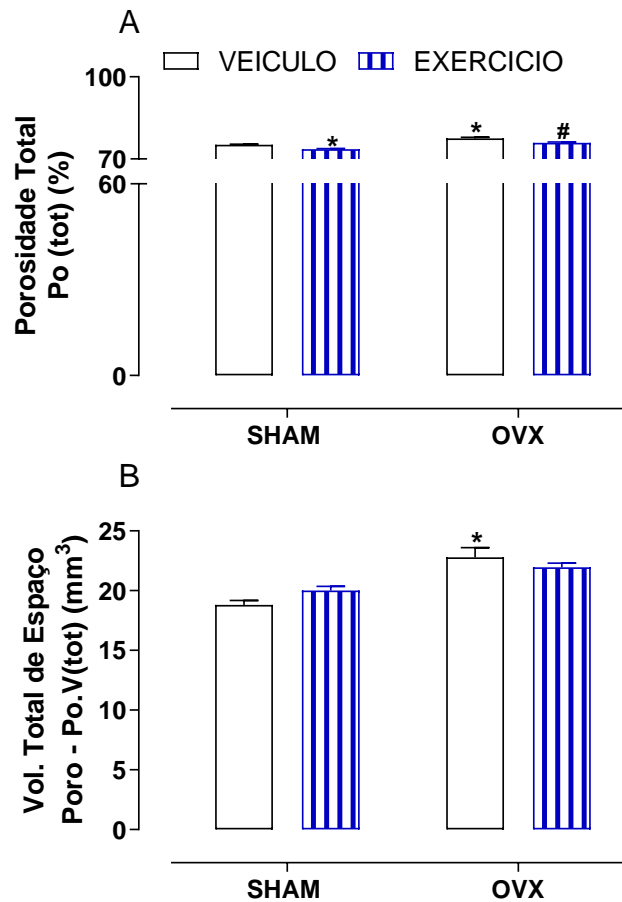
se notar aumento em relação às suas ratas controle (versus grupos SS e CS, respectivamente).

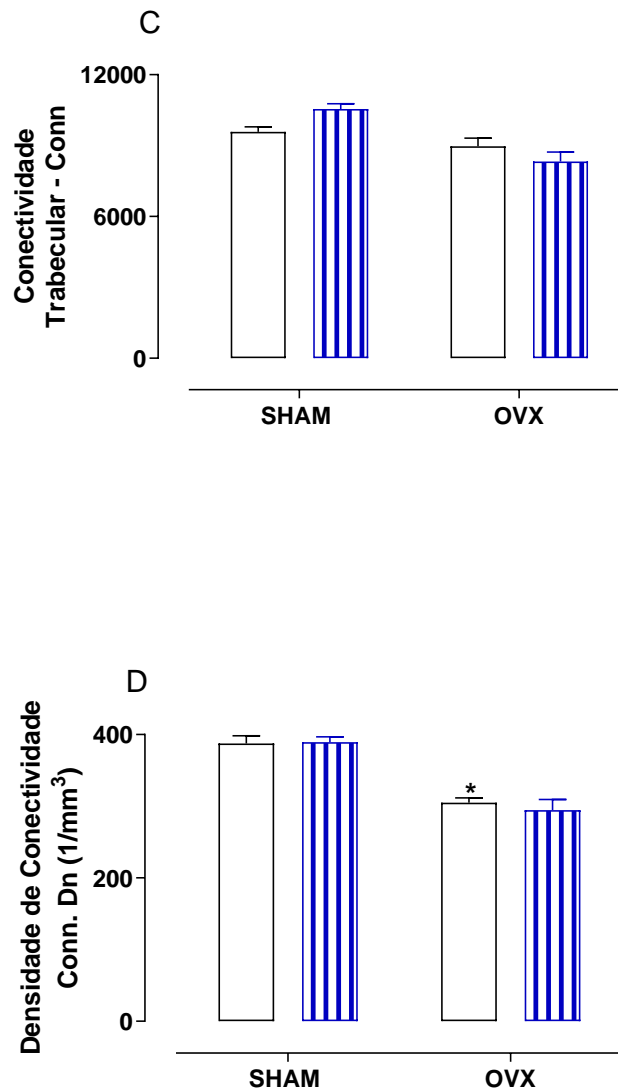




**Figura 23:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 7$ ). (A) Espessura trabecular, (B) Número de trabéculas, (C) Separação trabecular, (D) Número de poros fechados. As diferenças são como se segue: \*  $p < 0.05$  vs. grupo SS, +  $p < 0.05$  vs. demais grupos (ANOVA de duas vias e teste post hoc de Fisher).

As respostas dos parâmetros da microarquitetura óssea pelo exercício na figura 24 corroboram a figura anterior sobre as trabéculas (figura 23) e demonstram alterações benéficas pela atividade física. A OVX aumentou a porosidade total (painel A) versus as ratas SHAM. As ratas SE e CE reduziram a porosidade quando comparadas às respectivas ratas controle (SS e CS); já o volume total de espaço poro (painel B) foi maior nas ratas OVX em relação àquelas ratas controle (CS versus SS), enquanto que a densidade de conectividade foi reduzida para as mesmas condições (ratas OVX versus SHAM).





**Figura 24:** Efeitos da realização de exercício físico por 8 semanas sobre parâmetros da microarquitetura trabecular da região proximal do fêmur avaliados por MicroCT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 7$ ). (A) Porosidade total, (B) Volume total de espaço poro, (C) Conectividade, (D) Densidade de conectividade. As diferenças são como se segue: \*  $p < 0.05$  vs. grupo SS, #  $p < 0.05$  vs. grupos CS (ANOVA de duas vias e teste post hoc de Fisher).

## 5. DISCUSSÃO

Os estudos atuais tiveram como objetivo avaliar os efeitos de duas intervenções distintas sobre parâmetros ósseos em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas: 1) uso de um medicamento anti-hipertensivo, a telmisartana, e 2) realização de atividade física em esteira. A discussão dos resultados das duas intervenções utilizadas no presente estudo foi realizada em conjunto a título de melhor desenvolvimento das ideias, apesar de o objetivo do estudo não ter sido comparar estatisticamente as duas intervenções.

O envelhecimento feminino está associado a alterações negativas em múltiplos sistemas, com destaque para os sistemas cardiovascular e musculoesquelético. Neste contexto, há um crescente número de mulheres que desenvolvem hipertensão arterial e osteoporose, tanto pelas alterações decorrentes do processo de envelhecimento, quanto pela redução abrupta dos hormônios femininos na fase pós-menopausa. No presente estudo, as ratas SHR ovariectomizadas representam um modelo de hipertensão essencial (FORTEPIANI *et al*, 2003) e de retirada dos hormônios femininos, de modo a mimetizar em algum grau o que ocorre com a mulher especialmente durante o envelhecimento. Além disso, as ratas SHR foram escolhidas pelo fato de apresentarem desordens ósseas osteoporóticas pré-existentes (IZAWA *et al*, 1985), as quais podem ser ainda mais exacerbadas com a retirada dos estrogênios pela OVX (modelo de osteoporose pós menopausal).

Os principais resultados dos estudos foram os seguintes: 1) ambas as abordagens foram capazes de causar redução importante na pressão arterial, com maior efetividade pelo uso da telmisartana; 2) o exercício físico em esteira melhorou ou manteve a saúde óssea, por outro lado foi observado perda óssea associada ao uso da telmisartana. Destaca-se ainda que pela primeira vez foi observada um aumento



na expressão da proteína PPAR $\gamma$  associada com a ocorrência de defeitos biomecânicos e morfológicos no fêmur das ratas que receberam a telmisartana, independentemente da OVX.

As abordagens farmacológica e não farmacológica (telmisartana e corrida em esteira, respectivamente) foram efetivas na redução da pressão arterial dos animais tratados em relação aos animais controle. Estes resultados corroboram a literatura e estão de acordo com estudos que mostram que o uso do bloqueador do receptor do tipo I de angiotensina II telmisartana reduziu a pressão arterial, tanto em modelos animais (WIENEN *et al*, 2006) quanto em humanos hipertensos (SHARPE *et al*, 2001; WHITE, 2002). A ação antagonista da telmisartana impedindo a ação da angiotensina II sobre os receptores do tipo I reduzem a pressão arterial pela vasodilatação de pequenas artérias de resistência (reduzindo a resistência periférica total), ainda que não altere o débito cardíaco e a frequência cardíaca (LAURENT, 2017).

Adicionalmente a telmisartana também promove vasodilatação dependente e/ou independente do endotélio (BENNDORF *et al*, 2007) pela maior permeabilidade endotelial (BIAN *et al*, 2009), e essas respostas podem ser mediadas pela *downregulation* na expressão e distribuição da zonula ocludens-1 (ZO-1), proteína fundamental para formação e estabilização das junções entre células endoteliais adjacentes (TOMIYAMA *et al*, 2007).

SHANG *et al* (2017) demonstraram um mecanismo anti-hipertensivo associado ao uso de telmisartana por conta de efeito antioxidante e antifibrótico (efeito que reduz a aumentada deposição de colágeno), e, portanto, reduzindo o remodelamento vascular em ratos SHR. Estes mesmos autores ainda mostraram que a telmisartana reduziu a fibrose vascular por prevenir a via de sinalização TGF- $\beta$ 1/Smad3. Tanto o efeito antioxidante

quanto antifibrótico da telmisartana decorrem do bloqueio da ação de angiotensina II. Isso não foi avaliado em nossos estudos.

Uma característica interessante deste ARA que aumenta sua capacidade de reduzir a pressão arterial, é sua habilidade de melhor controlar a pressão por 24 horas, e especialmente nas últimas 6 horas antes da próxima dose (GALZERANO *et al*, 2010; CALVO *et al*, 2004; NISHIMURA *et al*, 2005; ZHENG *et al*, 2010), por sua maior meia vida quando comparado com outros bloqueadores de AT1 (DESTRO *et al*, 2011). Como bem estabelecido a elevada pressão sanguínea pelo início da manhã (as últimas 6 horas de eficácia da droga), está associada com aumentado risco cardiovascular e neste sentido, pelo seu tempo de meia vida, a telmisartana se apresenta como uma excelente droga (DESTRO *et al*, 2011).

A atividade física do mesmo modo, tem se mostrado capaz de reduzir os níveis de pressão arterial (aguda e cronicamente), tanto pela redução da resistência vascular periférica, quanto por outros mecanismos, tais como, redução do estresse oxidativo, melhora na função endotelial, alterações na massa corporal, aumento na atividade parassimpática, dentre outros (HEDGE, SOLOMON, 2015). Entretanto, os mecanismos que levam a redução da pressão arterial permanecem ainda sob investigação e há limitações nesta direção pelo desenho experimental dos estudos realizados (SEMLITSCH *et al*, 2013). A grande variabilidade intra e inter estudos sobre a resposta pressórica ao exercício se dá especialmente pelos tipos de atividade, fatores ambientais e fatores genéticos (ASH *et al*, 2013). PESCATELLO *et al* (2008) mostraram em um estudo com 45 voluntários que cerca de 20 a 25% dos indivíduos hipertensos não responderam de maneira aguda à redução na pressão, o que corrobora que outros fatores (ambientais e genéticos) podem participar na modulação dos resultados encontrados (ASH *et al*, 2013).

A despeito desta variabilidade, em geral, se aceita que a atividade física afeta positivamente a pressão arterial, reduzindo-a. Em uma meta-análise de ensaios clínicos na população brasileira, encontrou-se que a atividade física regular, reduziu os níveis da pressão nos estudos avaliados. Apesar da grande variabilidade nos resultados encontrados e o baixo número de estudos (n=7) que preencheram os critérios para a referida meta-análise, os resultados indicaram o efeito protetor da prática de atividades físicas sobre a PA (BENTO *et al*, 2015).

