

**GILTON DE JESUS GOMES**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E  
MECÂNICAS DO FÊMUR DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL E SOB  
INSULINOTERAPIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Educação  
Física, para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

T

G633e  
2013

Gomes, Gilton de Jesus, 1978-

Efeitos do exercício físico sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com diabetes experimental e sob insulino-terapia / Gilton de Jesus Gomes. - Viçosa, MG, 2013.

xv, 90 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Antônio José Natali.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 72-90.

1. Exercícios físicos. 2. Diabetes. 3. Fêmur - Análise. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. II. Título.

CDD 22.ed. 613.7

**GILTON DE JESUS GOMES**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E  
MECÂNICAS DO FÊMUR DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL E SOB  
INSULINOTERAPIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 12 de Julho de 2013.

---

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo  
(Coorientador)

---

Prof. Thales Nicolal Prímol Gomes  
(Coorientador)

---

Prof. Flávio de Castro Magalhães

---

Prof. Antônio José Natali  
(Orientador)

A Deus por iluminar sempre o meu caminho.

Aos meus pais, pelo amor, educação,  
caráter, princípios e exemplo de vida.

À minha esposa, por embarcar nesta caminhada,  
pelo amor e dedicação à nossa família;  
possibilitando esta conquista.

Ao meu filho, pelo carinho, pelo amor,  
pela força que vem de você, FILHÃO.

Aos meus irmãos, pelo amor, amizade, força e apoio constante.

***“O futuro tem muitos nomes.  
Para os fracos, é o inatingível.  
Para os temerosos, o desconhecido.  
Para os valentes, a oportunidade.”***

***(Victor Hugo)***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que está sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho.

Aos meus pais, Geraldo e Maria, exemplo de força, coragem e perseverança, pelo amor incondicional.

À minha esposa Rafaele e ao meu filho Giovane, por estarem sempre ao meu lado, pelo amor, carinho, paciência, amizade, companheirismo e por sempre me darem força.

Aos meus irmãos Geraldo, Gessiane e Antônio Conrado, pela nossa amizade e por me apoiarem sempre.

Ao professor e orientador Antônio José Natali, pela oportunidade, pela confiança, pelos grandes ensinamentos, pelo exemplo de serenidade, ética e competência.

Ao professor Ricardo Junqueira Del Carlo, por ter me recebido como orientando, pelos ensinamentos, competência, pelo grande apoio para as análises e sua grande presteza.

Ao professor Thales Nicolau Prímola Gomes, pela ajuda para aquisição da bolsa de mestrado, pela atenção e ensinamentos no BIOEX.

Ao professor Mário Jefferson Quirino Louzada, por disponibilizar seu laboratório, “seus orientandos” e sua boa vontade para as análises.

Ao professor Flávio Castro de Magalhães, por aceitar participar da banca de defesa de dissertação.

Aos amigos Márcia Silva (Marcinha) e Edson Silva, companheiros desta conquista, pela confiança, dedicação, convivência, aprendizados e a amizade construída.

À Médica veterinária, Daise Nunes Queiroz da Cunha, pelos procedimentos, acompanhamento e ensinamentos, durante todo o experimento.

Ao grande amigo Miguel Araújo Carneiro Junior, pela sua amizade, ensinamentos, constantes ajudas, pela força e incentivo para essa conquista.

Ao amigo Rodrigo de Oliveira Simões, pela acolhida à minha família em Viçosa, pela sua amizade, pela força e incentivo para essa conquista.

À Aurora Rodrigues, pela grande atenção e ajuda prestada nas análises.

As amigas Bárbara Braga Fernandes e Karina Ana da Silva, pelo início do trabalho e a atenção dispensada durante o mestrado.

Ao amigo Helton Campos, pela amizade e convívio nestes dois anos de mestrado.

Aos amigos Márcio, Miguel e Isac pelos meses de estadia, apoio e “desestresse”.

Aos amigos do BIOEX, Filipe Rios, Felipe Belfort, Regiane Ramos, Anselmo Gomes, Aurora Rodrigues, Lucas Rios, Victor Neiva e Matheus Freitas, pelos momentos de trabalho, pela convivência e amizade.

Aos amigos do voleibol UFV pela amizade e o voleibol para liberar dos momentos tensos.

Aos funcionários do departamento de Educação Física: Rita, José Francisco, Maysa, e ao Jackson funcionário do biotério pela atenção e auxílio.

A todos os meus familiares pelas manifestações de carinho e apoio.

Aos amigos de Diamantina, Maurício e Walter, sempre dispostos a ajudar e torcendo por mim.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo conhecimento adquirido.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esta conquista se realizasse.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo Geral.....	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
3.1 DIABETES <i>MELLITUS</i> .....	6
3.1.1 MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL.....	7
3.2 INSULINA E DIABETES <i>MELLITUS</i> .....	8
3.3 TECIDO ÓSSEO.....	9
3.3.1 MODELAMENTO E REMODELAMENTO.....	11
3.3.2 BIOMECÂNICA DO OSSO.....	14
3.4 DIABETES <i>MELLITUS</i> E <i>TECIDO ÓSSEO</i> .....	15
3.5 DIABETES <i>MELLITUS</i> E EXERCÍCIO.....	19
3.6 TECIDO ÓSSEO E EXERCÍCIO.....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS.....	25
4.2 INDUÇÃO DE DIABETES.....	25
4.3 PROGRAMA DE TREINAMENTO EM NATAÇÃO E INSULINOTERAPIA .....	26
4.4 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DE REPOUSO.....	27
4.5 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS.....	28
4.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO E DENSIDADE MINERAL ÓSSEA.....	28

4.7 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO OSSO.....	28
4.8 MORFOMETRIA ÓSSEA.....	30
4.8.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	30
4.8.2 ANÁLISE DO VOLUME TRABECULAR ÓSSEO NO COLO DO FÊMUR.....	31
4.8.3 ANÁLISE DA ESPESSURA CORTICAL NA DIÁFISE DO FÊMUR.....	31
4.8.4 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE COLÁGENO TOTAL, TIPO I E III.....	31
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
5.1 PESO CORPORAL E GLICEMIA.....	33
5.2 FREQUÊNCIA CARDÍACA DE REPOUSO.....	37
5.3 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DO FÊMUR.....	39
5.3.1 PESO E COMPRIMENTO.....	39
5.3.2 ÁREA, CONTEÚDO MINERAL E DENSIDADE MINERAL.....	42
5.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS DO FÊMUR.....	46
5.4.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS DO COLO DO FÊMUR.....	46
5.4.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS DA DIÁFISE DO FÊMUR.....	50
5.4.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS DO COLO E DA DIÁFISE DO FÊMUR RELATIVAS AO PESO CORPORAL.....	54
5.5 HISTOMORFOMETRIA DO FÊMUR.....	60
5.5.1 VOLUME ÓSSEO.....	60
5.5.2 ESPESSURA DA DIÁFISE DO FÊMUR.....	63
5.5.3 CONTEÚDO DE COLÁGENO.....	66
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\mu\text{m}$  - micrômetro
- A1C – hemoglobina glicada
- ADA – Associação Americana de Diabetes
- AGEs – produto de glicação final
- Akt – proteína quinase B
- ALK-Phos – fosfatase alcalina óssea
- AMP – adenosina monofosfato
- AMPK - proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
- ANOVA – análise de variância
- BMP – proteína morfogenética óssea
- BMU – unidades multinucleares básicas
- Cbfa-1 – fator  $\alpha$  um do núcleo de ligação
- CE – controle exercitado
- cm – centímetros
- $\text{cm}^2$  – centímetros quadrados
- CMO – conteúdo mineral ósseo
- CS – controle sedentário
- DE – diabético exercitado
- DEI – diabético exercitado insulina
- DM – diabetes *mellitus*
- DMT 1 – diabetes *mellitus* tipo 1
- DMT 2 - diabetes *mellitus* tipo 2
- DMO – densidade mineral óssea
- DS – diabético sedentário
- DSI – diabético sedentário insulina
- DXA – densitometria óssea
- ECG – eletrocardiograma
- Ets – fator de transcrição familiar
- FCR – frequência cardíaca de repouso
- Fmáx – força máxima
- PI3K - fosfatidilinositol três quinase

g – gramas  
g/cm<sup>2</sup> – gramas por centímetro quadrado  
GH – hormônio do crescimento  
GLUT 4 – transportador de glicose tipo quatro  
HCL – ácido clorídrico  
HE - hematoxilina e eosina  
IDF – Federação Internacional de Diabetes  
IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina um  
IGF1R - receptor de fator de crescimento semelhante à insulina um  
IL1 – interleucina um  
IL2 – interleucina dois  
IL6 – interleucina seis  
IR – receptor de insulina  
IRS – substrato receptores de insulina  
m/min – metros por minuto  
M-CSF – fator estimulador de colônia de macrófagos  
Média ± EPM – média mais ou menos erro padrão da média  
mg/kg – miligrama por quilo  
mJ – mili joule  
mL – mililitro  
mm - milímetro  
MP – mega pascoal  
N – Newton  
NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
N/g – newton por grama  
NPH – *neutral protamine Hagedon*  
°C – (graus Celsius)  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
ON – oxido nítrico  
OPG – osteoprotegerina  
PE – pentosidina  
pH – potencial hidrogeniônico  
PTH – paratormônio

PTHrP – peptídeo liberador de paratormônio da paratireóide

PTN – programa de treinamento em natação

RANK – receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\beta$

RANKL – ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\beta$

ROS – espécies reativas de oxigênio

rpm – rotações por minuto

Runx-2 – fator dois de domínio runt

s - segundos

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

STZ – estreptozotocina

TGF- $\beta$  – fator de crescimento  $\beta$

TN – treinamento em natação

TNF $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

UFV – Universidade Federal de Viçosa

VO – volume ósseo

vs – versus

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do processo de diferenciação dos osteoclastos (osteoclastogênese) por intervenção direta dos osteoblastos através do sistema RANKL/RANK/OPG (adaptado de Palma, 2009).....	13
Figura 2: Fotografia do ensaio mecânico de flexão em três pontos, em diáfise de fêmur de rato.....	29
Figura 3: Representação esquemática da curva da carga de deformação por deslocamento de um teste de três pontos para osso.....	29
Figura 4: Fotografia do ensaio mecânico de flexão no colo do fêmur de rato.....	30
Figura 5: Frequência Cardíaca de Repouso dos animais dos grupos experimentais no final do período experimental.....	37
Figura 6: Área (A); conteúdo mineral ósseo (CMO) (B); e densidade mineral óssea DMO (C) do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	43
Figura 7: Rigidez (A); Força máxima de fratura (B); e Tenacidade (C), no colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	48
Figura 8: Rigidez (A); Força máxima de fratura (B); e Tenacidade (C), na diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	52
Figura 9: Rigidez (A); Força máxima de fratura (B); e Tenacidade (C), relativos ao peso corporal, no colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	56
Figura 10: Rigidez (A); Força máxima de fratura (B); e Tenacidade (C), relativos ao peso corporal na diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	58
Figura 11: Fotomicrografias da região do colo do fêmur (A) e volume trabecular ósseo do colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais (B).....	61
Figura 12: Fotomicrografias da espessura cortical (A) e espessura cortical no terço médio da diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais (B).....	64
Figura 13: Fotomicrografias da região do colo do fêmur de animais dos grupos experimentais (Colágeno).....	66
Figura 14: Colágeno total (A); colágeno tipo I (B) e colágeno tipo III (C), do colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programa de Treinamento em Natação dos animais ao longo das 8 semanas e incremento de carga.....	27
Tabela 2. Peso corporal dos animais no início do experimento e após oito semanas do programa de treinamento em natação.....	33
Tabela 3. Glicemia de jejum dos animais no início do experimento, pós-indução do diabetes e no final do período experimental.....	33
Tabela 4. Peso e comprimento do fêmur direito dos ratos ao final das oito semanas do programa de treinamento em natação.....	39

## RESUMO

GOMES, Gilton de Jesus M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Efeitos do exercício físico sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com diabetes experimental e sob insulino terapia.** Orientador: Antônio José Natali. Coorientadores: Ricardo Junqueira Del Carlo, Thales Nicolau Prímola Gomes.

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento em natação (TN) de baixa intensidade combinado com a insulino terapia sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos em crescimento com diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) experimental induzido por streptozotocina (STZ). Foram utilizados 60 ratos Wistar com 30 dias de idade e massa corporal média de 90g no início do experimento. Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em seis grupos experimentais com 10 animais em cada: controle sedentário (CS); controle exercitado (CE); diabético sedentário (DS); diabético exercitado (DE); diabético sedentário tratado com insulina (DSI); diabético exercitado tratado com insulina (DEI). Os animais dos grupos DE, DS, DEI e DSI receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de massa corporal) de STZ, diluída em 1mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5). Sete dias após a aplicação de STZ e jejum de 12 horas, os animais que apresentaram glicemia de jejum superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos. Após sete dias de indução do diabetes, os animais dos grupos DE, DEI e CE foram submetidos ao TN (90 min/dia; 5 dias/semana; 5% peso corporal), por oito semanas. No mesmo período os animais dos grupos DSI e DEI receberam uma dose de insulina (1-4 UI). Após o período experimental os animais sofreram eutanásia, o fêmur direito foi dissecado para avaliação da densidade mineral óssea (DMO), do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da resistência óssea. O fêmur esquerdo foi dissecado para determinação da morfometria óssea. Os resultados mostraram que o DMT1 experimental reduziu o CMO e a DMO do fêmur. Na região do colo femoral o DMT1 reduziu a rigidez, a força de fratura, a tenacidade, o volume ósseo e a quantidade de colágeno total e tipo III. Na região da diáfise femoral houve redução da rigidez, da força de fratura, da tenacidade e da espessura cortical. A insulino terapia isoladamente amenizou os efeitos deletérios do DMT1 sobre o CMO e a DMO do fêmur; e atenuou a redução da força de fratura e da tenacidade, assim como reverteu a perda de volume ósseo e da quantidade de colágeno total no colo femoral. Na diáfise femoral, a insulino terapia amenizou a redução na rigidez, na força de fratura óssea, na tenacidade e na espessura cortical. O treinamento em natação isoladamente aumentou a DMO do fêmur e o volume

ósseo no colo femoral e a tenacidade na diáfise femoral dos animais controles (grupo CE), assim como a força de fratura e a tenacidade no colo femoral dos animais diabéticos não tratados com insulina (grupo DE). A combinação do TN com a insulinização aumentou o volume ósseo e a força de fratura no colo femoral dos animais diabéticos (grupo DEI). Concluiu-se que a combinação do treinamento em natação de baixa intensidade com a insulinização durante oito semanas é efetiva em atenuar os efeitos deletérios do DMT1 experimental induzido por STZ sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos em crescimento.

## ABSTRACT

GOMES, Gilton de Jesus, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013. **Effects of physical exercise on structural and mechanical properties of the femur in rats with experimental diabetes and under insulin therapy.** Adviser: Antônio José Natali. Co-Advisers: Ricardo Junqueira Del Carlo. Thales Nicolau Prímola Gomes.

The aim of this study was to investigate the effects of a low-intensity swimming training (ST) combined with insulin therapy on the femoral structural and mechanical properties in growing rats with experimental type 1 diabetes mellitus (T1DM) induced by streptozotocin (STZ). Sixty Wistar rats at 30 days of age and average body mass of 90g at the onset of the experiment were used. The animals were randomized into six groups of ten animals: sedentary control (CS), exercised control (CE), diabetic sedentary (DS) and diabetic exercised (DE), sedentary diabetic treated with insulin (DSI), insulin-treated diabetic exercised (DEI). The animals from DE, DS, DEI and DSI groups received an intraperitoneal injection (60 mg/kg body weight) of STZ diluted in 1 mL of sodium citrate buffer (0.1M, pH 4.5). Seven days after the STZ injection and 12 hours fasting animals showing blood glucose above 300 mg/dL were considered diabetic. Seven days after induction of diabetes, the animals in group DE, DEI and CE were subjected to swimming training (90 min/day; 5 days/week; 5% body weight) for eight weeks. For the same period animals from groups and DEI and DSI received a daily dose of human insulin (1-4 U/day). By the end of the experimental period, animals were euthanized and the right femur was dissected for assessment of bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and bone strength. The left femur was dissected for determination of bone morphometry. The results showed that the experimental T1DM reduced femoral BMC and BMD, femoral neck stiffness, breaking force, tenacity, bone volume, total collagen and type III collagen content. In the femoral midshaft T1DM reduced bone breaking force, stiffness and the cortical thickness. The insulin therapy itself attenuated the deleterious effects of T1DM on the femoral BMC and BMD; and mitigated the reductions of bone breaking force and tenacity as well as reversed the trabecular bone volume loss and the total collagen content in the femoral neck. In the femoral midshaft region insulin therapy attenuated the reductions in bone stiffness, breaking force, tenacity and cortical bone thickness. Swimming training itself increased the femoral BMD, the femoral neck trabecular bone volume, and the midshaft tenacity in control rats (CE group) as well as the femoral neck breaking force and tenacity in diabetic animals non treated with insulin (DE group). The

combination of ST with insulin therapy increased the femoral neck trabecular bone volume and breaking force in diabetic animals (DEI group). It was concluded that the combination of low-intensity swimming training with insulin therapy is effective in attenuating the deleterious effects of experimental T1DM induced by STZ on the femoral structural and mechanical properties in growing rats.

## 1- INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na produção e na ação da insulina, ou ambos (ADA, 2010; AIRES, 2012). O DM pode ser classificado segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) em quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DMT1), DM tipo 2 (DMT2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Ainda há duas categorias referidas como pré-diabetes, que são glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída (ADA, 2008; SBD, 2009).

O DMT1 tem como causa primária a destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. Caracteriza-se por hiperglicemia contínua ou intermitente que promove alterações teciduais, celulares e moleculares em diferentes sistemas orgânicos (FANG et al., 2004; AIRES, 2012). A hiperglicemia crônica advinda do DMT1 é devida à falta de insulina, - hormônio anabólico produzido pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta a ações de hormônios do sistema nervoso e alterações nos níveis plasmáticos de nutrientes, fundamentalmente a glicose (RAW, 2006; AIRES, 2012). O DMT2, denominada “resistência insulínica”, envolve uma regulação incorreta no metabolismo da glicose, caracterizada por resistência a ação da insulina e resposta compensatória inadequada da secreção de insulina (SBD, 2009; ADA, 2010; MAAHS et al., 2010).

O DM é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, afetando cerca de 360 milhões de pessoas. Estima-se que no ano de 2030, o número de indivíduos atingidos ultrapasse os 520 milhões, se não forem tomadas medidas preventivas urgentes (IDF, 2011). No Brasil, há aproximadamente 13,4 milhões de pessoas diabéticas com idade entre 20 e 79 anos (IDF, 2012). Em um estudo na cidade de Bauru, São Paulo, com o objetivo de avaliar a tendência em longo prazo (1986 a 2006) de DMT1, em crianças menores de 14 anos, verificou-se que houve aumento de 6,56 vezes, um padrão de incidência considerado alto (NEGRATO et al., 2010).

O termo “doença diabética óssea” é usado para descrever as alterações mais comuns causadas pelo DM no sistema ósseo (BILEZIKIAN et al., 2008). A hiperglicemia produz efeitos deletérios na formação óssea, pois a manutenção da glicemia elevada aumenta a função dos osteoclastos e reduz a dos osteoblastos. Além disso, induz a produção do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e do

ligante ativador do fator nuclear- $\kappa\beta$  (RANKL), determinando um desequilíbrio no *turnover* ósseo para maior reabsorção óssea (WONGDEE & CHAROENPHANDHU, 2011).

A insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) induzem várias respostas metabólicas e de crescimento, e têm importante papel na regulação anabólica do metabolismo ósseo. A diminuição ou ausência da insulina determina perda óssea pela redução da osteoblastogênese, além de alterar a regulação de outros fatores como o paratormônio (PTH), IGF-1 e vitamina D, provocando diminuição na formação óssea (OGATA et al., 2000; BLAKYTTY et al., 2011; MIAZGOWSKI et al., 2007). O DMT1 provoca alterações no crescimento, remodelamento, diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e do conteúdo mineral ósseo (CMO) e aumenta a fragilidade óssea e o risco de fratura (BOTOLIN et al., 2005; HOFBAUER et al., 2007; BILEZIKIAN et al., 2008; BLAKYTTY et al., 2011). Por exemplo, homens e mulheres portadores de DMT1 têm de 6-7 vezes maior risco de fraturas no quadril, comparados a pessoas sem DM (MIAO et al. 2005; JANGHORBANI et al. 2007).

Todavia, o aumento do risco de fraturas em indivíduos com DMT1 é mais provável de ser devido à pobre qualidade óssea, desequilíbrio orgânico e inorgânico ósseo, do que à redução da DMO em si (VESTERGAARD et al., 2009; STROTMAYER AND CAULEY, 2007). Prejuízos na fase orgânica, na matriz de colágeno, em resposta a hiperglicemia levam ao aumento da fragilidade óssea e reduz a resistência óssea à fratura (SAITO et al., 2006a, SAITO et al., 2006b; NYMAN et al., 2011; SILVA, 2011).

Estudos com modelos de diabetes induzidos por estreptozotocina (STZ), o qual imita o DMT1 humana, indicam prejuízos nas propriedades estruturais, mecânicas e na resistência à fratura no fêmur e no colo femoral de ratos (HOU et al., 1991; HOU et al., 1993; REDDY et al., 2001; SILVA et al., 2009; NYMAN et al., 2011; SILVA, 2011; ERDAL et al., 2012). Em contraste, a terapia insulínica foi capaz de reverter a redução da DMO femoral de ratos adultos, sem afetar os prejuízos mecânicos causados pela STZ (ERDAL et al., 2012). Da mesma forma, a insulinização atenuou os efeitos deletérios da STZ nas propriedades estruturais e mecânicas no colo femoral de ratos jovens com hiperglicemia severa (60mg/kg de STZ; glicemia sanguínea > 300 mg/dL) (HOU et al., 1993) e moderada (45 mg/kg de STZ; glicemia sanguínea ~ 277 mg/dL) (HOU et al., 1991).

A atividade física regular, por sua vez, produz efeitos benéficos na saúde de pessoas com DM, tais como a melhora da sensibilidade à insulina, do controle glicêmico, redução e manutenção do peso corporal e redução de doenças cardiovasculares (ACSM, 2000; HAYES & KRISKA, 2008; SBD, 2009). Quando realizada em adição com dieta e insulinoterapia,

torna-se uma ferramenta importante para o controle do DMT1 (REGENSTEINER et al., 2009). O exercício físico bem estruturado também melhora a capacidade física, diminui a necessidade de insulina, reduz os níveis de lipídios e proporciona bem-estar geral (CHIMEN et al., 2012). Além disso, o exercício aeróbico tem se mostrado eficiente em induzir melhoras nas propriedades ósseas de ratos com diabetes experimental (GOMES et al., 2006).

A carga mecânica é um potente estímulo para as células ósseas, ampliando a força e inibindo a perda óssea com a idade (ROBLING et al., 2006). A carga imposta pelo exercício produz deformação na matriz óssea que estimula a osteogênese (BOPARTE et al., 1998) e, em consequência, aumenta a massa óssea em humanos e animais (FUJIMURA et al., 1997; HUANG et al., 2008). Isto ocorre por meio do efeito piezoelétrico causado pela carga mecânica que aumenta a resposta osteoblástica e, conseqüentemente, a massa e a DMO (ROBLING et al., 2006). Também, o aumento da massa muscular, em resposta ao exercício, exerce maior tensão na junção osteotendinosa, resultando em maiores estímulos osteogênicos (IWAMOTO et al., 2005). Além disso, a otimização da saúde óssea (pico de massa e força óssea) na adolescência parece estar associada com a redução do risco de desenvolvimento de osteoporose e fraturas na idade adulta (TSUJI et al., 1996; BONO AND EINHORN, 2003; HENRY et al., 2004). Porém, até o momento, poucos estudos sobre os efeitos do exercício nas propriedades biomecânicas de ratos com DMT1 sem tratamento insulínico foram realizados (VERHAEGHE et al., 2000; GOMES et al., 2006; SILVA, 2011) e os resultados não são consistentes. Ambos, benefícios (GOMES et al., 2006) e sem efeito (VERHAEGHE et al., 2000; SILVA, 2011) foram observados em ratos com DMT1 experimental sem tratamento insulínico.

Apesar do exercício de alto impacto exercer maior estímulo mecânico para o osso, comparado aos exercícios de baixo impacto ou sem impacto (WELCH et al., 2008; CAMHI AND KATZMARZYK, 2012), indivíduos com fragilidade óssea podem não ser capazes de realizar esses exercícios, o que torna a natação uma opção terapêutica atrativa. Na verdade, o treinamento em natação tem mostrado efeitos benéficos nas propriedades estruturais e mecânicas no fêmur de ratos não diabéticos (HUANG et al., 2003; HUANG et al., 2010; McVEIGH et al., 2010; SILVA, 2011), e estimula a massa óssea em ratos com diabetes, induzidos por Alloxan (GOMES et al., 2006). Apesar disso, o treinamento em natação de baixa intensidade parece não ser efetivo em atenuar os prejuízos do DMT1 nas propriedades estruturais e mecânicas de ratos em crescimento não tratados com insulina (SILVA, 2011).

Portanto, considerando: a) que a atividade física regular e o tratamento insulínico têm sido indicados como formas de controle do DMT1; e b) que os efeitos isolados do treinamento físico e da insulino terapia parecem ser ineficientes em atenuar os efeitos deletérios do DMT1 sobre o osso, a hipótese do presente estudo é de que a combinação do treinamento em natação de baixa intensidade, tipo de exercício cuja prática é segura para indivíduos com esta patologia, com a insulino terapia pode atenuar os efeitos deletérios do DMT1 experimental induzido por STZ sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos em crescimento.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo Geral:**

Investigar os efeitos de um programa de exercício físico aeróbico regular combinado com a insulinização sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos em crescimento com diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) experimental.

### **2.2- Objetivos Específicos:**

Verificar se o treinamento em natação de baixa intensidade aplicado em combinação com a insulinização durante 8 semanas afeta os seguintes parâmetros ósseos em ratos Wistar em crescimento com diabetes DMT1 induzido por streptozotocina:

- Densidade mineral óssea do fêmur;
- Conteúdo mineral ósseo do fêmur;
- Força máxima, rigidez e tenacidade do colo e da diáfise do fêmur;
- Volume ósseo do colo e da diáfise do fêmur;
- Quantidade de colágeno do tipo I e III no colo do fêmur.

### **3- REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Diabetes *Mellitus***

O DM é caracterizado por um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, fundamentados na hiperglicemia resultante de defeitos na produção e na ação da insulina, ou ambos (SBD, 2009; ADA, 2010; AIRES, 2012).

Os sintomas clássicos do diabetes incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, cansaço, podendo ocorrer polifagia e visão turva (ADA, 2010; MAAHS et al., 2010; GAN et al., 2012). As complicações, a longo prazo, estão associadas à disfunção e falha de vários órgãos, como retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia, neuropatia com risco de úlceras nos pés e amputações, doença neuropática articular, osteopenia e neuropatia autonômica causando disfunções cardiovasculares, gastrointestinal e sexual (ADA, 2008).

O DM pode ser classificado, com base em sua etiologia, em quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DMT1), DM tipo 2 (DMT2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Ainda há duas categorias referidas como pré-diabetes, quando estão presentes glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída (ADA, 2008; SBD, 2009). Alguns pacientes podem não ser claramente identificados como portadores de DMT1 ou DMT2, pois a apresentação clínica pode variar consideravelmente em ambos os tipos. O DMT1, presente em 5% a 10% dos casos, tem como causa primária a destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina (FANG et al., 2004; SBD, 2009; AIRES, 2012). A hiperglicemia crônica resultante é conseqüente à falta de insulina, que atua em resposta a ações de hormônios do sistema nervoso e alterações nos níveis plasmáticos de nutrientes, fundamentalmente a glicose (RAW, 2006; AIRES, 2012). Alguns possíveis desencadeadores ambientais que podem ativar a autoimunidade das células  $\beta$  são: dieta, mais especificamente leite de vaca (proteína); falta de vitamina D; infecções virais e drogas; e toxinas (WHERRETT & DANEMAN, 2009; MAAHS et al., 2010; GAN et al., 2012).

O curso clínico do DM é caracterizado por início agudo dos sintomas. Em muitos casos, a cetoacidose diabética aparece como a primeira manifestação, em outros casos, a hiperglicemia se apresenta de forma lenta, agravando-se para a forma severa na presença de infecções (MAAHS et al. 2010; ADA, 2010; GAN et al., 2012).

O DMT2, presente em 90% a 95% dos casos, envolve a regulação incorreta do metabolismo da glicose, e caracteriza-se por resistência a ação da insulina e resposta compensatória inadequada à sua secreção, anomalia denominada “resistência insulínica”

(SBD, 2009; ADA 2010; MAAHS et al., 2010). A hiperglicemia pode estar presente por longo período antes de ser detectada e é suficiente para causar alteração em vários órgãos, mesmo sem apresentar sintomas clínicos (ADA, 2008). No tratamento do DMT2 a dieta e o exercício físico podem ser efetivos, sem dependência de insulina exógena, todavia, alguns portadores necessitam de insulino-terapia (SBD, 2009). No DMT2 o fator genético é importante, contudo devem ser considerados outros fatores como o envelhecimento, o sedentarismo e, de forma relevante, a obesidade, pois além de induzir resistência insulínica em resposta ao excesso de alimentos, leva a superestimulação da secreção de insulina, o que contribui para a exaustão das células  $\beta$  (AIRES, 2012).

Apesar dos recentes aumentos na taxa de DMT2 em jovens, DMT1 tem sido, e continua a ser, o tipo mais comum de diabetes em crianças e adolescentes (GAN et al., 2012). Embora as doenças auto-imunes mais comuns afetem desproporcionalmente mulheres, garotas e garotos são igualmente afetados com DMT1 em populações jovens (MAAHS et al., 2010).

### **3.1. 1 Modelo experimental de diabetes induzido por Streptozotocina**

A ação diabetogênica da estreptozotocina (STZ), substância isolada do *Streptomyces achromogenes*, foi descrita inicialmente por Rakieten et al. (1963) e Evans et al. (1965). A injeção intravenosa de soluções de STZ induziu diabetes em ratos e cães e, a partir desses achados, o diabetes passou a ser induzido com sucesso em diferentes modelos experimentais.

Os mecanismos da ação diabetogênica da STZ estão relacionados à citotoxicidade e glicosilação de proteínas das ilhotas pancreáticas, uma vez que STZ inibe seletivamente a enzima O-GlcNAcase, responsável pela remoção de N-acetilglucosamina da proteína. Tal ação causa apoptose das células  $\beta$ -pancreáticas (KONRAD et al., 2001). Outro mecanismo proposto para o efeito diabetogênico da STZ é que a droga promove lesão histopatológica nas células  $\beta$ -pancreáticas por reduzir os níveis de NAD (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) disponível nessas células (AKBARZADEH et al., 2007).

Os ratos com diabetes induzido por STZ apresentam algumas características como perda de massa corporal, glicosúria, polifagia, hipoinsulinemia e hiperglicemia (HAKIM et al., 1997). A patofisiologia deste tipo de diabetes inclui osteopenia ou mesmo osteoporose que está freqüentemente associada com a redução da DMO, do CMO e diminuição da taxa de mineralização (BLAKYTTY et al., 2011). Além disso, ratos com diabetes induzido com STZ

apresentam redução na atividade física diária, temperatura corporal e na frequência cardíaca (HOWARTH et al., 2006a).

### **3.2. Insulina e Diabetes *Mellitus***

A regulação da secreção de insulina é feita fundamentalmente pela glicemia, cujo aumento determina que a secreção de insulina seja elevada (AIRES, 2012). A insulina inicia uma via de sinalização que inclui o receptor de insulina (IR), substratos receptores de insulina (IRS), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt) e GLUT 4 (CARTEE AND FUNAI, 2009). A ativação da via insulínica diminui a glicemia após a ingestão de alimentos por reforçar a captação de glicose pelos tecidos alvos, favorecendo a glicólise, síntese de glicogênio e captação de aminoácidos. Ao mesmo tempo, a insulina inibe processos que liberam energia como a lipólise, glicogenólise, proteólise e gliconeogênese (FUZELE & CLEMENS, 2012). Além da glicose, outros substratos, hormônios e o sistema nervoso, têm interferências nos mecanismos secretores de insulina, e participam do controle de sua secreção (RAW, 2006; AIRES, 2012).

O objetivo do tratamento do DM é reduzir a hiperglicemia, devolver ao diabético o equilíbrio metabólico, propiciando um estado o mais próximo possível da fisiologia normal do organismo (SBD 2006). As insulinas são classificadas quanto ao tempo para início, pico de ação e duração total. As insulinas de ação rápida variam nos tempos para o pico de ação entre 30 minutos e 2 horas e tem duração total de 3 a 5 horas. Entre as insulinas de ação intermediária e prolongada, encontra-se a NPH (*neutral protamine Hagedorn*) e os análogos de insulina glargina e detemir com pico de duração de 4 a 10 horas e duração total de 10 a 24 horas. Além dessas, encontram-se as misturas insulínicas compostas por porcentagens das insulinas de ações rápidas e regular (SBD, 2011).

Segundo (TSCHIEDEL & PUÑALES, 2010), a reposição de insulina geralmente inclui uma insulina basal, uma insulina prandial (bolus refeição) e doses complementares que ocorrem no período interalimentar (bolus correção). Outra forma também utilizada no controle metabólico do diabético, porém, com um custo mais elevado é a bomba de infusão de insulina. Nessa forma de controle glicêmico, a infusão de insulina ocorre automaticamente variando entre os períodos do dia de acordo com a programação pré-estabelecida (SBD, 2006).

A insulinoterapia, independente dos esquemas de insulinização estabelecidos, deve ser aliada à terapia nutricional, prática de atividade física regular e planejada, automonitoramento e ajuste freqüente das doses, buscando o controle metabólico (SBD, 2009; TSCHIEDEL & PUÑALES, 2010).

O tratamento do DMT2 inicia-se com combinações de drogas orais, e, à medida que a doença se intensifica, utiliza-se a insulinoterapia intensiva, como no DMT1 (SBD, 2006). Contudo, estudos indicam que a terapia com insulina, pode ser utilizada mais precocemente, logo após a terapia oral (TSCHIEDEL & PUÑALES, 2010).

### **3.3. Tecido Ósseo**

O osso contém um componente orgânico (20-25%), um inorgânico (70%) e água (5%). A matriz orgânica determina sua estrutura e as propriedades mecânicas e biomecânicas (KHAN et al., 2001), contém principalmente colágeno tipo I, e em quantidades menores o colágeno tipo V e traços dos colágenos tipos III, XI e XII, juntamente com outras proteínas não colagenosas (AIRES, 2012). Todas as moléculas de colágeno constituem, aproximadamente, 90% do peso total das proteínas da matriz óssea (ROSS & PAWLINA 2008; AIRES, 2012).

As fibras de colágeno tipo III são conhecidas por não serem estruturas homogêneas simples, uma vez que as fibrilas de colágenos sempre estão codistribuídas com outras proteínas estruturais, tais como, colágeno tipo I e VI. Portanto, as fibras de colágeno tipo I e III podem estar presentes na mesma fibrila para modular as propriedades físicas, embora as fibras de colágeno tipo III sejam mais finas e menos ordenadas (KIELTY et al., 1993). As fibras de colágeno tipo III são confinadas na periferia (subperiósteo) do osso. No rato, as fibras tipo III encontram-se na região proximal do fêmur, ocupam um substancial, discreto e complexo domínio como uma extensão do periósteo. Sua densidade é maior na região do trocanter e do colo fêmural e seu domínio estreita-se para a região distal. Embora o colágeno tipo I seja mais abundante, fibras de colágeno tipo III tem um papel proativo e reativo na determinação da massa e força óssea por facilitar a ligação musculoesquelética (LUTHER et al., 2003).

As células ósseas, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos são uma pequena parte da massa óssea, responsáveis pela manutenção dos níveis circulantes de cálcio (homeostase mineral) e pelo modelamento e remodelamento da matriz óssea (AIRES, 2012).

Dentro deste processo de remodelamento, outros dois tipos de células também são associadas ao tecido ósseo, as células osteoprogenitoras e as células de revestimentos (ROSS & PAWLINA, 2008). As células osteoprogenitoras são derivadas de células tronco mesenquimais da medula óssea. É necessária uma população destas células (células precursoras de osteoblastos), que são receptivas aos estímulos moleculares, para acontecer à osteogênese (ROSS & PAWLINA, 2008).

Os osteoblastos são células formadoras de osso, diferenciadas e secretam a matriz óssea, tanto colágeno tipo I quanto as proteínas da matriz óssea. A membrana plasmática destas células é rica em fosfatase alcalina (marcador de formação óssea), além de possuir receptores para PTH, citocinas, prostaglandinas, estrogênios e vitamina D (AIRES, 2012). A função osteoblástica é controlada por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Hormônios como PTH, vitamina D, glicocorticóides, hormônio do crescimento (GH) e esteróides gonadais atuam diretamente sobre os osteoblastos (KHAN et al., 2001).

Os osteócitos são osteoblastos envolvidos pela matriz óssea, que foi previamente secretada pelo osteoblasto. São as células responsáveis por manter a matriz óssea madura e também desempenham o papel na mecanotransdução, que permite ao osteócito responder às forças mecânicas aplicadas ao osso (ROSS & PAWLINA, 2008; AIRES, 2012). As células de revestimento ósseo são células de reabsorção óssea que derivam de osteoblastos e revestem o osso quando não está sendo remodelado. Parecem exercerem a função de manutenção e suporte nutricional dos osteócitos, além de regular o movimento do cálcio e fosfato para dentro e para fora do osso (ROSS & PAWLINA, 2008).

Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, derivadas da fusão de células progenitoras hematopoéticas mononucleares localizadas na medula óssea. Caracterizam-se pela auto mobilidade e estão localizados sobre a superfície óssea onde a reabsorção está acontecendo (ROSS & PAWLINA, 2008; AIRES, 2012). O processo de reabsorção depende de interação entre o osteoclasto e a superfície óssea, e um espaço fechado forma-se entre a célula e a matriz. Nesse espaço, os osteoclastos liberam enzimas lisossomais mantendo um pH ácido, de maneira a possibilitar a dissolução da matriz óssea (KHAN et al., 2001; MOTTA, 2003).

A DMO é resultado de um processo dinâmico de formação e reabsorção denominado de remodelamento. A reabsorção é responsável pela deterioração do tecido ósseo, enquanto a formação do mesmo é responsável pela reconstrução e fortalecimento do tecido deteriorado (CREIGHTON et al., 2001; CADORE et al., 2005).

O CMO e a DMO são determinados principalmente pelo genótipo. Aproximadamente 70% da variação na densidade óssea são determinadas pela hereditariedade e os 30% restantes dependem dos hábitos de vida, em que a atividade física e, ou, a nutrição podem induzir respostas fisiológicas que permitem níveis maiores de obtenção de massa óssea (VICENTE-RODRIGUEZ et al., 2008).

### **3.3.1. Modelamento e Remodelamento ósseo**

Os processos de modelamento e remodelamento ósseo atuam em conjunto com o crescimento para definir a forma apropriada do osso, manter os níveis adequados de íons no soro sanguíneo, e reparar estruturalmente regiões comprometidas (ROBLING et al., 2006). O modelamento, ou construção óssea, dependente de osteoblastos, é vigoroso durante o crescimento e produz mudanças na dimensão e forma do osso. A remodelagem, ou reconstrução, ocorre durante toda a vida. O osso é primeiramente reabsorvido pelos osteoclastos e, então, formado no mesmo local pelos osteoblastos (BILEZIKIAN et al., 2008). O remodelamento ocorre tanto no osso cortical, predominante na diáfise do fêmur, como no trabecular, predominante no colo do fêmur, porém é mais intensa no trabecular, devido à disposição e função de trabéculas ósseas. Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 2002).

O modelamento ósseo, em qualquer superfície, envolve a ativação osteoblástica e subsequente formação óssea, ou envolve ativação do osteoclasto e subsequente reabsorção óssea, mas não no mesmo local (ROBLING et al., 2006). Esta ação complexa alcança força por dois caminhos: deposição óssea estratégica em locais onde é necessária a modificação da dimensão e forma do osso, e por remoção óssea do local onde permite a reabsorção sem prejuízo aparente (BILEZIKIAN et al., 2008).

O remodelamento ósseo ocorre com a remoção e substituição de discretos “pacotes” mensuráveis de osso, sendo este remodelado por células derivadas de diferentes fontes, as quais são coletivamente chamadas de unidades multicelulares básicas (BMU). A região com presença de BMU fica em linha com os osteoclastos, células especializadas e capacitadas a reabsorção óssea (ROBLING et al., 2006). Atrás destas células estão as células de revestimento ósseo, que revestem o osso no período entre a reabsorção e formação (ROSS & PAWLINA, 2008). Depois das células de revestimento, linhagens de osteoblastos (células formadoras ósseas) aderem à zona reversa e depositam camadas de osteóides (matriz óssea

não mineralizada). Em seguida a dimensão do espaço remodelado sofre deposição e mineralização (ROBLING et al., 2006).

Estímulos sistêmicos, pelo PTH, ou locais, por tensão mecânica ou microfraturas, podem iniciar o processo de ativação da remodelação óssea (ROBLING et al., 2006). A osteoclastogênese começa quando as células hematopoiéticas são estimuladas para gerar células mononucleares, as quais se tornam pré-osteoclastos e são lançadas na corrente sanguínea. Este passo requer expressão do fator de transcrição familiar (Ets) e M-CSF. A circulação dos pré-osteoclastos próxima ao local a ser reabsorvido desenvolve uma fusão entre estas células formando osteoclastos maduros. A diferenciação do osteoclasto maduro ocorre sob a presença do mecanismo de sinalização RANK (receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\beta$ ) e seu ligante RANK-L (RANK-RANK-L) processo essencial para a diferenciação e maturação dos osteoclastos (Figura 1). Com o mecanismo ativado, o osteoclasto engaja na reabsorção (ROBLING et al., 2006; BILEZIKIAN et al., 2008). Esta via da osteoclastogênese tem um fator que controla a sua atividade, a produção pelos osteoblastos de osteoprotegerina (OPG). A OPG é um receptor solúvel para RANK e funciona para reduzir a osteoclastogênese por competitividade com os sítios de ligação para o receptor RANK-L. Conseqüentemente, as células do estroma podem controlar a osteoclastogênese em uma direção positiva por aumentar a expressão de RANK-L e diminuir a expressão de OPG, ou contrariamente, podem ser revertidas para um decréscimo da atividade reabsortiva (ROSS & PAWLINA, 2008). O eixo RANK/OPG pode ser controlado pelos osteoblastos, que são controlados por muitos reguladores metabólicos ósseos, como as interleucinas I, II e VI (IL-1, IL2, IL6), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), vitamina D e prostaglandinas (ROBLING et al., 2006; ROSS & PAWLINA, 2008).

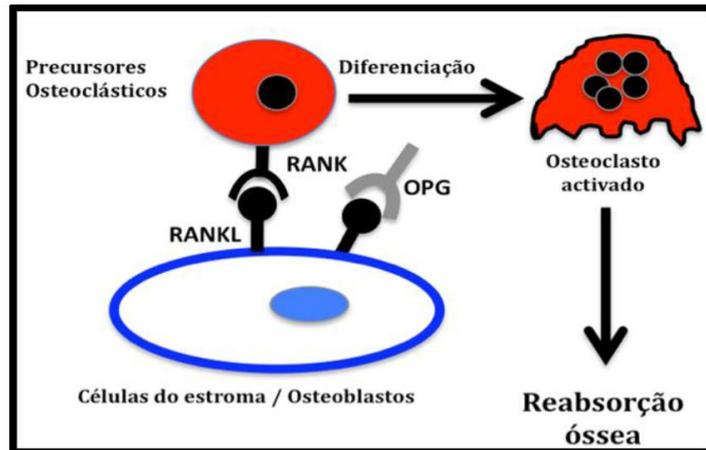


Figura 1. Esquema do processo de diferenciação dos osteoclastos (osteoclastogênese) por intervenção direta dos osteoblastos através do sistema RANKL/RANK/OPG (adaptado de Palma, 2009).

No remodelamento, a formação óssea direcionada pelos osteoblastos desenvolve um curso diferente das células reabsortivas, começando uma proliferação de células mesenquimais na medula óssea e periósteo. Essas células se diferenciam em pré-osteoblastos, passando a osteoblastos maduros que expressam na matriz óssea o colágeno tipo I, osteocalcina e uma enzima chave no processo de mineralização, a fosfatase alcalina (ALK Phos). Em subsequência, os osteoblastos dão origem aos osteóides (matriz óssea não mineralizada), a qual após um período de amadurecimento será mineralizada (ROBLING et. al., 2006; BILEZIKIAN et al., 2008).

A carga mecânica é um fator importante no modelamento e remodelamento ósseo. O principal sinal para a adaptação óssea mediada pela carga mecânica corresponde à taxa e à magnitude da tensão, a qual faculta alcançar níveis mínimos ou um limiar para provocar modificações estruturais no tecido ósseo (GUADALUPE-GRAU et al., 2009). A carga mecânica cria uma cascata de eventos, iniciando uma sinalização intracelular e aumentando os sinais de cálcio, proteínas-G e integrinas (glicoproteínas que integram o exterior com o interior das células), que são ativados pela carga mecânica (BUARQUE GUSMÃO & BELANGERO, 2009). Essa sinalização é convertida na chave de ativação de enzimas intracelulares que determinam a liberação de alguns mediadores químicos, como por exemplo, o óxido nítrico (ON), que podem atuar suprimindo a atividade dos osteoclastos e promovendo a atividade osteoblástica. A estimulação mecânica induz a síntese de prostaglandinas que estimulam a atividade osteoblástica através dos IGF's (Fator de crescimento semelhante à insulina) e outros mediadores. Entre eles, o peptídeo liberador de paratormônios da

paratireóide (PTHrP) que tem ações similares ao PTH nos osteoblastos, e os seus precursores, que podem ser mediadores de formação óssea (BERGMANN et al., 2011).

### 3.3.2 Biomecânica do osso

O metabolismo ósseo é regulado por uma interação de fatores como a variabilidade biológica, nutrição, hormônios, drogas e pela carga mecânica imposta (BANFI et al., 2010; BERGMANN et al., 2011).

Os ossos foram projetados para oferecer resistência contra cargas aplicadas a eles (BORER, 2005), que podem se originar de forças externas pela ação do corpo (ex. caminhar), forças internas criadas por tensão dos ligamentos ou contração muscular e na relação osso-osso e forças de contato (BORER, 2005; BILEZIKAN et al., 2008).

Dentre as funções do tecido ósseo, uma das mais importantes é a de suportar e transmitir forças sem se romper (GUADALUPE-GRAU et al., 2009). A força do osso depende da quantidade de tecido, da sua composição material e como este está organizado microarquiteticamente e geometricamente (forma e tamanho) (BOUXSEIN & KARASIK, 2006).

Analisando a força óssea, as propriedades mecânicas do osso são determinadas por dois fatores principais: as características da matriz colagenosa, que se relaciona à capacidade do osso em absorver energia sem se quebrar; e o grau de mineralização (quantidade de cristais de cálcio/hidroxiapatita depositado entre as fibras de colágeno) determinando principalmente a rigidez óssea (GUADALUPE-GRAU et al., 2009).

Os ossos possuem propriedades elásticas e plásticas. Na elástica o osso absorve a energia imposta a ele e é reversível, ou seja, ele sofre uma deformação, mas volta à sua forma normal. Se a carga imposta excede a capacidade de deformação elástica e se torna permanente é denominada de deformação plástica (SEEMAN et al., 2008). As propriedades estruturais ósseas são a rigidez, ou flexibilidade, resistência à flexão, torção e compressão, e tenacidade (BORER, 2005). A rigidez consiste na resistência à deformação permanente, reflete a resistência estrutural elástica do osso após a aplicação de carga. A tenacidade corresponde à energia absorvida pelo osso antes de fraturar e a força máxima para ruptura, indica a maior força aplicada ao osso até a fratura (BORER, 2005; GUADALUPE-GRAU et al., 2009).

A deformação local que resulta de forças aplicadas é referida como tensão, definida como relativa mudança no tamanho ou forma do osso. Quando forças são aplicadas ao osso,

ocorre uma complexa e variada distribuição de estresse e tensão. Esses dois fatores podem ser categorizados como estresse ou tensão normal e estresse ou tensão de cisalhamento. Em um dado plano da estrutura óssea, o estresse normal atua perpendicularmente ao plano (tensão e compressão) e o estresse de cisalhamento atua no plano paralelo. Tensão normal representa alongamento ou encurtamento, e tensão de cisalhamento representa a distorção (BILEZIKIAN et al., 2008).

O estímulo mecânico é uma das ações reguladoras da manutenção da massa óssea, sendo reconhecido pelas células ósseas após um processo denominado mecanotransdução (BERGMANN et al., 2011). A partir dele, inicia-se a resposta celular podendo resultar na produção ou reabsorção óssea (LEMURA & DUVILLARD, 2006).

A mecanotransdução pode ser interpretada como o processo de produção de uma reação bioquímica a partir de um estímulo mecânico. As reações bioquímicas em cadeia, induzidas pelo estímulo mecânico, atuam em nível celular e podem causar inibição da apoptose, aumento da proliferação celular, alterações na migração celular, entre outros efeitos (BUARQUE GUSMÃO & BELANGERO, 2009). Neste processo de detecção e transdução, os osteócitos são apontados como o principal sensor para a tensão no osso. Os osteoblastos que originam os osteócitos também detectam o estímulo mecânico, mas em um grau menor (KLEIN-NULEND et al., 2005; ROSS & PAWLINA, 2008). Estas células, incorporadas em um sistema lacunocanicular e largamente distribuídas no osso, são interconectadas por “*gap junction*” entre os processos celulares, e conectam células da superfície e da medula óssea (BERGMANN et al., 2011). Os osteócitos são sensíveis ao estresse biomecânico e ao fluxo de fluido gerado pelo efeito piezoelétrico, resultante de um aumento das correntes elétricas pulsáteis no osso (FUKATA & YASUDA, 1957; TUREK, 1991; BERGMANN et al., 2011). O efeito piezoelétrico converte a energia mecânica em elétrica, produzindo carga elétrica negativa e positiva. A primeira está associada à osteogênese (deposição) em áreas de compressão no osso, enquanto a segunda está ligada à reabsorção óssea nas áreas de tração (FUKATA & YASUDA, 1957; BUARQUE GUSMÃO & BELANGERO, 2009).

### **3.4. Diabetes mellitus e tecido ósseo**

A “doença diabética óssea”, termo usado para descrever as complicações mais comuns causadas pelo DM no sistema ósseo, é um dos males causados pelo DMT1 (BILEZIKIAN et

al., 2008) e tem sido associada com osteopenia, osteoporose e fraturas (BLAKYTTY et al., 2011; THRAIKILL et al., 2005b).

Segundo Inzerillo & Epstein (2004), a osteoporose é um problema de saúde mundial caracterizada por redução da DMO com aumento da porosidade e suscetibilidade à fratura, e pode ser causada por aceleração da reabsorção e/ou desaceleração da formação óssea. O DMT1 não só agrava a osteoporose e a osteopenia como pode levar a ambas as condições, tanto em crianças como em adultos (THRAIKILL et al., 2005b; WONGDEE & CHAROENPHADHY, 2011). As desordens ósseas associadas ao DMT1 provocam alterações no crescimento, remodelamento, diminuem a taxa de formação óssea, a DMO e o CMO, atrasam a cicatrização óssea, aumentam a fragilidade e o risco de fratura (WEISS AND REDDY, 1980; BOTOLIN et al., 2005; BILEZIKIAN et al., 2008; BLAKYTTY et al., 2011; ARMAS et al., 2012). Todavia, é importante ressaltar que o aumento do risco de fratura em indivíduos com DMT1 é mais provável de ser devido à má qualidade óssea, desequilíbrio orgânico e inorgânico ósseo, do que devido à redução da DMO em si (VESTERGAARD et al., 2009; STROTMAYER & CAULEY, 2007).

O DMT2 e o tecido ósseo apresentam discrepâncias com relação à DMO, pois estudos têm demonstrado seu aumento, manutenção e redução. Entretanto, o DMT2 tem sido associado ao aumento do risco de fraturas, que está relacionado a comorbidades do DM, tais como: retinopatia diabética, neuropatia diabética e acidente vascular cerebral e hipoglicemia, que podem aumentar o risco de queda. Também, neste tipo de DM, a combinação da má qualidade óssea com o risco de acidentes pode elevar a incidência de fraturas independente da DMO (JANGHORBANI et al., 2007; YAMAGUCHI, 2010; BLAKYTTY et al., 2011).

Embora várias investigações tenham direcionado questões de como o DM induz as complicações ósseas, o exato entendimento ainda é elusivo. No entanto, aceita-se que a hiperglicemia, ausência de insulina, ou resistência à insulina são fatores relevantes para os efeitos deletérios diretos e indiretos da doença diabética óssea (WONGDEE & CHAROENPHANDHU, 2011). A hiperglicemia é um fator relevante que produz efeitos maléficos na formação óssea. A manutenção da glicemia acentuada aumenta a ação dos osteoclastos e reduz a dos osteoblastos. Fatores de transcrição que regulam os osteoblastos como o fator  $\alpha 1$  do núcleo de ligação (Cbfa1) e o fator-2 de domínio runt (Runx 2) são afetados, e encontram-se reduzidos com o DMT1 (LU et al., 2003). O DMT1 também induz a produção de M-CSF, TNF- $\alpha$  e RANK-L, levando a um desequilíbrio no *turnover* ósseo, para

maior reabsorção óssea (THRAIKIL et al., 2005b; WONGDEE & CHAROENPHANDHU, 2011).