No presente estudo, os efeitos do uso de telmisartana ou da atividade física, promoveram efeitos distintos sobre o peso corporal final, peso do coração e na razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia. Interessantemente, o peso corporal foi reduzido pelo uso da telmisartana e, isto chamou a atenção tendo em vista que essa droga ativa ao menos parcialmente o PPAR $\gamma$ , o qual tem sido observado tem efeito adipogênico (DUBOIS *et al*, 2017). Investigando a literatura, encontraram-se vários estudos apontando para um efeito da telmisartana na distribuição de gorduras no corpo, especialmente promovendo uma redução na gordura visceral. CHOI *et al* (2016) realizaram uma meta-análise e encontraram que a telmisartana teve efeitos benéficos sobre o perfil lipídico quando comparado a outros agentes anti-hipertensivos ou placebo. Outros estudos reforçam este efeito de redução de peso com o uso da telmisartana (SHIMABUKURO *et al*, 2007; TUCK, 2005; FUJISAKA *et al*, 2011; NAKAGAMI *et al*, 2013), contradizendo o efeito adipogênico previamente descrito (DUBOIS *et al*, 2017). Foi observado que esta droga induz aumentos no gasto energético, reduz a ingestão calórica e atenua o ganho de peso total, e estudos associam este efeito com a função da telmisartana tanto como bloqueador do receptor do tipo I para angiotensina II, quanto por sua habilidade em ativar PPAR $\gamma$  (SUGIMOTO *et al*, 2006; MULLER *et al*, 2014; SCHUCHARD *et al*, 2015). A atividade física, por

sua vez, não alterou o peso corporal quando se comparado com seus respectivos controles (SE versus SS, e CE versus CS). Entretanto, a literatura aponta o exercício como sendo um importante fator no controle do peso corporal pelo aumento no gasto energético decorrente do esforço (WING, HILL, 2001; ZHANG, BI, 2018) e pela modificação nos padrões de apetite com redução na ingestão alimentar (LEVIN, DUNN-MEYNELL, 2004; BI *et al*, 2005; THIVEL *et al*, 2013). A diferença entre nossos resultados e a literatura, provavelmente, deve-se às diferentes características dos protocolos e modelos animais estudados e, ainda que, não se tenha avaliado o perfil de massa gorda e magra, pode-se especular que nossos animais talvez tenham tido mudança no perfil da massa corporal na direção de maior quantidade de massa magra.

A OVX per se (grupo CS) foi capaz de aumentar o peso corporal e isto está de acordo com os trabalhos na literatura que mostram que a retirada dos estrogênios pela ovariectomia está associada a ganhos de peso (HOEGH-ANDERSEN *et al*, 2004; LARCO *et al*, 2012).

Em relação às alterações no peso do coração, a razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia também foram demonstrados efeitos opostos pelo uso da telmisartana e a realização do exercício em esteira. A hipertrofia cardíaca é um forte indicativo de morbidade e mortalidade cardiovascular (SHENOY *et al*, 2009). Em um estudo realizado em nosso laboratório (DALPIAZ *et al*, 2015) fêmeas SHR ovariectomizadas apresentaram aumento na hipertrofia ventricular esquerda, medida pela razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia.

O medicamento causou redução nos níveis da hipertrofia cardíaca e isto provavelmente está relacionado com a queda acentuada na pressão arterial causada pelo uso da telmisartana. É bem conhecido que aumento na pressão arterial causa

uma resposta adaptativa no músculo cardíaco, expressa pelo aumento na massa tecidual. Essa resposta está de acordo com a literatura, que associa valores acentuados de pressão arterial com aumento na massa do coração de forma patológica (CRISTIAANS *et al*, 2009). Além disso, dados da literatura demonstram em indivíduos em uso de telmisartana, redução da hipertrofia cardíaca pela diminuição da pressão arterial (DESTRO *et al*, 2011).

Os resultados referentes ao exercício físico como intervenção permitiram observar um aumento tanto no peso do coração quanto na razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia, e isto está de acordo com outros estudos que mostraram a reversão da hipertrofia patológica e até desenvolvimento de hipertrofia fisiológica (positiva) pela atividade física, mostrada por alterações estruturais, tais como, redução de colágeno e aumento na capilarização (GARCIARENA *et al*, 2009) e funcionais pelo redirecionamento do metabolismo energético (IEMITSU *et al*, 2003).

Como observado o protocolo de exercício utilizado foi eficaz na redução da pressão arterial quando comparado ao efeito nos grupos controle (SS e CS) e, portanto, adequado para modificar a função cardiovascular dos modelos SHRs. Este dado corrobora estudos clínicos (MANN *et al*, 2016) e modelos experimentais (ROSSI *et al*, 2013; WALDMAN *et al*, 2017) nos quais se mostram benefícios do exercício na redução da pressão arterial.

Em termos de avaliação e resultados para a estrutura óssea, sabe-se que a absorptometria dupla de raios X (DEXA) é considerada o melhor método para diagnóstico da osteoporose e predição do risco de fratura (PISANI *et al*, 2013). Outros estudos citam que a microtomografia computadorizada é ideal para a avaliação da microarquitetura óssea (KLINTSTROM *et al*, 2013; HSU *et al*, 2013). No presente estudo, utilizando ambas ferramentas diagnósticas consideradas como “padrão ouro”,

mostramos a ocorrência de defeitos biomecânicos e morfológicos tanto no fêmur, quanto na quinta vértebra lombar. Estas alterações na arquitetura óssea foram associadas ao uso de telmisartana, em um modelo de deficiência estrogênica de ratas SHRs. Em contraste, o exercício físico em esteira preservou a estrutura do tecido, apresentando-se como uma intervenção com efeitos positivos sobre o arcabouço ósseo destes animais.

O modelo de osteoporose usado no presente estudo foi confirmado pelos dados que indicam que a OVX levou a alterações ósseas negativas pela redução na densidade mineral óssea no fêmur e na quinta vértebra lombar (ambos avaliados por DEXA), bem como alterações microarquiteturais, as quais representam a qualidade do osso avaliado (KUROSHIMA *et al*, 2017) e complementam os dados obtidos de DMO, na região proximal do fêmur quando comparado com as ratas do grupo SHAM.

A deterioração da microarquitetura óssea (alteração na densidade mineral óssea, a destruição da superfície trabecular e a redução na densidade de conectividade) devido à depleção do hormônio sexual feminino são consideradas como parâmetros sensíveis para revelar a desconectividade das trabéculas e, conseqüentemente a redução da força do tecido, bem como sua capacidade de resistir às tensões impostas, com aumento no risco de fraturas (BRANDI, 2009).

A resposta óssea à ovariectomia tem sido frequentemente investigada devido aos alvos moleculares envolvidos. Além disso, tem-se observado alteração na sensibilidade aos estrogênios tanto no osso cortical, quanto no osso trabecular (MCNAMARA *et al*, 2006). Essa sensibilidade deve-se a diferente expressão de receptores aos estrogênios em ambas as regiões (cortical e trabecular), e envolve maior presença de receptores do tipo beta ( $ER\beta$ ) nas trabéculas, e receptor do tipo alfa ( $ER\alpha$ ) nas duas áreas (NICKS *et al*, 2016). Aparentemente  $ER\beta$  atua com

resposta antagônica a ER $\alpha$ , o que provavelmente leva a respostas diferentes diante da deficiência de estrogênios nestas duas regiões ósseas (BORD *et al*, 2001). Independentemente dessa possível distinção entre as respostas, de acordo com o receptor aos quais os estrogênios se ligam, tem-se clareza na literatura de que a presença dos hormônios femininos inibe a ligação RANKL-RANK, impedindo um desequilíbrio na homeostasia óssea na direção de maior atividade osteoclástica. Da mesma forma, porém na direção contrária, a retirada dos estrogênios causa maior ligação RANKL-RANK, daí disparando a cascata de mecanismos que em última análise leva a uma maior reabsorção óssea pela ação dos osteoclastos (NAGY, PENNINGER, 2015).

Os achados atuais foram interessantes e chamam a atenção, uma vez que o modelo avaliado (ratas hipertensas e ovariectomizadas) mimetiza a deficiência estrogênica observada na pós-menopausa, a qual está associada a aumento da incidência de osteoporose e hipertensão nas mulheres. O ponto que mais se destacou nos dados atuais indicou que a perda óssea foi ainda mais pronunciada em ratas ovariectomizadas tratadas com telmisartana (grupo CT), enquanto o exercício foi benéfico em ambas as situações (grupos SE ou CE; ratas SHAM e OVX exercitadas, respectivamente). De modo bastante intrigante, nas ratas SHAM com hormônios femininos preservados às quais foi administrada telmisartana (ratas do grupo ST), a redução na densidade mineral, e a concorrente deterioração na arquitetura trabecular, foi semelhante às ratas do grupo OVX (ratas CS). Isto aponta para uma preocupação translacional para mulheres que mesmo antes da fase menopausal são hipertensas e quem fazem uso deste medicamento, uma vez que estes dados pré-clínicos indicam que pode haver prejuízo na estrutura óssea trabecular das mesmas. Diante do fato de haver a possibilidade do uso de um anti-hipertensivo como a telmisartana por

mulheres, tanto na fase pré- quanto na pós-menopausa, levanta-se a preocupação e a necessidade de acompanhamento dessas mulheres para possíveis efeitos colaterais ósseos pelo uso dessa droga.

Meta análises e estudos epidemiológicos mostram uma associação entre drogas anti-hipertensivas e função óssea (REJNMARK *et al*, 2006; WIENS *et al*, 2006; SOLOMON *et al*, 2011; YANG *et al*, 2011) e sabe-se que essas drogas impactam na osteoporose de modo direto ou indireto por afetar o metabolismo, a força e a densidade óssea (LACROIX *et al*, 2008).

Os diuréticos tiazidas têm mostrado ser capazes de reduzir o risco de fratura osteoporótica (WIENS *et al*, 2006; SOLOMON *et al*, 2011), enquanto que os resultados de outras drogas anti-hipertensivas são controversos (REJNMARK *et al*, 2006; WIENS *et al*, 2006; SOLOMON *et al*, 2011; YANG *et al*, 2011).

SCHOOFS *et al* (2003) em um estudo prospectivo com 7891 indivíduos a partir de 50 anos, examinando a associação entre a dose e a duração do uso dos diuréticos tiazidas e fraturas de fêmur, observaram um efeito positivo da droga, que é perdido após 4 meses de interrupção do seu uso. Em uma coorte de indivíduos dinamarqueses com aproximadamente 65 mil pessoas, foi observada uma redução no risco de fraturas entre 7 e 23% (fraturas em geral e fraturas no antebraço) naqueles indivíduos sob uso de tiazidas por até cinco anos antes da análise (REJNMARK *et al*, 2005).

Especificamente em relação aos bloqueadores do receptor do tipo I de angiotensina II os dados em animais e humanos, os efeitos no osso são controversos e inconclusivos (SHIMIZU *et al*, 2008; BIROCALE *et al*, 2016; AYDOGAN *et al* 2019; ZHANG *et al*, 2013). O uso de olmesartan por 4 semanas em ratas SHR ovariectomizadas de 10 semanas de idade, aumentou a densidade óssea (SHIMIZU *et al*, 2008). Em contraste, em um estudo de nosso grupo em ratos machos SHR não



castrados de 12 semanas de idade, o tratamento por 8 semanas com telmisartana levou a efeitos ósseos negativos (BIROCALE *et al*, 2016). AYDOGAN *et al* (2019) avaliando o uso de dois diferentes ARAs, telmisartana (n = 22 e dose diária de 80 mg) ou losartana (n = 20 e dose de 100 mg/dia), por 12 semanas, não observaram alterações nos marcadores do “turnover” ósseo (níveis de cálcio sérico, fósforo, 25-hidroxi vitamina D, fosfatase alcalina, interleucina 6, telopeptídeo N-terminal) em 42 pacientes com hipertensão leve. Vale ressaltar que este próprio grupo não realizou outras avaliações como, por exemplo, técnicas de imagens como (DEXA) que utilizamos em nosso estudo.