De acordo com Blakytny et al. (2011), a hiperglicemia pode ter outros fatores com efeitos diretos nas células ósseas e indiretos através da formação de glicação e oxidação de produtos relacionados. A hiperglicemia pode diminuir a proliferação de osteoblastos, reduzir a expressão OPG e levar à diminuição de osteocalcina e de deposição de cálcio. A expressão de receptores de PTH, de vitamina D, e a produção de ON também diminuem. As altas concentrações de glicose podem resultar em aumento de AGEs (produtos de glicação final), por exemplo, no colágeno, causando alterações nas suas ligações. Estudos com modelos de DMT1 induzidos por STZ demonstraram aumento de marcadores de AGEs e prejuízo ósseo. Por exemplo, Tomasek et al. (1994) observaram que o aumento de AGEs coincidiu com redução da força óssea, DMO e volume ósseo. Porém, Silva et al. (2009) encontraram aumento de marcadores de AGEs, redução na força de fratura óssea, sem alterações na quantidade de colágeno em osso de ratos diabéticos.

Hamada et al. (2009) também ressaltam o estresse oxidativo que é aumentado no diabetes. O estudo dos autores mostra que as espécies reativas de oxigênio (ROS) aumentam com o diabetes e podem inibir a diferenciação osteoblástica e aumentar a formação de osteoclastos, o que pode elevar a reabsorção óssea.

A insulina e o IGF-1 induzem várias respostas metabólicas e de crescimento, e têm importante papel na regulação anabólica do metabolismo ósseo. A diminuição ou ausência da insulina determina perda óssea através da redução da osteoblastogênese, além de alterar a regulação de outros fatores como o PTH, IGF-1 e a vitamina D, provocando diminuição na formação óssea (THRAIKILL et al., 2005a; BLAKYTNY et al., 2011). A falta de insulina pode ter efeito direto nos osteoblastos e seus precursores prejudicando a formação óssea (THRAIKILL et al., 2005a).

De acordo com Thrailkill et al. (2005b), os osteoblastos apresentam um número significativo de IRS na superfície celular, que apresentam alta capacidade de ligação. Ogata et al. (2000), utilizando modelos animais, demonstraram que os IRS-1 são essenciais para a sinalização intracelular para a insulina e IGF-1, e que a deficiência de IRS-1 nos osteoblastos prejudica a proliferação e diferenciação dessas células, além de reduzir o *turnover* ósseo.

Outros aspectos, como a inflamação, também podem estar envolvidos com a perda óssea no DM. A inflamação, por ser um processo presente no DMT1, aumenta o perfil de citocinas, e estas como são mediadoras da diferenciação dos osteoclastos, podem ativar a

osteoclastogênese e acelerar a perda óssea no DMT1 (McCABE, 2007; WONGDEE & CHAROENPHADHY, 2011).

Além da importância da ação da insulina nos osteoblastos para aquisição óssea normal, é sugerido que o tecido ósseo, no processo de interação com outros tecidos do corpo, participa na regulação do metabolismo energético global (KARSENTY & FERRON, 2012). Dada a dimensão do esqueleto e a quantidade de células residentes, a demanda energética do osso é, provavelmente por ser grande, especialmente durante os períodos de formação e remodelação óssea. Assim, a interrupção da ação da insulina nos osteoblastos, pode ter efeito no metabolismo geral da glicose (FULZELE & CLEMENS 2012).

Avaliando ações *in vivo* do IGF-1 no metabolismo ósseo, Spencer et al. (1991) infundiram IGF-1 no membro posterior direito de ratos por 14 dias para avaliar o efeito na formação óssea cortical e trabecular. O membro contrário foi utilizado para comparação, que foram feitas por meio de técnicas histológicas. Os resultados mostraram um aumento significativo da formação óssea cortical e um aumento de 22% na formação trabecular, que foi analisada por um período menor, sete dias.

GANDHI et al. (2005) utilizaram um sistema de administração intramedular de insulina diretamente no local de fratura. A entrega direta de insulina normalizou a proliferação celular e condrogênese no início e, posteriormente, normalizou a mineralização do tecido e a força mecânica local no DMT1, contudo, sem afetar os parâmetros sistêmicos de glicose sanguínea. Estes resultados sugerem importante papel da insulina, diretamente no local da fratura, e mostra que a deficiência de insulina no estado de DMT1 pode afetar negativamente o processo de cicatrização óssea.

Estudos em humanos e em modelos de diabetes experimental induzido por STZ, o qual mimetiza o DMT1 humana, demonstram os efeitos deletérios desta patologia no sistema esquelético. Estudos em humanos (MOYER-MILEUR et al., 2008; SAHA et al., 2009; SOTO et al., 2011) revelaram redução na DMO e CMO em adolescentes diabéticos, comparados aos controles pareados. Além disso, homens e mulheres portadores de DMT1 têm de 6 a 7 vezes maior risco de fraturas no quadril se comparados a pessoas sem DM (MIAO et al., 2005; JANGHORBANI et al., 2007).

Em modelos de diabetes induzidos por STZ, os estudos indicam prejuízos nas propriedades estruturais, mecânicas e na resistência à fratura no fêmur e no colo femoral de ratos (HOU et al., 1991; HOU et al., 1993; REDDY et al., 2001; SILVA et al., 2009; NYMAN et al., 2011; SILVA, 2011; ERDAL et al., 2012). O estudo de Erdal et al. (2012)

demonstrou em ratos com DMT1 induzido por STZ que apenas a DMO foi prevenida com o tratamento insulínico, sendo que as demais propriedades biomecânicas ósseas (força de fratura, rigidez e tenacidade) foram prejudicadas tanto no grupo diabético como no grupo diabético tratado com insulina. Por outro lado, Hou et al. (1993), também utilizando o modelo de DMT1 induzido por STZ e insulinoterapia, observaram que o DMT1 reduziu a massa do fêmur e propriedades mecânicas ósseas para resistência à fratura, no entanto, o tratamento insulínico amenizou os efeitos deletérios. Thrailkill et al. (2005b), utilizando de outro modelo de DMT1, camundongos diabéticos não obesos, encontraram efeito preventivo do tratamento insulínico na formação óssea dos animais tratados, em comparação aos animais sem tratamento, que demonstraram formação óssea reduzida em relação aos animais controles não diabéticos. Portanto, o tratamento insulínico e os efeitos deste sobre as propriedades estruturais e mecânicas do tecido ósseo têm apontado efeitos benéficos; contudo, os resultados ainda são inconsistentes.

### **3.5. Diabetes *mellitus* e exercício**

A atividade física regular é reconhecida por produzir vários efeitos benéficos na saúde de pessoas com DM, como melhora da sensibilidade à insulina, do controle glicêmico, redução e manutenção do peso corporal e redução de doenças cardiovasculares (ACSM, 2000; HAYES & KRISKA, 2008; SBD, 2009; YARDLEY et al. 2012).

A realização de exercício físico, em adição com dieta e insulina, tornou-se uma ferramenta importante para o gerenciamento do DMT1 (REGENSTEINER et al., 2009). O exercício físico bem estruturado traz benefícios importantes no tratamento do DMT1, pois melhora a capacidade física, diminui a necessidade de insulina, reduz os níveis de lipídio e melhora o bem-estar geral dos pacientes (CHIMEN et al., 2012).

Estudos em animais com diabetes experimental induzido por STZ mostram efeitos benéficos do exercício. Por exemplo, Jorge et al. (2012) verificaram efeitos positivos de uma sessão de exercício aeróbico dinâmico, onde os resultados demonstraram atenuação da hipotensão, bradicardia e respostas barreflexa prejudicadas pelo DMT1. Combinando tratamento insulínico com exercício aeróbico de corrida por oito semanas, Lahaye et al. (2012) demonstraram benefícios do treinamento nas funções cardíacas basais e na expressão de proteínas no ciclo de cálcio. Além de o exercício mostrar efeitos positivos nas respostas da frequência cardíaca (FC), pressão arterial (PA) em animais com DMT1 experimental, os

benefícios evidenciados após dez semanas de treinamento aeróbico nas funções cardiovasculares foram parcialmente mantidos após três semanas de destreinamento (MOSTARDA et al., 2009).

O exercício físico regular pode afetar favoravelmente a sensibilidade insulínica muscular e do fígado, a ingestão e utilização de glicose e o controle glicêmico geral (HAYES & KRISKA, 2008; CHIMEN et al., 2012). O principal local de ação da insulina é o músculo, enquanto o fígado é o responsável por armazenar glicogênio. O efeito do exercício no músculo é mediado através da dependência de insulina e independente da insulina, por meio da contração muscular (KOURTOGLOU, 2011). Apesar de, em última análise, depender da mesma proteína transportadora, GLUT 4, a insulina e o exercício não compartilham vias de sinalização idênticas. Insulina inicia uma via de sinalização que inclui IR, IRS, PI3K e Akt. O exercício conta com os efeitos cumulativos de outras entradas, como de adenosina monofosfato de proteína (AMP)-ativada, proteína quinase (AMPK) e aumento de cálcio citosólico ( $Ca^{2+}$ ), geralmente considerado como susceptível de ser o principal fator (CARTEE AND FUNAI, 2009). Esses dois mecanismos atuam independentemente e sinergicamente para facilitar a absorção de glicose pelo músculo através dos transportadores de glicose GLUT 4 (KOURTOGLOU, 2011). O exercício físico aumenta a sensibilidade à insulina através de uma melhoria na captação de glicose via GLUT 4, resultante do efeito do exercício no aumento, tanto da expressão, como da translocação deste transportador para a membrana plasmática (STEHNO-BITTEL, 2012).

Em portadores de DMT1, os níveis de insulina não podem ser suprimidos durante a realização de exercícios, como acontece com aqueles sem diabetes, pelo fato da insulina ser injetada e os processos regulatórios induzidos pelo exercício nas células pancreáticas não diminuir os níveis de insulina. O fato da produção de glicose hepática não compensar a maior absorção de glicose muscular pode levar a um grande risco de hipoglicemia (KOURTOGLOU, 2011). Por outro lado, redução da dosagem de insulina, grande ingestão de carboidratos e o aumento de hormônios contra regulatórios (glucagon, epinefrina, cortisol, GH) induzido pelo exercício podem deteriorar o controle da glicose e desencadear hiperglicemia severa e ou mesmo cetoacidose (DE FEO et al., 2006; KOURTOGLOU, 2011).

As adaptações metabólicas que ocorrem em resposta ao exercício físico podem melhorar o controle glicêmico, principalmente no DMT2, promovendo uma redução no nível de hemoglobina glicada (A1C), mas apresentam inconsistência com relação ao DMT1. No entanto, apesar do exercício provocar variações glicêmicas no DMT1 e desafios para o seu

gerenciamento, o auto-monitoramento e o treinamento regular podem reduzir o potencial de variabilidade excessiva de glicose relacionada ao exercício (HAYES & KRISKA, 2008).

Apesar dos estudos sobre os benefícios do exercício regular em portadores de diabetes serem mais elucidados e diretivos para os pacientes de DMT2, benefícios e diretrizes para o DMT1 também são enfatizados, mesmo que fundamentados nos entendimentos obtidos a partir de estudos com pacientes de DMT2 ou sem a presença de patologias (DE FEO et al., 2006; CHIMEN et al., 2012). Quando as numerosas variáveis do DM e do exercício (incluindo duração e intensidade do exercício, alimentação pré-exercício, suplementação de carboidratos, dosagem de insulina, local de aplicação da insulina, monitoramento da glicemia antes, durante e após o exercício) são observadas, os portadores de DMT1 podem e devem ser encorajados a prática regular de todos os tipos de exercício (DE FEO et al., 2006; HAYES & KRISKA, 2008; KOURTOGLOU, 2011).

### **3.6. Tecido ósseo e exercício**

A atividade física regular desempenha um papel importante para minimizar a perda e aumentar a massa e a força ósseas (ACSM 2004; CHANG et al., 2010). Crianças e adultos engajados em um estilo de vida ativo, independente de idade e sexo, possuem uma massa óssea maior que sedentários (McARDLE et al., 2008). Além disso, a otimização da saúde óssea (pico de massa e força óssea) na juventude, parece estar associada com redução do risco de desenvolvimento de osteoporose e fraturas na idade adulta (TSUJI et al., 1996; BONO & EINHORN, 2003; HENRY et al., 2004).

O efeito do exercício sobre o tecido ósseo varia conforme o tipo, intensidade, duração e frequência (ACSM, 2004). O exercício físico impõe cargas mecânicas ou uma força que atua sobre o osso quando os músculos se contraem ou quando o corpo pousa, decola, ou entra em contato com objetos (LEMURA & DUVILLARD, 2006). Através do estímulo mecânico produzido pelo exercício, ocorrem as possíveis alterações no metabolismo ósseo, conforme mencionado nas secções 3.3.1 e 3.3.2. Os mecanismos pelos quais os exercícios interferem nos ossos não estão totalmente esclarecidos.

A carga mecânica é um potente e particular estímulo para as células ósseas, as quais melhoram a força óssea e inibem a perda óssea com a idade (ROBLING et al., 2006). Esses estímulos causam o encurvamento momentâneo e ligeiro do osso, sobrecarga (tensão). A carga imposta pelo exercício produz grandes taxas de deformação na matriz óssea

estimulando a osteogênese; as cargas mecânicas aumentadas transformam as superfícies quiescentes, e até mesmo reabsortivas, em superfícies formadoras do osso (BOPARTE et al., 1998). A tensão gerada no osso inicia uma cascata de eventos, incluindo a elevação de cálcio intracelular, secreção autócrina e parácrina, e a expressão de fatores de crescimento (TURNER & ROBLING, 2003).

As cargas mecânicas produzidas pelo exercício promovem alterações ósseas aumentando o número de osteoblastos e a formação óssea (BOPARTE et al., 1998). Em resposta à carga mecânica sobre o osso, o efeito piezoelétrico aumenta a resposta osteoblástica e, conseqüentemente, a massa e a DMO (ROBLING et al., 2006). As cargas dinâmicas criam gradientes de pressão hidrostática dentro da rede lacunocanicular preenchida por fluidos. Os gradientes de pressão são equilibrados por meio de circulação de fluido extracelular das regiões de alta pressão para regiões de baixa pressão. Assim, o movimento dos fluídos dentro dessa rede gera estresse de cisalhamento que atua sobre as células ósseas, desencadeando eventos celulares que estimulam a produção de proteína da matriz óssea (TURNER & ROBLING, 2003).

O exercício aumenta o fornecimento de sangue aos músculos em atividade, assim como para os ossos, fornecendo nutrientes, hormônios e oxigênio por meio dos vasos sanguíneos que, através dos canais de Volkmann e Harvers, vascularizam o osso. O exercício aumenta a liberação de hormônio pulsátil: a pulsatilidade do GH estimula a proliferação celular no osso, principalmente nos mais jovens (BORER, 2005).

O aumento da massa muscular, em resposta ao exercício, exerce maior tensão sobre a junção osteotendinosa, resultando em maiores estímulos osteogênicos e, conseqüentemente, aumento na deposição de minerais no tecido ósseo (IWAMOTO et al., 2005). Provavelmente também aumenta proteínas morfogenéticas (BMP) que, após o exercício, aumenta a formação e reduz a reabsorção óssea (IWAMOTO et al., 1998).

O exercício pode alterar a orientação dos osteons e suas fibras de colágeno. Fibras longitudinais são encontradas em regiões que suportam cargas de tensão, enquanto fibras transversais predominam em regiões sob cargas de compressão. Esta reorientação das fibras de colágeno em resposta ao exercício pode contribuir para a manutenção da força óssea que é relacionada à deposição óssea (GUADALUPE-GRAU et al., 2009). A rede de colágeno também pode ser aumentada como resultado do estímulo do exercício, principalmente durante o crescimento (ISAKSSON et al., 2009).

Outro ponto a ser destacado em relação aos efeitos do exercício sobre o tecido ósseo é a adaptação e o efeito local específico. Depois que a adaptação a determinada carga imposta pelo exercício regular for alcançada e que a estrutura óssea for suficiente para atender às novas demandas de força, a atividade celular volta aos níveis de repouso, sem exercício, pois a nova estrutura está formada. Para uma nova adaptação óssea é necessário uma nova sobrecarga (LEMURA & DUVILLARD, 2006). Com relação ao efeito local, a lei de Wolff, citada por Robling et al. (2006), estabelece que o estresse mecânico aplicado aos ossos causaria uma mudança estrutural na remodelação óssea. É importante mencionar que, segundo esta Lei, toda mudança na função de um osso é seguida por certas mudanças na arquitetura interna e na conformação externa. Os ossos se fortalecem de acordo com a maneira e a região estimulada.

Diferentes tipos de exercício físico impõem sobrecargas distintas aos ossos. Exercícios de alto impacto exercem maiores estímulos mecânicos nos ossos comparados aos exercícios sem ou com baixo impacto (WELCH et al., 2008; CAMHI & KATZMARZYK, 2012). Em relação à natação, exercício sem impacto e usado no presente estudo, os benefícios desta sobre os ossos parecem estar associados à intensidade da atividade muscular. Em estudos com animais, Huang et al. (2003) encontraram que diferentes modelos de exercício, como natação e corrida, aumentaram o peso e a força na tíbia e no fêmur dos ratos, entretanto, não encontraram mudanças na DMO e no CMO. Huang et al. (2010), comparando efeitos do exercício de natação sobre propriedades mecânicas e estruturais de ossos em ratos Wistar, observaram que após oito semanas de natação, os ratos treinados apresentaram menores força e tamanhos absolutos comparados ao grupo controle. Estas diferenças desapareceram quando estas variáveis foram normalizadas pelo peso corporal, contudo, o treinamento de natação aumentou a energia absorvida pelo osso até a fratura. Outros estudos (SWISSA-SIVAN et al., 1989 e 1990; McVEIGH et al., 2010) também apresentaram efeitos positivos do treinamento com natação nas propriedades estruturais e mecânicas dos ossos de ratos. Portanto, apesar do exercício de natação não provocar impacto, a atividade muscular que ocorre neste modelo de exercício tem mostrado causar estímulos suficientes para beneficiar as propriedades estruturais e mecânicas ósseas.

Em animais com diabetes experimental, estudos sobre os efeitos do exercício regular sobre o osso são raros e os resultados são controversos. Por exemplo, Gomes et al. (2006) submeteu ratos com DMT1 induzido por Aloxxan ao treinamento de natação e demonstraram que o referido treinamento aumentou a massa óssea na tíbia dos animais. Por outro lado,

Verhaeghe et al. (2000) não encontraram efeito na DMO e nas propriedades mecânicas de animais espontaneamente diabéticos submetidos ao treinamento de corrida, cinco dias por semana, por um período de cinco a oito semanas.

No estudo de Silva (2011), ratos em crescimento com DMT1 induzido por STZ e não tratados com insulina, foram submetidos ao treinamento de natação de baixa intensidade (4% do peso corporal) por 8 semanas. Os resultados mostraram que apesar do programa de treinamento aumentar propriedades estruturais (ex. CMO, DMO e volume ósseo) e mecânicas (ex. rigidez) no fêmur nos animais controles, tal programa não foi eficiente em beneficiar estas propriedades nos ratos diabéticos.

Os efeitos do exercício físico regular sobre parâmetros ósseos em crianças com DMT1 e crianças saudáveis comparados aos seus grupos controles foram avaliados por Maggio et al. (2012). Eles observaram os efeitos de um programa de exercício com sustentação do peso corporal, 180 minutos por semana, durante nove meses. O programa de exercício evidenciou benefícios para os dois grupos exercitados - diabéticos e saudáveis. Decréscimo nos marcadores de reabsorção óssea e aumento do acréscimo de massa óssea na espinha lombar foram evidenciados no grupo DMT1 exercitado.

Diante do exposto, até o momento não está esclarecido na literatura os efeitos do exercício regular sobre o osso de ratos com diabetes experimental. Os estudos são raros e apresentam inconsistências nos resultados. Além disso, as diferenças observadas entre os estudos podem ser devido aos diferentes modelos de diabetes, tipos de exercício e idade dos animais usados, o que torna necessário maiores investigações para um melhor entendimento sobre os efeitos do exercício no tecido ósseo em portadores de diabetes.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais e tratamentos**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob o parecer nº51/2011. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram executados por metodologia permitida e indicada pela Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e foram supervisionados pela médica veterinária Daise Nunes Queiroz da Cunha, CRMV MG 26410.

Foram utilizados 60 ratos Wistar com 30 dias de idade e massa corporal média de 90g, distribuídos, aleatoriamente, em seis grupos experimentais:

- Controle sedentário (CS, n = 10): receberam injeção de tampão citrato de sódio e não exercitaram;
- Controle exercitado (CE, n = 10): receberam injeção de tampão citrato de sódio e exercitaram;
- Diabético sedentário (DS, n = 10): receberam injeção de estreptozotocina e não exercitaram;
- Diabético exercitado (DE, n = 10): receberam injeção de estreptozotocina e exercitaram;
- Diabético sedentário tratado com insulina (DSI, n = 10): receberam injeção de estreptozotocina, insulino-trapia e não exercitaram;
- Diabético Exercitado tratado com insulina (DEI, n = 10): receberam injeção de estreptozotocina, insulino-trapia e exercitaram.

Os animais foram alojados em gaiolas, cinco animais em cada, em ambiente com temperatura média de 24°C e regime de luminosidade de 12 horas de escuridão e 12 horas de claridade, e receberam água e ração *ad libitum*. Todos foram pesados, as 8:00 horas no primeiro dia de cada semana ao longo do período experimental, em balança eletrônica digital (Marte - Brasil, modelo AS5500C).

### **4.2. Indução do diabetes**

Após jejum de 12 horas, os animais dos grupos DE, DS, DEI e DSI receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de massa corporal) de estreptozotocina [STZ] (Sigma, St. Louis, EUA), diluída em 1mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5).

Sete dias após a aplicação de STZ e jejum de 12 horas a glicemia foi aferida utilizando-se o glicosímetro *One touch ultra* (Johnson & Johnson, México). Os animais que apresentaram glicemia de jejum superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos. A glicemia de jejum foi monitorada semanalmente, no primeiro dia de cada semana, pela manhã, durante o período experimental. A glicemia de jejum foi aferida 68 horas após última sessão de treinamento físico de cada semana e 15 horas após aplicação da dose diária de insulina.

### **4.3. Programa de treinamento em natação e insulino terapia**

Após sete dias de indução de diabetes, os animais dos grupos DSI e DEI, após constatação da hiperglicemia em glicosímetro (veja secção 4.2), receberam uma dose diária de insulina (1-4 UI) no período da tarde, 6 horas após o treinamento físico nos dias de exercício, durante oito semanas.

Após sete dias de indução de diabetes, os animais do grupo DE, DEI e CE foram submetidos a um programa de treinamento em natação (PTN), adaptado de Medeiros et al. (2000), por oito semanas.

No primeiro dia, da primeira semana, os animais exercitaram na água, sem sobrecarga, durante 10 minutos. A duração do exercício foi aumentada em 10 minutos por dia nos quatro dias subseqüentes desta semana. Na segunda semana, a duração do exercício continuou a ser aumentada até atingir 90 minutos, permanecendo essa duração até o final das oito semanas. A partir da quarta semana foi afixada ao corpo de cada animal uma carga correspondente a 1% de sua massa corporal (arruelas de metal atadas com tiras de borracha flexível). A partir da quinta semana, a carga continuou a ser aumentada em 1% do peso corporal até atingir a carga total de 5% do peso corporal na última semana de treinamento.

A tabela 1 apresenta o programa de treinamento dos animais ao longo das oito semanas.

Para o treinamento em natação foram utilizados tanques de alvenaria quadrados, com 55cm de largura e 65cm de profundidade, cheios de água com temperatura entre 28 e 30°C. Durante o período de treinamento os animais dos grupos CS, DS e DSI foram colocados em uma caixa de polipropileno com água aquecida (28-30°C) e profundidade de 10cm.

Tabela 1. Programa de Treinamento em Natação dos animais ao longo das 8 semanas e incremento de carga.

SEMANA	CARGA	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA
1	0 %	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
2	0 %	60 min	70 min	80 min	90 min	90 min
3	0 %	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min
4	1 %	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min
5	2 %	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min
6	3 %	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min
7	4 %	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min
8	5 %	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min

#### 4.4. Determinação da frequência cardíaca de repouso

Os animais foram colocados dentro de uma câmara de indução anestésica e receberam isoflurano 2% e oxigênio 100% num fluxo constante de 1L/minuto. Uma vez inconscientes, foram retirados da câmara de indução, e colocados em decúbito dorsal em uma plataforma com os membros fixados por fita adesiva. A concentração de isoflurano foi mantida entre 0,5 - 1%, suficiente para imobilização durante o exame eletrocardiográfico e sob respiração espontânea.

Os eletrocardiogramas foram obtidos após a oitava semana do PTN e a cada animal foi permitido descanso de 48 horas antes do eletrocardiograma (ECG). O ECG, livre de ruídos e interferências, foram adquiridos por no mínimo 60 segundos consecutivos. Uma tricotomia de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> foi realizada nos membros torácicos e no membro pélvico esquerdo para inserção dos eletrodos. O ECG - derivação DII - foi adquirido utilizando o sistema de aquisição de dados PowerLab® (AD Instruments, São Paulo, Brasil), e os dados foram analisados através do programa LabChart® Pro (ADInstruments LabChart 7, São Paulo, Brasil). Análise das variáveis do ECG consistiu do cálculo da média de cinco ciclos cardíacos

consecutivos usando traçados livres de ruídos. Os intervalos RR foram mensurados e usados para determinar a frequência cardíaca de repouso (FCR).

#### **4.5. Eutanásia e coleta de amostras**

Após o período experimental, 48 horas após a última sessão de treinamento físico, os animais sofreram eutanásia. O fêmur direito foi dissecado e os tecidos moles retirados. O osso foi depositado em uma gase embebida em soro fisiológico e armazenado em freezer a -20°C para análises futuras da CMO, DMO e propriedades mecânicas.

Da mesma forma, o fêmur esquerdo foi dissecado e o osso livre dos tecidos moles foi fixado em formol 10%, neutro tamponado à temperatura ambiente para análises futuras da morfometria óssea.

#### **4.6. Determinação do conteúdo e densidade mineral óssea**

As amostras do fêmur direito foram descongeladas por pelo menos 2 horas em temperatura ambiente imediatamente antes das análises do CMO que foram realizadas em densitômetro ósseo de raios X (LUNAR DPX-ALPHA<sup>®</sup>) equipado com software para pequenos animais. A DMO foi automaticamente obtida pelo sistema a partir da fórmula:

$$\text{DMO (g/cm}^2\text{)} = \text{CMO (g)} / \text{ÁREA (cm}^2\text{)}.$$

#### **4.7. Avaliação das propriedades mecânicas do osso**

A análise da resistência óssea à fratura foi realizada no mesmo fêmur direito, logo após a análise da DMO, conforme Vicentini et al. (2007), em máquina universal de ensaio (EMIC<sup>®</sup>, modelo DL 3000\*), com carga aplicada a velocidade de 5mm/min. Um sistema computadorizado acoplado ao aparelho registrou a força aplicada (carga) e o deslocamento, em intervalos padronizados de tempos definidos pelo programa. A análise foi realizada tanto no colo do fêmur (com predomínio de osso esponjoso) como também no terço médio da diáfise (com predomínio de osso cortical). Na diáfise femoral foi realizado ensaio de flexão simples em três pontos, que consistiu em apoiar o fêmur sobre dois suportes distanciados entre si em 20mm, sendo a carga aplicada no centro da amostra (Figura 2), utilizando uma célula de carga de 2000N.