Em outro estudo, o tratamento com losartana (10 ou 25 mg/kg/dia) por 16 semanas não preveniu o desarranjo ósseo em ambos os ratos castrados, normotensos e hipertensos, de 6 meses de idade (ZHANG *et al*, 2008). Estes resultados podem sugerir uma menor participação de receptores do tipo I de angiotensina II em termos de efeitos sobre o tecido ósseo. Consistente com esta ideia, outro estudo em camundongos utilizando losartana oral (10 mg/kg/dia) e injeções intraperitoneais de um bloqueador de receptor do tipo II de angiotensina II (AT2) mostrou que o bloqueio do receptor AT2, e não do receptor AT1 aumentou a massa óssea, com maior atividade osteoblástica e redução na atividade osteoclástica *in vivo* (IZU *et al*, 2009). Diante desses resultados esses autores sugeriram uma menor participação de receptores do tipo I de angiotensina II em termos de efeitos sobre o tecido ósseo, pelo resultado observado com o uso de losartana (sabidamente um bloqueador de AT1). Além disso, os dados sugerem que esse receptor do tipo II de angiotensina II (AT2) teria uma importância maior para alterações ósseas decorrentes da participação do sistema renina angiotensina.

Corroborando a relação entre ARAs e os receptores AT1 e/ou AT2, BAI *et al* (2016) avaliaram o uso de angiotensina II, ou da telmisartana em associação com angiotensina II, e demonstraram que ambos tratamentos influenciaram nos níveis de expressão dos receptores AT1 e AT2. A telmisartana foi capaz de aumentar os níveis de expressão de AT2 e da razão AT2/AT1, em vasos intracardíacos e no miocárdio, os quais haviam sido reduzidos pela angiotensina II isoladamente em ratos Sprague Dawley. Esses resultados sugeriram que a inibição do receptor AT1 pela telmisartana estava associada ao aumento na expressão do receptor AT2. Embora não se conheça totalmente o comportamento do receptor AT2 no tecido ósseo durante tratamento com telmisartana, estes dados poderiam explicar, pelo menos em parte no estudo atual, os efeitos da telmisartana no osso, pela via de bloqueio dos receptores AT1, o que levaria a uma *upregulation* do receptor AT2 e, deste modo, induzir a perda óssea.

Outro mecanismo que possivelmente envolve o sistema renina angiotensina e um possível efeito sob o tecido ósseo pelo uso dos bloqueadores do receptor de angiotensina II, pode estar relacionado ao fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). Este peptídeo multifuncional exerce papel em muitos mecanismos corporais, especialmente relacionados a proliferação e diferenciação celular com formação tecidual e outras funções celulares (desenvolvimento embrionário, tumogênese, fibrose, cicatrização de feridas, hematopoiese e imunoregulação) (AKINCI *et al*, 2007). No tecido ósseo a literatura tem associado este fator com a manutenção ou com o aumento da massa óssea (AKINCI *et al*, 2007; FINKELMAN *et al*, 1991; GULCAN *et al*, 2008; NICOLAS *et al*, 1994). Sabe-se que este fator está presente em altas concentrações no osso produzido a partir dos osteoblastos, e que sua presença estimula a diferenciação de pré-osteoblastos. Este mecanismo induz a ativação de mais osteoblastos, ao mesmo tempo em que diminui a ativação de

osteoclastos (JANSSENS *et al*, 2005; AKINCI *et al*, 2007). Estudos mostraram que a deficiência estrogênica leva a redução nos níveis de TGF- $\beta$ 1 e isso está associado a reduzida atividade osteoblástica (deposição óssea), aumentada reabsorção pelos osteoclastos, e assim a uma tendência à osteoporose pós-menopausal (RIGGS, 2000; GULCAN *et al*, 2007).

Outros estudos mostraram que o bloqueador de receptores de angiotensina II, candesartan, foi capaz de reduzir os níveis de TGF- $\beta$ 1 no fígado o que reduziu a fibrose hepática (YOSHIJI *et al*, 2001) e diminuiu a aterosclerose no coração (ZEZINA *et al*, 2001). A partir disso e, considerando que este fator é altamente expresso no osso pela maior atividade osteoblástica, poderia se especular que os resultados ósseos negativos em nosso estudo pelo uso da telmisartana, também poderiam decorrer dos menores níveis deste fator no osso pelo uso deste medicamento. No entanto, estes possíveis efeitos são controversos, uma vez que os antagonistas do receptor AT1 da angiotensina (telmisartana e valsartan) reduziram os níveis de TGF- $\beta$ 1 no soro, mas não nos ossos e não aceleraram a perda óssea induzida por ovariectomia em ratas Sprague-Dawley de 5 meses de idade (LI *et al*, 2009).

Uma lacuna do presente estudo foi não terem sido avaliados esses possíveis mecanismos que relacionam os receptores de angiotensina II e a telmisartana em nosso modelo, ou seja, a questão dos níveis de AT2 em relação a AT1, visto que aumento na expressão e atividade de AT2 pode aumentar a perda óssea, ou ainda, a questão sobre como ficam os níveis de TGF- $\beta$ 1, que como exposto piora a qualidade óssea quando estão reduzidos.

Tendo em vista a associação entre os níveis aumentados de PPAR $\gamma$  pelo uso de tiazolidinedionas (TZDs) e a consequente deterioração na DMO e parâmetros de qualidade óssea, em nosso estudo avaliamos os níveis desta proteína pelas ratas que

fizeram uso de telmisartana. Os presentes resultados associaram pela primeira vez o aumento nos níveis do PPAR $\gamma$  no fêmur pelo uso da telmisartana concomitantemente aos efeitos ósseos negativos demonstrados nas ratas SHAM e OVX (grupos ST e CT). De modo interessante as ratas ST tiveram alterações nos níveis de PPAR $\gamma$  semelhantes às das somente OVX (ratas CS), e ambos os grupos foram diferentes das ratas SHAM (CS e ST versus SS) e a associação entre uso da telmisartana e a OVX (grupo CT) causou aumento maior nos valores de expressão de PPAR $\gamma$ . Os resultados encontrados aqui são inéditos, uma vez que na literatura não se encontram estudos mostrando modificações pelo uso da telmisartana nos níveis ósseos de PPAR $\gamma$ .

O PPAR $\gamma$  promove diferenciação celular (TONTONNOZ, SPIEGELMAN, 2008; WU *et al*, 2013) e a telmisartana é reconhecida como um modulador/agonista parcial de PPAR $\gamma$  devido à sua estrutura química e sua interação com proteína. O uso do antidiabético rosiglitazona (uma tiazolidinediona - TZD), considerada uma droga agonista total de PPAR $\gamma$  (WU *et al*, 2013), tem sido associado com perda óssea (BILLINGTON *et al*, 2015). Em conjunto isso pode auxiliar a explicar os resultados encontrados em nosso estudo experimental.

MEIER *et al* (2008) em um artigo de revisão aponta que o tratamento com TZDs causa alguns efeitos colaterais, tais como, um risco significativamente aumentado de efeitos adversos no osso, tais como diminuição na DMO e no volume ósseo e mudanças na microarquitetura do osso, pela ativação do PPAR $\gamma$ .

RZONCA *et al* (2004) avaliaram os efeitos da administração de rosiglitazona por 7 semanas em camundongos machos C57BL/6 não diabéticos de 6 meses de idade, e observaram redução na densidade mineral óssea, prejuízo em parâmetros microarquiteturais (volume ósseo, espessura trabecular, número de trabéculas e

espaçamento entre as trabéculas), diminuição na taxa de formação óssea com aumento concomitante de conteúdo gorduroso na medula óssea e mudanças na expressão de marcadores gênicos específicos para osteoblastos (redução) e adipócitos (aumento). Outro estudo confirmou este efeito negativo da rosiglitazona em camundongos e associou tal efeito à redução de dois fatores chave na transcrição osteoblastogênica (Runx2 e Osterix), fornecendo uma explicação mecanicística entre a ativação do PPAR $\gamma$  e alterações negativas ósseas pelo uso de um agonista PPAR $\gamma$  (ALI *et al*, 2005)

BILLINGTON *et al* (2015) em uma revisão sistemática e meta-análise mostraram que o tratamento com TZDs resultaram em modesta perda óssea que não foi revertida mesmo após um ano de término do tratamento. WU *et al* (2013) avaliaram o efeito da rosiglitazona e de dois moduladores seletivos de PPAR $\gamma$  (SPPAR $\gamma$ Ms) sobre a diferenciação de osteoclastos a partir de células indiferenciadas em cultura. Os resultados indicaram que moduladores seletivos atuam de forma diferente da rosiglitazona recrutando coativadores e disparando uma cascata de expressão de gênica para ativar o PPAR $\gamma$ . Estes autores usaram Fmoc-L-Leu (9-fluorenilmetiloxicarbonil L leucina) e a telmisartana, e mostraram que os três ligantes ativaram PPAR $\gamma$ , porém com menor capacidade em causar diferenciação de osteoclastos pelos SPPAR $\gamma$ Ms. Os resultados concluíram que o uso de SPPAR $\gamma$ Ms, em vez de glitazonas, pode ajudar no desenvolvimento de drogas antidiabéticas com menos efeitos colaterais, tendo em vista terem capacidade de ativar PPAR $\gamma$ , com menor potencial de dano, especialmente no osso, pelo menor número de osteoclastos diferenciados.

Em conjunto, esses dados sugerem que os agonistas do PPAR $\gamma$  podem aumentar o risco de perda óssea e, como o aumento da ativação desta via, pode atenuar a DMO.

Assim, os resultados em nosso modelo sugerem que o uso de telmisartana pode ter induzido perda óssea mediada pela ativação de PPAR $\gamma$  nesse tecido. Entretanto, não foram avaliados os possíveis alvos ósseos do PPAR $\gamma$ , isto é, possíveis vias ou fatores associados à aumentada adipogênese ou osteoclastogênese, ou mesmo reduzida osteoblastogênese, e por esse motivo não se pode afirmar que as alterações ósseas observadas decorrem do aumento somente dessa proteína. Mecanismos envolvendo diretamente os receptores AT1 e/ou AT2 para angiotensina II também poderiam ser responsáveis pelos resultados encontrados.

Finalmente foram avaliados os efeitos ósseos pelo protocolo de atividade física com corrida em esteira elétrica no fêmur e na quinta vértebra lombar, e de modo geral as ratas exercitadas tiveram poucas alterações nos parâmetros avaliados, DMO ou microarquitetura, quando comparadas àquelas dos grupos sedentários (SE versus SS e CE versus CS). Isto se deve, provavelmente devido ao desenho do protocolo utilizado no presente estudo ter tido menor impacto em afetar o osso. Há controvérsias em relação aos efeitos ósseos do exercício físico, com alguns estudos mostrando uma mudança positiva com o aumento da prática, enquanto outros estudos não mostraram modificações e, ainda, outros estudos mostraram uma redução na densidade mineral óssea dependendo dos protocolos em termos de tipo e intensidade do exercício, amostra populacional e outros aspectos das atividades realizadas (PIGOZZI *et al*, 2009; SIEGRIST, 2008). As características ósseas microarquiteturais parecem ser positivamente alteradas por programas de exercícios apropriados que levam à modelagem ou remodelamento ósseo pela inibição dos osteoclastos e, portanto, reduzem a perda óssea. No entanto, exercícios além da capacidade de resposta óssea em humanos levam à perda óssea, dependendo da intensidade e/ou duração excessiva, especialmente porque nestes exercícios ocorre redução nos níveis dos

hormônios sexuais e com isso comprometimento da massa óssea (HUMPHRIES *et al*, 2000; GREMION *et al*, 2001; HELGE *et al*, 2002; MAIMOUN *et al*, 2003; BURROWS *et al*, 2003).

GREMION *et al* (2001) avaliando a DMO de corredoras de longa distância num intervalo de 1 ano, observaram reduções na densidade óssea, associadas a alterações no ciclo menstrual das atletas (oligoamenorréia, eumenorréia ou uso de contraceptivos orais). Para esses autores a redução na massa gorda decorrente do exercício nessas atletas pode ter comprometido a síntese dos hormônios femininos, e disso decorreu menor massa óssea pela falta de ação dos estrogênios sobre o osso. Estes resultados foram corroborados pelo estudo de BURROWS *et al* (2003) que avaliaram 52 corredoras de resistência (1500 metros até maratona) e observaram correlação positiva entre a atividade física e a redução na DMO na coluna lombar e colo do fêmur.

Estudos sugerem que o exercício físico é capaz de alterar o metabolismo ósseo diretamente por meio da tensão, que gera sinais endógenos capazes de alterar o processo de remodelamento ósseo pela ativação de receptores mecânicos (HENDERSON *et al*, 1998; CHERIAN *et al*, 2003). A força mecânica a partir do exercício físico é transformada em sinais bioquímicos que regulam o *turnover* ósseo na direção da maior formação tecidual (CHERIAN *et al*, 2003; NOMURA, YAMAMOTO, 2000). Do mesmo modo sabe-se que a falta de atividade e/ou carga sobre o osso leva à diminuída formação e aumentada reabsorção óssea (VERHAEGHE *et al*, 2000).

Em um modelo com roedores, por exemplo, se mostrou que a estimulação mecânica produziu estimulação imediata e tardia na formação óssea (VERHAEGHE *et al*, 2000). A resposta imediata é baseada na ativação de células de linhagem óssea para

formarem osteoblastos diretamente (CHOW *et al*, 1998), e a tardia é resultado de proliferação de pré-osteoblastos e diferenciação posterior a osteoblastos (TURNER *et al*, 1998). Em ambas ocorre a melhora da competência biomecânica do tecido em suportar cargas estressantes pela maior e melhor formação do tecido.

Interessante é que a presença e atividade dos estrógenos no osso parecem aumentar a sensibilidade destes mecanorreceptores às cargas mecânicas, com a ovariectomia, no caso dos modelos experimentais, ou a menopausa em estudos clínicos, levando a diminuição desta sensibilidade (LEE, LANYON, 2004). Em ratas ovariectomizadas, KIUCHI *et al* (2006) demonstraram que a deficiência de estrogênios levou a não detecção de cargas mecânicas de muita baixa intensidade; sendo assim os efeitos do exercício sobre o tecido ósseo foram dose-dependente, com a sobrecarga promovendo o aumento no remodelamento ósseo, diferentemente do que foi encontrado em exercício em esteira. Corroborando estes dados, TAE-WONG *et al* (2006) mostraram em ratas ovariectomizadas (OVX) que exercícios com maior sobrecarga e tensão foram mais eficientes em aumentar a massa óssea que exercícios de corrida em esteira. Entretanto, mesmo não apresentando o melhor resultado, estes exercícios apresentaram melhor efetividade quanto ao tecido ósseo em relação às ratas sedentárias.

Além deste mecanismo direto proposto pela ação dos estrogênios, também ocorrem alterações indiretas na deposição e/ou retirada óssea por meio de fatores hormonais (OCARINO, SERAKIDES, 2006). A sequência de eventos ainda não está totalmente descrita, porém, se especula que as prostaglandinas E2 (PGE2) e a conexina 43 (Cx43) estejam envolvidas. Quando a força mecânica é aplicada, a liberação de PGE2, derivada do ácido aracídico, parece agir como um fator autócrino no osso e se conectaria com seu receptor de membrana no osteócito, causando a estimulação



da formação da proteína Cx43 via AMPc, e daí a formação de novo tecido. Outros fatores hormonais, citocinas e diversos fatores de crescimento também têm participação na formação óssea pela maior ativação osteoblástica (OCARINO & SERAKIDES, 2006). Outros hormônios (T3, T4 e PTH) são alterados com a atividade física, porém não se estabeleceu uma relação causal para os mesmos em termos ósseos (OCARINO & SERAKIDES, 2006).

Apesar de não termos avaliado a expressão proteica do PPAR $\gamma$  nos animais submetidos ao exercício físico, acreditamos que a melhora observada em parâmetros que mensuraram a qualidade do osso nesses animais, possa envolver a redução dessa proteína. Um estudo em ratas wistar ovariectomizadas mostrou que a expressão do PPAR $\gamma$  e Runx2 foi influenciada no osso pelo exercício, assim como redução da DMO. Essas ratas foram submetidas ao treinamento físico em esteira, que foi capaz de reduzir a expressão do PPAR $\gamma$  e aumentar a DMO, sem alterar Runx2. Assim os autores concluíram que o treinamento em esteira poderia impedir a perda óssea induzida por OVX por meio da inibição do fator de diferenciação de adipócitos PPAR $\gamma$  (CHEN *et al*, 2011).

## 6. CONCLUSÃO

O uso de telmisartana em ratas SHRs ovariectomizadas, um modelo de deficiência estrogênica e hipertensão arterial, comprometeu a microarquitetura óssea por reduzir a massa óssea e causar deterioração da estrutura trabecular (parâmetros relacionados à forma e à conectividade óssea) observados por DEXA e análise por MicroCT. A via PPAR $\gamma$ , provavelmente tenha atuado com um papel determinante nestes resultados, embora esta droga seja eficiente na redução da pressão arterial e hipertrofia cardíaca destes animais. O exercício físico utilizado foi eficiente na redução da pressão arterial e melhorou algumas das alterações ósseas causadas pela OVX, sendo que, de maneira geral, observou-se a manutenção dos valores dos parâmetros avaliados em acordo com a literatura.

### 6.1. PERSPECTIVAS CLÍNICAS

Se desconhece se esses achados experimentais se traduzem em situações clínicas humanas, sendo necessários estudos adicionais utilizando técnicas de imagem específicas, como densitometria e/ou tomografia, para o acompanhamento de pacientes em uso dessa droga.

## 7. REFERÊNCIAS

Ackerman KE, Singhal V, Baskaran C, Slattery M, Reyes KJC, Toth A, Eddy KT, Bouxsein ML, Lee H, Klibanski A, Misra M. Oestrogen replacement improves bone mineral density in oligo-amenorrhoeic athletes: a randomized clinical trial. *Br J Sports Med* 2019, 53:229-236. doi:10.1136/bjsports-2018-099723.

Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita I, Murota S, Nagata N, Takatani O, Suda T. Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Miner Res* 1989, 4(1):29-35. doi:10.1002/jbmr.5650040106.

Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Imamura K, Yamaguchi A, Sato K, Nagata N, Suda T. Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *J Bone Miner Res* 1991, 6:183-189. doi:10.1002/jbmr.5650060212.

Akinci B, Bayraktar F, Saklamaz A, Demir T, Yener S, Comlekci A, Ozcan MA, Kebapcilar L, Yuksel F, Yesil S. Low transforming growth factor-beta1 serum levels in idiopathic male osteoporosis. *J Endocrinol Invest*. 2007, 30(5):350-355. doi:10.1007/bf03346309.

Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone Causes Bone Loss in Mice by Suppressing Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Endocrinology* 2005, 146(3):1226-1235. doi:10.1210/en.2004-0735.

Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int* 2003, 14(Suppl 3):S13–S18. doi:10.1007/s00198-002-1345-4.

Arai M, Sato T, Takeuchi S, Goto S, Togari A. Dose effects of butoxamine, a selective b2-adrenoceptor antagonist, on bone metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol* 2013, 701(1-3):707-713. doi:10.1016/j.ejphar.2012.12.016.

Asaba Y, Ito M, Fumoto T, Watanabe K, Fukuhara R, Takeshita S, Nimura Y, Ishida J, Fukamizu A, Ikeda K. Activation of Renin–Angiotensin System Induces Osteoporosis Independently of Hypertension. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009, 24(3):241-250. doi.org/10.1359/jbmr.081006.

Ash GI, Eicher JD, Pescatello LS. The promises and challenges of the use of genomics in the prescription of exercise for hypertension: the 2013 update. *Curr. Hypertens. Rev.* 2013, 9(2):130-147. PMID:23971695.

Aydoğan BI, Erarslan E, Unluturk U, Gullu S. Effects of telmisartan and losartan treatments on bone turnover markers in patients with newly diagnosed stage I hypertension. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2019, 1–6 July- September. <https://doi.org/10.1177/1470320319862741>.

Bagger YZ, Tankó LB, Alexandersen P, Hansen HB, Møllgaard A, Ravn P, Qvist P, Kanis JA, Christiansen C. Two to three years of hormone replacement treatment in healthy women have long-term preventive effects on bone mass and osteoporotic

fractures: the PERF study. *Bone*. 2004, 34(4):728-735. doi: 10.1016/j.bone.2003.12.021.

Bai F, Pang XF, Zhang LH, Wang NP, McKallip RJ, Garner RE, Zhao ZQ. Angiotensin II AT1 receptor alters ACE2 activity, eNOS expression and CD44-hyaluronan interaction in rats with hypertension and myocardial fibrosis. *Life Sci*. 2016 15, 153:141-52. doi: 10.1016/j.lfs.2016.04.013.

Benndorf R, Appel D, Maas R, Schwedhelm E, Wenzel UO, Böger RH. Telmisartan improves endothelial function in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007, 50(4):367-371. doi:10.1097/FJC.0b013e31811dfbe7.

Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of Telmisartan as a Unique Angiotensin II Receptor Antagonist With Selective PPAR $\gamma$  Modulating Activity. *Hypertension*. 2004, 43:993-1002. doi.org:10.1161/01.HYP.0000123072.34629.57.

Bento VFR, Albino FB, Moura KF, Maftum GJ, Santos MC, Guarita-Souza LC, Neto JRF, Baena CP. Impact of Physical Activity Interventions on Blood Pressure in Brazilian Populations. *Arq Bras Cardiol*. 2015 Sep, 105(3): 301-308. doi:10.5935/abc.20150048.

Bi S., Scott K. A., Hyun J., Ladenheim E. E., Moran T. H. Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in Otsuka long-evans Tokushima Fatty rats: role of hypothalamic signaling. *Endocrinology* 2005, 146:1676-1685. 10.1210/en.2004-1441. Bian C, Wu Y, Chen P. Telmisartan increases the permeability of endothelial cells through zonula occludens-1. *Biol Pharm Bull* 2009, 32:416-420. doi:10.1248/bpb.32.416.

Billington EO, Grey A, Bolland MJ. The effect of thiazolidinediones on bone mineral density and bone *turnover*: systematic review and meta-analysis, *Diabetologia* 2015, 58: 2238-2246. doi:10.1007/s00125-015-3660-2.

Birocale AM, Medeiros ARS, Ruffoni LDG, Takayama L, Oliveira Jr. JM, Nonaka KO, Pereira RMR, Bissoli NS. Bone mineral density is reduced by telmisartan in male spontaneously hypertensive rats, *Pharmacol. Rep.* 2016, 68:1149-1153, doi.org/10.1016/j.pharep.2016.06.014.

Blake GM, Fogelman I. Technical principles of dual energy x-ray absorptiometry. *Semin Nucl Med*. 1997, 27(3):210-28. doi:10.1016/s0001-2998(97)80025-6

Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality Risk Associated With Low-Trauma Osteoporotic Fracture and Subsequent Fracture in Men and Women. *JAMA*. 2009, 301(5):513-521. doi: 10.1001/jama.2009.50.

Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86(5):2309–14. doi: 10.1210/jcem.86.5.7513.

Bragdon B, Burns R., Baker AH, Belkina AC, Morgan EF, Denis GV, Gerstenfeld LC, Schlezinger JJ. Intrinsic sex-linked variations in osteogenic and adipogenic differentiation potential of bone marrow multipotent stromal cells, *J. Cell. Physiol.* 2015, 230:296-307. <https://doi:10.1002/jcp.24705>.

Brandi ML. Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology* 2009, 48:iv3-iv8. [doi.org/10.1093/rheumatology/kep273](https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep273)

Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Investig.* 2013, 123(3):951-957. doi: 10.1172/JCI64125.

Brickman AS, Nyby MD, von Hungen K, Eggena P, Tuck ML. Calcitropic hormones, platelet calcium and blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 1990, 16(5):515-522. doi:10.1161/01.hyp.16.5.515

Burrows M, Nevill AM, Bird S, Simpson D. Physiological factors associated with low bone mineral density in female endurance runners. *Br J Sports Med* 2003, 37:67-71. doi: 10.1136/bjism.37.1.67

Calvo C, Hermida R, Ayala D, Ruilope LM. Effects of telmisartan 80 mg and valsartan 160 mg on ambulatory blood pressure in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2004, 22(4):837-846. doi:10.1097/00004872-200404000-00028.

Cappuccio FP, Meilahn E, Zmuda JM, Cauley JA. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study for the Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 1999, 354(9183):971-975. doi:10.1016/s0140-6736(99)01437-3

Chen Y, Wang S, Bu S, Wang Y, Duan Y, Yang S. Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR $\gamma$  expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol.* 2011, 111(8):1759-1767. doi: 10.1007/s00421-010-1820-0.

Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell.* 2005, 16(7):3100-3106. doi:10.1091/mbc.e04-10-0912.

Chesnut CH, Skag A, Christiansen C, Recker R, Stakkestad JA, Hoiseth A, Felsenberg D, Huss H, Gilbride J, Schimmer RC, Delmas PD; Oral Ibandronate Osteoporosis Vertebral Fracture Trial in North America and Europe (BONE). Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2004, 19(8):1241-1249. doi:10.1359/JBMR.040325.

Choi GJ, Kim HM, Kang H, Kim J. Effects of telmisartan on fat distribution: a meta analysis of randomized controlled trials. *Curr Med Res Opin.* 2016, 32(7):1303-1309. doi: 10.1185/03007995.2016.1171204.

Chow, J. W. M., Wilson, A. J., Chambers, T. J., and Fox, S. W. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 1998, 13:1760-1767. doi:10.1359/jbmr.1998.13.11.1760.

Cole JH, van der Meulen MC. Whole bone mechanics and bone quality. *Clin Orthop Relat Res.* 2011, 469(8):2139-2149. doi: 10.1007/s11999-011-1784-3.

Compston JE. Hormone replacement therapy for osteoporosis: clinical and pathophysiological aspects. *Repro Med Rev.* 1994, 3:209-224. doi: <https://doi.org/10.1017/S0962279900000880>.

Cooper C, Gehlbach S, Lindsay R. Pathophysiology of osteoporosis. In: Cooper C, Gehlbach S, Lindsay R. *Prevention and treatment of osteoporosis: a clinician's guide*. London: Taylor & Francis, 2005: 27–42.

Cristiaans I, Birnie E, Van Langen IM, Van Spaendonck-Zwarts KY, Van Tintelen JP, Van den Berg MP, Atsma DE, Helderma-Wilde AA. The yield of risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy myosin-binding protein C gene mutation carriers: focus on predictive screening. *Eur. Heart J.* 2009, 31(7):842-848. doi: 10.1093/eurheartj/ehp539.

Currey JD. Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporos Int* 2003; 14(suppl 5):S29–S36. doi:10.1007/s00198-003-1470-8.

Dalpiatz PLM, Lamas AZ, Caliman IF, Ribeiro Jr. RF, Abreu GR, Moyses MR, Andrade TU, Gouvea SA, Alves MF, Carmona AK, Bissoli NS. Sex Hormones Promote Opposite Effects on ACE and ACE2 Activity, Hypertrophy and Cardiac Contractility in Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS One.* 2015 May 26, 10(5):e0127515. doi:10.1371/journal.pone.0127515 *PlosONE*,2015.

Destro M, Cagnoni F, Dognini GP, Vincenzo Galimberti, Carlo Taietti, Chiara Cavalleri & Emilio Galli. Telmisartan: just na antihypertensive agent? A literature review. *Expert Opin. Pharmacother.* 2011, 12(17):2719-2735 doi://10.1517/14656566.2011.632367.

Dubois V, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J Clin Invest.* 2017, 127(4):1202–1214. doi.org/10.1172/JCI88894.

Dunnewind T, Dvortsin EP, Smeets HM, *et al.* Economic consequences and potentially preventable costs related to osteoporosis in the Netherlands. *Value Health* 2017; 20(06):762-768. doi: 10.1016/j.jval.2017.02.006.

Ebbesen E, Thomsen J, Beck-Nielsen H, Nepper-Rasmussen H, Mosekilde L. Age and gender related differences in vertebral bone mass, density and strength. *J Bone Miner Res* 1999, 14(8):1394-1403. doi:10.1359/jbmr.1999.14.8.1394.

Endlich PW, Claudio ERG, Lima LCF, Ribeiro Jr. RF, Peluso AAB, Stefanon I, Bissoli NS, Lemos VS, dos Santos RAS, de Abreu GR. Exercise modulates the aortic renin-angiotensin system independently of estrogen therapy in ovariectomized hypertensive rats, *Peptides* 2017, 87:41–49. doi.org/10.1016/j.peptides.2016.11.010.

Ensrud KE, Crandall CJ. Osteoporosis. *Ann Intern Med* 2018, 20, 168(4):306-307. doi: 10.7326/L17-0587.

Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res*. 2007, 22(1):1-6. doi:10.1080/14041040701482935.

Evely RS, *et al*: Structural requirements for the action of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on bone resorption by isolated osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1991, 6:85-93. doi: 10.1002/jbmr.5650060114

Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest*. 2000, 106:1553-1560. doi: 10.1172/JCI10942.

Farr JN, Khosla S. Determinants of bone strength and quality in diabetes mellitus in humans. *Bone*. 2016, 82:28-34. doi: 10.1016/j.bone.2015.07.027.

Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm, *J. Opt. Soc. Am.* 1984, A 1: 612–619. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.1.000612>.

Martin RB. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. *Journal of Biomechanics*, v. 23, n. 10, p. 1021-1029, 1990. DOI:10.1016/0021-9290(90)90317-v.

Finkelman RD, Linkhart TA, Mohan S, Lau KH, Baylink DJ, Bell ND. Vitamin D deficiency causes a selective reduction in deposition of transforming growth factor beta in rat bone: possible mechanism for impaired osteoinduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88(9): 3657–3660. doi: 10.1073/pnas.88.9.3657

Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*. 2013, 28(5):330-58. doi:10.1152/physiol.00019.2013.

Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med*. 2014, 44(1):37-53. doi: 10.1007/s40279-013-0100-7.

Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts II LJ, Reckelhoff JF. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension* 2003, 41:640-645. doi.org/10.1161/01.HYP.0000046924.94886.EF.

Fritton JC, Myers ER, Wright TM, van der Meulen MC. Bone mass is preserved and cancellous architecture altered due to cyclic loading of the mouse tibia after orchidectomy. *J Bone Miner Res*. 2008, 23(5):663-71. doi: 10.1359/jbmr.080104.

Fuchs RK, Bauer JJ, Snow CM. Jumping improves hip and lumbar spine bone mass in prepubescent children: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2001, 16(1):148-156. doi:10.1359/jbmr.2001.16.1.148.

Fujisaka S, Usui I, Kanatani Y, Ikutani M, Takasaki I, Tsuneyama K, Tabuchi Y, Bukhari A, Yamazaki Y, Suzuki H, Senda S, Aminuddin A, Nagai Y, Takatsu K, Kobayashi M, Tobe K. Telmisartan improves insulin resistance and modulates

adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology*. 2011, 152(5):1789-1799. doi: 10.1210/en.2010-1312.

Fukumoto S, Matsumoto T. Recent advances in the management of osteoporosis. *F1000 Res* 2017, 6:625. doi: 10.12688/f1000research.10682.1.

Gadallah M, Massry SG, Bigazzi R, Horst RL, Eggena P, Campese VM. Intestinal absorption of calcium and calcium metabolism in patients with essential hypertension and normal renal function. *Am J Hypertens* 1991, 4(5 Pt 1):404-409. doi:10.1093/ajh/4.5.404.

Galzerano D, Capogrosso C, Michele SD, Galzerano A. New standards in hypertension and cardiovascular risk management: focus on telmisartan. *Vasc Health Risk Manag* 2010, 6:113-133. doi: 10.2147/vhrm.s7857.

Garciarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, Ennis IL. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2009, 53(4):708-714. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.126805.

Gierach GL, Johnson BD, Merz CNB, Kelsey SF, Bittner V, Olson MB, Shaw LJ, Mankad S, Pepine CJ, Reis SE, Rogers WJ, Sharaf BL, Sopko G. Hypertension, Menopause, and Coronary Artery Disease Risk in the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study. *Journal of the American College of Cardiology* 2006, 47(3):50-58S. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.099>.

Gillis EE, Sullivan JC. Sex Differences in Hypertension Recent Advances. *Hypertension*. 2016, 68:1322-1327. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06602.

Gremion G, Rizzoli R, Sloman D, Theintz G, Bonjour J-P. Oligo-amenorrheic long-distance runners may lose more bone in spine than in femur. *Med Sci Sports Exerc* 2001, 33(1):15-21. doi:10.1097/00005768-200101000-00004

Grobbbee DE, Hackeng WHL, Birkenhager JC, Hofman A. Raised plasma intact parathyroid hormone concentrations in young people with mildly raised blood pressure. *BMJ* 1988, 19;296(6625):814-816. doi:10.1136/bmj.296.6625.814.

Guadalupe-Gral A, Fuentes T, Guerra B, Calbet JAL. Exercise and bone mass in adults. *Sports Med* 2009, 39(6):439-468. doi:10.2165/00007256-200939060-00002.

Guan XX, Zhou Y, Li JY. Reciprocal roles of angiotensin II and angiotensin II receptors blockade (ARA) in regulating Cbfa1/RANKL via cAMP signaling pathway: possible mechanism for hypertension-related osteoporosis and antagonistic effect of ARA on hypertension-related osteoporosis. *Int J Mol Sci* 2011, 12:4206-4212. doi: 10.3390/ijms12074206.

Gulcan E, Gulcan A, Toker S, Cosar E. Are there any effects of angiotensin II receptor blockers on postmenopausal osteoporosis? *Med. Hypotheses* 2008, 70(3):701-702. doi:10.1016/j.mehy.2007.07.011.



Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol* 1992, 152:5-10. doi:10.1677/joe.0.1520005.

Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res*. 2001, 16:1575-1582. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.9.1575.

Heaney RP. Remodeling and skeletal fragility. *Osteoporos Int* 2003, 14 (suppl 5): S12–S15. doi: 10.1007/s00198-003-1466-4.

Hegde SM, Solomon SD. Influence of Physical Activity on Hypertension and Cardiac Structure and Function. *Curr Hypertens Rep*. 2015, 17(10):77. doi:10.1007/s11906-015-0588-3.

Helge EW, Kanstrup IL. Bone density in female gymnasts: impact of muscle strength and sex hormones. *Med Sci Sports Exerc* 2002, 34:174-80. doi: 10.1097/00005768-200201000-00026.

Henderson NK, White CP, Eisman JA. The roles of exercise and fall risk reduction in the prevention of osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1998, 27(2):369-387. doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70010-4.

Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* 2013, 8:136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.

Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H. Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997, 230:176-178. doi:10.1006/bbrc.1996.5914.

Hita-Contreras F, Martínez-Amat A, Cruz-Díaz D, Pérez-López FR. Osteosarcopenic obesity and fall prevention strategies. *Maturitas* 2015, 80:126-132. doi:10.1016/j.maturitas.2014.11.009.

Hoegh-Andersen P, Tanko LB, Andersen TL, Lundberg CV, Mo JA, Heegaard AM, Delaisse JM, Christgau S. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthr Res Ther*. 2004, 6:R169–R180. doi:10.1186/ar1152.

Hsu JT, Chen YJ, Ho JT, Huang HL, Wang SP, Cheng FC, Wu J, Tsai MT. A Comparison of Micro-CT and Dental CT in Assessing Cortical Bone Morphology and Trabecular Bone Microarchitecture. *PLOS ONE* 2014,9(9):e107545 doi: 10.1371/journal.pone.0107545.

Hughes VA, Frontera WR, Wood M, Evans WJ, Dallal GE, Roubenoff R, Fiatarone Singh MA. Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle

mass, physical activity, and health. *Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 2001, 56:B209–B217. doi:10.1093/gerona/56.5.B209.

Hulley SB, Bittner V, Furberg C, Grady D, Herrington D, Vittinghoff E, Wenger N. Hormone treatment misconceptions and agreements. *Eur Heart J.* 2002, 23(1):89-91. doi:10.1053/euhj.2001.2840.

Humphries B, Newton RU, Bronks R, Marshall S, McBride J, McBride TT, Häkkinen K, Kraemer WJ, Humphries N. Effect of exercise intensity on bone density, strength, and calcium *turnover* in older women. *Med Sci Sports Exerc* 2000, 32:1043-1050. doi: 10.1097/00005768-200006000-00002.