Figura 2. Fotografia do ensaio mecânico de flexão em três pontos, em diáfise de fêmur de rato.

A cada incremento de carga aplicada ao material, o *software* no microcomputador automaticamente registrava a deformação correspondente (frequência de 60Hz), e em seguida, plotava os dados em gráfico correspondente à carga por deformação/deslocamento (Figura 3).

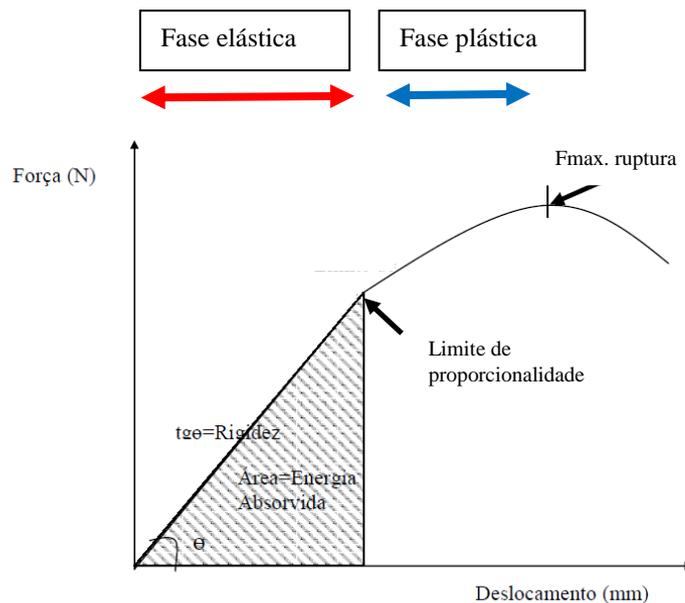


Figura 3: Representação esquemática da curva da carga de deformação por deslocamento de um teste de três pontos para osso.

A partir dos gráficos, foram obtidas a força máxima para ruptura (maior força aplicada à amostra até a fratura) e a rigidez (dada pela inclinação da curva na fase elástica). Quanto maior a rigidez menor a deformação resultante da aplicação da carga. Também foi avaliada a tenacidade das amostras, que corresponde à energia absorvida pelo osso sob a área da curva na fase elástica.

O ensaio de flexão no colo do fêmur foi realizado no mesmo equipamento descrito acima com a amostra fixada em um aparato mecânico que mantinha o fêmur em posição vertical (Figura 4). A partir do gráfico correspondente à carga por deformação/deslocamento gerado foram obtidas a força máxima para ruptura, a rigidez e a tenacidade.

O *software* emitiu um arquivo com todos os pontos adquiridos durante os ensaios [Tempo (s)  $\times$  Deslocamento (mm)  $\times$  Força (N)] e estes valores foram transferidos para planilhas Excel para posterior determinação das propriedades mecânicas do colo e da diáfise do fêmur.

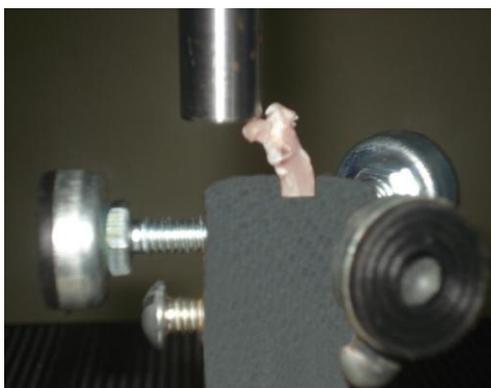


Figura 4. Fotografia do ensaio mecânico de flexão no colo do fêmur de rato.

## 4.8. Morfometria óssea

### 4.8.1. Preparação das amostras

O fêmur esquerdo foi dissecado e o osso, livre dos tecidos moles. O comprimento de cada fêmur, distância da borda superior da cabeça até a borda inferior do côndilo medial, foi aferido utilizando-se um paquímetro universal (Digimess – SP). O peso ósseo foi aferido em balança de precisão em miligramas (Marte – Brasil).

As amostras do fêmur esquerdo foram fixadas em formol 10%, neutro tamponado à temperatura ambiente. Posteriormente, os fêmures esquerdos foram colocados em cuba descalcificadora contendo solução com citrato de sódio, água destilada e ácido fórmico, e permaneceram nesta solução por 15 dias consecutivos.

Após a descalcificação, o fêmur foi medido com paquímetro universal (Digimess – SP) para que se realizasse, na porção média, um corte transversal para análise da espessura do osso cortical. Após a retirada dessa amostra, o osso foi cortado longitudinalmente ao meio, da

região proximal (cabeça do fêmur) até a sua porção média. As amostras retornaram à cuba descalcificadora, armazenadas em cassetes, onde permaneceram por mais sete dias.

Posteriormente, as amostras foram colocadas em álcool 70%, 80% e 90%, por 1 hora em cada. Em seguida, foram colocadas em álcool absoluto e xilol, em partes iguais, por 1 hora, e depois em xilol absoluto por 30 minutos. Após isso, as amostras foram incluídas em parafina. Em seqüência, foram obtidos cortes longitudinais da região do colo e cortes transversais da diáfise de 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, que foram montados em lâminas histológicas em *Entellan*. Depois disso, alguns cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise do volume trabecular ósseo e da espessura da diáfise, e outros em *picrosirius red* para análise das fibras de colágeno I e III (JUNQUEIRA et al., 1978).

#### **4.8.2. Análise do volume trabecular ósseo no colo do fêmur**

Para avaliação histomorfométrica, os cortes histológicos foram analisados através do sistema para análises Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, EUA). As imagens foram digitalizadas pelo fotomicroscópio (Olympus Biological CX31) com ocular de 10x e objetiva de 20x. No osso trabecular foram feitas de três a cinco imagens por animal, em campos distintos, garantindo maior fidelidade dos resultados encontrados. Foram contados cem pontos por imagem capturada, distribuídos sobre o tecido ósseo e outros componentes (tecido mielóide). Foi mensurada toda a região que continha tecido ósseo, utilizando a média simples como resultado.

#### **4.8.3. Análise da espessura cortical na diáfise do fêmur**

Os cortes foram analisados através do sistema para análises Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, EUA). As imagens foram digitalizadas pelo fotomicroscópio (Olympus Biological CX31) com ocular de 10x e objetiva de 10x. No osso cortical foram feitas duas imagens por animal, em campos distintos, com dez medidas por campo, para mensuração da espessura cortical, utilizando-se da média simples como resultado.

#### **4.8.4. Análise da quantidade de colágeno total, tipos I e III**

Para analisar as fibras de colágeno, as lâminas coradas com *picrosirius red* foram observadas em um microscópio de luz polarizada (Olympus AX-70), que transmite as imagens a um microcomputador equipado com o software Spot Basic 3.5.9 para identificação

dos tipos de colágeno. A partir de cada amostra foram registradas de três a cinco imagens utilizando-se objetiva de 20x. Depois de capturadas, as imagens foram analisadas através do software Image Pró-Plus<sup>®</sup> 4.5.0.29 com a finalidade de avaliar a proporção de fibras de colágeno dos tipos I e III. Sobre cada imagem foi sobreposta uma gradícula com dez linhas e dez colunas totalizando cem pontos de interseção. Os pontos coincidentes sobre as cores vermelha, laranja ou amarela representam fibras colágenas do tipo I. Os pontos verdes representam fibras do tipo III. Os pontos pretos representam ausência de fibra colágena. A partir dessa análise estabeleceu-se o total de fibras colágenas, e a porcentagem das fibras tipos I e III.

#### **4.9. Análise Estatística**

As pressuposições da Análise de Variância (ANOVA), de homogeneidade, de variâncias entre os grupos e de normalidade das observações, foram checadas e não foram detectadas violações que merecessem atenção.

As comparações entre as glicemias pós-indução do diabetes e a glicemia final dos grupos DE, DS, DEI e DSI, foram realizadas através de teste t de *Student* pareado, para verificar o efeito do tempo em cada tratamento.

As comparações entre as médias dos grupos para as variáveis peso corporal e glicemia após os tratamentos, peso, área e comprimento do fêmur, FCR, CMO, DMO, força máxima de fratura, rigidez, tenacidade, volume trabecular ósseo, espessura cortical, conteúdo de colágeno total, colágeno tipo I e colágeno tipo III foram realizadas através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Foram realizadas comparações considerando os seguintes fatores: controles *vs* diabéticos sem tratamento insulínico; controles *vs* diabéticos sob insulino terapia; diabéticos sem tratamento insulínico *vs* diabéticos sob insulino terapia.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados através do programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM). Para todas as análises, adotou-se como nível de significância  $P \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Peso corporal e glicemia

Os resultados referentes ao peso corporal dos animais, no início do experimento e ao final de oito semanas do programa de treinamento em natação, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Peso corporal dos animais no início do experimento e a após oito semanas do programa de treinamento em natação.

Grupos	N	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
CS	10	88,6 ± 1,12	347,1 ± 6,74
CE	10	90,8 ± 2,54	281,3 ± 11,14 *
DS	10	89,5 ± 1,82	160,4 ± 3,74 *
DE	10	88,9 ± 3,81	164,1 ± 12,56 §
DSI	10	91,8 ± 3,09	240,3 ± 6,17 *#
DEI	10	88,6 ± 1,69	254,7 ± 6,27 §+

Dados expressos em média ± EPM. (n) número de animais; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS, (§) diferente de CE, (#) diferente de DS e (+) diferente de DE, na mesma coluna ( $p \leq 0,05$ ).

Não foi observada diferença significativa entre os pesos dos animais dos diferentes grupos no início do experimento, comprovando homogeneidade entre eles, e todos aumentaram o peso corporal ao final do experimento. Os ratos diabéticos tiveram menor ganho de peso corporal em relação aos grupos controles ao longo do período experimental. Estes dados indicam que o DMT1 afetou negativamente o crescimento dos ratos. Entre os animais diabéticos houve diferença de ganho de peso corporal, sendo que os grupos tratados com insulina ganharam mais peso quando comparados aos não tratados. Isto indica que o tratamento com insulina amenizou os efeitos deletérios do DMT1 sobre o crescimento dos animais.

Entre os animais controles, houve redução do peso corporal dos animais do grupo CE quando comparados aos CS. Um dos benefícios do exercício aeróbico é a redução do peso corporal, provavelmente da massa gorda (IRVING et al., 2008). Huang et al. (2010) verificaram que os animais treinados apresentaram peso corporal inferior ao grupo controle não exercitado, quando submeteram ratos Wistar a natação com intensidades diferentes, 2%

do peso corporal e 4% do peso corporal, por uma hora de treinamento contínuo por dia. Observa-se, portanto, que o PTN utilizado no presente estudo, 90 minutos com sobrecarga de até 5% do peso corporal, foi suficiente para promover o aumento do metabolismo aeróbico, promovendo redução no peso corporal. Entretanto, Silva (2011), utilizando-se do mesmo protocolo de exercício com a sobrecarga de 4% do peso corporal, não encontrou diferença significativa no peso corporal do grupo exercitado e o grupo controle ao final do programa de exercício.

Os animais dos grupos diabéticos (DE, DS, DEI e DSI) apresentaram menor ganho de peso corporal em relação aos grupos controles ao longo do experimento. Apesar de as massas de tecido muscular e adiposo não terem sido mensuradas no presente estudo, sabe-se que a presença de insulina em indivíduos não diabéticos promove a síntese de lipídeos e inibe a sua degradação (KAHN et al., 2009). Outro fator a ser considerado, é que o DMT1, determina um estado catabólico, aumentando a utilização de ácidos graxos e acelerando a proteólise para obtenção de energia (HOWARTH et al., 2008).

Outros estudos prévios também demonstraram a influência negativa do DMT1 sobre o ganho de peso corporal (VERHAEGHE et al., 2000; GOMES et al., 2009a; NYMAN et al., 2011; SILVA, 2011). Contudo, Verhaeghe et al. e Gomes et al. encontraram diferenças nos pesos finais entre os grupos diabéticos treinados, que apresentaram ganho de peso corporal maior que os diabéticos sedentários. Esta diferença não foi observada neste experimento, assim como no estudo de Silva (2011), com o mesmo programa de exercício e modelo de diabetes experimental.

O exercício, segundo Kourtoglou (2011) e Stehno-Bittel (2012), melhora a utilização de glicose pelo músculo, aumenta a sensibilidade insulínica com maior captação de glicose via GLUT 4, e diminui a degradação em outros tecidos. No entanto, parece que a carga (duração e intensidade) do PTN aplicado no presente estudo não foi efetivo em diminuir a utilização de ácidos graxos e o catabolismo protéico, evitando maior ganho de peso corporal nos grupos diabéticos treinados.

Os grupos diabéticos tratados com insulina (DEI e DSI) apresentaram maior ganho de peso corporal comparados aos grupos diabéticos sem tratamento (DE e DS). A insulina é um importante hormônio anabólico e sua deficiência afeta a quantidade de outros hormônios, como o GH e IGF-1 (GOMES et al., 2009b; FUZELE & CLEMENS, 2012), o que pode causar retardo no crescimento de animais com diabetes induzidos por STZ (MENON et al., 1994; ZAPF et al., 1998). Portanto, sugere-se que o tratamento insulínico amenizou os efeitos

deletérios do DMT1 por aumentar os níveis de insulina e por promover menores alterações na secreção de outros hormônios anabólicos, o que permite explicar o maior ganho de peso dos animais diabéticos tratados com insulina em comparação aos não tratados. De forma similar, o estudo de Li et al. (1995) demonstrou maior ganho de peso corporal nos grupos de animais diabéticos tratados com insulina, comparados aos grupos de animais diabéticos sem tratamento insulínico. No entanto, recentemente, Erdal et al. (2012) não encontraram diferença de peso corporal entre grupos de animais com diabetes induzido por STZ tratados e não tratados com insulina.

Na tabela 3 são apresentados os dados referentes à glicemia dos animais, durante três diferentes períodos do experimento.

Tabela 3. Glicemia de jejum dos animais no início do experimento, pós-indução do diabetes e no final do período experimental.

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Glicemia Inicial (mg/dL)</b>	<b>Glicemia 7 dias Pós indução do diabetes(mg/dL)</b>	<b>Glicemia Final (mg/dL)</b>
<b>CS</b>	10	71,5 ± 1,89	-	94,3 ± 6,41
<b>CE</b>	10	72,2 ± 5,66	-	80,0 ± 3,17
<b>DS</b>	10	72,1 ± 5,78	409,0 ± 28,72	573,3 ± 12,13 *##
<b>DE</b>	10	73,4 ± 4,26	367,6 ± 19,46	504,4 ± 30,43 § ++
<b>DSI</b>	10	62,1 ± 1,08	392,1 ± 16,85	312,1 ± 44,20 *#
<b>DEI</b>	10	69,1 ± 3,11	365,0 ± 16,18	339,6 ± 50,22 § +

Dados expressos em média ± EPM. (n) número de animais. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS, (§) diferente de CE, (#) diferente de DS e (+) diferente de DE na mesma coluna ( $p \leq 0,05$ );(##) diferente de DS e (++) diferente de DE na primeira coluna à esquerda ( $p \leq 0,05$ ).

A glicemia dos animais dos grupos diabéticos não apresentou diferença estatística no início do experimento e nem 7 dias após a indução. Entretanto, 7 dias após a indução, os grupos diabéticos apresentaram hiperglicemia (glicemia > 300 mg/dL), configurando a destruição das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas pela STZ (AKBARZADEH et al., 2007).

A glicemia permaneceu elevada até o final do experimento nos animais diabéticos, com valores maiores ( $p < 0,05$ ) nos grupos sem tratamento insulínico (DE e DS) quando

comparados aos grupos tratados (DEI e DSI). No entanto, não houve, em nenhum dos grupos diabéticos ou controles, redução da glicemia em resposta ao PTN.

Segundo Hayes e Kriska (2008), há inconsistência de resultados nos estudos sobre efeitos do exercício e melhor controle glicêmico no DMT1. Por exemplo, Gomes et al. (2003), utilizando de um modelo de exercício semelhante ao deste estudo (natação, uma hora por dia, cinco dias por semana) também não observaram redução da glicemia em ratos com DMT1 induzido por Alloxan e exercitados comparados aos diabéticos não exercitados. Da mesma forma, Loganathan et al. (2007), utilizando treinamento de corrida em esteira, 60 minutos até 20 m/min, cinco dias por semana, durante 9 semanas, não encontraram redução na glicemia de ratos com diabetes induzido por STZ. Todavia, Gomes et al. (2006) e Leme et al. (2009), observaram redução da glicemia após um programa de natação, 1 hora por dia, com carga até 5% do peso corporal, durante 6 semanas no primeiro estudo e 8 semanas no segundo estudo em ratos Wistar com diabetes induzido por Alloxan, em comparação aos sedentários. O melhor controle glicêmico pode ter ocorrido em função do aumento da sensibilidade das células musculares à insulina, que é um efeito conhecido do exercício (KOURTOGLOU, 2011).

A ausência dos efeitos do PTN sobre a glicemia dos grupos diabéticos no presente estudo pode ser devido à destruição de células beta pancreáticas pela STZ, evento próprio do DMT1. Por exemplo, Howard et al. (2009) encontraram menor porcentagem de células insulino-positivas nas ilhotas pancreáticas de ratos Wistar injetados com STZ comparados aos animais controles e atribuíram os resultados à ação diabetogênica da STZ. Além disso, a utilização de um programa de exercício de corrida em esteira com intensidade de até 18m/min (inclinação de 5%), cinco vezes por semana, uma hora por dia, durante 12 semanas, não melhorou o controle glicêmico dos animais diabéticos (Howard et al., 2009).

Os grupos diabéticos tratados com insulina (DEI e DSI), apesar de apresentarem níveis glicêmicos elevados (> 300 mg/dL) mostraram glicemia significativamente menor em relação aos grupos diabéticos sem tratamento insulínico (DE e DS). Do mesmo modo, Li et al. (1995) observaram redução da glicemia nos animais diabéticos tratados com insulina e exercício associado à insulina, comparados aos grupos diabéticos sedentários e exercitados. A resposta à ação da insulina acontece em razão do aumento do transporte de glicose para os tecidos alvos através da ativação dos IRS (KOURTOGLOU, 2011), ou em função do efeito do exercício no músculo, por meio da contração muscular. O exercício aumenta, tanto a expressão, como a translocação dos transportadores de glicose (GLUT-4) para a membrana

plasmática, aumentando, conseqüentemente, a captação dessa hexose (STEHNO-BITTEL, 2012; FUZELE & CLEMENS, 2012). No entanto, Erdal et al. (2012), não encontraram redução significativa na glicemia dos ratos Wistar com DMT1 induzido por STZ (65 mg/kg peso corporal) insulinizados em comparação com diabéticos não tratados.

## 5.2. Frequência cardíaca de repouso

Os resultados referentes à FCR dos animais dos grupos experimentais, após o PTN são apresentados na figura 5.

Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as FCR dos animais dos grupos controles e diabéticos tratados com insulina (CE = DEI e CS = DSI). Os animais diabéticos sem tratamento insulínico tiveram menor FCR ( $p \leq 0,05$ ), em relação aos animais dos grupos controles e aos animais diabéticos sob insulino terapia (DE < CE e DEI; e DS < CS e DSI). Ao comparar a FCR dos grupos exercitados e seus respectivos controles, observou-se que os grupos CE e DEI mostraram menor FCR, comparados à CS e DSI, respectivamente. Não foi observada diferença na FCR entre os grupos DE e DS.

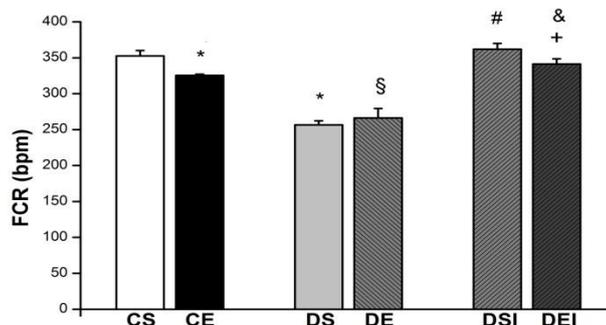


Figura 5 - Frequência cardíaca de repouso (FCR) dos animais dos grupos experimentais no final do período experimental. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS, (§) diferente de CE, (#) diferente de DS, (+) diferente de DE e (&) diferente de DSI ( $p \leq 0,05$ ).

A medida da FCR no final do período experimental foi avaliada no intuito de verificar o efeito do programa de exercício adotado sobre a capacidade aeróbica dos animais. Sabe-se que a bradicardia de repouso é um bom indicador de adaptação cardiovascular ao treinamento

aeróbico (NEGRÃO et al., 1992; BRUM et al., 2004). O exercício físico diminui a FCR, possivelmente por reduzir a FC intrínseca e/ou atividade simpática e/ou aumento do tônus vagal (COSTA et al., 2004).

No presente estudo foi observado que o PTN causou bradicardia de repouso nos animais controles e nos diabéticos sob insulino terapia. Em estudos prévios (EVANGELISTA et al., 2005; CARNEIRO-JUNIOR et al., 2013), também observaram bradicardia de repouso em resposta ao treinamento aeróbico em esteira. Os resultados desse estudo mostram que o PTN foi efetivo em melhorar a capacidade aeróbica dos animais controles e sob tratamento insulínico, embora a capacidade de exercício e os mecanismos responsáveis pela bradicardia não foram avaliados.

Em relação aos grupos diabéticos sem tratamento insulínico, não foi observada diferença na FCR (DE = DS). Lahaye et al. (2012), também não encontram diferença na FCR em animais diabéticos treinados em esteira, 5 dias por semana, com intensidade progressiva até atingir 25m/min. Apesar disso, em estudos anteriores onde ratos com DMT1 induzido por STZ treinaram em esteira, duas vezes por dia, 1 hora por sessão, durante 10 semanas, e com velocidade progressiva até atingir 31m/min (DE ANGELIS et al., 2000) e 1,2 Km/h (COSTA et al., 2004), foi observada atenuação na FCR. No entanto, parece que o PTN aplicado neste estudo não foi capaz de causar adaptações cardiovasculares suficientes para atenuar a resposta da FCR nos animais diabéticos treinados sem tratamento insulínico.

No presente estudo, os animais diabéticos sem tratamento insulínico apresentaram redução na FCR. A neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) é uma das complicações do DMT1 e causa lesões nas fibras nervosas autonômicas que inervam o coração e os vasos sanguíneos. Conseqüentemente, ocorrem anormalidades no controle do ritmo cardíaco (FOSS-FREITAS et al., 2008). Além disso, a bradicardia observada em diabéticos pode refletir uma alteração do tônus vagal para o coração, indicando disfunção autonômica (DE ANGELIS et al., 2000). Estudos anteriores (CHOI et al., 2002; SCHAAN et al., 2008) observaram redução da FCR em animais com DMT1 induzido por STZ.

No entanto, os animais diabéticos sob insulino terapia mostraram resultados semelhantes aos dos grupos controles, demonstrando efeito positivo do tratamento insulínico sobre a FCR. Estes resultados estão de acordo com os de outros trabalhos que verificaram efeitos positivos da insulino terapia na função cardíaca. Por exemplo, Howwarth et al. (2006b) mostraram recuperação da FCR após tratamento insulínico em animais com diabetes induzido por STZ. Recentemente, Lahaye et al. (2012) observaram redução da FCR em ratos

diabéticos sem tratamento insulínico, tanto nos sedentários quanto nos exercitados em esteira, mas nos grupos sob insulinoaterapia não houve alteração da FCR. No entanto, o exercício de corrida combinado com a insulinoaterapia não diminuiu de forma significativa a FCR. A diferença do presente estudo com relação ao de Lahaye et al. (2012), pode ser devido a diferença na idade dos animais no início dos experimentos. O estudo citado começou a treinar os animais com 12 semanas de idade, enquanto no presente estudo, os animais iniciaram o PTN com 5 semanas. Outro fator seria a diferença na dose de STZ para indução do diabetes. No presente estudo foi utilizado 65 mg/kg do peso, enquanto no estudo de Lahaye et al. foi utilizado 45 mg/kg do peso. Estes fatores podem desencadear diferença quanto à severidade do diabetes e causar alterações no sistema cardiovascular, o que possivelmente explicaria a diferença nos resultados.

### 5.3. Propriedades estruturais do fêmur

#### 5.3.1. Peso e comprimento

Os resultados referentes ao peso e comprimento do fêmur dos animais dos grupos experimentais, ao final das oito semanas do PTN, estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Peso e comprimento do fêmur direito dos ratos ao final das oito semanas do programa de treinamento em natação.

Grupos	n	Peso (g)	Comprimento (cm)
CS	10	0,772 ± 0,02	3,44 ± 0,03
CE	10	0,793 ± 0,02	3,48 ± 0,02
DS	10	0,456 ± 0,02 *	2,91 ± 0,03 *
DE	10	0,457 ± 0,03 §	2,89 ± 0,06 §
DSI	10	0,590 ± 0,01 * #	3,15 ± 0,03 * #
DEI	10	0,646 ± 0,03 § +	3,23 ± 0,03 § +

Dados expressos em média ± EPM. (n) número de animais. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS, (§) diferente de CE, (#) diferente de DS e (+) diferente de DE na mesma coluna ( $p \leq 0,05$ ).

O grupo CE não apresentou diferença no peso e comprimento do fêmur em relação ao grupo CS, portanto, estes parâmetros não foram influenciados pelo PTN. O exercício também não alterou o peso e comprimento do fêmur dos grupos diabéticos não tratados e tratados com

insulina (DE = DS e DEI = DSI). No entanto, houve diferença significativa entre os grupos diabéticos e os grupos controles. Os grupos DS e DE apresentaram peso e comprimento femoral significativamente menor, comparados aos CE e CS e aos DEI e DSI. Os grupos tratados com insulina, apesar de apresentarem peso femoral maior que os grupos DE e DS, exibiram menor peso femoral que os grupos controles (DEI < CE e DSI < CS).

Portanto, observa-se que o DMT1 afetou negativamente o crescimento dos animais e que o PTN aplicado não afetou o peso e comprimento do fêmur dos animais diabéticos e controles. Todavia, o tratamento insulínico amenizou a redução do peso e do comprimento femoral provocada pelo DMT1.

O menor peso femoral dos animais diabéticos (DE e DS) deve-se, possivelmente, a deficiência de insulina que é necessária, juntamente com o IGF-1, para induzir respostas metabólicas e de crescimento (FULZELE & CLEMENS, 2012). A falta de insulina diminui a expressão de fatores de transcrição *Cbfa1* e *Runx 2* envolvidos na diferenciação de osteoblastos, podendo provocar retardamento na ação osteogênica pela diminuição da atividade da fosfatase alcalina óssea e expressão de colágeno tipo I (LU et al., 2003). O DMT1 pode aumentar também a excreção urinária de cálcio (ZHANG et al., 2011), e a falta de IGF-1 pode reduzir o volume ósseo e produzir mineralização óssea defeituosa (ZHANG et al., 2002). Apesar da excreção de cálcio não ter sido medida no presente estudo, Zhang et al. (2011) encontraram maior excreção de cálcio urinário em camundongos DBA/2J diabéticos induzidos por STZ comparados aos controles após a quinta semana da indução do diabetes. Para examinar as ações locais da sinalização de IGF no tecido esquelético em um contexto fisiológico, Zhang et al. (2002) usaram recombinação genética para interromper seletivamente o gene que codifica o receptor de IGF tipo 1 (IGF1R) nos osteoblastos de camundongos. Os animais portadores dessa mutação específica mostraram uma diminuição na taxa de aposição mineral e um menor volume ósseo após 6 semanas de estudo.

No presente estudo os animais tratados com insulina apresentaram peso do fêmur significativamente maior em relação aos diabéticos não tratados (DEI > DE e DSI > DS); porém, inferiores aos grupos controles (CE > DEI e CS > DSI). Como a glicemia continuou elevada (> 300 mg/dL) nos grupos insulinizados, apesar dos valores menores em comparação com os grupos DE e DS, os resultados do peso femoral podem estar relacionados à deficiência de insulina, própria do DMT1. Assim, também, o tratamento insulínico pode ter amenizado os efeitos deletérios. Outro fato, e de acordo com Gandhi et al. (2005), é que a insulina pode ter efeito direto no osso promovendo maior proliferação celular e maior formação óssea. Dessa

forma, o aumento dos níveis de insulina promovido pela insulinização pode explicar o maior peso do fêmur nos grupos DEI e DSI em relação aos DE e DS, apesar dos níveis de insulina não terem sido medidos.

No estudo de Gandhi et al. (2005), a administração de insulina intramedular foi utilizada em ratos Wistar BB diabéticos com fratura no fêmur, para investigar os potenciais efeitos diretos da insulina sobre a cicatrização óssea. A administração de insulina no local da fratura normalizou a proliferação celular e posteriormente a mineralização óssea, sem afetar os parâmetros sistêmicos de glicose no sangue. Foi demonstrado também que os níveis de insulina sistêmica no grupo controle estavam significativamente maiores do que nos grupos diabéticos, antes da fratura, 2, 4 e 7 dias após fratura, indicando a presença de hipoinsulinemia em ambos os grupos diabéticos, sem administração e com administração de insulina intramedular.

O menor comprimento do fêmur, indicativo de retardo no crescimento dos animais diabéticos não tratados, também pode ser consequência da deficiência de insulina que possui importante papel na regulação anabólica do metabolismo ósseo (THRAILKILL et al., 2005a; BLAKYTNY et al., 2011). Nesse sentido, Souza et al. (2005), verificaram alterações nas placas epifisárias de ratos com DMT1 induzido por Alloxan (35mg/kg de peso) e degenerações nos condrócitos dos animais diabéticos que podem reduzir o crescimento ósseo em virtude de prejuízo no molde precursor. No estudo de Silva et al. (2009), também foi encontrado redução na espessura da placa epifisária de ratos Sprague-Dawley, com 12 semanas de diabetes induzido por STZ. Nyman et al. (2011) também encontram menor comprimento da diáfise do fêmur após 15 semanas de diabetes no mesmo modelo.

O tratamento insulínico pode melhorar o crescimento ósseo por ação direta no osso (GANDHI et al., 2005) e por diminuição dos níveis glicêmicos que prejudicam a proliferação de osteoblastos, baixam a expressão OPG e acarretam diminuição de osteocalcina e deposição de cálcio (BLAKYTNY et al., 2011). Thrailkill et al. (2005b), mostraram que o tratamento insulínico preservou a formação óssea prejudicada pelo DMT1 em animais experimentais.

Por fim, o PTN utilizado não afetou o peso e o comprimento do fêmur em nenhum dos grupos treinados, apesar do exercício gerar tensão mecânica e poder iniciar uma cascata de eventos em resposta à carga mecânica imposta (TURNER & ROBLING, 2003 e ROBLING et al., 2006). Parece, portanto, que a carga de exercício usada (duração e intensidade) não foi suficiente para afetar o peso e o comprimento no fêmur.

### 5.3.2 Área, conteúdo mineral e densidade mineral

Os dados da área femoral estão apresentados na Figura 6A. O grupo CS apresentou valores significativamente maiores (16%) que o grupo DS. O grupo CE também revelou valores significativamente maiores (23%) que o grupo DE, evidenciando o efeito prejudicial do DMT1 sobre o crescimento ósseo nos grupos DE e DS. Os grupos diabéticos tratados com insulina, por sua vez, apresentaram valores menores em relação aos grupos controles, no entanto, essa diferença não foi significativa (CE = DEI e CS = DSI). Os grupos insulinizados também revelaram valores significativamente maiores que os grupos não tratados com insulina (DEI > DE, 20%) e (DSI > DS, 10%). Portanto, observa-se que o PTN aplicado não afetou a área do fêmur dos animais diabéticos e dos controles. Entretanto, o tratamento insulínico protegeu o fêmur de prejuízos provocados pelo DMT1. Estes dados são coerentes com os do peso e do comprimento femoral apresentados acima.

Os animais do grupo DS apresentaram valores do CMO significativamente menores (67%) em relação aos do grupo CS (Figura 6B). Do mesmo modo, o grupo DE demonstrou valores significativamente menores (72%) em relação aos do grupo CE, ressaltando o prejuízo de deposição mineral no tecido ósseo causado pelo DMT1. Os grupos insulinizados revelaram valores significativamente menores em relação aos grupos controles (DEI < CE, 37% e DSI < CS, 34%). No entanto, esses mesmos grupos mostraram valores significativamente maiores em relação aos grupos diabéticos não tratados com insulina (DEI > DE, 58% e DSI > DS, 52%). Esses resultados indicam efeito da falta de insulina na redução da perda de mineral óssea nos animais diabéticos. O PTN, entretanto, não afetou o CMO do fêmur dos animais diabéticos e dos controles.

A DMO do grupo CE foi significativamente maior (9%), em relação ao grupo CS, evidenciando a influência positiva do programa de exercício (Figura 6C). Contudo, os animais dos grupos DE e DEI não apresentaram valores estatisticamente diferentes dos seus respectivos controles DS e DSI. O PTN não influenciou a DMO do fêmur de animais diabéticos. Os grupos CE e CS demonstraram valores significativamente maiores que os grupos diabéticos sem tratamento insulínico (CE > DE, 64% e CS > DS, 63%). Dessa forma, assim como no CMO, o tratamento insulínico, diminui o efeito maléfico na DMO, pois influencia a deposição mineral. O grupo DEI apresentou valores significativamente maiores (49%), em relação aos do grupo DE, enquanto o grupo DSI evidenciou valores significativamente maiores (47%), comparados aos do grupo DS.

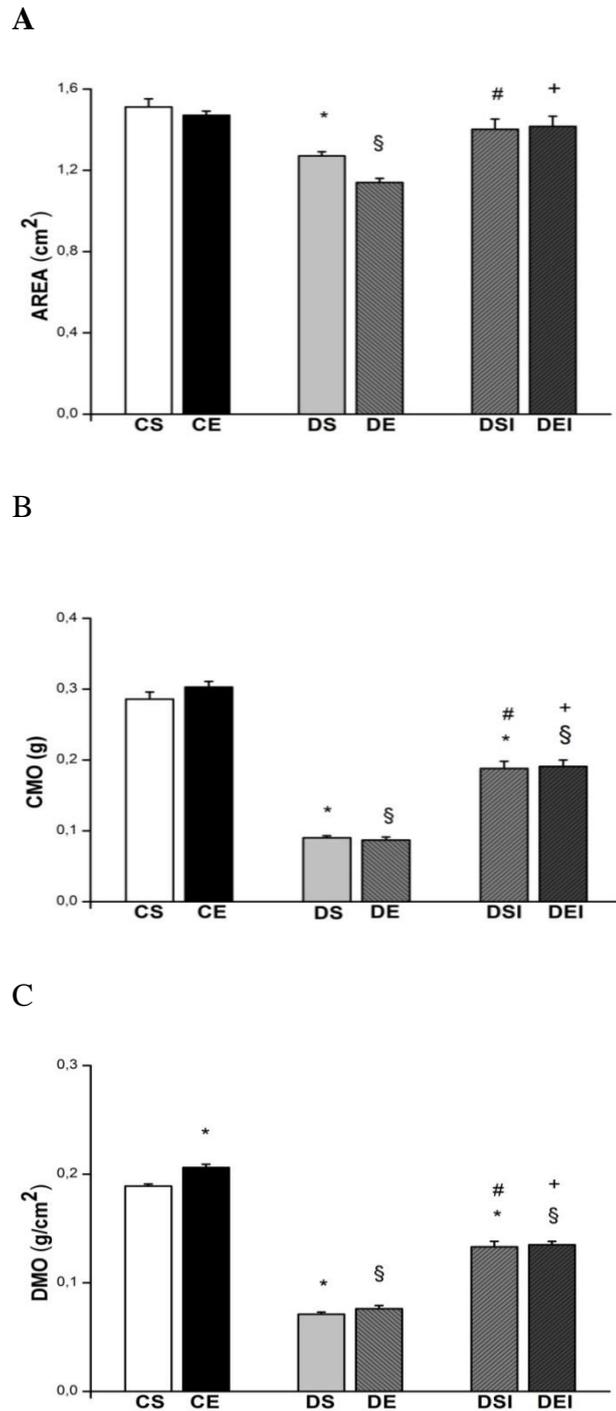


Figura 6 – Área (A), conteúdo mineral ósseo (CMO) (B) e densidade mineral óssea DMO (C) do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina, (\*) diferente de CS, (§) diferente de CE (#) diferente de DS e (+) diferente de DE ( $p \leq 0,05$ ).

A deficiência de insulina, a hiperglicemia crônica, e as baixas concentrações de IGF-1 podem reduzir a atividade osteoblástica, determinando decréscimo na formação óssea (LU et

al., 2003 e THRAIKILL et al., 2005a). Desta forma, como verificado por Silva et al. (2009) e Souza et al. (2005), que encontraram alterações nas placas epifisárias de ratos diabéticos induzidos por STZ e por Alloxan, a falta de insulina e, conseqüentemente, redução de IGF-1 nos animais diabéticos podem influenciar negativamente o crescimento ósseo, e uma vez que o cálculo da área óssea depende do comprimento do osso, o diabetes pode determinar menor área.

Os resultados deste estudo estão de acordo com outros trabalhos que encontraram menor área óssea em pacientes diabéticos. Nyman et al. (2011) observaram resultados inferiores na área femoral de ratos após dez semanas de DMT1 induzido por STZ. Da mesma forma, Silva (2011) utilizando o mesmo modelo de DMT1 do presente estudo, encontrou menor área femoral nos animais diabéticos. Em humanos, Moyer-Mileur et al. (2008) revelaram resultados de área e CMO menores em garotas adolescentes diabéticas com controle insulínico comparadas a grupo controle pareado. Todavia, a insulinização pode reverter ou reduzir as alterações no metabolismo ósseo devido à falta de insulina em diabetes experimental (THRAIKILL et al., 2005b), o que corrobora aos resultados do presente estudo, pois os grupos tratados com insulina não apresentaram diferença estatística quanto à área femoral e mostram resultados de CMO maiores, comparados aos grupos diabéticos sem tratamento insulínico.

A deposição mineral está diretamente ligada às células osteoblásticas. A deficiência de insulina prejudica a formação óssea, pois reduz a capacidade de proliferação e a atividade dos osteoblastos (LU et al., 2003 e PERRINI et al., 2008). Além disso, o menor CMO pode estar associado ao aumento da excreção de cálcio urinário provocada pelo DMT1. Zhang et al. (2011) evidenciaram aumento na proteinúria de animais com DMT1 induzidos por STZ, caracterizando nefropatia diabética. Ademais, outros fatores como menor expressão de genes receptores de vitamina D (VDR), que atuam na absorção intestinal de cálcio, menor expressão de proteínas transportadoras de cálcio nos tubos renais e aumento da excreção de cálcio urinário, foram evidenciados nos animais diabéticos do estudo de Zhang et al. (2011). Em humanos, Saha et al. (2009) e Moyer-Mileur et al. (2008), trabalhando com adolescentes com DMT1 e pares saudáveis, evidenciaram CMO reduzidos nos portadores de DMT1, resultados semelhantes ao deste estudo. No estudo de Moyer-Mileur et al., os níveis de excreção dos minerais cálcio, fósforo e magnésio foram analisados na urina, no entanto, apenas a quantidade de magnésio foi significativamente maior nos portadores de DMT1.

Valores reduzidos de DMO nos animais diabéticos, observados neste estudo, estão de acordo com os de outros estudos em humanos e em modelos animais (MASTRANDREA et al, 2008; MOYER-MILEUR et al., 2008; SILVA et al., 2009; SILVA, 2011; ERDAL et al., 2012) e refletem os efeitos da falta do anabolismo da insulina e IGF-1 no metabolismo ósseo. O tratamento insulínico pode possibilitar a ação direta da insulina no osso (GANDHI et al., 2005) ou diminuir os níveis de glicemia que prejudicam a proliferação de osteoblastos e determinam diminuição de osteocalcina e deposição de cálcio (BLAKYTTY et al., 2011). No presente estudo, o tratamento insulínico melhorou o CMO e a DMO dos animais diabéticos em relação aos grupos não tratados, de forma semelhante ao observado por Erdal et al. (2012), trabalhando com ratos Wistar portadores de diabetes induzida por STZ.

O exercício físico submete o osso à carga mecânica estimulando a osteogênese. Neste sentido, o efeito piezoelétrico aumenta a resposta osteoblástica e, conseqüentemente, a massa e a DMO (ROBLING et al., 2006). O efeito do exercício sobre a DMO verificado no grupo CE em relação ao grupo CS, no entanto, não foi identificado nos grupos diabéticos. Resultados semelhantes foram encontrados previamente por Silva (2011) no mesmo modelo de diabetes e exercício em ratos Wistar não tratados com insulina.

A presença de insulina e IGF-1 têm importância fundamental para promover os efeitos anabólicos no osso, sintetizar o colágeno, e aumentar a deposição de minerais. Diante da redução dos níveis de insulina e dos menores níveis de IGF-1, a síntese da matriz óssea é inapropriada, interferindo na calcificação do osso (BILEZIKIAN et al., 2008), justificando a ausência de aumento do CMO nos animais DE e o menor aumento nos animais do grupo DEI.

A combinação do PTN com o tratamento insulínico, no grupo DEI, não foi capaz de gerar um estímulo suficiente para manter ou aumentar a DMO nos animais diabéticos. Todavia, em estudo com humanos, Maggio et al. (2012) submeteram crianças saudáveis e portadoras de DMT1 a um programa de exercício de sustentação do peso corporal durante nove meses, 180 minutos por semana, e observaram acréscimo de massa óssea e decréscimo nos marcadores de reabsorção óssea. Os benefícios alcançados podem estar relacionados ao tipo de exercício (impacto vs. sem impacto), duração do programa de exercício e do melhor controle glicêmico com a insulinização e com a severidade do DMT1.

## 5.4. Propriedades mecânicas do fêmur

### 5.4.1. Propriedades mecânicas do colo do fêmur

Foram avaliadas a rigidez, a força máxima de fratura e a tenacidade no colo do fêmur. Não houve diferença estatística na rigidez do colo do fêmur entre os grupos CE e CS (Figura 7A), estabelecendo que o programa de exercício adotado não afetou esse parâmetro. Do mesmo modo, o exercício também não alterou a rigidez do colo do fêmur dos animais diabéticos (DE = DS e DEI = DSI). Entretanto, o grupo CE demonstrou valores de rigidez significativamente maiores quando comparados ao grupo DE (38%), e o grupo CS apresentou valores de rigidez superior a DS (27%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,10$ ). Os resultados apresentados pelos grupos diabéticos DE e DS em relação aos controles CE e CS, apontam um prejuízo dos animais diabéticos na deposição mineral. Entre os grupos DS e DSI, e os grupos DE e DEI, também não houve diferença significativa (DE = DS, DEI = DSI). Todavia, o grupo CE apresentou maior rigidez se comparado ao grupo DEI (31%) e o grupo CS demonstrou maior rigidez que o DSI (37%). Isto indica, mais uma vez, o efeito deletério do DMT1.

Em relação à força máxima de fratura (Figura 7B), os grupos CE e CS apresentaram resultados significativamente maiores em relação aos grupos diabéticos. O grupo CE mostrou resultados maiores tanto em relação ao grupo DE (59%) quanto ao grupo DEI (31%). O grupo CS evidenciou resultados superiores tanto em relação ao DS (63%), quanto em relação ao DSI (38%), o que demonstra os efeitos deletérios do DMT1. Os grupos de animais diabéticos que receberam tratamento insulínico, DEI e DSI, apresentaram maior força máxima quando comparados aos grupos DE (40%) e DS (41%), respectivamente, o que demonstra o efeito da insulina em amenizar os danos do DMT1 na força óssea.

Observou-se que o PTN aplicado aos animais resultou em efeitos benéficos significativos nos grupos diabéticos, mas apenas uma tendência no grupo controle ( $p = 0,08$ ). O grupo DE mostrou resultado superior ao DS (25%), o grupo DEI revelou aumento de 23% comparado ao DSI, e o grupo CE apresentou resultado superior ao CS (15%). Isto indica que o PTN usado parece ser eficiente em aumentar a força máxima de fratura no colo dos animais, mesmo em condição de deficiência de insulina.

Os resultados da tenacidade do colo do fêmur (Figura 7C) mostram que os grupos CE e CS, apresentaram resultados significativamente maiores em relação aos grupos diabéticos. No grupo CE a tenacidade foi maior quando comparada ao grupo DE (56%), e ao DEI (31%).

O grupo CS também mostrou resultados superiores tanto em relação ao DS (70%) quanto ao DSI (40%), o que evidencia os danos do DMT1 sobre a capacidade de absorver energia quando o colo do fêmur é deformado. Os grupos DEI e DSI apresentaram maior tenacidade quando comparados ao DE e ao DS, respectivamente. Foi observado aumento de 25% no grupo DEI em relação ao DE e aumento de 50% no grupo DSI em relação ao DS, o que demonstra o efeito amenizador da insulina sobre os danos do DMT1 na tenacidade do colo do fêmur. Os dados mostram que o PTN aplicado resultou em efeito positivo somente no grupo DE em comparação ao DS, com resultado superior a 40%, indicando um efeito benéfico do exercício mesmo na falta de insulina.

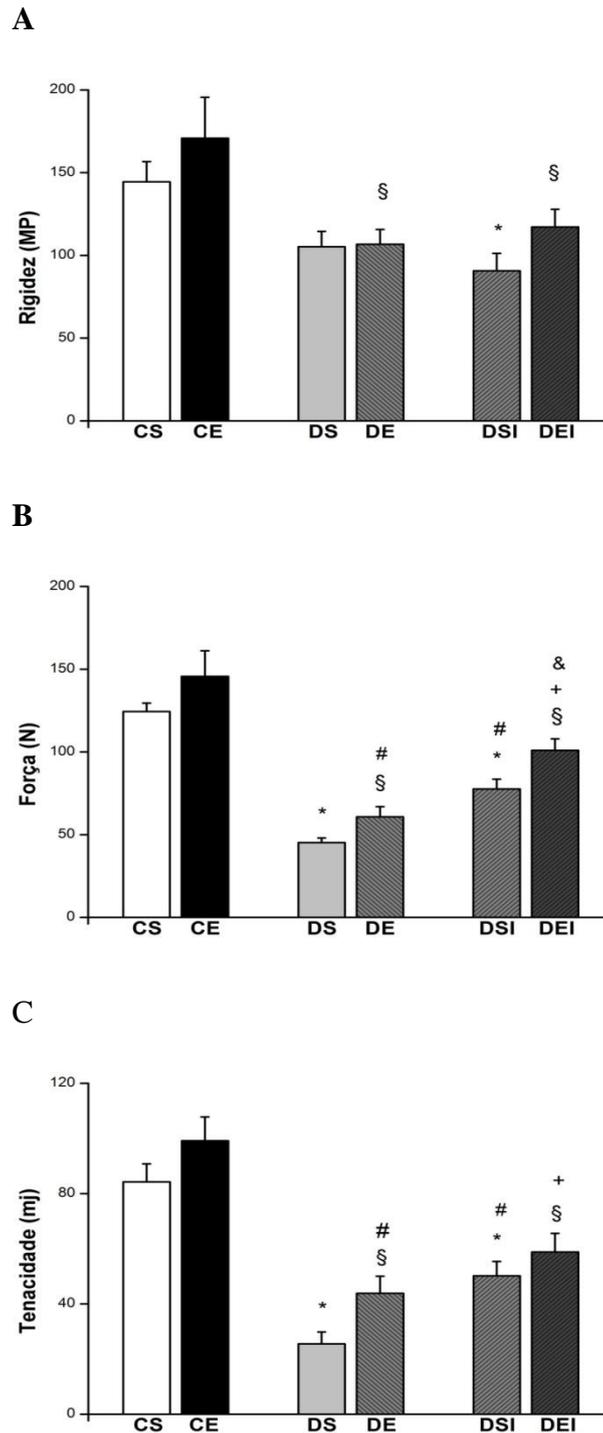


Figura 7 – Rigidez (A), força máxima de fratura (B) e tenacidade (C) no colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS; (§) diferente de CE; (#) diferente de DS; (+) diferente de DE; (&) diferente de DSI ( $p \leq 0,05$ ).

Os parâmetros CMO e DMO, assim como as propriedades materiais do osso são fatores importantes para determinar a qualidade e a força óssea. A matriz óssea é composta

por dois componentes básicos: o mineral que fornece a rigidez ao osso e as fibras de colágeno que provêm resistência à tensão e tenacidade (ISAKSSON et al., 2009 e SAITO & MARUMO, 2010). A menor rigidez, força e tenacidade óssea aumentam as probabilidades de fraturas (LIRANE-GALVÃO & CASTRO, 2010), parâmetros que estão diminuídos em diabéticos (SILVA et al., 2009 e SAITO & MARUMO, 2010).

Neste estudo, os três parâmetros mecânicos analisados (rigidez, força máxima e tenacidade) estavam diminuídos nos grupos diabéticos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores neste mesmo modelo (SILVA et al., 2009; SILVA, 2011; ERDAL et al., 2012). Isto pode ser explicado pelos prejuízos causados pela deficiência de insulina provocada pela STZ ao osso (REDDY et al., 2002; NYMAN et al., 2011; ERDAL et al., 2012). Como mencionado anteriormente, os animais diabéticos apresentaram menor CMO (Figura 6B) que os controles, o que possibilita explicar a menor rigidez observada nos animais diabéticos (Figura 7A), parâmetro este relacionado ao componente mineral do osso. Outro fator que pode elucidar a redução dos três parâmetros na região do colo do fêmur dos animais diabéticos é o dano causado pela DMT1 nas ligações cruzadas de colágeno. O aumento das concentrações de glicose resulta em glicação, uma maior produção de AGEs, que pode causar alterações nas ligações cruzadas enzimáticas de colágeno e afetar o processo de mineralização óssea, o que resulta em desestabilização biológica e deficiência mecânica do osso (VASHISHTH, 2007; SAITO & MARUMO, 2010; BLAKYYNY et al., 2011).

Os melhores resultados mecânicos encontrados nos grupos diabéticos insulinizados em relação aos não tratados (DE e DS) podem ser explicados pelo papel da insulina no metabolismo ósseo e a possibilidade da insulina interferir na formação óssea por efeitos diretos. Através de aplicações diretas de insulina e IGF-1 no tecido e células ósseas, foram observados aumentos na diferenciação e proliferação celular de osteoblastos (SPENCER et al., 1991; YANG et al., 2010). Indiretamente, o tratamento insulínico também pode viabilizar um melhor controle da glicemia e de outros parâmetros metabólicos que, quando irregulares, prejudicam a função das células osteoblásticas (TRAILKILL et al., 2005 b).

O exercício físico regular aumenta a massa e a força do osso, tanto em humanos como em modelos animais (FUJIMURA et al., 1997; SAINO et al., 2003; ISAKSSON et al., 2009), pois a estimulação mecânica incitada pode melhorar as propriedades mecânicas e materiais do osso, pode modelar sua arquitetura, afetar o conteúdo da rede colágeno ou sua estabilidade molecular, assim como aumentar a deposição de mineral na região óssea estimulada (GUADALUPE-GRAU et al., 2009). No presente estudo, os resultados indicam efeitos

benéficos do PTN nas propriedades mecânicas do fêmur tanto nos animais diabéticos não tratados como nos insulinizados (tenacidade e força). Estes dados reforçam a importância da ação muscular proporcionada pela natação para o fortalecimento ósseo, assim como a relevância do controle insulínico em indivíduos diabéticos engajados em programas de exercício, pois os efeitos obtidos pelos animais insulinizados foram superiores.

Todavia, em contraste a estudos prévios (HUANG et al., 2003; HUANG et al., 2010; SILVA, 2011), o PTN usado aqui não foi eficiente em aumentar de forma significativa as propriedades mecânicas analisados no colo do fêmur dos animais não diabéticos. Neste estudo houve apenas uma tendência ( $p = 0,08$ ) em relação à maior força máxima de fratura do grupo CE comparado ao CS. A falta de efeitos significativos do PTN aplicado neste estudo nas propriedades mecânicas dos animais não diabéticos, em comparação aos estudos mencionados acima, Huang et al. e Silva, podem ser devido a diferença na idade dos animais no início dos experimentos. Os estudos citados começaram a treinar os animais com 7 e 10 semanas de idade, enquanto no presente estudo, os animais iniciaram o PTN com 5 semanas. No entanto, quando os parâmetros mecânicos do presente estudo foram normalizados pelo peso corporal, os efeitos do PTN foram evidenciados, tornaram-se significativos na força máxima e na tenacidade dos animais não diabéticos (item 5.4.3).

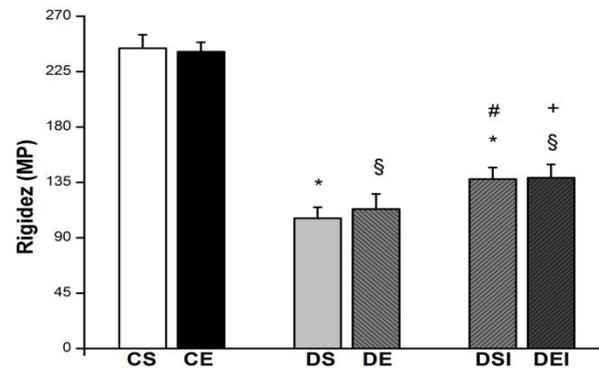
#### **5.4.2. Propriedades mecânicas da diáfise do fêmur**

As propriedades mecânicas rigidez, força máxima de fratura e tenacidade foram avaliadas também na diáfise do fêmur. Os dados relativos à rigidez da diáfise do fêmur estão apresentados na Figura 8A. Nos grupos CE e CS foi identificada maior rigidez em relação aos grupos diabéticos. O grupo CE mostrou resultados maiores quando comparado ao DE (53%) e ao DEI (42%), enquanto que o grupo CS revelou resultados superiores ao DS (56%) e ao DSI (43%), demonstrando o efeito deletério do DMT1 sobre a rigidez óssea. Não houve diferença significativa entre os grupos exercitados quando comparados aos seus controles (CE = CS, DE = DS e DEI = DSI), determinando a ausência de influência do PTN aplicado. Os grupos tratados com insulina (DEI e DSI) apresentaram resultados superiores aos grupos não tratados (DE e DS), evidenciando a importância da terapia insulínica. A rigidez da diáfise do fêmur do grupo DEI foi maior (18%) comparado a do DE, assim como a do DSI foi superior a do DS (23%).

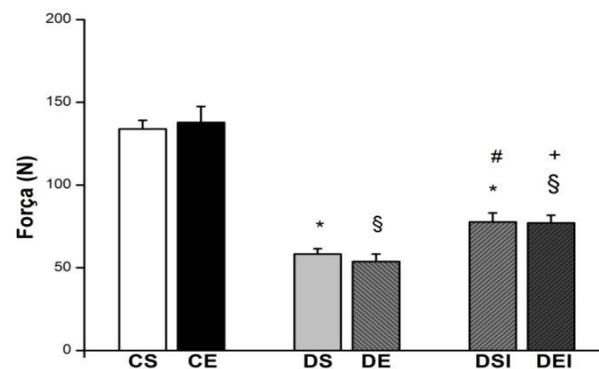
A força máxima de fratura na diáfise do fêmur comportou-se de forma semelhante à rigidez (Figura 8B). O grupo DE apresentou valores menores que os do CE (60%), assim como os do DS foram menores que os do CS (56%). A força máxima nos grupos DEI e DSI também foram menores que nos grupos CE (43%) e CS (57%), respectivamente, indicando o efeito nocivo do DMT1 sobre a resistência à fratura do fêmur. O exercício aplicado não influenciou este parâmetro, pois os resultados foram iguais entre tratados e controles (CE = CS, DE = DS e DEI = DSI). Por outro lado, o tratamento insulínico amenizou a perda da força máxima de fratura na diáfise do fêmur, conforme observado nos grupos diabéticos insulinizados em relação aos sem tratamento. No grupo DEI o valor foi maior que no DE (30%) e os valores de DSI foi maior que no DS (25%).

Os resultados da tenacidade da diáfise do fêmur estão apresentados na Figura 8C. O grupo CS apresentou valores maiores que o DS (63%) e o DSI (20%), evidenciando o prejuízo do DMT1 sobre as propriedades mecânicas ósseas. O grupo CE apresentou valores maiores que o CS (35%), indicando eficiência do PTN. O grupo CE apresentou valores superiores ao DE (65%) e ao DEI (50%). Os grupos tratados com insulina (DEI e DSI) apresentaram resultados superiores aos grupos não tratados (DE e DS), evidenciando a importância da terapia insulínica. A tenacidade da diáfise do fêmur do grupo DEI foi maior (31%) comparado a do DE, assim como a do DSI foi superior a do DS (55%).

**A**



**B**



**C**

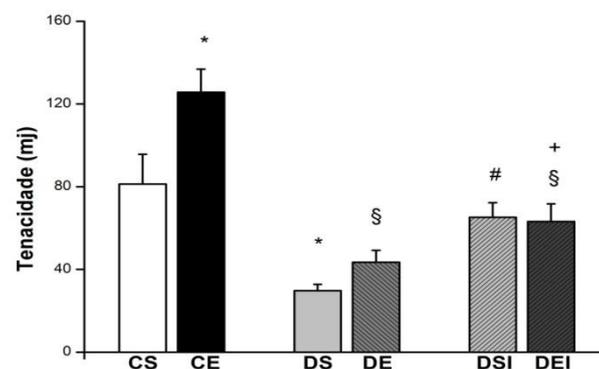


Figura 8 – Rigidez (A), Força máxima de fratura (B), e Tenacidade (C) na diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS; (§) diferente de CE; (#) diferente de DS; (+) diferente de DE ( $p \leq 0,05$ ).

Estes resultados, assim como os do colo do fêmur, configuram a pior qualidade e a menor força óssea e, conseqüentemente, maior fragilidade óssea nos grupos diabéticos. No

entanto, o tratamento insulínico mostrou-se eficiente em amenizar o efeito nocivo do DMT1 nas propriedades mecânicas analisadas. No presente estudo, os resultados indicam efeitos benéficos do PTN na capacidade de absorver energia (tenacidade) quando o fêmur é deformado nos animais não diabéticos. Estes dados estão de acordo com resultados encontrados nos estudos de (HUANG et al., 2003; HUANG et al., 2010; SILVA, 2011), nos quais o treinamento em natação melhorou a capacidade de absorção de energia pelo osso em animais não diabéticos. Em relação às propriedades rigidez e força máxima de fratura, não houve efeito do programa de exercício. Como nas análises da região do colo, a falta de efeito do PTN usado pode ser devido à diferença no período de crescimento dos animais, pois quando as propriedades mecânicas analisadas foram relativizadas pelo peso corporal, houve identificação de efeitos positivos nas propriedades mecânicas força e tenacidade (item 5.4.3).

O exercício produziu efeitos diferentes nas duas regiões femorais analisadas, pois o colo femoral apresentou valores indicativos de maior força máxima de ruptura e tenacidade que a diáfise. Uma possível explicação é o efeito do estímulo local do exercício, pois, segundo Robling et al. (2006), os ossos se fortalecem de acordo com a forma e a região estimulada. Além disso, o exercício pode modificar a orientação das fibras de colágenos na região incitada (GUADALUPE-GRAU et al., 2009). Também, o aumento da massa muscular, em resposta ao exercício, exerce maior tensão sobre a junção osteotendinosa, localizada na epífise proximal do fêmur, resultando em maiores estímulos osteogênicos (SAINO et al., 2003; IWAMOTO et al., 2005). Além disso, o osso esponjoso predominante no colo do fêmur é mais reativo às cargas mecânicas proporcionadas pelo exercício (BORER 2005).

O modelo de exercício adotado neste experimento pode ter resultado em maior força aplicada na região do colo do fêmur dos animais exercitados promovendo maior estimulação osteogênica por ação da contração muscular. Saino et al. (2003) mostraram, em estudos com ratos *Sprague-Dawley* submetidos a corrida voluntária, que o músculo *gemellus* tem inserção na fossa intertrocantérica na região do colo femoral e a ação desse músculo pode explicar a maior força e o maior conteúdo de colágeno tipo III nesta região em relação aos animais controles. Provavelmente, a ação do músculo *gemellus*, incitada no exercício de natação, ajuda a elucidar os resultados encontrados neste estudo.

Assim como em outros estudos, ficou demonstrada neste estudo a deteriorização das propriedades mecânicas analisadas no fêmur de animais diabéticos. Reddy et al. (2001) observaram redução na força de fratura do fêmur e menor capacidade de absorção de energia em ratos *Sprague-Dawley* com DMT1 induzido por STZ. Também, Silva et al. (2009)

encontraram redução das propriedades mecânicas em animais com DMT1 induzido por STZ. Além disso, mensuraram a quantidade de resíduos de pentosidina (PE), um marcador de índice de AGEs no colágeno, e encontraram valores superiores nos animais diabéticos, o que pode explicar alterações nas ligações cruzadas de colágeno e aumento de AGEs o que resultou em prejuízos para a força e tenacidade dos ossos desses animais.

No presente estudo, o tratamento insulínico resultou em efeito protetor, amenizando os problemas ósseos advindos do DMT1. Entretanto, o estudo de ERDAL et al. (2012), no mesmo modelo, verificou que apenas a DMO foi melhorada com a insulino terapia, e que as demais propriedades biomecânicas ósseas (força de fratura, rigidez e tenacidade) permaneceram com valores inferiores tanto no grupo de animais diabéticos como no de animais diabéticos tratado com insulina. Os diferentes resultados do estudo mencionado com relação aos do presente estudo podem ser devido à diferença de idade dos animais. Os animais do presente experimento estavam em crescimento (quatro semanas de idade), enquanto no estudo de Erdal et al. (2012) possuíam 12 semanas. Outro fator que pode ter levado à diferença de resultados é a quantidade de insulina aplicada por Erdal et al. (2 UI).

#### **5.4.3. Propriedades mecânicas do colo e da diáfise do fêmur relativas ao peso corporal**

Devido às diferenças entre as médias do peso corporal final dos grupos experimentais, especialmente entre diabéticos e controles, observadas no presente estudo, e porque o peso corporal tem relação com propriedades mecânicas no osso (HOU et al., 1993). Os resultados das propriedades mecânicas da região do colo e na região da diáfise do fêmur foram reexaminados após a divisão do valor destas pelo peso corporal.

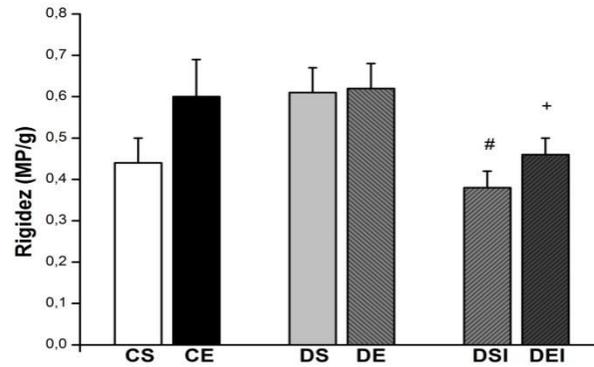
Após a normalização pelo peso corporal, os prejuízos da DMT1 nas propriedades mecânicas dos animais diabéticos e o efeito amenizador da insulino terapia na região do colo do fêmur permaneceram (Figura 9), exceto para rigidez. Isto indica que os efeitos deletérios foram causados pela STZ, em algumas propriedades, independentemente do menor ganho de peso pelos animais diabéticos.

Os animais do grupo DS apresentaram resultados da força máxima de fratura significativamente menores em relação aos dos grupos CS e DSI (Figura 9B). O grupo CS foi maior que DSI, porém, sem diferença estatística significativa ( $p = 0,15$ ). Com relação aos grupos exercitados, as diferenças da força máxima de fratura também foram mantidas, o grupo CE apresentou-se maior que DE e uma tendência em relação ao DEI ( $p = 0,07$ ). No

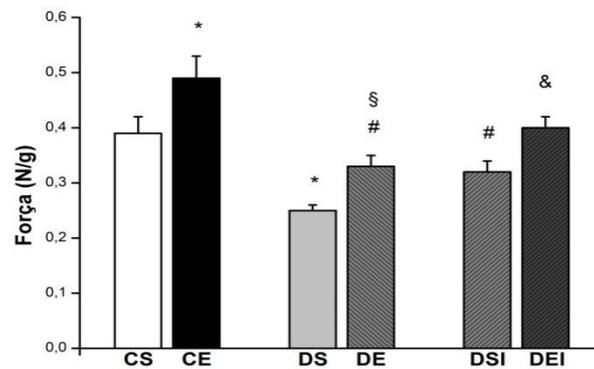
grupo DE também houve tendência em apresentar menor valor que o DEI ( $p = 0,06$ ). Verificou-se que o PTN aplicado, manteve os efeitos benéficos, pois os grupos exercitados demonstraram maior força máxima de fratura em comparação aos seus controles.

Em relação à rigidez no colo femoral (Figuras 9 A), os grupos diabéticos sem tratamento insulínico não apresentaram diferenças dos grupos controles e apresentaram maiores valores em relação aos grupos insulinizados. Estes dados indicam uma interferência do peso na rigidez. Entretanto, nos resultados da tenacidade (Figuras 9 C), os grupos diabéticos sem insulino terapia demonstraram resultados inferiores se comparados aos controles e aos diabéticos sob insulino terapia, porém, com diferença estatística significativas somente do grupo DSI comparado ao DS. Observou-se que o PTN utilizado foi efetivo em aumentar a tenacidade e apresentou uma tendência para maior rigidez ( $p = 0,07$ ) no grupo CE em comparação ao CS. Nos grupos diabéticos, os animais exercitados demonstraram resultados superiores comparados aos que não exercitaram, uma tendência para maior tenacidade foi observada no grupo DE em comparação ao DS ( $p = 0,07$ ), porém, nos demais resultados (rigidez e tenacidade dos animais insulinizados) não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

**A**



**B**



**C**

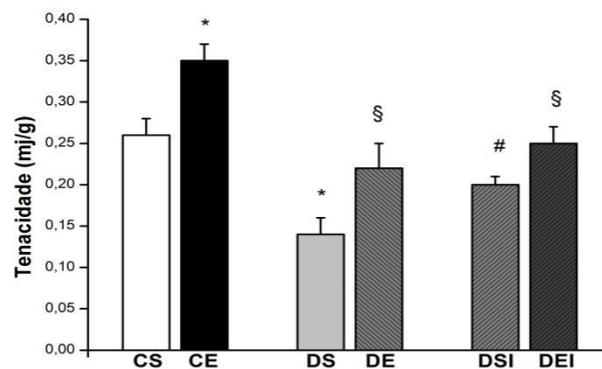


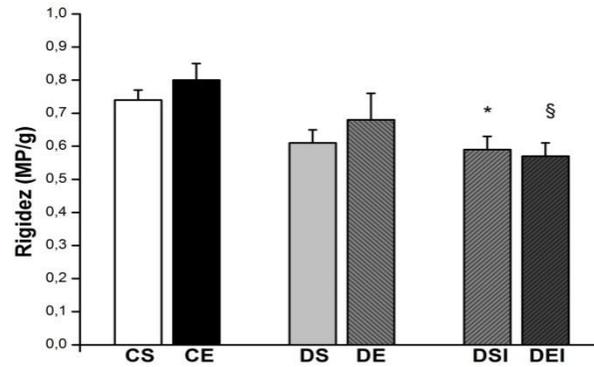
Figura 9 – Rigidez (A), força máxima de fratura (B) e tenacidade (C) no colo do fêmur relativas ao peso corporal. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS; (§) diferente de CE; (#) diferente de DS; (+) diferente de DE; (&) diferente de DSI ( $p \leq 0,05$ ).

Na região da diáfise femoral, os animais dos grupos diabéticos apresentaram valores de força máxima de fratura menores em relação aos dos grupos controles ( $p \leq 0,05$ ) (Figura

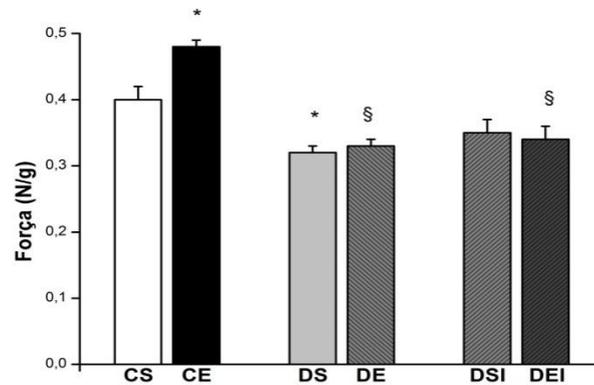
10 B). Os valores do grupo CS foram significativamente maiores que os do DS e os valores do grupo DSI não foram estatisticamente diferentes de CS e DS. Os grupos DE e DEI demonstraram resultados significativamente inferiores aos do grupo CE, no entanto, sem diferenças significativas entre eles. O PTN utilizado, por sua vez, mostrou efeito positivo somente nos controles, pois o grupo CE apresentou resultados da força máxima de fratura maior em comparação ao CS. Os efeitos do PTN nos animais diabéticos desapareceram após a normalização pelo peso corporal.

Os animais dos grupos diabéticos sob insulino terapia tiveram rigidez menor ( $p \leq 0,05$ ) que a dos grupos controles, mas a rigidez não foi diferente em relação aos grupos diabéticos sem tratamento insulínico (Figura 10 A). Em relação à tenacidade (Figura 10 C), os grupos diabéticos sem insulino terapia, demonstraram resultados inferiores aos controles e aos diabéticos insulinizados, sendo a diferença estatística demonstrada assim:  $DE < CE$ ; e  $DS < DSI$ . Os grupos DE e DEI, apresentaram resultados menores em relação ao CE ( $p \leq 0,05$ ). Entretanto, o efeito do PTN permaneceu somente nos animais controles após a normalização ( $CE > CS$ ).

**A**



**B**



**C**

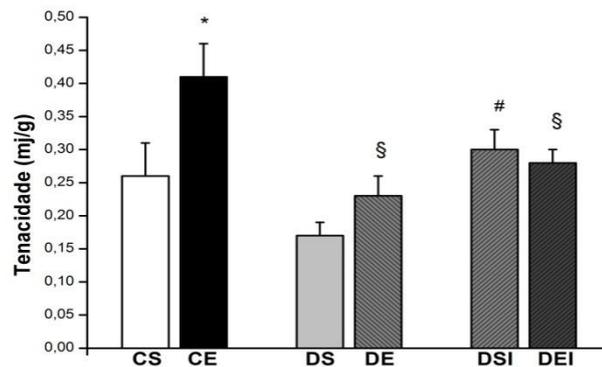


Figura 10 – Rigidez (A), força máxima de fratura (B) e tenacidade (C) na diáfise do fêmur relativas ao peso corporal. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS; (§) diferente de CE; (#) diferente de DS; (†) diferente de DE; (&) diferente de DSI ( $p \leq 0,05$ ).

A normalização das propriedades mecânicas pelo peso corporal foi realizada para verificar se havia interferência do peso corporal nos efeitos causados pelo DMT1 nestas

propriedades. No entanto, após a normalização das propriedades mecânicas analisadas, a interferência do peso corporal foi observada de forma significativa somente na rigidez. Os grupos diabéticos sem tratamento insulínico não apresentaram diferença dos grupos controles e apresentaram maiores valores em relação aos grupos insulinizados. Outra interferência observada foi a efetividade do PTN na força máxima de fratura no colo e diáfise femoral e na tenacidade no colo femoral dos animais não diabéticos, indicando que o treinamento em natação traz efeitos benéficos para o tecido ósseo.

O retardo no crescimento e menor ganho de peso em função do DMT1 podem confundir algumas interpretações das propriedades mecânicas do osso, pois a massa corporal altera a carga mecânica no osso e afeta suas propriedades mecânicas (HOU et al., 1993; BARBOSA et al., 2010). A insulina é um hormônio anabólico e pode afetar outros hormônios, como o GH e IGF-1 (GOMES et al., 2009a; GOMES et al., 2009b), e o baixo nível de insulina reduz a síntese de proteínas, o que pode causar perda de massa muscular e baixo peso corporal (HOU et al., 1993).

Os resultados deste estudo mostraram decréscimos na força, rigidez e tenacidade do fêmur em função da DMT1. Entretanto, mesmo quando as propriedades mecânicas foram normalizadas pelo peso corporal, a interpretação dos resultados mostra o prejuízo provocado pelo DMT1. No entanto, tanto neste estudo como no de Hou et al. (1993) mesmo após a normalização, os efeitos do tratamento insulínico em amenizar os efeitos deletérios do diabetes foram mantidos, principalmente no colo femoral. Isto indica que o DMT1 causa efeitos deletérios no tecido ósseo independente do peso corporal e que a insulina tem papel fundamental no metabolismo ósseo.

## **5.5. Histomorfometria do fêmur**

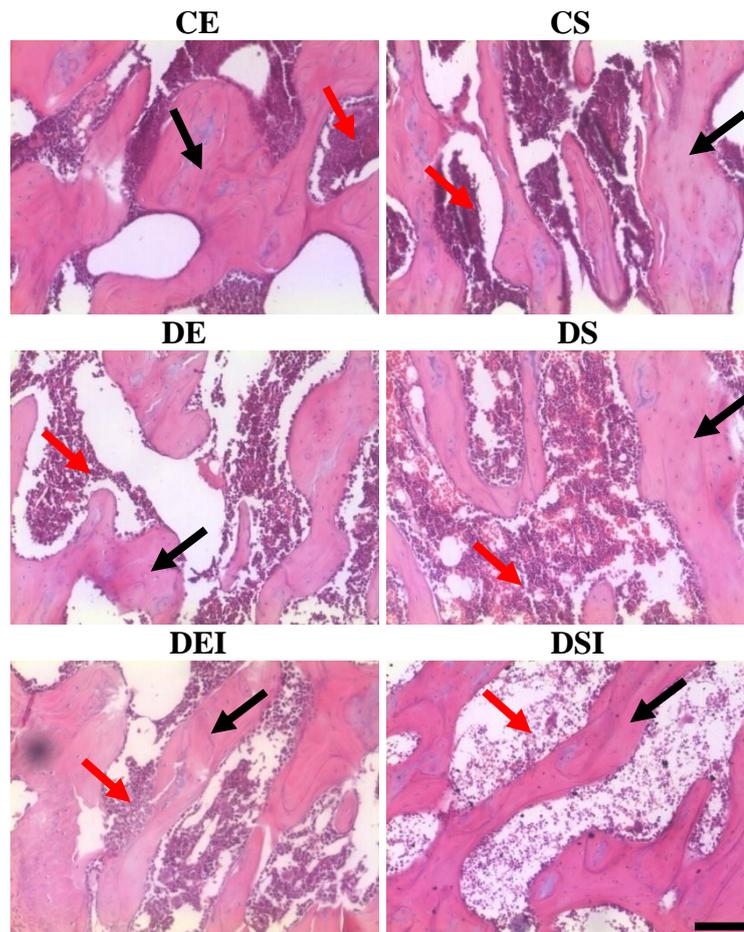
### **5.5.1. Volume ósseo**

Tentando buscar razão morfológica para a grande incidência de fraturas no colo do fêmur (BAGI et al.,1997; GAMMAGE et al., 2009), este estudo analisou as quantidades de osso trabecular, colágeno total, e de colágenos tipo I e III nesta região.

Na figura 11 são apresentadas fotomicrografias representativas do volume trabecular ósseo no colo do fêmur (Figura 11A) e os resultados médios dos animais dos grupos experimentais (Figura 11B). Os grupos controles (CE e CS), assim como os tratados com insulina (DEI e DSI), apresentaram volume ósseo maiores que os grupos diabéticos não tratados (DE e DS). O grupo CS apresentou resultado maior a DS (46%), e o grupo DSI mostrou resultado superior a DS (40%). Nos grupos exercitados, o grupo CE demonstrou valor 44% maior que DE, enquanto o grupo DEI mostrou volume ósseo superior a DE em 37%. Não houve diferença entre CE e DEI, tampouco entre os grupos CS e DSI. Estes dados demonstram que o DMT1 diminui o volume ósseo e que o tratamento insulínico reverte esse quadro.

Quanto ao PTN aplicado, o exercício foi eficiente em aumentar o volume ósseo nos grupos CE e DEI, mas não no DE, comparados aos seus respectivos controles. O grupo CE apresentou valor maior que CS (25%), enquanto o DEI foi superior a DSI (24%), indicando benefício do exercício, aumentando o volume ósseo e que, nos animais diabéticos sob tratamento insulínico, também há favorecimento desse aumento. Entretanto, o efeito do exercício não foi observado na ausência de insulina (DE vs. DS).

(A)



(B)

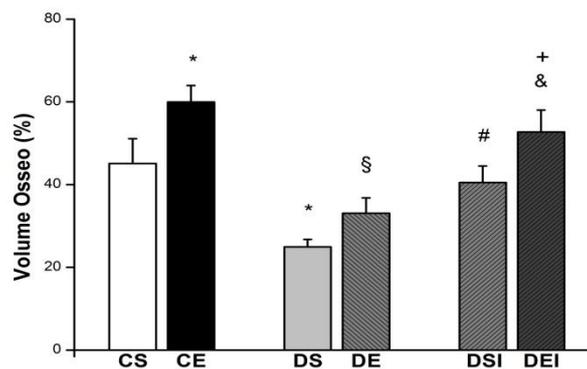


Figura 11 – Fotomicrografias da região do colo do fêmur (A) e volume trabecular ósseo do colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais (B). Medula óssea (setas vermelhas), osso trabecular (setas pretas). Hematoxilina e Eosina (HE) aumento de 20x. Barra 100  $\mu$ m. Dados no painel B são expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário, (CE) controle exercitado, (DS) diabético sedentário, (DE) diabético exercitado, (DSI) diabético sedentário insulina e (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS; (§) diferente de CE; (#) diferente de DS; (+) diferente de DE; (&) diferente de DSI ( $p \leq 0,05$ ).

A remodelação óssea ocorre tanto no osso cortical como no trabecular; todavia, a intensidade nas trabéculas é maior, em razão da disposição e função das trabéculas ósseas como citado por Saraiva & Lazaretti-Castro, (2002).

A perda óssea trabecular na região do colo de animais diabéticos não tratados com insulina também foi observada nos estudos de Silva et al. (2009), onde observaram redução no volume ósseo após 4 semanas de DMT1 em ratos *Fischer* 344 e após 8 semanas em ratos *Sprague-Dawley*. Do mesmo modo, Nyman et al. (2011), utilizando camundongos DBA/2J, relataram redução do volume ósseo após 10 semanas de DMT1. A falta de insulina reflete a necessidade de estimulação dos receptores para este hormônio presentes nas células osteoblásticas (OGATA et al., 2000; TRAIKILL et al., 2005b) e, como essas células estão intimamente ligadas ao processo de síntese de colágeno e deposição mineral, a deficiência de insulina nos animais diabéticos é a possível explicação para a redução do volume ósseo encontrada nos grupos DE e DS no presente estudo.

Além da deficiência de insulina, a redução do volume ósseo observada neste estudo pode estar relacionada ao aumento de ROS em consequência do DMT1. O estresse oxidativo é reconhecido como causador de uma série de disfunções celulares, inclusive nas células ósseas, podendo determinar redução da proliferação ou apoptose dos osteoblastos (HAMADA et al., 2009) prejudicando, assim, a deposição óssea. Todavia, nos grupos diabéticos insulinizados, houve reversão da perda de volume ósseo no colo do fêmur, pois a insulina produz efeitos osteogênicos diretos atuando nos receptores nos osteoblastos (OGATA et al., 2000; TRAIKILL et al., 2005b), além de atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo nas células ósseas (HAMADA et al., 2009).

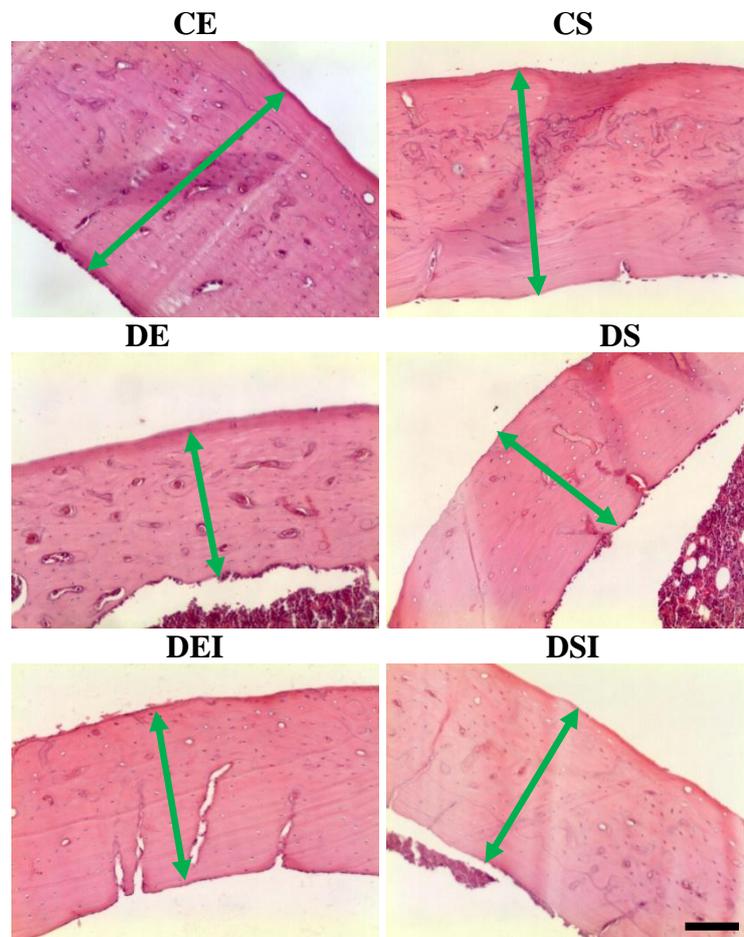
A eficiência do PTN, traduzida por aumento do volume ósseo, pode ser explicada pela tensão gerada pelo exercício no colo do fêmur, pois em regiões estimuladas a formação óssea é aumentada e o *turnover* ósseo é reduzido; conseqüentemente, a carga mecânica pode aumentar a área, fortalecer o osso e aumentar a densidade do tecido (TURNER & ROBLING, 2005). Estudos prévios demonstraram que a carga mecânica imposta pelo exercício acarreta maior tensão sobre a junção osteotendinosa, resultando em maior estímulo osteogênico (IWAMOTO et al., 2005), pois aumenta a vascularização e perfusão, que são processos importantes para reparação de microfraturas, e na nutrição e atuação dos osteoblastos (VIBOOLVORAKUL et al., 2009). De fato, no estudo de Saino et al. (2003), foi encontrada maior vascularização na região óssea trabecular de animais *Sprague-Dawley* não diabéticos, e

o exercício de corrida voluntária, a curto e longo prazos, também aumentou o volume ósseo, à semelhança dos resultados observados neste estudo nos animais CE e DEI.

### **5.5.2. Espessura da diáfise do fêmur**

Na figura 12 são apresentadas fotomicrografias representativas da espessura cortical (Figura 12A) e os resultados médios da espessura cortical da diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais (Figura 12B). A espessura cortical no terço médio da diáfise do fêmur dos animais diabéticos apresentou resultados inferiores aos observados nos controles (Figura 12B). O grupo CE demonstrou maior espessura cortical, tanto em relação ao DE (34%) quanto ao DEI (23%). O grupo CS mostrou valores maiores que os do DS (40%) e que os do DSI (25%), demonstrando a interferência do DMT1 nesta região do fêmur desses animais. Entretanto, o tratamento com insulina atenuou o referido prejuízo, como pode ser demonstrado pelas maiores espessuras corticais encontrados nos grupos DEI e DSI se comparados aos dos grupos DE e DS. O grupo DEI apresentou maior espessura cortical em relação a DE (15%), assim como o grupo DSI apresentou valores superiores aos dos DS (20%). O programa de natação utilizado não alterou a espessura cortical na diáfise do fêmur dos animais controles ou diabéticos.

(A)



(B)

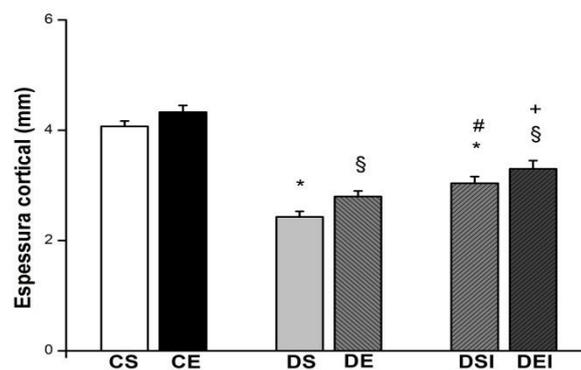


Figura 12 – Fotomicrografias da espessura do osso cortical (setas verdes) (A) e espessura cortical no terço médio da diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais (B). Hematoxilina e Eosina (HE) aumento de 10x. Barra 100  $\mu$ m. Dados do painel B são expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS; (§) diferente de CE; (#) diferente de DS; (+) diferente de DE ( $p \leq 0,05$ ).

A menor espessura encontrada no osso cortical do terço médio da diáfise dos fêmures dos animais diabéticos deveu-se, provavelmente, à deficiência de insulina, que prejudica a ação dos osteoblastos, como mencionado anteriormente. Também, o DMT1 pode induzir acúmulo de lipídeo na medula óssea, determinando expansão da cavidade medular e redução do envelope cortical. Ainda, podem ocorrer ligações entre adipócitos e osteoblastos reduzindo o número de osteoblastos disponíveis para formação óssea (BOTOLIN et al., 2005). No entanto, segundo Blankytny et al. (2011) a reposição insulínica pode reduzir os efeitos crônicos causados pela hiperglicemia, diminuindo a atividade dos osteoclastos e aumentando a dos osteoblastos, o que, possivelmente, explica a menor reabsorção óssea dos grupos insulinizados em relação aos grupos não tratados.

Estudos com resultados semelhantes ao deste, mostraram redução da área cortical em camundongos após dez semanas de DMT1 induzido por STZ (NYMAN et al., 2011), que foi evidenciada por interrupção prematura do crescimento ósseo. Silva et al. (2009) encontraram que ratos *Sprague-Dawley* diabéticos apresentaram menor área cortical em relação aos animais controles.

No presente estudo, parece que o PTN não provocou estímulo suficiente para aumentar a formação óssea cortical na diáfise do fêmur dos animais, provavelmente, devido à falta de impacto deste modelo de exercício. A tensão gerada por esta forma de exercício não criou tensão uniforme em todo o osso, assim, pode ter ocorrido concentração de estímulos somente nas inserções músculos/osso (TURNER & ROBLING, 2005). Estudos prévios utilizando do treinamento em natação com animais não diabéticos (HUANG et al., 2003; HUANG et al., 2010) também não encontraram diferença na espessura cortical do fêmur dos animais treinados, em comparação aos controles sedentários. Da mesma forma, o mesmo treinamento em natação com o mesmo modelo de diabetes deste estudo, Silva (2011) não observou diferença na espessura cortical em função do exercício nos animais não diabéticos e nos diabéticos não tratados com insulina em relação aos seus respectivos controles.

### 5.5.3. Conteúdo de colágeno

Na figura 13 são apresentadas fotomicrografias representativas das imagens utilizadas para análise de colágeno total, tipo I e III presentes no colo do fêmur dos animais estudados.

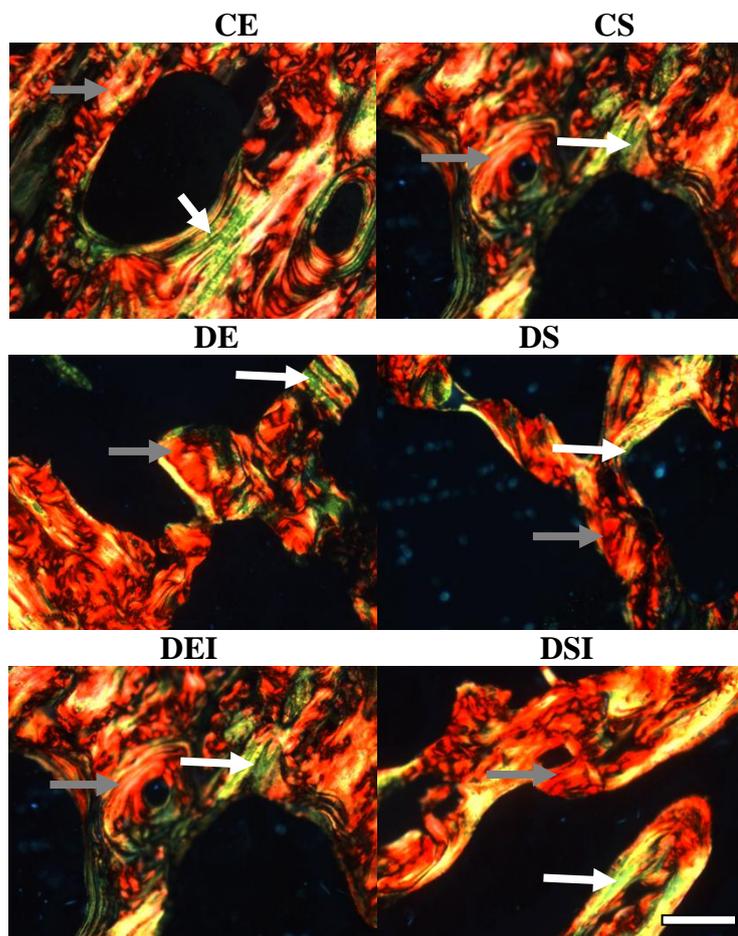


Figura 13 Fotomicrografias da região do colo do fêmur de animais dos grupos experimentais. Controle exercício (CE); controle sedentário (CS); diabético exercício (DE); diabético sedentário (DS); diabético exercício tratado com insulina (DEI) e diabético sedentário tratado com insulina (DSI). Colágeno tipo I (setas cinzas) e colágeno tipo III (setas brancas). *Picrosirius red*, aumento de 20x. Barra 100  $\mu$ m

Os resultados médios da quantidade de colágeno total no colo femoral estão apresentados na figura 14A. Os grupos controles (CE e CS) e insulinizados (DEI e DSI) apresentaram valores maiores que os dos grupos diabéticos não tratados (DE e DS). Estes dados indicam a menor síntese de colágeno em consequência do DMT1. O grupo CE apresentou valor maior que o DE (33%), enquanto DEI foi superior a DE (31%). O grupo DS apresentou valores menores que os do CS (43%) e que os do DSI (38%). Não houve diferença

entre os grupos controles e os grupos diabéticos tratados com insulina (CE = DEI e CS = DSI), evidenciando a ação da insulina nas células osteoblásticas que estão envolvidas no processo de síntese de colágeno. O PTN, todavia, não foi efetivo em aumentar significativamente a quantidade de colágeno total nos grupos controle ou diabéticos.

A análise do conteúdo de colágeno tipo I demonstrou que não houve efeito do PTN aplicado nos grupos controles ou diabéticos (Figura 14B). O grupo DS apresentou menor conteúdo de colágeno tipo I que os grupos CS (41%) e DSI (43%). Quanto aos grupos exercitados, não houve diferença significativa entre eles, tanto controles como diabéticos, mas foi observada uma tendência ( $p = 0,07$ ) de aumento do conteúdo de colágeno tipo I no grupo DEI comparado à do grupo DE (30%).

Os resultados do colágeno tipo III estão apresentados na figura 14C. Os grupos exercitados apresentaram conteúdo de colágeno tipo III ligeiramente maiores que seus controles CS e DSI, respectivamente, porém, sem diferenças estatísticas significativas. Os grupos DE e DS demonstraram valores menores que os dos seus respectivos controles, CE e CS. O grupo CE exibiu maior conteúdo de colágeno tipo III que o DE (56%), enquanto o CS apresentou valor superior ao DS (50%), demonstrando diferenças na quantidade e no tipo de colágeno em função do DMT1. Foi observado maior quantidade colágeno tipo III no grupo DEI em relação ao DE (41%), indicando melhor efeito do exercício nos animais insulinizados.

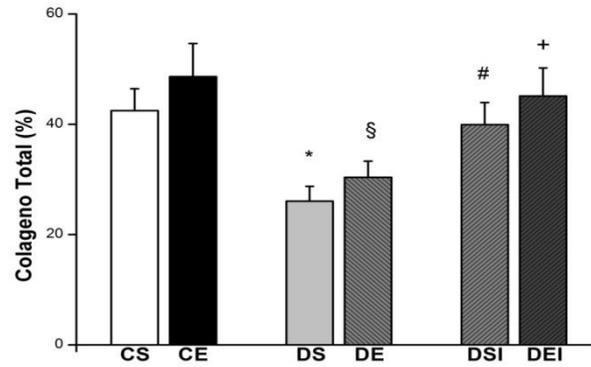
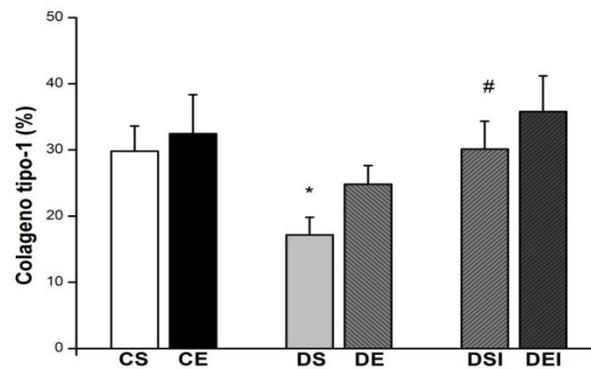
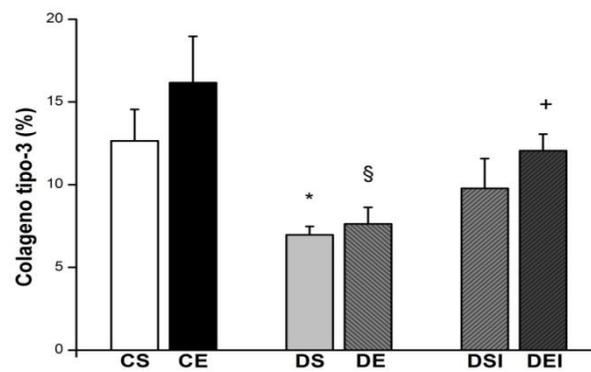
**A****B****C**

Figura 14 – Conteúdo de colágeno total (A), colágeno tipo I (B) e colágeno tipo III (C) no colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (DSI) diabético sedentário insulina; (DEI) diabético exercitado insulina; (\*) diferente de CS; (§) diferente de CE; (#) diferente de DS; (+) diferente de DE ( $p \leq 0,05$ ).

As moléculas de colágeno constituem, aproximadamente, 90% das proteínas da matriz óssea e determinam importante papel nas características do tecido ósseo (ROSS &

PAWLINA, 2008; AIRES, 2012), sendo o colágeno tipo I o principal constituinte, enquanto o do tipo III apresenta-se em menor quantidade e está mais presente nas regiões de inserção de tendões e ligamentos (LUTHER et al., 2003; BILEZIKIAN et al., 2008).

A quantidade total de colágeno presente nos grupos diabéticos sem tratamento com insulina, encontrada neste estudo, demonstra que a falta do hormônio pode aumentar a reabsorção óssea, uma vez que o DMT1 induz a produção de TNF- $\alpha$ , que inibe a função dos osteoblastos e aumenta a osteoclastogênese. Em consequência, favorece a destruição da matriz óssea em oposição à formação. Do mesmo modo, o TNF- $\alpha$  inibe a produção de componentes da matriz, inclusive de colágeno (BILEZIKIAN et al., 2008 e WONGDEE & CHAROENPHANDHU, 2011).

Além disso, as alterações nas ligações cruzadas de colágeno, devido a formação de AGEs, afetam o processo de mineralização óssea (SAITO & MARUMO, 2010). A redução do conteúdo de colágeno e as prováveis alterações nas ligações cruzadas de colágeno nos grupos diabéticos sem tratamento insulínico podem explicar outros resultados deste estudo, como a redução do CMO femoral e o menor volume trabecular ósseo encontrado na região do colo desses animais.

Por outro lado, não houve diferença na quantidade de colágeno total entre os grupos controle e os diabéticos que receberam tratamento insulínico. Isto é, provavelmente, devido ao efeito direto da insulina no tecido ósseo ou indireto por um melhor controle glicêmico induzido (SPENCER et al., 1991; TRAILKILL et al., 2005a). Entretanto, a quantidade similar de colágeno observada entre os grupos controle e diabéticos insulinizados pode não refletir a qualidade do colágeno encontrado, pois a possível presença de AGEs nas ligações cruzadas de colágeno devido ao DMT1 pode reduzir a resistência óssea via a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. A formação de AGEs nas ligações cruzadas do osso faz com que o colágeno tenha fibras mais frágeis, levando ao acúmulo de microdanos e alterando as propriedades mecânicas do osso (SAITO & MARUMO, 2010).

Apesar dos marcadores de AGEs não terem sido quantificado neste estudo, estudos prévios sobre DMT1 e aumento da produção de AGEs no colágeno (SAITO et al., 2006; SILVA et al., 2009) permitem especular diferença na qualidade do colágeno. A possível diferença na qualidade do colágeno entre os animais não diabéticos e os diabéticos pode ajudar a explicar alguns resultados observados no presente estudo, tais como menor força de fratura e tenacidade encontrada nos grupos diabéticos. Um estudo recente procurou relações entre as ligações cruzadas de colágeno e força óssea. Silva et al. (2009), utilizando ratos com

DMT1 induzidos por STZ, demonstraram aumento de marcadores de AGEs, contudo sem alterar a quantidade de colágeno, e foi demonstrada menor força de ruptura óssea nestes animais.

Os resultados da análise da quantidade de colágenos tipos I e tipo III permitiram associar as análises das propriedades mecânicas ósseas e o efeito do PTN aplicado. O colágeno tipo III está ligado a “fibras de *Sharpey*”, que são extensões de fibras do periosteio que fixam tendões e ligamentos no osso (SAINO et al., 2003), são mais distensíveis e pouco mineralizadas (LUTHER et al., 2003; BILEZIKIAN et al., 2008). Apesar de não estar claro o entendimento, a presença de fibras de colágeno tipo III reduz a reabsorção óssea, possivelmente, devido a sua menor mineralização (SAINO et al., 2003). De acordo com o mencionado acima, maior quantidade de colágeno tipo III na região do colo favorece a força óssea e o aumento no conteúdo deste colágeno pode ajudar a explicar as alterações nas propriedades mecânicas. É provável que as fibras de colágeno no colo do fêmur, na inserção do músculo *gemulus* aumentam a resposta às forças exercidas por uma musculatura melhor exercitada (SAINO et al., 2003). A formação de colágeno no osso afeta a tenacidade e rigidez óssea, talvez, diretamente influenciando a resistência óssea à fratura (SAITO & MARUMO, 2010). Desta forma, esperava-se que o exercício aplicado promovesse aumento no conteúdo de colágeno no colo femoral, com maior aumento das fibras tipo III, contudo os aumentos nos conteúdos de colágeno observados não foram significativos.

No estudo de Saino et al. (2003), foi verificada uma maior concentração de colágeno tipo III no colo dos animais exercitados comparados aos controles. No presente estudo, foram observadas maiores quantidades de colágeno tipo III no colo dos animais dos grupos controles e diabéticos tratados com insulina exercitados, em relação aos seus controles, diferença não significativa, mas que mostra um indicativo que o exercício pode beneficiar a composição de colágeno na região do colo do fêmur.

## 6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que a combinação do treinamento em natação de baixa intensidade com a insulino terapia durante oito semanas foi efetiva em atenuar os efeitos deletérios do DMT1 experimental induzido por STZ sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos em crescimento, principalmente na região do colo femoral devido o modelo de exercício utilizado.

Verificou-se que, mesmo com a glicemia elevada em relação aos animais controles, a combinação dos tratamentos aumentou nos animais diabéticos: a) a DMO e o CMO no fêmur; b) a força máxima de fratura e a tenacidade no colo femoral; c) a rigidez, a força máxima de fratura e a tenacidade na diáfise do fêmur; d) o volume trabecular ósseo no colo femoral; e) a espessura cortical da diáfise do fêmur; e f) a quantidade de colágeno total e do tipo III no colo femoral.

Os resultados encontrados são importantes para o entendimento, em níveis estrutural, mecânico e histomorfométrico, dos efeitos do exercício físico regular e do tratamento insulínico sobre o tecido ósseo de portadores de diabetes *mellitus*. Entretanto, novos estudos são necessários para que se possam entender os mecanismos responsáveis pelos efeitos do exercício e da insulina sobre o tecido ósseo, assim como novos modelos de tratamento, exercício e insulino terapia.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES M. M. **Fisiologia**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p.1232.

AKBARZADEH, A; NOROUZIAN, D. MEHRABI, M. R JAMSHIDI, A. FARHANGI, S.H; ALLAH A. V; MOFIDIAN, S. M. A; LAME, B. R. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. Indian J Clin Bioch. v. 22, p.60-64 Sep, 2007.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. POSITION STAND. Exercise and Type II Diabetes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2000.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. POSITION STAND. Physical Activity and Bone Health. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2004.

ARMAS, Akhter, M. P.; Drincic, A.; Recker, R. R. Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. Bone. 50: 91–96, 2012.

BAGI, C. M., AMMANN, P., RIZZOLI, R. E MILLER, S. C. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. Calcif Tissue Int, v.61, n.4, p.336-44, Oct, 1997.

BANFI, G.; LOMBARDI, G.; COLOMBINI, A.; Lippi G. *Bone Metabolism Markers in Sports Medicine*. Sports Med. 40 (8): 697-714, 2010.

BARBOSA, E. J. L., KORANYI, J., FILIPSSON, H., BENGTSSON, B., BOGUSZEWSKI, C. L., JOHANNSSON, G. Models to predict changes in serum IGF1 and body composition in response to GH replacement therapy in GH-deficient adults. European Journal of Endocrinology: v.162 p.869–878. 2010.

BERGMANN, P.; BODY, J. J.; BOONEN, S.; BOUTSEN, Y.; DEVOGELAER, J. P.; GOEMAERE,S.; KAUFMAN, J.; REGINSTER, J. Y.; ROZENBERG, S. Loading and Skeletal Development and Maintenance. Journal of Osteoporosis Volume 2011.

BILEZIKIAN, J. P.; LAWRENCE, G. R., MARTIN, T. J. **Principles of Bone Biology**. Third edition. Vol. I and II. Copyright. ed. Elsevier, 2008.

BLAKYTYNY, R.; SPRAUL, M. AND JUDE, E. B. The Diabetic Bone: A Cellular and Molecular Perspective. International Journal of Lower Extremity Wounds p.10:16, 2011.

BONO, C. M., and EINHORN, T. A. Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength. Eur Spine J. Oct, 12(Suppl 2): S90–S96, 2003.

BOPPART, MD., KIMMEL DB., YEE, JA., CULLEN, DM. Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading. Bone v.23 (5): 409-415, 1998.

BORER, K. T. Physical Activity in the Prevention and Amelioration of Osteoporosis. Sports Med 35 (9) 779-830, 2005.

BOTOLIN, S.; FAUGERE, M, F. MALLUCHE, H.; ORTH, M.; MEYER, R AND MCCABE, L. R. Increased Bone Adiposity and Peroxisomal Proliferator-Activated receptor-2 Expression in Type I Diabetic Mice. Endocrinology, v. 146(8) p. 3622–3631, August 2005.

BOUXSEIN M. L, KARASIK D. Bone geometry and skeletal fragility. Curr Osteoporos Rep v.4 (2): p. 49-56, 2006.

BRUM, P. C.; FORJAZ, C. L.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C. E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. Rev. paul. Educ. Fís., São Paulo, v.18, p.21-31, ago. 2004.

BUARQUE DE GUSMÃO, C. V. e BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? Rev Bras Ortop. 44(4):299-305, 2009.

CADORE, E. L., BRETANO, M. A. E KRUEL, L. F. M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.11, n. 6, p. 373-379, 2005.

CAMHI, S.M., and KATZMARZYK, P.T. Total and femoral neck bone mineral density and physical activity in a sample of men and women. Appl. Physiol. Nutr. Metabol. v. 37(5): p. 947-437 954, 2012.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A.; QUINTÃO-JÚNIOR, J. F.; DRUMMOND, L. R.; LAVORATO, V. N.; DRUMMOND, F. R.; CUNHA, D. N. Q.; AMADEU, M. A.; FELIX, L. B.; EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA, E. M.; SANTOS CRUZ, J.; PRÍMOLA-GOMES, T. N.; JOSÉ GERALDO MILL, J. G.; NATALI, A. J. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. Journal of Molecular and Cellular Cardiology p. 119–128, 2013.

CARTEE, G. D., and FUNAI, K. Exercise and Insulin: Convergence or Divergence at AS160 and TBC1D1? Exerc Sport Sci Rev. v. 37(4): p. 188–195, Oct 2009.

CHANG, T-K., HUANG, C-H., HUANG, C-H., CHEN, H-C., CHENG, C-K. The influence of long-term treadmill exercise on bone mass and articular cartilage in ovariectomized rats. BMC Musculoskeletal Disorders, p. 1471-2474, 2010.

CHIMEN, M., K., NIRANTHARAKUMAR, K., PANG, T. T., ANDREWS, R., NARENDRAN, P. What are the health benefits of physical activity in type 1 diabetes mellitus? A literature review. Diabetologia v. 55:542–551, 2012.

CHOI, K. M.; ZHONG, Y.; HOIT, B. D.; GRUPP, I. L.; HAHN, H.; DILLY, K. W.; GUATIMOSIM, S.; LEDERER, J. W.; MATLIB, M. A. Defective intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H1398–H1408, 2002.

COSTA, L. P.; HARTHMANN, A.; ARRUDA, P.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M-C. Treinamento físico melhora a disfunção quimiorreflexa em ratos diabéticos por estreptozotocina. Rev. bras. Educ. Fís. Esp, São Paulo, v.18, n.3, p.293-301, jul./set. 2004.

CREIGHTON DL, MORGAN AL, BOARDLEY D, et al. Weight bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. J Appl Physiol 90: 565-70, 2001.

DE ANGELIS<sup>1</sup>, K. L. D., OLIVEIRA<sup>1</sup>, A. R., DALL'AGO, P., PEIXOTO, L.R.A., GADONSKI, G., LACCHINI, S., FERNANDES, T.G., IRIGOYEN, M.C. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Braz J Med Biol Res 33(6), 2000.

DE FEO, P., DI LORETO, C., RANCHELLI, A., FATONE, C., GAMBELUNGHE, G., LUCIDI, P., SANTEUSANIO, F. Exercise and diabetes. Acta Biomed, Aug p.14-17. 2006.

Diabetes Atlas 2011. <<http://www.idf.org/media-events/press-releases/2011/diabetes-atlas-5th-edition>>. Acesso em 02 de julho de 2012.

Diabetes Atlas 2012 <<http://www.idf.org/media-events/press-releases/2011/diabetes-atlas-5th-edition>>. Acesso em 02 de dezembro de 2012.

ERDAL, N.; GURGU, S.; DEMIREL, C.; ALTAN YILDIZ, A. The effect of insulin therapy on biomechanical deterioration of bone in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes mellitus in rats. Diabetes Researc. And Clin. Pract. 97 p. 461 – 467, 2012.

EVANGELISTA, F. S.; MARTUCHI, S. E. D.; NEGRÃO, C. E.; BRUM P. C. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. Braz J Med Biol Res 38(7) 2005.

EVANS, D. A. Conjoint Clinic on Drugs and Genes. J Chronic Dis, v.18, Jan, p.59-76. 1965.

FANG, Z. Y., PRINS, J. B. AND MARWICK, T. H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. Endocr Rev, v.25, n.4, p.543-67, Aug, 2004.

FOSS –FREITAS, M. C.; MARQUES JUNIOR, W.; FOSS, M. C. Neuropatia Autonômica: Uma Complicação de Alto Risco no Diabetes Melito Tipo 1. Arq Bras Endrocrinol Metab 52/2, 2008.

FUJIMURA, R., ASHIZAWA, N., WATANABE, M., MUKAI, N., AMAGAI, H., FUKUBAYASHI, T., HAYASHI, K., TOKUYAMA, K., AND SUZUKI, M. Effect of resistance exercise training on bone formation and resorption in young male subjects assessed by biomarkers of bone metabolism. *J. Bone. Miner. Res.* 12(4):656–662, 1997.

FUKADA, B. E., AND YASUDA, T. On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the Physical Society of Japan.* vol 12. n. 10 Oct. 1957.

FULZELE, K., AND CLEMENS, T. L. Novel functions for insulin in bone. *Bone* 50 p. 452–456, 2012.

GAMMAGE, K. L., FRANCOEUR, C., MACK, D. E. E KLENTROU, P. Osteoporosis health beliefs and knowledge in college students: the role of dietary restraint. *Eat Behav.* v.10, n.1, p.65-7, Jan, 2009.

GAN, M. J., ALBANESE-O'NEILL, A., AND HALLER, M. J. Type 1 Diabetes: Current Concepts in Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Care, and Research. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 42: p. 269-291, 2012.

GANDHI, A.; BEAM, H. A.; O'CONNOR, J. P.; PARSONS, J. R.; LIN, S. S. The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 37 p. 482 – 490, 2005.

GOMES, R. J.; CAETANO, F. H.; HERMINI, H. A.; ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico sobre o hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em ratos diabéticos. *R. bras. Ci. e Mov.* Brasília v. 11 n. 3 p. 57-62 jul./set. 2003.

GOMES, R. J.; MELLO, M. A. R.; CAETANO, F. H.; SIBUYA, C. Y.; ANARUMA C. A.; G.P. ROGATTO, G. P.; PAULI J.R.; LUCIANO, E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Hormone & IGF Research*, 16, p. 326–331, 2006.

GOMES, R. J., LEME, J. A. C. A., MOURA, L. P., ARAU'JO, M. B., ROGATTO, G. P., MOURA, R. F., LUCIANO, E., MELLO, M. A. R. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. Cell Biochem Funct, 27: p. 199–204, 2009a.

GOMES, R. J., OLIVEIRA, C. A. M., MOTA, C. S. A., MOURA, L. P., MARI, L., TOGNOLI, M. C., LEME, J. A. C. A., LUCIANO, E., MELLO, M. A. R. Effects of Exercise Training on Hippocampus Concentrations of Insulin and IGF-1 in Diabetic Rats. HIPPOCAMPUS. 19: p. 981–987, 2009b.

GUADALUPE-GRAU, A.; FUENTES, T.; GUERRA, B.; CALBET, A. L. Exercise and Bone Mass in Adults. Sports Med, 39 (6): p. 439-468, 2009.

HAKIM, Z. S., PATEL, B. K. AND GOYAL, R. K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. Indian J Physiol Pharmacol, v.41, n.4, Oct, p.353-60. 1997.

HAMADA, Y.; FUJII, H.; FUKAGAWA, M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. Bone; 45 S35–S38, 2009.

HAYES, C. and KRISKA, A. Role of Physical Activity in Diabetes Management and Prevention. J Am Diet Assoc.108:S19-S23, 2008.

HENRY, Y. M., FATAYERJI, D. EASTELL, R. Attainment of peak bone mass at the lumbar spine, femoral neck and radius in men and women: relative contributions of bone size and volumetric bone mineral density. Osteoporosis Int; 15:263-273, 2004.

HOFBAUER, L. C., BRUECK, C. C., SINGH, S. K., DOBNIG, H. Osteoporosis in Patients With Diabetes Mellitus. JBMR vol 22, n. 9, 2007.

HOU, J. C., ZERNICKE, R. F., BARNARD, R. J. Experimental diabetes, insulin treatment, and femoral neck morphology and biomechanics in rats. Clin Orthop Relat Res. (264):278-85, Mar; 1991.

HOU, J. C., ZERNICKE, R. F., AND BARNARD, R. J. Effects of Severe Diabetes and Insulin on the Femoral Neck of the Immature Rat. Journal of Orthopaedic Research 11:263-271, 1993.

HOWARTH, F. C.; JACOBSON, M.; SHAFIULLAH, M.; ADEGHATE, E. Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in streptozotocin-induced diabetic rat. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 33, 327–331, 2006a.

HOWARTH, F. C., AL-SHAMSI, N., AL-QAYDI, M., AL-MAZROUEI, M., QURESHI, A., CHANDRANATH, S. I., KAZZAM, E. and ADEM, A. Effects of brain natriuretic peptide on contraction and intracellular Ca<sup>2+</sup> in ventricular myocytes from the streptozotocin-induced diabetic rat. Ann N Y Acad Sci, v.1084, Nov, p.155-65. 2006b.

HOWARTH, F. C.; CHANDLER, N. J., KHARCHE, S., TELLEZ, J. O., GREENER, I. D., YAMANUSHI, T. T., BELLETER, R. BOYETT, M. R., ZHANG, H. and DOBRZYNSKI, H. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin 43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. Moll Cell. Biochem. v. 319, n1-2. Dec, p.105-14. 2008.

HOWARTH, F. C.; MARZOUQI, F. M. A.; AL SAEEDI, A. M. S.; RASHEED SHAUL HAMEED, R. S.; ADEGHATE, E. The Effect of a Heavy Exercise Program on the Distribution of Pancreatic Hormones in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. JOP. J Pancreas (Online) Sep 4; 10(5):485-491, 2009.

HUANG, T. H., LIN, S. C., CHANG, F. L., HSIEH, S. S., LIU, S. H. and YANG, R. S. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol, v.95, n.1, Jul, p.300-7, 2003.

HUANG, T. H., CHANG, F. L., LIN, S. C., LIU, S. H., HSIEH, S. S. and YANG, R. S. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. J Bone Miner Metab, v.26, n.4, p.350-7, 2008.

HUANG, T. H.; HSIEH, S. H.; LIU, S. H.; CHANG, F. L.; LIN, S. C.; YANG, R. S. Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. Calcif Tissue Int. v.86, Feb. 142-153, 2010.

INZERILLO, A. M., and EPSTEIN, S. Osteoporosis and diabetes mellitus. Endocrine & Metabolic Disorders v.5, Aug, p.261-268, 2004.

IRVING, B. A., DAVIS, C. K., BROCK, D. W., WELTMAN, J. Y., SWIFT, D., BARRETT, E. J., GAESSER, G. A. E WELTMAN, A. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. Med Sci Sports Exerc.; v.40, n.11, p.1863-72, Nov, 2008.

ISAKSSON, H., TOLVANEN, V., FINNILA, M. A., IIVARINEM, J., TUUKKANEN, J., SEPPÄANEN, K., AROKOSKI, J. P., BRAMA, P. A., JURVELIN, J. S., HELMINEN, H. J. Physical exercise improves properties of bone and its collagen network in growing and maturing mice. Calcif Tissue Int., v.85 n.3, Sep, p247-56. 2009.

IWAMOTO, J, TAKEDA, T. and ICHIMURA, S. Effects of exercise on bone mineral density in nature osteopenic rats. J Bone Miner Res, v. 13, n 8, p 1308-17, Aug, 1998.

IWAMOTO, J., TAKEDA, T. and SATO, Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. Exp Anim, v.54, n.1, Jan, p.1-6, 2005.

JANGHORBANI, M., VAN DAM, R. M., WILLET, W. C., and HU, F. B. Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture. Am J Epidemiol;166:495–505, 2007.

JORGE, L., PUREZA, D. Y., DIAS D. S., CONTI F. F., IRIGOYEN, M. C., DE ANGELIS, K. Dynamic Aerobic Exercise Induces Baroreflex Improvement in Diabetic Rats. Experimental Diabetes Research vol. 2012.

JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R. Coloração diferencial de colágeno tipo I, II, III por *picrosirius red* e microscopia de polarização. Arch. Histológico. Jpn. 41 (3): 267-272, 1978.

KAHN, C. R.; WEIR, G. L.; KING, G. C.; JACOBSON, A. M.; MOSES, A. C.; SMITH, R. J. JOSLIN: *Diabetes Melito*. 14 ed, [s.I] Artmed, 2009.

KARSENTY, G & FERRON, M. The contribution of bone to whole-organism physiology. Nature Vol 481: 19 January 2012.

KHAN, K.; MCKAY, H.; KANNUS, P.; BAILEY, D.; WARK, J. E BENNELL, K. **Physical Activity and Bone Health**. Human Kinetics. 2001.

KIELTY C. M.; HOPKINSON, I.; GRANT, M. E. The collagen family: structure, assembly and organization in the extracellular matrix. In: Royce PM, Steinmann B, editors. Connective tissue and its heritable disorders. New York: Wiley-Liss; p. 103–47, 1993.

KLEIN-NULEND, J.; BACABAC, R. G.; MULLENDER, M. G. Mechanobiology of bone tissue: Mecanobiologie du tissu osseux. Pathologie Biologie 53: 576–580, 2005.

KONRAD, R. J.; MIKOLAENKO, I.; TOLAR, J. F.; LIU, K. and KUDLOW, J. E. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. Biochem J, v.356, n.Pt 1, May 15, p.31-41. 2001.

KOURTOGLOU, G. I., Insulin therapy and exercise. Diabetes Research and clical practice 93s; s73–s77, 2011.

LAHAYE, S. L. D.; GRATAS- DEMARCHE, A.; MALARDÉ, L.; ZGUIRA, S.; VICENT, S.; MOREL, S. L.; CARRÊ, F.; BEKONO, F. R. Combined insulin treatment and exercise training improved basal cardiac function and Ca<sup>2+</sup> cycling proteins expression in type 1 diabetic rats. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 37: 53-62, 2012.

LEME, J. A. C. A.; SILVEIRA, R.F.; GOMES, R. J.; MOURA, R. F.; SIBUYA, C. A.; MELLO, M.A.R.; LUCIANO, E. Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. Growth Hormone & IGF Research;19, p. 262–266, 2009.

LEMURA, L. M. & DUVILLARD, S. P. **Fisiologia do Exercício Clínico. Aplicação e Princípios Fisiológicos.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006. p. 409-419.

LI, K. C.; ZERNICKE, R.F.; BARNARD, R. J.; LI, A. F-Y. Response of immature diabetic rat bone-ligament junctions to insulin and exercise. Clinical Biomechanics; vol. 10, No. 6, p. 331-336, 1995.

LIRANE-GALVÃO, A. P.; CASTRO, M. L. Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. Arq Bras Endocrinol Metab., v.54, n.2, Mar, p.171-178, 2010.

LOGANATHAN, R.; BILGEN, M.; AL-HAFEZ.; ZHERO, S. D.; ALENEZY, M. D.; and SMIRNOVA, I. V. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. J. Appl. Physiol. v.102, n. 2, Feb. p-665-72. 2007.

LU, H.; KRAUT, D.; GERSTENFELD, L. C.; GRAVES, D. T. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression on transcription factors that regulate osteoblast differentiation. Endocrinology; v.144, n.1, Jan, p.346-352, 2003.

LUTHER, F.; SAINO, H.; CARTER, D. H.; AARONA, J. E. Evidence for an extensive collagen Type III/VI proximal domain in the rat fêmur I Diminution with ovariectomy. Bone; 32 652–659, 2003.

MAAHS, D. M.; WEST, N. A.; LAWRENCE, J. M.; MAYER-DAVIS, E. J. Epidemiology of Type 1 Diabetes. Endocrinol Metab Clin N Am 39: 481–497, 2010.

MAGGIO, A. B. R.; RIZZOLI, R. R.; MARCHAND, L. M.; FERRARI, S.; BEGHETTI, M.; FARPOUR-LAMBERT, N. J. Physical Activity Increases Bone Mineral Density in Children with Type 1 Diabetes. Medicine & Science In Sports & Exercise, 2012.

MASTRANDREA, L. D.; WACTAWSKI-WENDE, J.; DONAHUE, R. P.; HOVEY, K. M.; CLARK, A.; QUATTRIN, T. Young Women With Type 1 Diabetes Have Lower Bone Mineral Density That Persists Over Time. Diabetes Care. 31:1729–1735, 2008.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício. Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. Sex Ed. Rio de Janeiro. 2008.

McCABE, L. R. Understanding the Pathology and Mechanisms of Type I Diabetic Bone Loss. Journal of Cellular Biochemistry, v.102, p.1343-1357, 2007.

McVEIGH, J.; KINGSLEY, S.; GRAY, D.; LORAM, L.C. Swimming enhances bone mass acquisition in growing female rats. J. Sports. Sci. Med. 9:612-619, 2010.

MEDEIROS, A.; GIANOLLA, R. M.; KALIL, L. M. P.; BACURAU, R. F. P.; ROSA, L. F. B. C.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. Rev Paul Educ Fis, Fís. v.14, p.7-15, jan./jun. 2000.

MENON, R. K.; STHEPAN, D. A.; RAO, R. H.; SHEN-ORR, Z.; DOWNS, L.S.; ROBERTS, JR. C. T.; LEROITH, D.; PERLING, M. A. A tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozocin-induced diabetes in the rat. J. Endocrinol. v.142, n.3, Sep, p.453-62. 1994.

MIAO, J.; BRISMAR, K.; NYRÉN, O.; UGARPH-MORAWSKI, A; YE W. Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: a population-based cohort study in Sweden. Diabetes Care; 28:2850–2855, 2005.

MIAZGOWSKI, T.; PYNKA, S.; NOWORYTA-ZIEŁM.; BARBARA KRZYŻANOWSKA-SŹWINIARSKA, B.; and PIKUL, R. Bone mineral density and hip structural analysis in type 1 diabetic men. European Journal of Endocrinology; 156: 123–127, 2007.

MOSTARDA, C.; ROGOW, A.; MORAES SILVA, I. C.; DE LA FUENTE, R. N.; JORGE, L.; RODRIGUES, B.; HEEREN, M. V.; CALDINI, E. G.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 145; 11–16, 2009.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. 419p.

MOYER-MILEUR, L. J.; SLATER, H.; JORDAN, K. C.; MURRAY, M. A. IGF-1 and IGF-Binding Proteins and Bone Mass, Geometry, and Strength: Relation to Metabolic Control in Adolescent Girls With Type 1 Diabetes. Journal of bone and mineral research. v. 23, n 12, 2008.

NEGRÃO C.E.; MOREIRA E.D.; SANTOS M. C. L. M.; FARAH, V. M. A.; KRIEGER E.M. Vagal function impairment after exercise training. Journal of Applied Physiology, 72: 1749-1753, 1992.

NEGRATO C. A.; DIAS J. P.; TEIXEIRA M. F.; DIAS A.; SALGADO M.H.; LAURIS J.R.; MONTENEGRO R. M JR.; GOMES M. B.; JOVANOVIC L. Temporal trends in incidence of Type 1 diabetes between 1986 and 2006 in Brazil. Endocrinol Invest. 33(6):373-7, Jun, 2010.

NYMAN, J. S.; EVEN, J. L.; JO, C. H.; HERBERT, E. G.; MURRY, M. R.; COCKRELL, G. E.; WAHL, E. C.; BUNN, R. C.; LUMPKIN, C. K.; FOWLKES, J. L.; THRAILKILL, K. M. Increasing duration of type 1 diabetes perturbs the strength-structure relationship and increases brittleness of bone. Bone 48: 733-740, 2011.

OGATA, N., CHIKAZU, D.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; TOBE, K.; AZUMA, Y.; OHATA, T.; KADOWAKI, T.; NAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, H. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. The Jouof Clinical Investigation, v. 105, n.7, Apr, p. 935-943, 2000.

PALMA, P. J. R. Estudo de novas formulações para regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica. (Mestrado em Patologia Experimental) Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.

PERRINI, S.; NATALICCHIO, A.; LAVIOLA, L.; CIGNARELLI, A.; MELCHIORRE, A.; DE STEFANO, F.; CACCIOPPOLI, C.; LEONARDINI, A.; MARTEMUCCI, S.; BELSANTI, G.; MICCOLI, S.; CIAMPOLILLO, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, A. P.; GIORGINO, R.; AND GIORGINO, F. Abnormalities of Insulin-Like Growth Factor-I Signaling and Impaired Cell Proliferation in Osteoblasts from Subjects with Osteoporosis. Endocrinology, March, 149(3):1302–1313, 2008.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; and NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep, v.29, May, p.91-8. 1963.

RAW, ISAIAS. Mecanismo de ação da insulina. Revista de Medicina. v.4 n. 85, p. 124-129. São Paulo, out.-dez, 2006.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; HAMADE, S.; ENWEMEKA, C. S. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice, 2001; 54 1–8.

REGENSTEINER, J. G.; REUSCH, J. E. B.; STEWART, K. J.; VEVES, A. **Diabetes and Exercise**. Humana Press, 2009.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annual Review of Biomedical Engineering, Palo Alto, v. 8, p. 455-498, 2006.

ROSS, M. H, E PAWLINA, W. **Histologia**. Em correlação com biologia celular e molecular. 4º Ed. Ed Guanabara Koogan. RJ. 2008.

SAHA, M. T.; SIEVÄNEN, H.; SALO, M. K.; TULOKAS, S.; SAHA, H. H. Bone mass and structure in adolescents with type 1 diabetes compared to healthy peers. Osteoporos Int, 20:1401–1406, 2009.

SAINO, H.; LUTHER, F.; CARTER, D. H.; NATALI, A. J.; TURNER, D.L.; SHAHTAHERI, S. M.; AARONA, J. E. Evidence for an extensive collagen Type III proximal domain in the rat femur II. Expansion with exercise. Bone 32: 660–668, 2003.

SAITO, M.; FUJII, K.; MORI, Y.; and MARUMO, K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic BN/Kob rats. Osteoporos. Int. 17(10):1514–1523, 2006a.

SAITO, M.; FUJII, K.; SOSHI, S.; and TANAKA, T.. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. Osteoporos. Int. 17(7):986–538 995, 2006b.

SAITO, M. & MARUMO K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. Osteoporos Int; 21: 195-214, 2010.

SARAIVA, G. L. E LAZARETTI-CASTRO, M. marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.

SCHAAN, B.D.; DALL'AGO, P.; MAEDA, C.Y.; FERLIN, E.; FERNANDES, T.G.; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M.C. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in Seeman, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. J Bone Miner Metab, v.26, n.1, p.1-8, 2008.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. J Bone Miner Metab, v.26, n.1, p.1-8. 2008.

SILVA, M. J.; BRODT, M. D.; LYNCH, M. A.; MCKENZIE, J. A.; TANOUYE, K. M.; NYMAN, J. S.; WANG, X. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. J. Bone and Miner. Res. v.24, n.9, p. 1618-1627, 2009.

SILVA, K. A. Efeitos do exercício físico sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com diabetes mellitus experimental. (Mestrado em Educação Física) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Atualização Brasileira sobre diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Revisão sobre análogos de insulina: indicações e recomendações para a disponibilização pelos serviços públicos de saúde. Posicionamento Oficial SBD nº 01/2011 São Paulo, Fevereiro de 2011.

SOTO, N.; PRUZZOB, R.; EYZAGUIREC, F.; IÑIGUEZC, G.; LÓPEZA, P; MOHRC, J.; PÉREZ-BRAVOD, F.; CASSORLAC, F.; CODNERC, E. Bone mass and sex steroids in postmenarcheal adolescents and adult women with Type 1 diabetes mellitus. J Diabetes Complications; 25:19–24, 2011.

SOUZA, M. Z.; LUCIANO, E. Influências do Treinamento Físico sobre o Crescimento Ósseo de Ratos Diabéticos. Saúde Rev., Piracicaba, 7(16): 27-35, 2005.

SPENCER, E. M.; LIU, C. C.; SI, E. C. C.; HOWARD, G. A. In Vivo Actions of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) on Bone Formation and Resorption in Rats. Bone, 12, 21-26 1991.

STANDARDS of Medical Care in Diabetes. Position Statement. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. DIABETES CARE, VOLUME 31, SUPPLEMENT 1, JANUARY 2008.

STANDARDS of Medical Care in Diabetes. Position Statement. Diabetes Care. v.32, Suppl. 1 Jan p. S13-S69, 2009.

STANDARDS of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care. v.33, Suppl. 1 Jan p. S11-S61, 2010.

STEHNO-BITTEL, L. Organ-Based Response to Exercise in Type 1 Diabetes. ISRN Endocrinology Volume 2012, Article ID 318194, 14 pages.

STROTMAYER, E.S.; and CAULEY, J.A.. Diabetes mellitus, bone mineral density, and fracture risk. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 14(6):429–435, 2007.

SWISSA-SIVAN, A.; LEICHTER, I.; SIMKIN, A.; NYSKA, A.; NYSKA, J. M.; STATTER, M.; BIVAS', A.; MENCZE, J.; SOMUELOFF, S. Effect of swimming on bone growth and development in young rats. Bone and Mineral; 91-105, 1989.

SWISSA-SIVAN, A.; AZOURY, R.; STOTTER, M.; LEICHTER, I.; NYSKA, A.; NYSKA, J. M.; SOMUELOFF, S. The effect of swimming on bone modeling and composition in young adults rats. Calcif. Tissue Int; 47: 173-177, 1990.

THRAILKILL, K. M.; LUMPKIN, C. K.; BUNN, R.; KEMP, S. F.; FOWLKES, J. L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. n.289, p.725-745, Jun, 2005a.

THRAILKILL, K. M. LIU, L.; WAHL, E. C.; BUNN, R. C.; PERRIEN, D. S.; COCKRELL, G. E.; SKINNER, R. A.; HOUGE, W. R.; CARVER, A. A.; FOWLKES, J. L.; Aronson, J.; Lumpkin Jr. C. K. Bone Formation Is Impaired in a Model of Type 1 Diabetes. Diabetes, vol. 54, Oct 2005b.

TOMASEK, J. J.; MEYERS, S. W.; BASINGER, J. B et al. Diabetic and age-related enhancement of collagen-linked fluorescence in cortical bones of rats. Life Sci; 55:855–861, 1994.

TSCHIELDEL, B. & PUÑALES, M. **Insulinas: insulinizando o paciente com diabetes.** Itapevi – SP: Ed AC Farmacêutica, 2010.

TSUJI, S.; KATSUKAWA, F.; ONISHI, S.; YAMAZAKI, H. Period of adolescence during which exercise maximizes bone mass in young women. J Bone Miner Metab; 14:89-93, 1996.

TUREK, S. L. **Ortopedia: princípios e sua aplicação**. 4. ed., São Paulo: Manole, 1991. p.250-257.

TURNER, C. H. & ROBLING, A. G. Designing exercise regimens to increase bone strength. Exerc Sport Sci Rev, v.31, n.1, Jan, p.45-50. 2003.

TURNER, C. H & BOBLING, A. G. Mechanisms by whci exercise improves bone strength. J. Bone Miner. Metab. 23 Supll, 16-22, 2005.

VASHISHTH, D. The Role of the Collagen Matrix in Skeletal Fragility. Current Osteoporosis Reports, 5:62–66, 2007.

VERHAEGHE, J.; THOMSEN, J.S.; VAN BREE, R.; VAN HERCK, E.; BOUILLON, R.; AND MOSEKILDE, L.I. Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. Bone. 27(2):249–256, 2000.

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; and MOSEKILDE, L.. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. Calcif. Tissue. Int. 84(1):45–55, 2009.

VIBOOLVORAKUL, S., NIIMI, H.; WONGEAK-IN, N.; EKSAKULKLA, S.; PATUMRAJ S. Increased capillary vascularity in the femur of aged rats by exercise training. Microvasc Res; 78: 459-463, 2009.

VICENTE-RODRIGUEZ, G.; EZQUERRA, J.; MESANA, M. I.; FERNANDEZ-ALVIRA, J. M.; REY-LOPEZ, J. P.; CASAJUS, J. A.; AND MORENO, L. A. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. J Bone Miner Metab;; v.26, n.5, p.416-24, 2008.

VICENTINI, C. R.; ROSA, R. A. C.; CIARLINI, L. D. R. P.; SANTOS, P. H.; LOUZADA, M.J.Q. Análise Biomecânica em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira. Vet e Zootec, v.14, n.1, Jun, p.62-71, 2007.

WEISS, R. E.; and REDDY, A. H. Influence of experimental diabetes and insulin on matrix induced cartilage and bone differentiation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 238(3):200–570, 1980.

WELCH, J.M.; TURNER, C.H.; DEVAREDDY, D.; ARJMANDI, B.H.; and WEAVER, C.M. High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. Bone. 42(4):660–668, 2008.

WHERRETT, D. K.; and DANEMAN, D. Prevention of Type 1 Diabetes. Endocrinol Metab Clin N Am 38: 777–790, 2009.

WONGDEE, R. & CHAROENPHANDHU, N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. World J Diabetes; March 15; 2(3): 41-48, 2011.

YAMAGUCHI, T., Bone fragility in type 2 diabetes mellitus. World J Orthop. November 18; 1(1): -9, 2010.

YANG, J.; ZHANG, X.; WANG, W.; LIU, J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. Cell Biochem Funct. Jun;28(4):334-41, 2010.

YARDLEY, J. E.; KENNY, G. P.; PERKINS, B. A.; RIDDELL, M. C.; MALCOLM, J.; BOULAY, P.; KHANDWALA, F.; SIGAL, R. J. EffectsofPerformingResistance Exercise Before Versus After Aerobic Exercise on Glycemia in Type 1 Diabetes. DIABETES CARE February 28, 2012.

ZHANG, M.; XUAN, S.; BOUXSEIN, M.L.; VON STECHOW, D.; AKENO, N.; FAUGERE, M.C.; MALLUCHE, H.; ZHAO, G.; ROSEN, C.J. Efstratiadis A, Clemens TL. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. J Biol Chem; 277: 44005-44012, 2002.

ZHANG, Y.; PAPASIAN, C. J.;DENG, H-W. Alteration of vitamin D metabolic enzyme expression and calcium transporter abundance in kidney involved in type 1 diabetes-induced bone loss. Osteoporos Int, 22:1781–1788, 2011.

ZAPF, J.. Growth promotion by insulin-like growth factor I in hypophysectomized and diabetic rats. Mol. Cell. Endocrinol. 140 (1):143-149. 1998.