Hvarfner A, Bergstrom R, Morlin C, Wide L, Ljunghall S. Relationship between calcium metabolic indices and blood pressure in patients with essential hypertension as compared with a healthy population. *J Hypertens* 1987, 5(4):451-456.

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M, Yamaguchi I. Cardiac Hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* 2003, 26(10):829-837. doi:10.1291/hypres.26.829.

Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat, *Calcif Tissue Int.* 1985, 37(6):605-607. doi.org/10.1007/BF02554916.

Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, Inagami T, Ezura Y, Noda M. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. *J Biol Chem.* 2009, 284(8):4857-4864. doi:10.1074/jbc.M807610200. Epub 2008 Nov 11.

James PA, Oparil S, Carter BL, *et al.* 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA.* 2014, 311:507-520. doi: 10.1001/jama.2013.284427.

Jamsa T, Jalovaara P, Peng Z, Vaananen HK, Tuukkanen J. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone* 1998.23(2):155-161. doi:10.1016/s8756-3282(98)00076-3.

Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* 2005, 26: 743-774. doi: 10.1210/er.2004-0001.

Kado DM, Browner WS, Blackwell T, Gore R, Cummings SR. Rate of bone loss is associated with mortality in older women: a prospective study. *J Bone Miner Res.* 2000, 15(10):1974-1980. doi:10.1359/jbmr.2000.15.10.1974.

Kalpakcioglu BB, Morshed S, Engelke K, Genant HK. Advanced imaging of bone macrostructure and microstructure in bone fragility and fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2008, 90(Suppl. 1):68-78. doi.org/10.2106/JBJS.G.01506.

Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet* 2014, 2:819-829. doi:10.1016/S2213-8587(14)70034-8.

Kanis JA, Devogelaer JP, Gennari C. Practical guide for the use of bone mineral measurements in the assessment of treatment of osteoporosis: a position paper of the European foundation for osteoporosis and bone disease. The Scientific Advisory Board and the Board of National Societies. *Osteoporos Int.* 1996, 6(3):256-261.

Kang KY, Kang Y, Kim M, Kim Y, Yi H, Kim J, Jung HR, Park SH, Kim HY, Ju JH, Hong YS. The Effects of Antihypertensive Drugs on Bone Mineral Density in Ovariectomized Mice. *J Korean Med Sci* 2013, 28: 1139-1144. <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2013.28.8.1139>

Kerr D, Ackland T, Maslen B, Morton A, Prince R. Resistance training over 2 years increases bone mass in calcium-replete postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001, 16(1):175-181. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.1.175.

Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005, 120:437-447. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.027.

Kiuchi A, Shimegi S, Tanaka I, Izumo N, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M. Dose-response Effects of Exercise Intensity on Bone in Ovariectomized Rats. *International Journal of Sport and Health Science* 2006, 4:10-18. doi: 10.5432/ijshs.4.10.

Klintstrom E, Smedby O, Moreno R, Brismar TB. Trabecular bone structure parameters from 3D image processing of clinical multi-slice and cone-beam computed tomography data. *Skeletal Radiol.* 2014, 43(2):197-204. doi: 10.1007/s00256-013-1766-5.

Kudlacek S, Schneider B, Resch h, Freudenthaler O, Willvonseder R. Gender differences in fracture risk and bone mineral density. *Maturitas* 2000, 36:173–180. doi: 10.1016/s0378-5122(00)00149-3.

Kuo TR, Chen CH. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark Res* 2017, 5:18. doi: 10.1186/s40364-017-0097-4.

Kuroshima S, Kaku M, Ishimoto T, Sasaki M, Nakano T, Sawase T. A paradigm shift for bone quality in dentistry: A literature review. *J Prosthodont Res.* 2017, 61(4):353-362. doi: 10.1016/j.jpor.2017.05.006.

LaCroix AZ, Lee JS, Wu L, Cauley JA, Shlipak MG, Ott SM, Robbins J, Curb JD, Leboff M, Bauer DC, Jackson RD, Kooperberg CL, Cummings SR; Women's Health Initiative Observational. Cystatin-C, renal function, and incidence of hip fracture in postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc.* 2008, 56(8):1434-41. doi:10.1111/j.1532-5415.2008.01807.x.

Larco DO, Cruthirds DF, Weiser MJ, Handa RJ, Wu TJ. The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine.* 2012, 42:717–725. doi: 10.1007/s12020-012-9716-x.

Laurent MR, Jardí F, Dubois V, Schollaert D, Khalil R, Gielen E, Carmeliet G, Claessens F, Vanderschueren D. Androgens have antiresorptive effects on trabecular disuse osteopenia independent from muscle atrophy. *Bone* 2016, 93:33-42. doi: 10.1016/j.bone.2016.09.011.

Laurent S. Antihypertensive drugs. *Pharmacol Res.* 2017, 124:116-125. doi: 10.1016/j.phrs.2017.07.026.

Lazarenko OP, Rzonca SO, Hogue WR, Swain FL, Suva LJ, Lecka-Czernik B. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. *Endocrinology.* 2007, 148(6):2669-2680. doi:10.1210/en.2006-1587.

Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2002, 143(6):2376-2384. doi:10.1210/endo.143.6.8834.

Lee KC, Lanyon LE. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev.* 2004, 32(2):64-68.

Levin BE, Dunn-Meynell AA. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004, 286(4):R771-R778. doi:10.1152/ajpregu.00650.2003.

Li YQ, Ji H, Shen Y, Ding LJ, Zhuang P, Yang YL, Huang QJ. Chronic treatment with angiotensin AT1 receptor antagonists reduced serum but not bone TGF-beta1 levels in ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009, 87(1):51-55. doi:10.1139/Y08-097.

Lorentzon M, Cummings SR. Osteoporosis: the evolution of a diagnosis. *J Intern Med* 2015, 277(06):650–661. doi:10.1111/joim.12369.

Ma L, Ji JL, Ji H, Yu X, Ding LJ, Liu K, Li YQ. Telmisartan alleviates rosiglitazone-induced bone loss in ovariectomized spontaneous hypertensive rats. *Bone* 2010, 47:5-11. doi:10.1016/j.bone.2010.03.016.

MacGregor GA, Cappuccio FP. The kidney and essential hypertension: a link to osteoporosis? *J Hypertens* 1993, 11:781-785. doi:10.1097/00004872-199308000-00003.

Maïmoun L, Lumbroso S, Manetta J, Paris F, Leroux JL, Sultan C. Testosterone is significantly reduced in endurance athletes without impact on bone mineral density. *Horm Res* 2003, 59(6):285-92. doi:10.1159/000070627.

Mann S, Jimenez A, Domone S, Beedie C. Comparative effects of three 48-week community-based physical activity and exercise interventions on aerobic capacity, total cholesterol and mean arterial blood pressure. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2016, 2(1):e000105. doi: 10.1136/bmjsem-2015-000105.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Rev.* 2000, 21(2):1132-1136. doi:10.1210/edrv.21.2.0395.

Masi L. Epidemiology of osteoporosis. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 2008, 5 (1):11-13. PMID: 22460840 PMCID: PMC2781190.

McCarron DA, Pingree PA, Rubin RJ, Gaucher SM, Molitch M, Krutzik S. Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to a urinary calcium leak. *Hypertension* 1980, 2(2):162-168. doi:10.1161/01.hyp.2.2.162

McNamara LM, Ederveen AG, Lyons CG, Price C, Schaffler MB, Weinans H, Prendergast PJ. Strength of cancellous bone trabecular tissue from normal, ovariectomized and drug-treated rats over the course of ageing. *Bone.* 2006, 39(2):392-400. doi: 10.1016/j.bone.2006.02.070.

Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M, Jick SS, Jick H, Meier CR. Use of thiazolidinediones and fracture risk. *Arch Intern Med.* 2008, 168(8):820-825. doi: 10.1001/archinte.168.8.820.

Michel MC, Foster C, Brunner HR, Liu L. A Systematic Comparison of the Properties of Clinically Used Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists. *Pharmacol Rev* 2013, 65:809–848. doi.org/10.1124/pr.112.007278.

Minisola S, Cipriani C, Occhiuto M, Pepe J. New anabolic therapies for osteoporosis. *Intern Emerg Med* 2017, 12(07):915–921. doi:10.1007/s11739-017-1719-4.

Mosti MP, Stunes AK, Ericsson M, Pullisaar H, Reseland JE, Shabestari M, Eriksen EF, Syversen U. Effects of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\delta$  agonist GW501516 on bone and muscle in ovariectomized rats. *Endocrinology* 2014, 155:2178–2189. doi:10.1210/en.2013-1166.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2016, 26; 133(4):e38-360. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.

Muller-Fielitz H, Hubel N, Mildner M, Vogt FM, Barkhausen J, Raasch W. Chronic blockade of angiotensin AT1 receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats. *Br J Pharmacol.* 2014, 171(3):746-760. doi:10.1111/bph.12510.

Muller R. Hierarchical microimaging of bone structure and function. *Nat Rev Rheumatol.* 2009, 5(7):373-381. doi: 10.1038/nrrheum.2009.107.

Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story. *Gerontology.* 2015;61(6):534-42. doi: 10.1159/000371845.

Nakagami H, Osako MK, Morishita R. Potential Effect of Angiotensin II Receptor Blockade in Adipose Tissue and Bone. *Current Pharmaceutical Desing,* 2013, 19:3049-3053. doi: 10.2174/1381612811319170011.

National Osteoporosis Foundation, available at: <https://www.nof.org/prevention/general-facts/>.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001, 344(19):1434-1441. doi:10.1056/NEJM200105103441904.

Nicks KM, Fujita K, Fraser D, McGregor U, Drake MT, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ, Monroe DG, Khosla S. Deletion of estrogen receptor beta in osteoprogenitor cells increases trabecular but not cortical bone mass in female mice. *J Bone Miner Res.* 2016, 31(3):606-14. doi: 10.1002/jbmr.2723.

Nicolas V, Prewett A, Bettica P, Mohan S, Finkelman RD, Baylink DJ, Farley JR. Age-related decreases in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, 78(5):1011-1016. doi:10.1210/jcem.78.5. 8175953.

Ninios I, Ninios V, Lazaridou F, Dimitriadis K, Kerasidou O, Louridas G. Gender-Specific Differences in Hypertension Prevalence, Treatment, Control, and Associated Conditions among the Elderly: Data from a Greek Population. *Clin. and Exp. Hyp.* 2008, 30:327-337. <https://doi.org/10.1080/10641960802269943>.

Nishimura T, Hashimoto J, Ohkubo T, Kikuya M, Metoki H, Asayama K, Totsune K, Imai Y. Efficacy and duration of action of the four selective angiotensin II subtype 1 receptor blockers, losartan, candesartan, valsartan and telmisartan, in patients with essential hypertension determined by home blood pressure measurements. *Clin Exp Hypertens* 2005, 27:477-489. doi: 10.1081/CEH-200067668.

No authors listed. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens Statement.* 2000, 17(1):1-45.

Nordsletten L, Kaastad TS, Madsen JE, Reikeras O, Ovstebo R, Stromme JH, Falch J. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. *Calcif Tissue Int.* 1994, 55(6):436-42.

Nomura S, Takano-Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol.* 2000, 19(2):91-96. doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00050-0

Ocarino NM, Serakides R. Effect of the physical activity on normal bone and on the osteoporosis prevention and treatment. *Rev Bras Med Esporte* 2006, 12(3):149-153.

Ott SM, LaCroix AZ, Scholes D, Ichikawa LE, Wu K. Effects of three years of low-dose thiazides on mineral metabolism in healthy elderly persons. *Osteoporos Int* 2008, 19: 1315-1322. doi: 10.1007/s00198-008-0612-4.

Paniagua JG, Diaz-Curiel M, Gordo CP, Reparaz CC, Garcia MT. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry, *Br. J. Radiol.* 1998, 71(847):754-758. <https://doi.org/10.1259/bjr.71.847.9771386>.

Patullo IM, Takayama L, Patullo RF, Jorgetti V, Pereira RM. Influence of ovariectomy and masticatory hypofunction on mandibular bone remodeling, *Oral Dis.* 2009, 15(8):580-586. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01599.x>.

Pershad Singh HA, Heneka MT, Saini R, Amin NM, Broeske DJ, Feinstein DL. Effect of pioglitazone treatment in a patient with secondary multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2004, 1(1):3. doi:10.1186/1742-2094-1-3.

Pescatello LS, Blanchard BE, Tsongalis GJ, O'Connell AA, Gordish-Dressman H, Maresh CM, Thompson PD. A comparison of the genetic and clinical profile of men that respond and do not respond to the immediate antihypertensive effects of aerobic exercise. *Appl Clin Genet.* 2008,1:7-17. doi:10.2147/tacg.s3813.

Pigozzi F, Rizzo M, Giombini A, Parisi A, Fagnani F, Borriero P. Bone mineral density and sport: effect of physical activity. *J Sports Med Phys Fitness* 2009, 49 (2):177-183.

Pisani P, Renna MD, Conversano F, Casciaro E, Muratore M, Quarta E, Paola MD, Casciaro S. Screening and early diagnosis of osteoporosis through X-ray and ultrasound based techniques. *World J Radiol.* 2013, 5(11):398-410. doi:10.4329/wjr.v5.i11.398.

Qaseem A, Forciea MA, McLean RM, Denberg TD. Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures in men and women: a clinical practice guideline update from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2017, 166(11): 818–839. doi:10.7326/M15-1361.

Rajkumar C, Kingwell BA, Cameron JD, Waddell T, Mehra R, Christophidis N, Komesaroff PA, McGrath BM, Jennings GL, Sudhir K, Dart AM. Hormonal therapy increases arterial compliance in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol.* 1997, 30:350-356. doi.org/10.1016/S0735-1097(97)00191-5.

Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Reduced fracture risk in users of thiazide diuretics. *Calcif Tissue Int.* 2005, 76(3):167-175. doi:10.1007/s00223-004-0084-2

Rejnmark L, Vestergaard P, Heickendorff L, Andreasen F, Mosekilde L. Loop diuretics increase bone turnover and decrease BMD in osteopenic postmenopausal women: results from a randomized controlled study with bumetanide. *J Bone Miner Res.* 2006, 21(1):163-170. doi:10.1359/JBMR.051003

Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998, 20(2):92-102. doi:10.1016/S1350-4533(98)00007-1.

Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 2000, 106(10):1203-1204.

Roberts L. 9 Billion? *Science* 2011, 333:540-543. doi:10.1126/science.333. 6042.540.

Rocabado JMR, Kaku M, Nozaki K, Ida T, Kitami M, Aoyagi Y, Uoshima K. A multi-factorial analysis of bone morphology and fracture strength of rat femur in response to ovariectomy. *J Orthop Surg Res* 2018, 13:318. doi.org/10.1186/ s13018-018-1018-4.

Rossi NF, Chen H, Maliszewska-Scislo M. Paraventricular nucleus control of blood pressure in two-kidney, one-clip rats: effects of exercise training and resting blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013, 305(11):R1390-1400. doi: 10.1152/ajpregu.00546.2012.

Rzonca So, Suva Lj, Gaddy D, Montague Dc, Lecka-Czernik B. Bone Is a Target for the Antidiabetic Compound Rosiglitazone. *Endocrinology.* 2004, 145(1):401-406 doi:10.1210/en.2003-0746

Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clinical Science* 2012, 123:567–590. doi:10.1042/ CS20120078.

Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006, 367(9527):2010–2018. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68891-0.

Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2010, 334(1):99-105. doi: 10.1124/jpet.110.167643.

Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K, Kawano H, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metabolism* 2013, 18:749-758. doi:10.1016/j. cmet.2013.09.014.

Sato Y, Tando T, Morita M, Miyamoto K, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Matsumoto M, Nakamura M, Miyamoto T. Selective estrogen receptor modulators and the vitamin D analogue eldecalcitol block bone loss in male osteoporosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017, 482(4):1430-1436. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.053.

Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA* 2004, 292(11):1326-1332. doi:10.1001/jama.292.11.1326.

Schoofs MW, Van der Klift M, Hofman A, Laet CE, Herings RM, Stijnen T, Pols HA, Stricker BH. Thiazide diuretics and the risk for hip fracture. *Ann Intern Med* 2003, 139:476-82. doi: 10.7326/0003-4819-139-6-200309160-00010.

Schuchard J, Winkler M, Stölting I, Schuster F, Vogt FM, Barkhausen J, Thorns C, Santos RA, Bader M, Raasch W. Lack of weight gain after angiotensin AT1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway. *Br J Pharmacol.* 2015, 172(15):3764-3778. doi: 10.1111/bph.13172. Epub 2015 Jun 12.



Seeman E. The structural basis of bone fragility in men. *Bone* 1999, 25(1):143–147. doi: 10.1016/s8756-3282(99)00117-9.

Semlitsch T, Jeitler K, Hemkens LG, Horvath K, Nagele E, Schuermann C, Pignitter N, Herrmann KH, Waffenschmidt S, Siebenhofer A. Increasing Physical Activity for the Treatment of Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* 2013; 43(10):1009-1023. doi:10.1007/s40279-013-0065-6.

Shang P, Liu T, Liu W, Li Y, Dou F, Zhang Y, Sun L, Zhang T, Zhu Z, Mu F, Ding Y, Wen A. Telmisartan improves vascular remodeling through ameliorating prooxidant and profibrotic mechanisms in hypertension via the involvement of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Mol Med Rep.* 2017, 16(4): 4537-4544. doi: 10.3892/mmr. 2017.7177.

Sharpe M, Jarvis B, Goa KL. Telmisartan: a review of its use in hypertension. *Drugs.* 2001, 61(10):1501-1529. doi:10.2165/00003495-200161100-00009.

Shenoy V, Grobe JL, Qi Y, Ferreira AJ, Fraga-Silva RA, Collamat G, *et al.* 17 beta-Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides.* 2009, 30:2309-2315. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.005.

Shimabukuro M, Tanaka H, Shimabukuro T. Effects of telmisartan on fat distribution in individuals with the metabolic syndrome. *J Hypertens.* 2007, 25(4):841-848. doi:10.1097/HJH.0b013e3280287a83.

Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, Tomita T, Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts by activating osteoclasts. *FASEB J* 2008, 22(7):2465-2475. doi:10.1096/fj.07-098954.

Siegrist M. Role of physical activity in the prevention of osteoporosis. *Med Monatsschr Pharm* 2008, 31(7):259-264.

Snow CM, Shaw JM, Winters KM, Witzke KA. Long-term exercise using weighted vests prevents hip bone loss in postmenopausal women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000, 55(9):M489-M491. doi:10.1093/gerona/55.9.m489.

Solomon DH, Mogun H, Garneau K, Fischer MA. Risk of fractures in older adults using antihypertensive medications. *J Bone Miner Res* 2011, 26: 1561-1567. doi: 10.1002/jbmr.356.

Sottile V, Seuwen K, Kneissel M. Enhanced marrow adipogenesis and bone resorption in estrogen-deprived rats treated with the PPARgamma agonist BRL49653 (rosiglitazone), *Calcif. Tissue Int.* 2004, 75(4):329-337. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-0224-8>.

Staessen JA, Ginocchio G, Thijs L, Fagard R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens.* 1997, 11:507-514. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1000476>.

Strazzullo P, Nunziata V, Cirillo M, *et al.* Abnormalities of calcium metabolism in essential hypertension. *Clin Sci* 1983, 65(2):137-141. doi:10.1042/cs0650137

Strazzullo P. The renal calcium leak in primary hypertension: pathophysiological aspects and clinical implications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1991, 1:98-103.

Stunes AK, Westbroek I, Gustafsson BI, Fossmark R, Warsing JH, Eriksen EF, Petzold C, Reseland JE, Syversen U. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha agonist fenofibrate maintains bone mass, while the PPAR gamma agonist pioglitazone exaggerates bone loss, in ovariectomized rats, *BMC Endocr. Disord.* 2011, 11(11):1-13. doi:10.1186/1472-6823-11-11.

Sugimoto K, Qi NR, Kazdová L, Pravenec M, Ogihara T, Kurtz TW. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension.* 2006, 47(5):1003-1009. doi: 10.1161/01.HYP.0000215181.60228.f7.

Tae-Woong O, Soon-Gill L, Mitsuru H. Resistance Running Exercise Effectively Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Sport Science Research* 2006, 3:8-17.

Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Nicholson GC, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. Induction of calcitonin receptors by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. *Endocrinology* 1988, 123:1504-1510. doi:10.1210/endo-123-3-1504.

Thivel D, Saunders TJ, Chaput JP. Physical activity in children and youth may have greater impact on energy intake than energy expenditure. *J Nutr Educ Behav.* 2013, 45(1):e1. doi: 10.1016/j.jneb.2012.08.004.

Tomiyaama H, Yamada J, Koji Y, Shiina K, Yoshida M, Yamashina A. Effect of Telmisartan on Forearm Postischemic Hyperemia and Serum Asymmetric Dimethylarginine Levels. *AJH* 2007, 20:1305–1311. doi:10.1016/j.amjhyper.2007.07.013.

Treback H, Zdunek A. Three-point bending and acoustic emission study of adult rat femora after immobilization and free remobilization, *J. Biomech.* 2006, 39(2):237-245. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.10.040>.

Tomiyaama H, Yamada J, Koji Y, Shiina K, Yoshida M, Yamashina A. Effect of telmisartan on forearm postischemic hyperemia and serum asymmetric dimethylarginine levels. *Am J Hypertens* 2007, 20:1305-1311. doi:10.1016/j.amjhyper.2007.07.013.

Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 2008, 77:289-312. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.

Tuck ML. Angiotensin-receptor blocking agents and the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma system. *Curr Hypertens Rep.* 2005, 7(4):240-243. doi:10.1007/s11906-005-0019-y

Turner, C. H., Owan, I., Alvey, T., Hulman, J., and Hock, J. M. Recruitment and proliferative responses of osteoblasts after mechanical loading in vivo determined using sustained-release bromodeoxyuridine. *Bone* 1998, 22:463- 469. doi:10.1016/S8756-3282(98)00041-6.

Ushijima K, Liu Y, Maekava T, Ishikawa E, Motosugi Y, Ando H, Tsuruoka SI, Fujimura A. Protective effect of amlodipine against osteoporosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2010, 635(1-3):227-230. doi:10.1016/j.ejphar.2010.02.039.

Verhaeghe J, Thomsen JS, Vanbree R, Vanherck E, Bouillon R, Mosekilde L. Effects of Exercise and Disuse on Bone Remodeling, BoneMass, and Biomechanical Competence in SpontaneouslyDiabetic Female Rats. *Bone* 2000, 27(2):249–256 [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(00\)00308-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(00)00308-2)

Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients* 2016, 8(6):338. doi:10.3390/nu8060338.

Waldman BM, Augustyniak RA, Chen H, Rossi NF. Effects of voluntary exercise on blood pressure, angiotensin II, aldosterone, and renal function in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Integr Blood Press Control.* 2017,10: 41-51. doi:10.2147/IBPC.S147122.

Wan Y. PPAR $\gamma$  in bone homeostasis, *Trends Endocrinol. Metab.* 2010, 21(12):722-728. doi:10.1016/j.tem.2010.08.006.

Wenger NK. Hypertension and other cardiovascular risk factors in women. *Am J Hypertens.* 1995, 8(12 Pt 2):94-99. doi.org/10.1016/0895-7061(95)99306-1.

White WB. Comparative Effects of Telmisartan in the Treatment of Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension* 2002, 4(4):20-25.

Wiens M, Etmnan M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med.* 2006, 260(4):350-362. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01695.x.

Wing RR, Hill JO. Successful weight loss maintenance. *Annu Rev Nutr*, 2001. 21:323-341. doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.323.

Wu H, Li L, Ma Y, Chen Y, Zhao J, Lu Y, Shen P. Regulation of selective PPAR $\gamma$  modulators in the differentiation of osteoclasts. *J. Cell. Biochem.* 2013, 114:1969-1977. doi.org/10.1002/jcb.24534.

Wu X, Pang L, Lei W, Lu W, Li J, Li Z, Frassica FJ, Chen X, Wan M, Cao X. Inhibition of Sca-1 positive skeletal stem cell recruitment by alendronate blunts the anabolic effects of parathyroid hormone on bone remodeling. *Cell Stem Cell.* 2010, (5):571-80. doi: 10.1016/j.stem.2010.09.012.

Yang S, Nguyen ND, Center JR, Eisman JA, Nguyen TV. Association between beta-blocker use and fracture risk: the dubbo osteoporosis epidemiology study. *Bone* 2011, 48:451-455. doi: 10.1016/j.bone.2010.10.170.

Yoon SS, Gu Q, Nwankwo T, Wright JD, Hong Y, Burt V. Trends in blood pressure among adults with hypertension: United States, 2003 to 2012. *Hypertension* 2015, 65:54-61. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04012.

Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001, 34(4 Pt 1):745-750. doi:10.1053/jhep.2001.28231

Young EW, Morris CD, McCarron DA. Urinary calcium excretion in essential hypertension. *J Lab Clin Med* 1992,120(4):624-632.

Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1068:173-179. doi: 10.1196/annals.1346.019.

Zhang N, Bi S. Effects of physical exercise on food intake and body weight: Role of dorsomedial hypothalamic signaling. *Physiology & Behavior* 2018, 192:59-63. doi:10.1016/j.physbeh.2018.03.018

Zeina L, Larsson E, Fellström B. Candesartan cilexetil reduces graft arteriosclerosis in aortic transplantation model in rat. *Transpl Immunol*. 2001, 8(4):245-251. doi.org/10.1016/S0966-3274(01)00028-4.

Zhang YF, Qin L, Kwok TC, Yeung BH, Li G, Liu F. Effect of angiotensin II type I receptor blocker losartan on bone deterioration in orchietomized male hypertensive and normotensive rats. *Chin. Med. J.* 2013, 126(14):2661-2665, doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20121244.

Zhao J, Yang H, Chen B, Zhang R. The skeletal renin-angiotensin system: A potential therapeutic target for the treatment of osteoarticular diseases. *Internat. Immunopharmacology* 2019, 72:258-263. doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.023.

Zheng Z, Lin S, Shi H. A systematic review and meta-analysis of telmisartan vs valsartan in the management of essential hypertension. *J Clin Hypertens* 2010, 12:414-421. doi: 10.1111/j.1751-7176.2010.00287.x.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Métodos para avaliação óssea

O osso é considerado um material poroso que possui características elásticas e que apresenta ainda marcantes propriedades de rigidez e tenacidade. Neste sentido o osso ao receber uma carga, como por exemplo, de tração ou de compressão, responde se deformando e retornando ao seu estado inicial. Uma vez cessada a referida força (característica elástica), sua deformação é dada pela intensidade da carga aplicada a ele e sua habilidade de ceder. A rigidez representa a dureza deste material e que deve ser vencida para haver deformação e a tenacidade é a capacidade do material de absorver a carga sem haver fratura.

Está bem estabelecido que a arquitetura óssea varia de acordo com a região corporal, sendo esponjoso em determinadas áreas ou compacto em outras. O primeiro é especialmente responsável pelo rápido *turnover* ósseo e pela regulação da homeostasia mineral sistêmica, enquanto o segundo é responsável pelo arcabouço corporal (RHO *et al*, 1998).

Suas trabéculas, predominantes nas extremidades dos ossos longos, protegidas por uma camada de osso cortical, possuem microestrutura porosa que varia em termos de forma entre bastonetes e placas. A compreensão das propriedades mecânicas do osso trabecular por meio de técnicas de monitoramento da qualidade óssea permite acompanhar e prognosticar doenças como a osteoporose.

Rotineiramente a conduta clínica utilizada com maior frequência é um método de monitoramento da qualidade óssea que utiliza raios X de baixa densidade (densitometria de dupla energia de raios X ou DEXA – Dual Energy X-Ray Absorptometry)

o qual determina a densidade mineral óssea em uma determinada área ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) (PISANI *et al*, 2013; ROCABADO *et al*, 2018). A fácil disponibilidade desta técnica e boa reprodução dos resultados, sua precisão e exatidão, sua segurança e a facilidade de execução, tornaram a DEXA o exame mais utilizado para avaliar a massa ou quantidade de osso, sendo fundamental para o diagnóstico da osteoporose e avaliação de risco de fraturas, além, de possibilitar o acompanhamento do efeito de medicamentos com propriedades anti osteoporóticas (BLAKE & FOGELMAN, 1997; KANIS *et al*, 1996). A DMO foi relacionada à resistência mecânica do osso trabecular e dá uma ideia razoável de suas propriedades mecânicas, ainda que não consiga determinar todas as características ósseas microestruturais, uma vez que responde por aproximadamente 40% da variação na força de resistência e assim da fragilidade óssea (AMMANN & RIZZOLI, 2003). Outros determinantes importantes das propriedades ósseas que contribuem para o risco de fratura, além da DMO, são a massa e a qualidade óssea (NIH, 2000). Uma vez que os ossos de uma perspectiva mecânica são compostos de diferentes níveis hierárquicos, a saber, a geometria óssea, as propriedades microestruturais e as propriedades intrínsecas dos materiais (MULLER, 2009), deve-se utilizar um método diagnóstico capaz de avaliar tais características e que permita uma maior assertividade sobre o grau de fraqueza óssea, além da DEXA.

Outra técnica bastante utilizada, que é capaz de analisar a qualidade do tecido ósseo, e que permite o diagnóstico das alterações morfológicas ultraestruturais do osso, é a microtomografia computadorizada (MicroCT – método não invasivo, rápido e de alta precisão). Em resumo, nesta técnica são adquiridas imagens tridimensionais de um dado objeto (material) que permitem analisar sua microestrutura de modo qualitativo e quantitativo.

Aspectos da qualidade óssea que caracterizam a estrutura e composição deste tecido incluem *turnover* ósseo, parâmetros da sua microarquitetura, o grau de distribuição de mineralização, a extensão dos microdanos e a composição da matriz óssea e mineral (COLE & VAN DER MEULEN, 2011; FONSECA *et al*, 2014; KUROSHIMA *et al*, 2017). A avaliação por MicroCT apresenta resultados altamente correlacionados com os exames histomorfométricos em termos de volumes ósseos avaliados e características trabeculares, tais como, número, espessura e separação, além de parâmetros como conectividade e porosidade das mesmas (KLINTSTROM *et al*, 2013; HSU *et al*, 2014). A maior reabsorção óssea trabecular observada em desordens ósseas osteoporóticas, e caracterizada pela alteração nestes parâmetros pode comprometer a força óssea, e assim aumentar o risco de fraturas (COLE & VAN DER MEULEN, 2011). Essas alterações associadas à reabsorção óssea foram grandemente indetectáveis por avaliação por DEXA (FONSECA *et al*, 2014; FARR & KHOSLA, 2016). Tomados em conjunto os métodos de diagnóstico por DEXA e por MicroCT são considerados ferramentas diagnósticas “padrão ouro” em relação ao tecido ósseo. Além das análises por DEXA e por MicroCT, para avaliação da força de resistência óssea e, portanto, para a percepção do risco de fratura osteoporótica, a análise biomecânica pelo teste de flexão de três pontos tem sido utilizada há tempos como ensaio experimental em ossos de roedores (JAMSA *et al*, 1998). Os parâmetros obtidos neste ensaio mecânico (força de ruptura/fratura, rigidez, resiliência e tenacidade, dentre outros) são indicadores positivos da força mecânica do osso cortical.

## 8.2. Artigos publicados derivados dos estudos ao longo do doutorado



### Telmisartan use in rats with preexisting osteoporotic bone disorders increases bone microarchitecture alterations via PPAR $\gamma$



Antonio Marcos Birocale<sup>a</sup>, Antonio Ferreira de Melo Jr.<sup>b</sup>, Pollyana Peixoto<sup>b</sup>, Phablo Wendell Costalonga Oliveira<sup>b</sup>, Leandro Dias Gonçalves Ruffoni<sup>c</sup>, Lilliam Masako Takayama<sup>d</sup>, Breno Valentim Nogueira<sup>e</sup>, Keiko Okino Nonaka<sup>c</sup>, Rosa Maria Rodrigues Pereira<sup>d</sup>, José Martins de Oliveira Jr.<sup>f</sup>, Nazaré Souza Bissoli<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Health Integrated Education, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>b</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup> Department of Medical Clinic, Medicine College, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>e</sup> Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>f</sup> Laboratory of Applied Nuclear Physics, University of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil

#### ABSTRACT

**Aims:** Telmisartan (TEL), an angiotensin II type I receptor blocker and PPAR $\gamma$  partial agonist, has been used for to treat hypertension. It is known that PPAR $\gamma$  activation induces bone loss. Therefore, we evaluate the effects of telmisartan on PPAR $\gamma$  protein expression, biomechanics, density and bone microarchitecture of femurs and lumbar vertebrae in SHR ovariectomized animals, a model of hypertension in which preexisting bone impairment has been demonstrated.

**Main methods:** SHR females (3 months old) were distributed into four groups: sham (S), sham + TEL (ST), OVX (C) and OVX + TEL (CT). TEL (5 mg/kg/day) or vehicle were administered according to the groups. After the protocol, blood pressure was measured and density, microarchitecture and biomechanics of bone were analyzed. Western blotting analysis was performed to evaluate PPAR $\gamma$  protein expression in the bones.

**Key findings:** Castration induced a deleterious effect on mineral density and trabecular parameters, with telmisartan enhancing such effects. Telmisartan increased PPAR $\gamma$  levels, which were at their highest when the treatment was combined with castration. As to biomechanical properties, telmisartan reduced the stiffness in the castration group (CT vs. S or C group), as well as resilience and failure load in ST group (vs. all others groups).

**Significance:** These results demonstrated that telmisartan compromised bone density and microarchitecture in animals that shows preexisting osteoporotic bone disorders, probably via mechanisms associated with increased PPAR $\gamma$ . If this translates to humans, a need for greater caution in the use of telmisartan by patients that have preexisting bone problems, as in the postmenopausal period, may be in order.





Contents lists available at ScienceDirect

## Pharmacological Reports

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pharep](http://www.elsevier.com/locate/pharep)



Short communication

### Bone mineral density is reduced by telmisartan in male spontaneously hypertensive rats



Antonio Marcos Birocale<sup>a,\*</sup>, Ana Raquel Santos Medeiros<sup>b</sup>,  
Leandro Dias Gonçalves Ruffoni<sup>c</sup>, Liliam Takayama<sup>d</sup>, José Martins de Oliveira Jr.<sup>e</sup>,  
Keico Okino Nonaka<sup>c</sup>, Rosa Maria Rodrigues Pereira<sup>d</sup>, Nazaré Souza Bissoli<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Department of Health Integrated Education, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

<sup>b</sup> Biological and Health Sciences, Federal Institute of Espírito Santo, Vitória, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

<sup>d</sup> Department of Medical Clinic, Medicine College, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Applied Nuclear Physics, University of Sorocaba, Sorocaba, Brazil

<sup>f</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

#### ABSTRACT

**Background:** Telmisartan, an angiotensin AT1 receptor blocker, and treadmill running were compared for their effects on bone mineral density (BMD) and biomechanical properties of male spontaneously hypertensive rats (SHR). It was hypothesized that running (18 m/min/60 min/d) and telmisartan (5 mg/kg/d) would have a positive effect on bone parameters.

**Methods:** Three-month-old male SHRs were divided into three groups: sedentary (S), telmisartan (T), and exercise (E). At the end of an 8-week protocol, femur and lumbar vertebrae were analyzed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) for bone mineral density and by the three-point bending test for biomechanical properties. Blood pressure in all groups was measured by a tail-cuff manometer.

**Results:** Telmisartan and treadmill running reduced blood pressure when compared to the sedentary group; however, telmisartan did not improve bone characteristics. Instead, it reduced BMD of femur total and lumbar vertebrae and worsened bone biomechanical properties. Treadmill running maintained bone characteristics and hence was effective in maintaining bone health.

**Conclusion:** Results showed that telmisartan negatively affected bones suggesting that caution should be taken in possible therapeutic applications for protecting bone health in hypertensive conditions. More studies are necessary to clarify the mechanisms through which telmisartan favors bone loss in this model.

© 2016 Published by Elsevier Sp. z o.o. on behalf of Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences.