

KARINA ANA DA SILVA

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

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
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586e
2011

Silva, Karina Ana da, 1978-

Efeitos do exercício físico sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com *Diabetes mellitus* experimental / Karina Ana da Silva. – Viçosa, MG, 2011.
xii, 55f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antônio José Natali.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 47-55

1. Exercícios físicos. 2. Diabetes. 3. Ossos. 4. Osteoporose.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

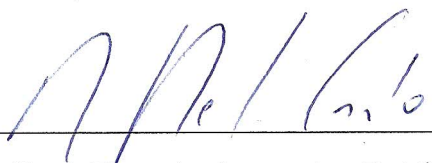
CDD 22. ed. 613.7

KARINA ANA DA SILVA

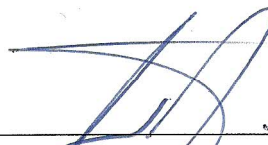
**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PROPRIEDADES
ESTRUTURAIS E MECÂNICAS DO FÊMUR DE RATOS COM *DIABETES
MELLITUS* EXPERIMENTAL**

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*.

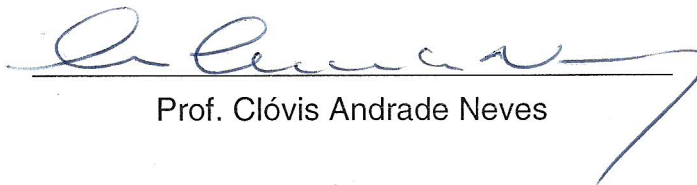
APROVADA: 27 de maio de 2011.



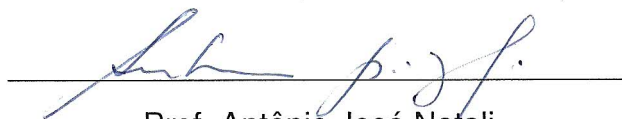
Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Coorientador)



Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Coorientador)



Prof. Clóvis Andrade Neves



Prof. Antônio José Natali
(Orientador)

A Deus, por mais essa benção.

Aos meus pais, pelo exemplo de perseverança.

Ao meu irmão, pelo apoio constante.

*De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!
(Fernando Sabino)*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade concedida, pelo alento e pela força quando os desafios pareciam intransponíveis.

Aos meus pais, Adão e Aparecida, pelo amor incondicional, por não me deixarem abater e pela confiança de que tudo daria certo.

Ao meu irmão, Paulinho e à minha cunhada, Ana Paula, pelas palavras de conforto nesta caminhada.

Ao professor e orientador Antônio José Natali, pela confiança, pela oportunidade e pelo exemplo de ética.

Aos meus coorientadores, professores Ricardo Junqueira Del Carlo, Sérgio Luis Pinto da Matta e Carlos Henrique Osório, pela presteza em atender-me quando era necessário, pelos conselhos e por terem aceitado este convite.

Aos grandes e eternos companheiros do G-8, Cynthia, Schin, Rodrigo, Ana Luiza, Erivelton, Thiago e Ariana, que sempre acreditaram no êxito deste sonho.

Aos grandes amigos, Miguel, Judson, Lucas, Bárbara e Juliana, pela paciência com os momentos de extremo estresse e, também, pelas horas de divertimento singular.

À Aurora, nova amiga, pela serenidade com que me acompanhou durante esta trajetória.

Aos amigos do biotério, Filipe Rios, Márcia, Vitor, Felipe Belfort, Matheus, Regiane, Ângela, Arlete, pela parceria e boa vontade em ajudar.

Ao Professor Mário Jefferson Quirino, pela disponibilidade e simpatia em me receber, por abrir as portas para a realização de um sonho e por ser essa figura carismática e singular.

À Bruna Biffe, pelo auxílio indispensável, pela nova amizade e pela adorável acolhida em Araçatuba, SP.

Ao professor Lino, pela atenção dispensada.

A Universidade Federal de Viçosa, pelo conhecimento adquirido.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que, ao meu lado, fizeram com que este trabalho se transformasse de um grande sonho a uma grande realidade.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. <i>Diabetes Mellitus</i>	4
3.1.1 O modelo experimental de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina	5
3.2. Tecido ósseo.....	6
3.2.1 Crescimento, modelação e remodelação óssea	9
3.2.2 Biomecânica do osso.....	11
3.3. <i>Diabetes mellitus</i> e tecido ósseo.....	12
3.4. <i>Diabetes mellitus</i> e exercício físico	13
3.5. Tecido ósseo e exercício físico	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Animais de experimentação e tratamentos	18
4.2. Indução de Diabetes	19
4.4. Avaliação da Densidade Mineral Óssea	20
4.5. Avaliação da Resistência Óssea.....	21
4.6. Exame Histomorfométrico.....	23
4.7. Análise Estatística.....	25

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Peso corporal e glicemia.....	26
5.2. Propriedades estruturais do fêmur.....	29
5.2.1. Peso e comprimento do fêmur dos animais dos grupos experimentais.	29
5.2.2. Área, conteúdo mineral e densidade mineral do fêmur	31
5.3. Propriedades mecânicas do fêmur	35
5.3.1. Propriedades mecânicas do colo do fêmur.....	35
5.3.2. Ensaio mecânico da diáfise do fêmur	38
5.4. Histomorfometria do fêmur.....	40
6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – Associação Americana de Diabetes
ad libitum - do latim “à vontade”
ANOVA – análise de variância
BMP – proteínas morfogenéticas ósseas
BC – *baseline* controle
BD – *baseline* diabético
°C – temperatura (graus Celsius)
CE – controle exercitado
CS – controle sedentário
CMO – conteúdo mineral ósseo
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DE – diabético exercitado
DM – *diabetes mellitus*
DMO – densidade mineral óssea
DS – diabético sedentário
FCF – força no colo do fêmur
FDF – força na diáfise do fêmur
GH – hormônio de crescimento
GLUT- 4 – Transportador de glicose tipo 4
IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina
IRS – substrato do receptor de insulina
MEC – matriz extracelular cartilaginosa
OPG – osteoprotegerina
post-hoc – do latim “depois disto”
PTH – hormônio da paratireoide
RANK – receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$
RANK-L ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$
RCF – rigidez no colo do fêmur
RDF – rigidez na diáfise do fêmur
STZ – estreptozotocina
SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes
TCF – tenacidade no colo do fêmur
TDF – tenacidade na diáfise do fêmur

UBM – unidade básica do metabolismo

VTO – Volume Trabecular Ósseo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia do ensaio mecânico de flexão em três pontos, em diáfise de fêmur.....	22
Figura 2. Representação sistemática da curva da carga de deformação de um teste de três pontos para osso.....	22
Figura 3. Fotografia do ensaio mecânico de flexão no colo do fêmur de rato...	23
Figura 4. Desenho esquemático da determinação da espessura de osso cortical.	24
Figura 5. Peso e comprimento do fêmur dos animais dos grupos experimentais	30
Figura 6. Área, conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) do fêmur dos animais dos grupos experimentais	33
Figura 7. Rigidez, força máxima de fratura e tenacidade no colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	36
Figura 8. Rigidez, força máxima e tenacidade na diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais	39
Figura 9. Fotomicrografias da região do colo do fêmur de animais dos grupos experimentais.....	41
Figura 10. Volume trabecular ósseo (VTO) do fêmur dos animais dos grupos experimentais.....	42
Figura 11. Espessura cortical do fêmur dos animais dos grupos experimentais.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Progressão de Treinamento dos animais.....	20
Tabela 2. Peso corporal dos animais durante o período experimental.	26
Tabela 3. Glicemia de jejum dos animais durante o período experimental.	28

RESUMO

SILVA, Karina Ana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Efeitos do exercício físico sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com *Diabetes mellitus* experimental.** Orientador: Antônio José Natali. Coorientadores: Ricardo Junqueira Del Carlo, Sérgio Luis Pinto da Matta e Carlos Henrique Osório Silva.

O objetivo deste estudo foi o de investigar os efeitos de um programa de natação sobre as propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com *Diabetes mellitus* experimental (DM). Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar com 30 dias idade e peso corporal médio de 87,42 g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais: *baseline* controle (BC, n=15); *baseline* diabético (BD, n=15); controle sedentário (CS, n=10); controle exercitado (CE, n=10); diabético sedentário (DS, n=10); e diabético exercitado (DE, n=10). Os animais dos grupos BD, DE e DS receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de estreptozotocina (STZ), diluída em 1mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5). Os animais dos grupos BC, CS e CE receberam a mesma dose de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5) sem STZ. 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 45 dias de hiperglicemia (diabetes), os animais do grupo DE e CE foram submetidos a um programa de natação por oito semanas. Após a eutanásia, o fêmur esquerdo foi removido para avaliação da densidade mineral óssea (DMO), do conteúdo mineral ósseo (CMO), da força de fratura, rigidez e tenacidade óssea. O fêmur direito foi retirado, para determinação da morfometria óssea. Os resultados apresentaram que o DM experimental reduziu o CMO, a DMO, a rigidez, a força de fratura óssea, a tenacidade, o volume trabecular ósseo e a espessura cortical nos fêmures dos ratos, aos 45 dias de DM. Esses efeitos do DM permaneceram até o final do experimento (101 dias). O programa de natação utilizado aumentou o CMO, a DMO, a rigidez, o volume trabecular ósseo, nos animais sem DM; Entretanto esse não foi capaz de alterar os parâmetros ósseos analisados, nos com DM. Concluiu-se que o programa de natação aplicado não afetou as propriedades estruturais e mecânicas do fêmur dos animais com DM experimental; no entanto, houve efeitos positivos desse, nessas propriedades, no fêmur dos animais não diabéticos de controles.

ABSTRACT

SILVA, Karina Ana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2011.
Effects of exercise on structural and mechanical properties of the femur isolated from rats with experimental Diabetes mellitus. Adviser: Antônio José Natali. Co-advisers: Ricardo Junqueira Del Carlo, Sérgio Luis Pinto da Matta and Carlos Henrique Osório Silva.

The aim of this study was to investigate the effects of a swimming training program on structural and mechanical properties of the femur from rats with experimental diabetes mellitus (DM). Thirty days old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with mean body mass of 87.42 g were randomly divided into six experimental groups: baseline control (BC, n=15); baseline diabetic (BD, n=15); control sedentary (CS, n=10); control exercised (CE, n=10); diabetic sedentary (DS, n=10); and diabetic exercised (DE, n=10). Animals from BD, DE and DS groups received an intraperitoneal injection (60 mg/kg body mass) of streptozotocin (STZ) diluted in 1 mL of sodium citrate buffer (0.1 M, pH 4.5). Animals from BC, SC and EC groups received the same dose of sodium citrate buffer (0.1 M, pH 4.5) without STZ. Seven days after STZ injection those animals with fasting glucose above 300 mg/dL were considered diabetic. After 45 days of hyperglycemia (diabetes), animals from ED and EC groups were subjected to a swimming training program for 8 weeks. After euthanasia, the left femur was removed for assessment of bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone breaking force, stiffness and toughness. The right femur was removed for determination of bone morphometry. The results show that experimental DM reduced the bone breaking force, stiffness and toughness, the BMC and BMD, the trabecular bone volume and cortical thickness in the rats' femurs by the 45th day of DM. These DM effects remained until the end of the experiment (101 days). The swimming training program increased BMC, BMD, stiffness and the trabecular bone volume in the control animal femures. However, the swimming training program did not affect these bone parameters in diabetic animals. It was concluded that the swimming training program did not affect the structural and mechanical properties of the femur from rats with experimental DM, however positive effects of this exercise program on these bone properties were observed in non diabetic control rats.

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença metabólica, caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção da insulina e ação da insulina, ou ambos (ADA, 2009; 2010).

Há diferentes classes clínicas de diabetes: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Há ainda, duas categorias referidas como pré-diabetes, que são a *glicemia de jejum alterada* e a *tolerância à glicose diminuída*. O tipo mais comum de DM é o 1 que é evidenciado pela deficiência absoluta de insulina, resultante da destruição autoimune, ou por causas desconhecidas, das células beta pancreáticas. O DM tipo 2, é distinguido pela incapacidade das células musculares e adiposas metabolizar a glicose presente da corrente sanguínea, apesar da contínua produção de insulina pelo pâncreas. Esta anomalia é chamada de “resistência insulínica” (OLIVEIRA; MILECH, 2004; KAHN et al., 2009; ADA, 2009; 2010).

No final da década de 1980, estimou-se que o diabetes ocorria em cerca de 8% da população, de 30 a 69 anos de idade, residente em áreas metropolitanas brasileiras. Essa prevalência variava de 3% a 17%, entre as faixas de 30-39 e 60-69 anos; assim como a tolerância à glicose diminuída era igualmente de 8%, variando de 6 a 11% entre as mesmas faixas etárias (CADERNO DE ATENÇÃO BÁSICA MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), atualmente, não se tem ao certo a estimativa do número de pessoas no Brasil que possui o diabetes diagnosticado, uma vez que o estudo realizado pelo Ministério da Saúde aconteceu na década de 1980 e não foi repetido na população atual.

O DM tipo 1 está associado a muitas complicações, inclusive perda óssea e retardo na cicatrização óssea (MOTYL ; MCCABE, 2009). Nesse caso, é denominada “doença óssea do diabético” ou “osteopatia diabética” (RETZEPI; DONOS, 2010). Pacientes diabéticos exibem densidade mineral óssea reduzida nas vértebras lombares e na região proximal do fêmur (LU et al., 2003). Há evidências de que ocorre diminuição do crescimento, durante o estirão da puberdade, e alterações relacionadas aos processos de formação óssea em diabéticos (INZERILLO; EPSTEIN, 2004).

O exercício físico exerce efeitos osteogênicos sobre o sistema esquelético (CADORE et al., 2005; WARNER et al., 2006). As forças de tensão,

compressão e cisalhamento e a deformação mecânica repetida das contrações musculares resultam em um aumento das correntes elétricas pulsáteis no osso, por causa dos fenômenos piezoelétrico e de fluxo, que também são capazes de provocar alterações na estrutura óssea (TUREK, 1991). Essas forças mecânicas impostas pelo exercício exercem influência anabólica sobre os ossos (SOUZA et al., 2005).

Em indivíduos diabéticos, além dessas ações mecânicas, o exercício físico regular pode aumentar a sensibilidade à insulina, em indivíduos com DM tipo 2 (DE FEO et al., 2006; KAHN et al., 2009). A diminuição da glicemia e o aumento dos níveis de GH e IGF-1, em indivíduos treinados, podem promover o desenvolvimento ósseo (SOUZA et al., 2005).

Acredita-se que a prática regular de exercício físico pode contrapor os efeitos deletérios do DM sobre o sistema ósseo. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um programa de exercício físico sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com DM experimental.

Neste trabalho, portanto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

H_0 - O exercício físico não altera as propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com *diabetes mellitus* experimental.

H_1 - O exercício físico altera as propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com *diabetes mellitus* experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos de um programa de natação sobre propriedades estruturais e mecânicas do fêmur de ratos com *diabetes mellitus* experimental.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar como um programa de natação afeta os animais com *diabetes mellitus* experimental, em relação as seguintes variáveis:

- Densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo do fêmur.
- Resistência à fratura do colo e da diáfise do fêmur.
- Histomorfometria do colo e da diáfise do fêmur.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Diabetes Mellitus*

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença metabólica, caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção da insulina e da ação da insulina, ou ambos (ADA, 2009; 2010).

A hiperglicemia crônica do diabetes está associada aos danos no longo prazo, às disfunções e à falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (SBD, 2007; ADA, 2009; 2010). Os sintomas da hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso e, algumas vezes, polifagia e visão turva. Em longo prazo, o DM causa retinopatia acompanhada de perda da visão, nefropatia e falência renal e neuropatia, resultando em ulcerações nos pés, amputações e articulações de Charcot (doença neuropática articular)(ADA, 2009; 2010).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui algumas classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM, e DM gestacional, havendo, ainda, duas categorias referidas como pré-diabetes, que são a *glicemia de jejum alterada* e a *tolerância à glicose diminuída*. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares (SBD, 2007).

O *diabetes mellitus* tipo 1 (5% a 10% do total de casos de diabetes) é caracterizado pela deficiência absoluta de insulina. Esse resulta, primariamente, da destruição das células beta pancreáticas, com tendência à cetoacidose, bem como inclui casos decorrentes de doença autoimune e aqueles em que a causa da destruição das células beta não é conhecida (causa idiopática). Alguns pacientes, particularmente crianças e adolescentes, apresentam a cetoacidose como a primeira manifestação da doença; outros podem apresentar modestas hiperglicemias, que podem mudar rapidamente para severas hiperglicemias e, ou, cetacidoses, na presença de infecção ou de outros estresses (ADA, 2010). A destruição autoimune das células beta tem predisposições genéticas e também está relacionada a fatores ambientais ainda não completamente definidos (ADA, 2009; 2010; KAHN et al., 2009).

O *diabetes mellitus* tipo 2 (90% a 95% do total de casos de diabetes) é caracterizado pela incapacidade de absorção das células musculares e adiposas. Por muitas razões, as células não conseguem metabolizar a glicose presente na corrente sanguínea, apesar da contínua produção de insulina pelo pâncreas. Essa anomalia é chamada de “resistência insulínica”. Os pacientes com DM tipo 2 podem responder ao tratamento com dieta e exercício físico, medicamentos orais e, por fim, da combinação desses com a insulina (SBD, 2009). A cetoacidose ocorre raramente nesse tipo de diabetes, mas pode acontecer em associação com o estresse de outras doenças como as infecções (ADA, 2010). A hiperglicemia no DM tipo 2 geralmente se desenvolve de forma gradual, não sendo suficiente nos estágios iniciais para promover o aparecimento dos sintomas clássicos. A causa desse desenvolvimento gradual é a evolução da doença que se inicia com leve resistência à ação da insulina, podendo culminar com a deficiência na produção dessa (OLIVEIRA; MILECH, 2004; ADA, 2009; 2010).

3.1.1 O modelo experimental de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina

A ação diabetogênica da estreptozotocina (STZ), substância isolada do *Streptomyces achromogenes*, foi descrita inicialmente por Rakiety et al. (1963) e depois por 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); e promove lesão nas células beta pancreáticas, por reduzir os níveis de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) disponível nessas células (AKBARZADEH et. al., 2007).

O exame de ossos de ratos com diabetes induzido por STZ demonstram diminuição significativa da fração de volume ósseo, determinada pela diminuição dos níveis de marcadores de maturação dos osteoblastos e

aumento nos níveis dos marcadores da adipogênese (MOTYL; MCCABE, 2009).

3.2. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo rígido, flexível, em que a matriz extracelular foi impregnada com sais de cálcio e fosfato amorfos, por um processo chamado de mineralização. Esse tecido é altamente vascularizado e metabolicamente muito ativo (KIERSZENBAUM, 2008). Suas principais funções são sustentação e proteção para o corpo e órgãos e reservatório para íons cálcio e fosfato.

Sob o aspecto morfológico, esse tecido ainda pode ser dividido, em cortical e trabecular. O cortical é um tecido ósseo compacto, predominante na haste central, ou diáfise dos ossos longos (como o fêmur), que delimita um cilindro oco, com um espaço central chamado de cavidade ou canal medular. O osso trabecular ou esponjoso é um tecido ósseo formado por trabéculas e encontrado na extremidade dos ossos longos, que é chamada de epífise que delimitam o espaço ocupado pela medula óssea e recoberta por uma fina camada de tecido ósseo compacto (AIRES, 2008; KIERSZENBAUM, 2008).

A superfície externa dos ossos é revestida pelo periósteo, que é formado de tecido conjuntivo, contendo na camada mais superficial principalmente fibras colágenas e fibroblastos. A porção mais interna desses ossos é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras, que se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação de fraturas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A camada externa é rica em vasos sanguíneos, alguns desses penetram pelos forames nutritivos; e em espessas fibras colágenas de ancoragem, chamadas de fibras de Sharpey, que penetram profundamente nas lamelas circunferenciais externas (KIERSZENBAUM, 2008).

O endósteo é formado por células pavimentosas e fibras do tecido conjuntivo, que revestem as paredes do tecido ósseo esponjoso, abrigando a medula óssea e se estendendo para todas as cavidades do osso, incluindo os canais de Havers e Volkmann (KIERSZENBAUM, 2008).

A matriz extracelular contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). As células osteoclastos, osteoblastos e osteócitos

correspondem a uma pequena parte da massa óssea, sendo responsáveis pela função de regulação da distribuição e do conteúdo do componente inorgânico; portanto, pela manutenção dos níveis circulantes de cálcio (homeostase mineral) e pela contínua reabsorção e formação (modelação e remodelação) da matriz óssea, fazendo com que o sistema esquelético responda às forças mecânicas, geradas pela sustentação de pesos e atividade física (homeostase esquelética) (AIRES, 2008).

O osteoblasto, localizado na superfície de formação óssea, é uma célula secretora versátil, que retém a capacidade de se dividir e secreta tanto o colágeno tipo 1 (que constitui 90% das proteínas do osso) quanto as proteínas da matriz óssea que constituem o osso desmineralizado inicial, ou osteóide. As proteínas da matriz óssea produzidas pelo osteoblasto incluem proteínas de ligação com o cálcio como a osteocalcina e a osteonectina. Essa célula também é responsável pela calcificação da matriz óssea. O processo de calcificação parece ser iniciado pelo osteoblasto, por meio da secreção para dentro de pequenas vesículas da matriz, limitadas por membranas. As vesículas são ricas em fosfatase alcalina e ativamente secretadas, apenas durante o período em que a célula produz a matriz óssea (ROSS; PAWLINA, 2008).

A função osteoblástica é controlada por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Hormônios como PTH, vitamina D3, glicocorticoides e esteroides gonadais atuam diretamente sobre os osteoblastos (KHAN et al., 2001).

Em contraste com os osteoblastos secretores encontrados na deposição ativa da matriz, os osteoblastos inativos são células achatadas, que cobrem a superfície óssea, e se assemelham às células osteoprogenitoras. Os osteoblastos respondem aos estímulos mecânicos para mediar as alterações no crescimento ósseo e na remodelação óssea. À medida que ocorre a deposição de osteoide, o osteoblasto é circundado mais adiante por matriz de osteoide e, em seguida, transforma-se em osteócito (ROSS; PAWLINA, 2008).

Os osteócitos são osteoblastos que, após mineralização do osteoide ao seu redor, tornam-se prisioneiros em lacunas ósseas, não significando, entretanto, que os osteócitos apresentem modificações acentuadas de suas propriedades funcionais ou estejam isolados dos osteoblastos. Os osteócitos jovens ainda guardam algumas das características ultraestruturais osteoblásticas, permanecendo em contato com os osteoblastos por uma vasta

rede de extensões celulares, que alcança esses osteoblastos, por meio de canalículos ósseos (AIRES, 2008). Os osteócitos são as células responsáveis por manter a matriz óssea. Um dos papéis dessas células é o de mecanotransdução, em que o osteócito responde às forças mecânicas aplicadas ao osso. Diferentes estímulos mecânicos alteram não somente a expressão gênica, mas também o mecanismo apoptótico da célula (ROSS; PAWLINA, 2008).

Os osteoclastos são macrófagos policarióticos, formados a partir das células precursoras, localizadas na medula óssea, de origem hematopoética. A presença de células do estroma ou da medula óssea é fundamental para que ocorra essa diferenciação, o que sugeria que fatores produzidos por essas células estimulariam esse processo. Atualmente sabe-se que dois componentes são necessários e suficientes para desencadear esse processo: a citocina RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B) e o fator de crescimento CSF-1 (fator estimulador de colônia tipo 1). Juntos, o CSF-1 e a RANKL são capazes de induzir a expressão de genes que caracterizam o osteoclasto, incluindo aqueles que tipificam a fosfatase alcalina ácida târtaro-resistente, a catepsina K, o receptor de calcitonina e de β_3 – integrina (AIRES, 2008). O processo de reabsorção depende de características especiais entre o osteoclasto e a superfície óssea, onde um espaço fechado forma-se entre a célula e a matriz. Nesse espaço, os osteoclastos liberam enzimas lisossômicas mantendo um pH ácido, a fim de possibilitar a dissolução da matriz óssea (KHAN et al., 2001; MOTTA, 2003). Em consequência da atividade osteoclástica (aparecimento da borda em escova), uma baía de reabsorção (lacuna de Howship), pode ser observada no osso, diretamente sob o osteoclasto (ROSS; PAWLINA, 2008).

A densidade mineral óssea (DMO) trata-se do equilíbrio entre o processo de formação e reabsorção, denominado remodelação. A formação está diretamente ligada à reconstrução e ao fortalecimento do tecido ósseo, enquanto a reabsorção se responsabiliza pela deterioração desse mesmo tecido (CADORE et al., 2005).

O conteúdo mineral ósseo (CMO) e a DMO são determinados principalmente pelo fator genético. Cerca de 70% da variação na densidade óssea são determinadas pela hereditariedade e os 30% restantes dependem do estilo de vida, em que a atividade física e, ou, a nutrição podem induzir

respostas fisiológicas que permitam níveis mais elevados de obtenção de massa óssea (VICENTE-RODRIGUEZ et al., 2008).

As propriedades mecânicas do osso são estabelecidas pela matriz colágena e pelo grau de mineralização, ou seja, pela quantidade de cristais de hidroxiapatita de cálcio depositada entre as fibras colágenas. A resistência óssea é determinada pela massa do tecido ósseo e pela rigidez dela, que é delimitada principalmente pela fase mineral, enquanto a matriz de colágeno contribui principalmente para aumentar a capacidade de o osso pode ser flexionado sem se romper (GUADALUPE-GRAU et al., 2009).

3.2.1 Crescimento, modelação e remodelação óssea

O tecido ósseo é um tecido dinâmico, que está em constante modificação, basicamente em razão dos três principais processos: o crescimento, a modelação e a remodelação óssea. (AIRES, 2008).

Segundo Aires (2008), durante o desenvolvimento dos vertebrados, o osso pode ser formado pela, ossificação intramembranosa, que é efetuada por osteoblastos originários diretamente da diferenciação de células mesenquimais primitivas. O tecido ósseo primordialmente desenvolvido é desorganizado, sendo gradativamente substituído por um osso de conformação lamelar; e pela ossificação endocondral que ocorre a partir de um molde cartilaginoso feito por condrócitos. É o mecanismo mais comum, responsável pelo aparecimento dos ossos longos, coluna vertebral, bacia e a base do crânio. Esse molde sofre erosões, sendo substituído por tecido ósseo, pela síntese e mineralização da matriz óssea pelos osteoblastos. Após a ossificação, surge a placa epifisária, uma camada cartilaginosa na região da epífise óssea, responsável pelo crescimento longitudinal do osso (AIRES, 2008).

Embora o crescimento ósseo cesse a partir de uma determinada idade com o desaparecimento das placas epifisárias, os processos de modelação e remodelação persistem durante toda vida (Aires, 2008).

A modelação óssea é a responsável pela arquitetura óssea, que envolve forma, tamanho, quantidade e disposição estrutural de seu tecido, obedecendo a estímulos mecânicos externos e não mecânicos locais e sistêmicos. Embora as alterações na forma e no tamanho do osso tendam a desaparecer com a parada do crescimento ósseo, as mudanças em sua estrutura microscópica

persistem no longo da vida, sempre com o objetivo de melhorar a resistência mecânica do osso (AIRES, 2008).

A remodelação óssea é um processo contínuo, caracterizado pela sequência de ativação-reabsorção-formação. Os fenômenos que levam à ativação ainda são pouco conhecidos. Tanto estímulos sistêmicos (PTH) como locais (por tensão mecânica ou microfraturas) podem iniciar essa ativação. Esse papel tem sido atribuído aos osteócitos, que determinam o local de remodelação (AIRES, 2008). O osso é então reabsorvido pelos osteoclastos e formado na mesma região pelos osteoblastos. Essas células formam a unidade básica do metabolismo (UBM), que o reconstrói em locais distintos nos três componentes (endocortical, intracortical e trabecular) do respectivo envoltório interno (endóstio) e num grau muito menor no envoltório externo (perióstio) (BILEZIKIAN et al., 2008). Os objetivos da remodelação são atingir um ponto ótimo de resistência óssea, por meio do reparo de lesões microscópicas (microfissuras), ocorridas pela atividade normal do peso; manter a homeostase do cálcio; e também fornecer um quadro para a mobilização de cálcio; durante estados fisiológicos excepcionais como a lactação (BILEZIKIAN et al., 2008; ROSEN, 2007).

A remodelação ocorre tanto no osso cortical como no trabecular, porém, é mais intensa no trabecular, em razão da 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).

Estímulos sistêmicos, pelo paratormônio (PTH), ou locais, por tensão mecânica ou microfraturas, podem iniciar o processo de ativação da remodelação óssea. A liberação de hormônios e substâncias, como PTH, 1,25-diidroxivitamina D, interleucina (IL) 1, 2 e 6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) induzem o aumento na produção do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-beta (RANKL) pelos osteoblastos, que se ligam ao seu receptor RANK, nas membranas das células hematopoiéticas precursoras, tornando os osteoclastos ativos. Substâncias inibidoras da reabsorção, como o estrogênio e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) estimulam a produção de osteoprotegerina (OPG), que é um inibidor de RANKL, pois a OPG captura o RANKL, impedindo sua ligação ao seu receptor, diminuindo o número de

osteoclastos ativos e induzindo a apoptose de osteoclastos maduros (ROBLING et al., 2006; PROFF; RÖMER, 2009).

A formação inicia-se com a diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos. Admite-se que há proteínas liberadas durante a degradação da matriz orgânica, como o *transforming growth factor-β*, capazes de recrutar células osteoprogenitoras para os sítios de formação óssea e induzir a diferenciação até osteoblastos e osteócitos (AIRES, 2008).

3.2.2 Biomecânica do osso

Os componentes do material e a organização estrutural do osso influenciam as maneiras que o osso responde às cargas mecânicas. A composição e a estrutura do osso dão origem a um material que é resistente para seu peso relativamente leve. Os principais componentes do osso são carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, colágeno e água, os percentuais relativos desse material variam com a idade e a saúde do osso. Os minerais conferem ao osso a sua rigidez e são os determinantes primários da resistência compressiva dele; já o colágeno é uma proteína que atribui a flexibilidade, o que contribui para a resistência tensiva (resistência à tração). O conteúdo de água presente no tecido ósseo (25% a 30%) contribui de maneira significativa para a resistência desse tecido (HALL, 2005).

A saúde óssea é um dos fatores mais importante relacionado à fratura; menor rigidez, força e tenacidade óssea aumentam a probabilidade do risco de fraturas, que é um grande problema de saúde pública, por estar associado à morbidade, mortalidade e alto custo econômico (GALVÃO; CASTRO, 2010).

Segundo Hall (2005), a mineralização óssea varia com a idade do indivíduo, bem como com o osso específico no corpo. O osso cortical possui porosidade baixa, cerca de 5% a 30% do volume ósseo ocupados por tecido não mineralizado; e o osso trabecular possui porosidade alta com 30% a mais de 90% do volume ósseo ocupados por tecido não mineralizado. A porosidade do osso é importante, pois afeta diretamente as características mecânicas do tecido. Com conteúdo mineral mais alto, o osso cortical é mais rígido o que permite suportar maior estresse, porém menos sobrecarga ou deformação relativa, quando comparado ao osso trabecular, que, por sua estrutura porosa, suporta maior sobrecarga antes de sofrer fratura. Entretanto, a resistência e a

elasticidade do osso trabecular variam consideravelmente com a localização no corpo, bem como a idade e a saúde do indivíduo.

Além das forças de tensão, compressão e cisalhamento, outra forma de estresse imposto ao tecido ósseo é o resultado final da deformação mecânica repetida das contrações musculares que resultam em um aumento das correntes elétricas pulsáteis no osso, por causa dos fenômenos piezoelétricos e de fluxo que também são capazes de provocar alterações na estrutura óssea (TUREK, 1991).

3.3. Diabetes mellitus e tecido ósseo

A presença de DM tipo 1 provoca várias consequências deletérias para saúde esquelética, como menor crescimento da estatura durante a puberdade, menor densidade óssea na idade adulta, aumento no risco de osteoporose e fratura, má cicatrização óssea e embriopatia esquelética, processo que depende de nova formação óssea (INZERILLO; EPSTEIN, 2004).

Segundo Hofbauer et al. (2007), a osteoporose é a mais importante doença metabólica em indivíduos com DM. Cerca de 20% dos idosos são afetados pelo DM; nessa fase a importância da saúde óssea é grande uma vez que os riscos de fraturas aumentam exponencialmente (SCHWARTZ, 2003). Apesar da osteoporose ser considerada uma doença de adultos com DM tipo 1, a situação se torna diferente, sendo capaz de atingir pessoas de todas as idades (TRAILKILL et al., 2005).

Inúmeros fatores podem contribuir para o desenvolvimento da osteopenia, que pode progredir para a osteoporose entre a população com DM tipo 1 (THRAILKILL, et al., 2005). Tais fatores incluem mineralização óssea insuficiente durante os períodos críticos de acúmulo de massa óssea; aumento da excreção de cálcio na urina, juntamente com diminuição na absorção de cálcio intestinal, levando à deficiência crônica de cálcio; efeitos da hiperglicemia crônica sobre a função dos osteoblastos; e insulinopenia e diabetes induzida, por desregulação do eixo GH-IGF.(THRAILKILL, et al., 2005)

Os efeitos do DM tipo 2 sobre o osso são controversos, visto que, mesmo com maior DMO, as pessoas sofrem com o risco de fraturas; o que pode justificar esse paradoxo é o fato de pessoas com essa doença terem mais probabilidade a quedas, estando mais suscetíveis a incidentes, que podem

gerar fraturas. O DM tipo 2 também está associado à má qualidade óssea, à retinopatia, à neuropatia periférica e ao derrame (SCHWARTZ, 2003).

A insulina tem sido reconhecida como regulador do metabolismo ósseo e promove estimulação da matriz óssea e formação de cartilagem (KAGEL; EINHORN, 1996); a falta dela tem sido vista como potencial motivo para explicar a menor densidade mineral óssea em DM tipo 1 (RÄKEL et al., 2008). Há evidências que sugerem que a deficiência de insulina no DM tipo 1 pode interferir na formação de novo osso, possivelmente em razão do mau funcionamento dos osteoblastos (MIAZGOWSKI et al., 2007). Além dos efeitos diretos da insulina nas células ósseas, essa também pode exercer efeitos sinérgicos com outros agentes anabólicos no osso como o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e PTH (THRAILKILL et al., 2005).

Os mecanismos celular e molecular subjacentes à perda de massa óssea por deficiência de sinalização de insulina e IGF-1 ainda não foi esclarecido; entretanto sabe-se que a IRS-1 osteoblástica desempenha importante papel na manutenção óssea, não só porque é essencial para a sinalização de IGF-1 e insulina, mas também porque pode estar envolvido na transdução de sinal para outros fatores. Entre outras funções, o IGF-1 aumenta a produção de colágeno, que é incorporado à matriz óssea, bem como pode regular a função osteoblástica, durante reabsorção do osteoclasto (OGATA et al., 2000).

Outros aspectos também estão envolvidos com a perda óssea em DM, como a inflamação, que pode contribuir para a perda óssea, visto que o DM tipo 1 é o resultado da destruição inflamatória autoimune do pâncreas e, portanto, perfis de citocinas e de suas vias sinalizadoras são susceptíveis de serem alteradas durante a fase aguda e crônica do DM tipo 1. Os níveis elevados de citocinas podem ativar a reabsorção osteoclástica do osso, não sendo um fator importante na perda óssea diabética; suprimir a diferenciação osteoblástica e a formação óssea, e podem contribuir para a perda óssea em indivíduos com DM tipo 1 (MCCABE, 2007).

3.4. Diabetes mellitus e exercício físico

A atividade física afeta o metabolismo da glicose e outros metabólitos intermediários em indivíduos normais, assim como nos com DM. Em sujeitos

com DM tipo 1, o exercício físico tem importante efeito sobre a insulina; desse modo, a dieta deve ser observada para que não ocorra severa hipo ou hiperglicemia. Nos com DM tipo 2, a atividade física aeróbica regular é uma ferramenta eficaz na prevenção e tratamento da doença (DE FEO et al., 2006).

O exercício físico eleva a sensibilidade à insulina em indivíduos com DM tipo 2. Acredita-se que esse aumento da sensibilidade seja causada pela melhoria na captação da glicose via GLUT4, resultante do efeito do exercício na expressão e translocação do transportador, para a membrana plasmática do músculo esquelético. Esse estado de sensibilidade alterada pode durar diversas horas. Os atletas altamente treinados possuem melhor tolerância à glicose, melhor eficiência das células beta e melhor utilização da glicose que os indivíduos não treinados; além disso, podem exibir maior resposta glicêmica à glicose oral, secundária a adaptações na absorção da glicose. As adaptações associadas ao treinamento são revertidas rapidamente, assim que esses interrompem os programas de exercício (KAHN et al., 2009).

Em indivíduos com DM tipo 1, ao contrário daqueles sem diabetes, os eventos regulatórios nas ilhotas pancreáticas induzidos pelo exercício não podem diminuir a secreção da insulina, pois essa é exógena (injetada). Como os níveis de insulina são sustentados, o efeito supressivo dela no fígado continua e a produção hepática de glicose permanece baixa, ao mesmo tempo em que a utilização da glicose do músculo se eleva, o que resulta em um risco substancial de hipoglicemia. Esse risco ainda pode aumentar, quando os pacientes injetam insulina em um local subcutâneo, em um membro que se está exercitando, pois o fluxo sanguíneo aumentado pode acelerar a absorção dela (KAHN et al., 2009).

Em alguns pacientes com DM tipo 1, a melhoria da sensibilidade à insulina exógena pode persistir por diversas horas, após esses pararem de se exercitar, podendo os efeitos durarem até 24 horas. O mecanismo não é totalmente compreendido, mas aceita-se que a sensibilidade aumentada seja em virtude da taxa relativamente alta de captação de glicose pelos músculos em exercício e da produção hepática menor de glicose, à medida que os depósitos de glicogênio são repostos (KAHN et al., 2009).

Apesar de todos esses fatores, segundo De Feo et al. (2006), ainda que alguns estudos apresentem redução da dose de insulina e melhor controle da glicose nos indivíduos DM tipo 1, em função da prática regular de exercícios

físicos, não há consenso geral sobre esse tema. Os benefícios de uma atividade física de longo prazo que são descritos para a população em geral, podem ser estendidos para os indivíduos com DM tipo 1.

Os diabéticos devem ser encorajados a realizar a prática diária de exercícios. Entretanto, esses indivíduos, antes de começar as sessões de exercício, devem ser cuidadosamente informados sobre os efeitos dessa atividade sobre a sua glicose sanguínea e sobre as modificações apropriadas na dieta, na sua terapia insulínica ou na utilização de hipoglicemiantes orais (DE FEO et al., 2006).

3.5. Tecido ósseo e exercício físico

Os efeitos osteogênicos do exercício físico sobre a saúde óssea são conhecidos (SOUZA; LUCIANO, 2005). Clinicamente, a DMO e ou o CMO são dois indicadores da saúde óssea (Huang et al., 2010), e a manutenção da DMO é importante para a prevenção da osteoporose (Cadore et al., 2005).

Os efeitos benéficos do exercício físico sobre o tecido ósseo têm sido extensivamente avaliados, por meio de vários estudos. No entanto, os mecanismos específicos pelos quais a atividade física atua no metabolismo ósseo ainda não estão completamente entendidos. O ganho de massa óssea conseguida com o exercício físico é, principalmente, em resposta a um aumento da tensão mecânica (TUREK, 1991). Durante o exercício, as forças de tensão, compressão e cisalhamento, associadas à deformação mecânica das contrações musculares, são capazes de provocar alterações na estrutura óssea. Acredita-se que correntes de baixa energia, geradas pela resposta piezoelétrica do cristal de hidroxiapatita ao estresse imposto a esse tecido, possam estar envolvidas nesse processo (AIRES, 2008; TUREK, 1991). Outros parâmetros, como, estímulos endócrinos, têm prováveis contribuições às adaptações esqueléticas (MAÏMOUN; SULTAN, 2010).

Por aumentar a massa óssea e, posteriormente, promover a manutenção ou amenizar a perda óssea, o exercício é um aliado contra a osteoporose (BILEZIKIAN et al., 2008). Muitos estudos têm enfatizado o papel do aumento da deposição mineral, em resposta ao exercício físico. A região mineralizada do osso controla a rigidez, considerando que o colágeno controla a força máxima e a tenacidade do osso. Outros estudos indicaram que a

composição relativa dos minerais e da matriz de colágeno é deslocada pelo exercício, em favor da região óssea mais mineralizada (ISAKSSON et al., 2009).

No entanto, Isaksson et al. (2009) ainda afirmaram que a rede de colágeno também pode ser afetada pela estimulação mecânica, sendo aumentada como resultado do exercício, principalmente durante o crescimento e a maturação. O exercício pode afetar o conteúdo de colágeno no tecido ou a sua estabilidade molecular. Além de mudar o ritmo de remodelação das suas redes, a atividade física pode afetar significativamente a produção do colágeno e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas do osso.

Em relação à natação, apesar de não haver impacto como acontece em exercício de corrida, o aumento da DMO, proporcionado pela natação, pode estar ligado à intensidade da atividade muscular. Estudos destacam a influência da força muscular sobre a massa óssea (BAYRAMOGLU et al., 2005). A contração muscular atua direta ou indiretamente sobre os ossos produzindo um estímulo osteogênico. De acordo com Iwamoto et al. (1999) Mais de 70% da tensão sofrida pelo osso é transmitida pela força muscular e não pelo peso corporal.

Em animais jovens, o exercício de natação foi correlacionado com maior aposição periosteal, crescimento longitudinal do osso, aumento do conteúdo mineral ósseo e força óssea. Outros estudos relataram alterações na geometria do osso de animais treinados com natação, o que reflete uma distribuição mais favorável do tecido ósseo; portanto, esse tecido capaz de fortalecer essa estrutura (HART et al., 2001).

Bourrin et al. (1992), utilizando análise histomorfométrica, apresentaram que o exercício de natação reduziu a reabsorção e a superfície osteoide em ratos jovens, indicando diminuição do *turnover* ósseo.

Os efeitos do exercício físico regular sobre a estrutura e mecânica do tecido ósseo de indivíduos com DM tipo 1 não são conhecidos. Burke et al. (1996) avaliaram os efeitos do DM e exercício sobre os níveis de minerais envolvidos no metabolismo ósseo. Esses autores relataram que os níveis plasmáticos de zinco, cobre e cálcio não foram diferentes entre os quatro grupos tratados (sedentário e exercitado com estreptozotocina e sedentário e exercitado controle). Todavia, os níveis de zinco e cobre nos fêmures dos

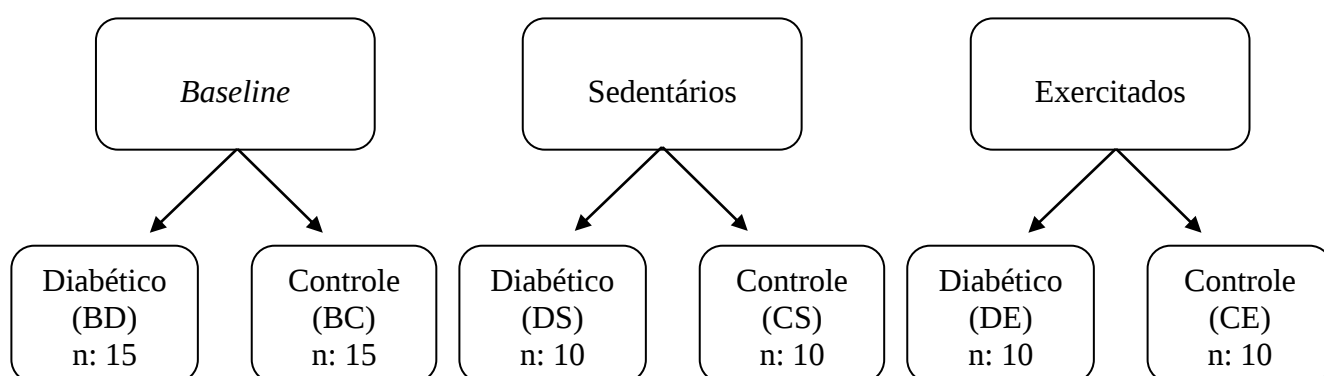
animais sedentários diabéticos apresentaram-se aumentados na quarta e oitava semana de estudo.

O exercício no grupo diabético evidenciou valores próximos aos apresentados pelos animais do grupo de controle. Os níveis de cálcio aumentaram ligeiramente nos animais diabéticos e o exercício não afetou significativamente esse parâmetro. Finalmente, os níveis de fósforo apresentaram-se reduzidos nos animais tratados com estreptozotocina, assim como os de cálcio, mas o exercício não causou efeito sobre esses (BURKE et al., 1996).

4 Material e Métodos

4.1. Animais de experimentação e tratamentos

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar*, com 30 dias de idade e peso corporal médio de 87,42 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Após a aclimação de sete dias, no Biotério de Experimentação do Departamento de Educação Física da UFV, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais, a saber:



Baseline Diabético (BD, n= 15). - animais que receberam a injeção de estreptozotocina e foram sacrificados após 45 dias da indução do diabetes;

Baseline Controle (BC, n= 15). - animais que receberam a injeção de tampão citrato de sódio e foram sacrificados juntamente com o grupo BD.

Controle Sedentário (CS, n=10). - animais que receberam injeção de tampão citrato de sódio; no entanto não foram sacrificados após 45 dias da indução do diabetes e não exercitaram;

Controle Exercitado (CE, n= 10). - animais que receberam injeção de tampão citrato de sódio; no entanto não foram sacrificados após 45 dias da indução do diabetes e exercitaram;

Diabético Sedentário (DS, n=10). - animais que receberam injeção de estreptozotocina, não foram sacrificados após 45 dias da indução do diabetes e não exercitaram (item 4.2);

Diabético Exercitado (DE, n=10). - animais que receberam injeção de estreptozotocina , não foram sacrificados após 45 dias da indução do diabetes e exercitaram (item 4.2).

Os animais dos respectivos grupos experimentais foram alojados em gaiolas coletivas, cinco animais por gaiola, em ambiente com temperatura média de 22 °C e regime de luminosidade invertido de 12 horas de escuridão e 12 horas de claridade, e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Todos os animais foram pesados, no primeiro dia de cada semana, ao longo do período experimental, em balança eletrônica digital (Marte Brasil, modelo AS5500C), com precisão de 0,01g.

Os procedimentos experimentais foram realizados, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº 03/2009).

4.2. Indução de Diabetes

Após jejum de 12 horas, os ratos dos grupos BD, DS e DE receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de estreptozotocina (STZ) (Sigma, St. Louis, EUA) diluída em 1mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5); bem como os dos grupos BC, CS e CE, que receberam a mesma dose de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5), sem STZ. Sete dias após a aplicação de STZ e jejum de 12 horas, aproximadamente 10 µL de sangue foram coletados, por meio de um corte transversal na ponta da cauda do animal e a glicemia foi aferida utilizando-se o glicosímetro One touch ultra® (Johnson & Johnson, México). Os ratos que apresentaram glicemia de jejum superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos. A glicemia de jejum e o peso corporal foram monitorados semanalmente, pela manhã às oito horas durante o período experimental. Os animais com glicemia de jejum inferior a 300 mg/dL receberam nova dose da droga, sendo esse parâmetro aferido sete dias após a nova aplicação. A glicemia dos animais de controle foi aferida no início do experimento e no final do experimento.

4.3. Programa de Treinamento

Após 45 dias de hiperglicemia (diabetes), os animais do grupo DE e CE foram submetidos a um programa de treinamento de natação, adaptado de Medeiros et al. (2000), por oito semanas.

Tabela 1. Progressão de Treinamento dos animais experimentais

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

O treinamento físico foi realizado no Laboratório de Biologia do Exercício (BioEx), do Departamento de Educação Física da UFV. Foram utilizados tanques de alvenaria quadrados (55 cm de largura por 65 cm de profundidade), com água na temperatura de 28 °C a 30 °C e profundidade de 45 cm. Os animais dos grupos DS e CS foram colocados em uma caixa de polipropileno com água aquecida (28 °C – 30 °C) e profundidade de 10 cm.

4.4. Avaliação da Densidade Mineral Óssea

Após eutanásia (CO₂), o fêmur esquerdo foi removido, pesado em balança eletrônica digital (Marte – Brasil, modelo AS5500C) com precisão de 0,01g. Os tecidos moles foram dissecados e o osso foi envolvido em uma gaze embebida com soro fisiológico e armazenado em freezer a -20 °C. As amostras foram descongeladas imediatamente antes das análises.

A análise da densidade mineral óssea (DMO) foi realizada pelo Densitômetro Ósseo de Raios-X (DPX-Alpha Lunar, EUA), equipado com software para pequenos animais. A análise foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, SP.

A densidade mineral óssea foi automaticamente obtida pelo sistema, a partir da fórmula:

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

4.5. Avaliação da Resistência Óssea

A análise da resistência óssea foi realizada no mesmo fêmur esquerdo, logo após à da DMO, realizado por Vicentini et al. (2007). O osso foi submetido a ensaio mecânico em máquina universal de ensaio (EMIC®, modelo DL 3000), com carga aplicada a uma velocidade de 5 mm/min. Um sistema computadorizado acoplado ao aparelho registrou a força (carga) e o deslocamento, sendo possível controlar todos os parâmetros do ensaio mecânico e obter o valor da força referente a cada deslocamento. A aquisição desses pontos foi realizada em intervalos de tempo padronizados, 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. Os ensaios foram realizados no Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da UNESP, Araçatuba, SP.

Na diáfise femoral, foi utilizado, nas amostras, ensaio de flexão simples em três pontos, que apoiou o fêmur sob dois suportes distanciados, 20 mm entre si, sendo a carga aplicada no centro da amostra (Figura 1). A célula de carga utilizada foi de 2000 N. A cada incremento de carga aplicada ao material, o computador automaticamente registrou a deformação correspondente, para, depois, ser construído o gráfico carga vs deformação (Figura 2), que, a partir desse se pôde obter: força máxima (maior força aplicada à amostra) e 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 corpo, obtida pelo cálculo da área sob a curva carga vs deformação, até o ponto de ruptura da amostra.



Figura 1. Fotografia do ensaio mecânico de flexão em três pontos, em diáfise de fêmur.

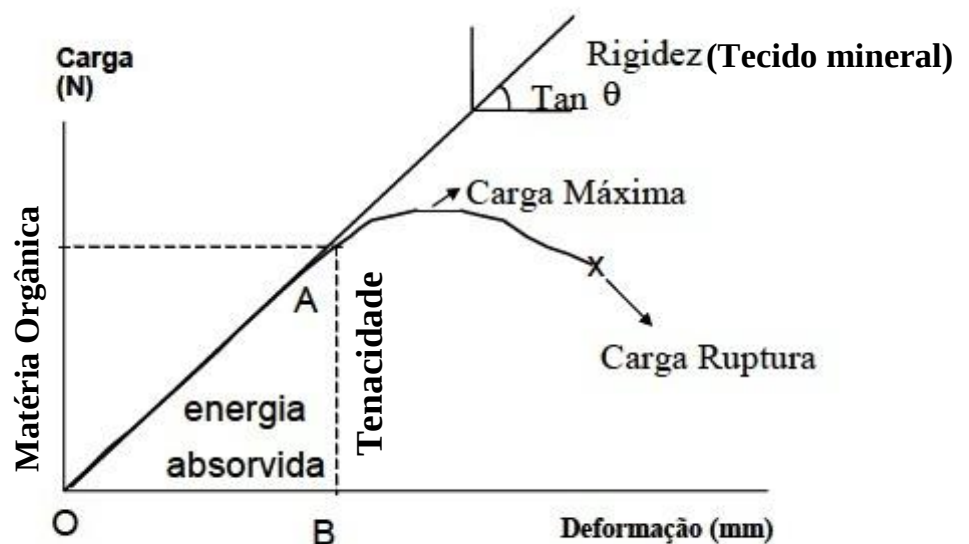


Figura 2. Representação sistemática da curva da carga de deformação de um teste de três pontos para osso.

Fonte : Mello, 2003

Também foi realizado o ensaio de flexão na cabeça do fêmur, com a amostra fixada em um aparato mecânico, ficando em posição vertical, mimetizando a posição fisiológica (Figura 3). Os mesmos parâmetros foram calculados nesse ensaio (força máxima, rigidez e tenacidade). O programa emitiu um arquivo com todos os pontos adquiridos durante os ensaios [Tempo

(s) x Deslocamento (mm) x Força (N)]. Esses valores foram transferidos para as planilhas *Microsoft Office Excel 2007*, permitindo a construção dos gráficos e o cálculo das propriedades mecânicas.

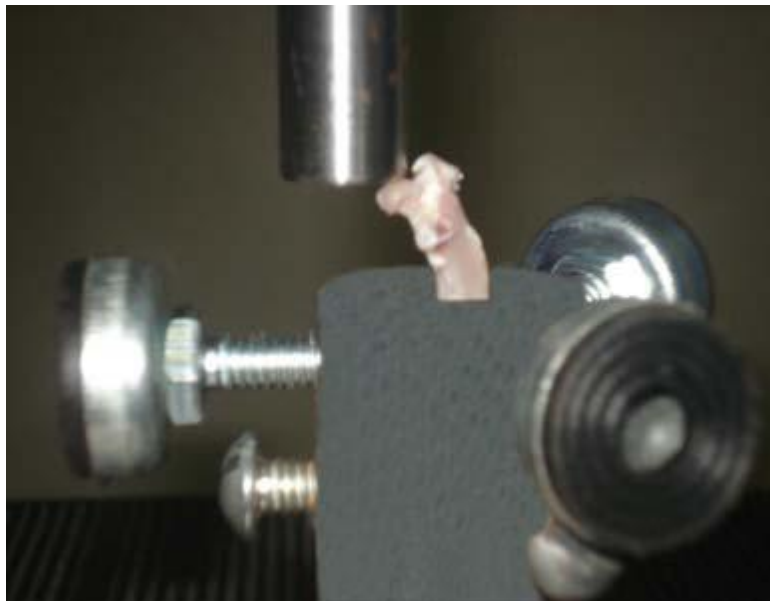


Figura 3. Fotografia do ensaio mecânico de flexão no colo do fêmur de rato

4.6. Exame Histomorfométrico

Após eutanásia, o fêmur direito foi dissecado e o osso, livre dos tecidos moles, foi fixado em formol 10%, neutro tamponado, em temperatura ambiente. Posteriormente, os fêmures foram colocados em cuba descalcificadora, contendo solução com citrato de sódio, água destilada e ácido fórmico. Após a descalcificação, o fêmur foi medido com paquímetro universal (Digimess – SP), para que se realizasse, em sua porção média, um corte transversal para análise da espessura do osso cortical. Após a retirada dessa amostra, o osso foi cortado longitudinalmente da região proximal (cabeça do fêmur) até sua porção média. As amostras retornaram à cuba descalcificadora, agora armazenada em cassetes, onde permaneceram por mais sete dias. Posteriormente, as amostras foram incluídas em parafina como rotina histológica. Em sequência, foram obtidos cortes de cinco micrômetros (μm) de espessura com micrótomo (LEICA, modelo RM2245 - Alemanha), e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas com *Entellan*.

Na sequência, os cortes histológicos foram analisados, por meio do sistema para análises de imagens (Image-Pro Plus versão 4.5.0.29). As imagens foram digitalizadas, utilizando-se um microscópio (NIKON Eclipse

E600), com objetiva de 20x, ligado a uma câmera (*Feldmann Wild Leitz Digi-Pro 5.0M*) e software (*Micrometrics SE Premium*), para análise do osso trabecular. No osso trabecular, foram feitas de três a seis imagens por animal dependendo das condições da amostra, em campos distintos, garantindo maior fidelidade dos resultados encontrados. Sobre cada imagem foi sobreposta uma grade (gratícula), com dez linhas e dez colunas totalizando cem pontos de interseção. Os pontos coincidentes com osso foram contabilizados e o volume trabecular ósseo (VTO) foi dado em porcentagem pela fórmula a seguir:

$$\text{VTO (\%)} = \frac{\text{número de pontos sobre osso}}{\text{número total de pontos}} \times 100$$

Para quantificação da espessura de osso cortical, uma câmera fotográfica (NIKON D700) acoplada a um microscópio estereoscópico (OLYMPUS SZ H10) foi utilizada, para visualização do corte como um todo. O mesmo software (*Micrometrics SE Premium*) foi usado agora fazendo o contorno do periósteo, assim como do canal medular; o resultado da subtração entre esses foi empregado como a espessura cortical óssea (Figura 4).

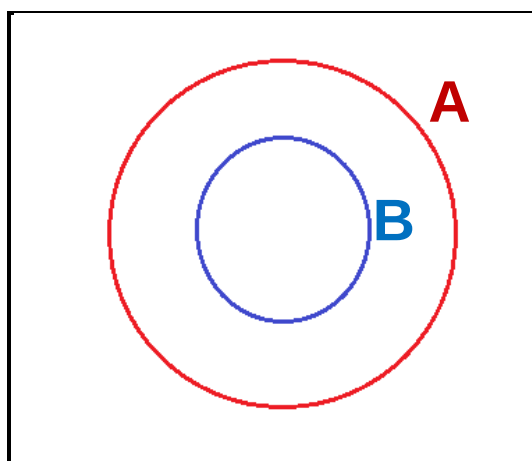


Figura 4. Desenho esquemático da determinação da espessura de osso cortical. Perímetro de A (Periósteo) – Perímetro B (Endósteo) = espessura de osso cortical.

4.7. Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio - padrão (DP). Para a comparação entre os grupos das médias das variáveis glicemia e peso corporal, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* de Tukey, para as comparações múltiplas. Para equiparação das médias das demais variáveis, CMO, DMO, área, força, rigidez, tenacidade, volume trabecular ósseo e perímetro ósseo, a estratégia adotada, após a ANOVA, foi de comparar médias pelo procedimento de Tukey (a 5%) ou com ajustamento do valor p por Tukey-Kramer, quando os dados eram desbalanceados, procedendo-se às comparações marginais, quando a interação era não significativa (valor p > 5%). Todas essas análises foram implementadas no sistema SAS (*Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*), versão 9.2, licenciada para a UFV 2011.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, antes de completar 45 dias de hiperglicemia, três animais do grupo CE morreram e antes de concluir o período experimental total, mais um animal desse grupo morreu.

5.1. Peso corporal e glicemia

Os dados de ganho de peso dos animais, em diferentes grupos, aos 45 dias após a indução do diabetes e ao final de oito semanas de exercício, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Peso corporal dos animais durante o período experimental

Grupos	<i>n</i> (45 dias)	Peso aos 45 dias (g)	<i>n</i> (final)	Peso final (g)
BC	15	246,0 ± 26,9	0	-
BD	15	71,8 ± 30,8 ^a	0	-
CS	10	277,1 ± 25,1	10	361,1 ± 18,7
CE	7	261,4 ± 31,7	6	320,7 ± 24,0
DS	10	86,3 ± 27,8 ^b	10	106,5 ± 18,6 ^b
DE	10	101,1 ± 34,1 ^{bc}	10	107,2 ± 16,3 ^{bc}

Os dados estão expressos em média ± DP(desvio padrão). *n* = número de animais. (BC) *Baseline* de controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (^a) diferente de BC na mesma coluna ($p < 0,05$); (^b) diferente de CS; e (^c) CE na mesma coluna ($p < 0,05$).

Os animais dos grupos diabéticos apresentaram ganho de peso inferior aos dos não diabéticos, tanto aos 45 dias quanto ao final do experimento. Apesar de as massas de tecidos muscular e adiposo não terem sido mensuradas neste estudo, sabe-se que a presença da insulina em um indivíduo sem diabetes promove a síntese de lipídios e inibe a sua degradação. (KAHN et al., 2009). No músculo, a insulina ativa a captação dos aminoácidos pelas células, assim como promove os processos de síntese proteica como transdução dos mRNA e síntese dos fatores de iniciação e alongação. Além disso, a insulina estimula o acúmulo de glicogênio no fígado e no tecido muscular com o aumento do transporte de glicose (AIRES, 2008). Durante o exercício, a deformação mecânica dos ossos, pelas contrações musculares,

associada às forças de tensão, compressão e cisalhamento, é capaz de provocar alterações na estrutura óssea (AIRES, 2008; TUREK, 1991). Essas ações mecânicas geram diferenças no potencial elétrico dos ossos, que agem como campo elétrico (efeito piezoelétrico), estimulador da atividade celular, levando à deposição de minerais nos pontos de estresse (CADORE et al., 2005)

O menor peso corporal final bem como o menor tamanho do fêmur em animais diabéticos, apresenta que esses animais tiveram o crescimento prejudicado. Sabe-se que a insulina é importante hormônio anabólico e sua deficiência pode afetar ainda a quantidade de outros hormônios, como hormônio de crescimento (GH), o que pode inibir o crescimento de animais com diabetes (GOMES et al. 2009).

Menon et al. (1994) verificaram que animais com DM tipo 1, induzido por STZ, apresentaram anormalidades na secreção de GH e na regulação tecido específica de receptores para esse hormônio. Esses autores mostraram que, na presença desse tipo de diabetes, os níveis de receptores de GH e de RNAm, para proteína carreadora de GH, estavam reduzidos no coração e fígado e aumentados no rim. Em vista desses resultados, sugeriram que a redução dos receptores de GH no tecido hepático, por exemplo, pode explicar a resistência celular a GH, em termos de geração de IGF-1 e consequente redução do crescimento linear.

Na Tabela 3 são apresentados os dados referentes à glicemia dos animais, durante o mesmo período experimental.

Tabela 3. Glicemia de jejum dos animais ao início do experimento, aos 45 dias e ao final do período experimental.

Grupos	n inicial	Glicemia inicial (mg/dL)	n 45 dias	Glicemia aos 45 dias (mg/dL)	n final	Glicemia final (mg/dL)
BC	15	84,73 ± 2,73	15	82,73 ± 16,17	-	-
BD	15	94,46 ± 4,27	15	536,26 ± 2,37 ^a	-	-
CS	10	82,60 ± 4,24	10	79,20 ± 1,93	10	79,70 ± 19,24
CE	10	78,57 ± 5,08	7	75,57 ± 3,37	6	80,17 ± 24,83
DS	10	88,90 ± 3,45	10	504,80 ± 15,22 ^b	10	480,40 ± 19,24 ^b
DE	10	93,00 ± 3,10	10	514,60 ± 20,64 ^{bc}	10	506,90 ± 19,24 ^{bc}

Os dados estão expressos em média ± DP. n = número de animais. (BC) *Baseline* de controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (^a) diferente de BC na mesma coluna (p<0,05); (^b) diferente de CS; e (^c) CE na mesma coluna (p<0,05).

A glicemia dos animais não apresentou diferença estatística entre os grupos no início do experimento. Entretanto, 45 dias após a indução do diabetes, os grupos de animais diabéticos apresentaram hiperglicemia, configurando-se a instalação do diabetes induzido pela STZ. Do mesmo modo, ao final do experimento, a hiperglicemia ainda estava presente. Esses dados indicam que a STZ foi eficiente em destruir células beta pancreáticas e, induzir a hiperglicemia (KONRAD et al., 2001; AKBARZADEH et. al., 2007). Reddy et al. (2001) trabalhando com ratos *Sprague-Dawley* com dez semanas, encontraram resultados semelhantes com os deste estudo. No entanto, resultados desta pesquisa não demonstraram alteração na glicemia dos animais diabéticos quando comparados ao de controle, após o protocolo de natação realizado ao final do período experimental. Porém, Souza et al. (2005) utilizando ratos *Wistar* com cerca de 60 dias de idade verificaram que os animais diabéticos treinados (60 min/cinco dias com sobrecarga de 5% do peso corporal) apresentaram glicemia inferior aos diabéticos sedentários. Segundo os autores, isso pode ter ocorrido em razão do aumento da sensibilidade à insulina das células musculares e adiposas, em indivíduos treinados. Essa sensibilidade relaciona-se ao aumento no número de transportadores de

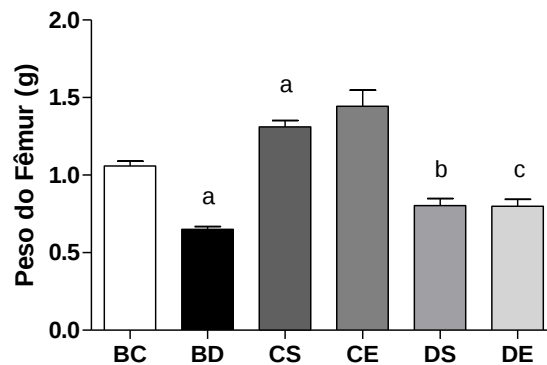
glicose insulino-sensíveis (GLUT 4). Além disso, sabe-se que, em situações em que a produção de insulina encontra-se diminuída, ocorre aumento da regulação dos receptores, um dos fatores que explica a maior sensibilidade a esse hormônio.

5.2. Propriedades estruturais do fêmur.

5.2.1. Peso e comprimento do fêmur dos animais dos grupos experimentais.

O grupo BD apresentou peso do fêmur significativamente menor (39%) que o BC (Figura 5A). Indicando que aos 45 dias havia prejuízo do desenvolvimento ósseo, em razão do diabetes. Ao final do experimento, os valores dos animais do grupo DS foram significativamente menores (39%) que os encontrados no CS. O grupo CE apresentou valores maiores (45%) que os encontrados no DE. O programa de exercício aplicado, entretanto, não afetou o peso do fêmur nos animais diabéticos e nos de controles (CS = CE e DS = DE, Figura 5A).

A



B

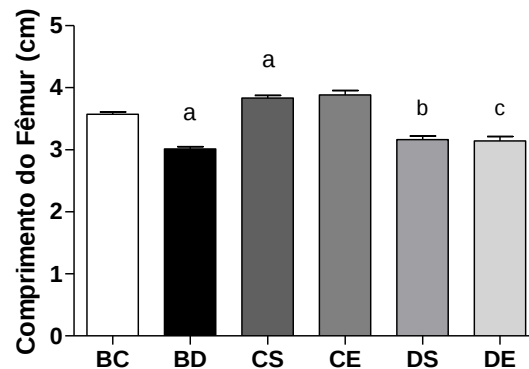


Figura 5 - Peso (A) e comprimento (B) do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP. (BC) *Baseline* controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; ^(a) diferente de BC ($p < 0,05$); ^(b) diferente de CS; e ^(c) diferente de CE ($p < 0,05$).

Uma possível justificativa para esse peso reduzido do fêmur dos animais diabéticos (DS e DE) é a deficiência de insulina, pois acredita-se que essa estimula a síntese nucleotídea pelos osteoblastos, além de promover o acúmulo intracelular de aminoácidos em ossos. Fatores de crescimento semelhantes à insulina promovem a síntese do colágeno ósseo e aumentam a deposição de cálcio no esqueleto, ou seja, se houver redução dos níveis de insulina, a síntese da matriz óssea fica inadequada, impedindo a calcificação adequada do osso (BILEZIKIAN et al 2008).

Apesar de o exercício provocar aumento da tensão mecânica, que ativa os mecanismos piezoelétricos dos cristais de hidroxiapatita dos ossos (SOUZA et al., 2005), e promover estímulos endócrinos, que contribuem para as adaptações esqueléticas (MAÏMOUN; SULTAN, 2010), o programa de natação

aplicado não afetou esse parâmetro ósseo nos ratos diabéticos, possivelmente por causa da deficiência de insulina nesses animais

O grupo BD evidenciou comprimento do fêmur significativamente menor (16%) que o BC (Figura 5B), o que indica que aos 45 dias havia prejuízo do desenvolvimento ósseo, em razão do diabetes. Ao final do experimento, os valores dos animais do grupo DS foram significativamente menores (18%) que os encontrados no CS. O comprimento do fêmur dos animais DE apresentou valores menores (19%), em comparação aos seus pares CE. O programa de exercício aplicado, entretanto, não afetou o comprimento do fêmur dos animais diabéticos e dos controles (CS=CE e DS=DE, Figura 5B).

Nos animais diabéticos, o menor comprimento do fêmur pode ser consequência da insulinopenia, causada pelo DM tipo 1, uma vez que a insulina também possui ação sobre o crescimento epifiseal (GOMES et al, 2009). Souza et al. (2005) verificaram alterações nas placas epifisárias da tíbia de ratos *Wistar* diabéticos, com cerca de 60 dias de idade e sacrificados aos 10, 20 e 30 dias de treinamento. Tais amostras demonstraram evidentes degenerações nos condrócitos dos animais com diabetes experimental o que aumenta a possibilidade do não crescimento ósseo uma vez que havendo um dano no molde precursor do osso, toda a estrutura final será prejudicada. Além disso, Silva et al. (2009) demonstraram que ratos *Sprague-Dawley*, com 12 semanas de diabetes, apresentaram redução na espessura da placa epifisária, o que pode afetar o crescimento ósseo.

5.2.2. Área, conteúdo mineral e densidade mineral do fêmur

Os dados da área estão apresentados na Figura 6A. A área do grupo BD foi significativamente menor (20%) que a do BC, indicando que o crescimento dos animais foi prejudicado, em virtude do diabetes, aos 45 dias. Os animais do grupo CS demonstraram área significativamente maior (12%) que a do grupo BC, o que evidenciou que o crescimento desses se apresentou normal ao final do experimento. O grupo DS revelou valores significativamente menores (26%) que os CS, determinando um prejuízo causado pelo diabetes ao grupo DS, também ao final do experimento. Os animais do grupo DE apresentou valores menores (29%) que os encontrados no grupo CE. O

programa de exercício aplicado, entretanto, não afetou a área do fêmur nos animais diabéticos e nos de controles (CS = CE e DS = DE, Figura 6A).

A redução da área do fêmur dos ratos diabéticos ocorreu, possivelmente, pela deficiência de insulina nesses animais, pois a insuficiência desse hormônio é capaz de provocar evidentes degenerações nos condrócitos encontrados na placa epifisária dos animais com diabetes experimental, prejudicando o seu crescimento, uma vez que a área óssea depende do comprimento do osso (SOUZA et al. 2005).

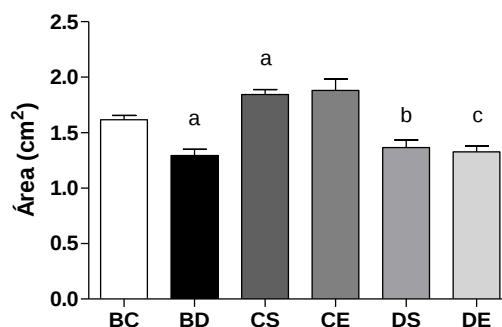
Os animais do grupo BD apresentaram valores de CMO significativamente menores (55%), em relação aos do BC (Figura 6B), pois, o diabetes aos 45 dias já havia comprometido o CMO dos animais desse grupo. O grupo CS apresentou CMO significativamente maior (20%) que o do BC, o que indica que os animais, ao final do experimento, identificaram maior deposição mineral que aos 45 dias, mostrando possível relação da idade com o CMO. Os animais de CE foram significativamente maiores (14%) que os de CS, determinando o efeito benéfico da atividade física em aumentar a deposição mineral nos grupos que foram submetidos ao protocolo de natação. Os dados do grupo DS foram significativamente menores (58%), quando comparados aos do CS, o que prenuncia que, assim como ocorreu aos 45 dias com os animais comprometidos pelo diabetes, ao final do experimento, esses ainda expuseram menores valores de CMO que os do grupo de controle. Os resultados encontrados do grupo DE foram menores (64%), quando comparados aos do CE, indicando que o exercício, sem a secreção normal de insulina, não foi capaz de aumentar o CMO dos animais com diabetes. O programa de exercício aplicado, entretanto, não afetou o CMO do fêmur nos ratos diabéticos (DS = DE, Figura 6B).

Os dados da DMO estão evidenciados na Figura 6C. Os animais do grupo BD apresentaram valores significativamente menores (45%) que os do BC, o que indica que aos 45 dias havia prejuízo na DMO, provocado pelo diabetes, nesse grupo de animais. Do mesmo modo, aconteceu ao final do experimento, uma vez que a DMO do grupo DS foi significativamente menor (44%) quando comparada à do CS.

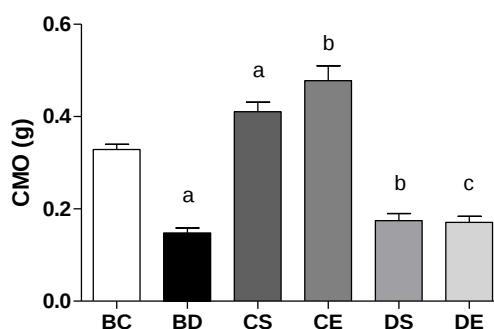
A DMO do grupo CE foi significativamente maior (10%), em relação ao grupo CS, evidenciando que o programa de natação foi eficiente em aumentar a DMO do fêmur dos animais desse grupo. Todavia, os ratos do DE

apresentaram valores significativamente menores (49%) que os do CE e não diferentes do DS.

A



B



C

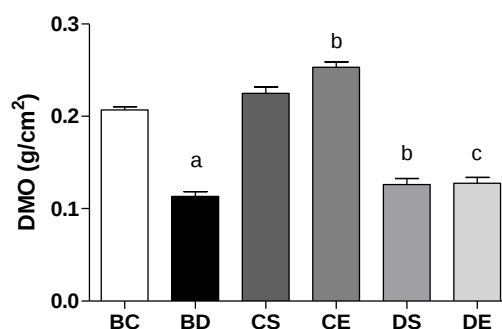


Figura 6 - Área (A); conteúdo mineral ósseo (CMO) (B); e densidade mineral óssea (DMO) (C) do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP. (BC) *Baseline* de controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (^a) diferente de BC ($p < 0,05$); (^b) diferente de CS; e (^c) diferente de CE ($p < 0,05$).

A deposição de CMO está diretamente ligada a processos das células osteoblásticas. A deficiência de insulina no DM tipo 1 pode interferir na formação de novo osso, possivelmente em razão do mau funcionamento de

osteoblastos (MIAZGOWSKI et al., 2007). Os mecanismos celular e molecular, subjacentes à perda de massa óssea por deficiência de sinalização de insulina e IGF-1, ainda não foram completamente esclarecidos. Entretanto, a deficiência no substrato do receptor de insulina (IRS-1) de osteoblastos dificulta a proliferação e diferenciação desses, bem como o apoio da osteoclastogênese, resultando em osteopenia; sendo assim, IRS-1 osteoblástica desempenha importante papel na manutenção óssea, não só porque é essencial para a sinalização de IGF-1 e insulina, mas também porque pode estar envolvida na transdução de sinal para outros fatores. Entre outras funções, o IGF-1 aumenta a produção de colágeno, que será incorporado à matriz óssea; pode regular a função osteoblástica, durante reabsorção do osteoclasto, e a reabsorção óssea, por meio de efeitos diretos e indiretos na diferenciação e ação de osteoclasto (OGATA et al., 2000).

Além de todos esses fatores, também podem vir a auxiliar no processo de redução da CMO: o aumento da excreção de cálcio pela urina, juntamente com diminuição na absorção de cálcio intestinal, levando à deficiência crônica de cálcio; os efeitos no longo da vida da hiperglicemia crônica sobre a função dos osteoblastos; os efeitos negativos do acúmulo produtos finais glicação na formação óssea; a insulinopenia; e o diabetes induzido por desregulação do eixo GH-IGF (THRAILKILL, et al., 2005).

O exercício físico tem efeitos osteogênicos sobre o sistema esquelético. As forças mecânicas induzidas a esse sistema pela sustentação do peso corporal e pela prática da atividade física podem exercer influência anabólica sobre esse, ativando mecanismos piezoelétricos dos cristais de hidroxiapatita dos ossos em situações normais (SOUZA et al., 2005). Esses efeitos podem ser percebidos nos grupos de controle; em contrapartida, não se identifica nos de diabéticos. Acredita-se que a presença de insulina estimula a síntese nucleotídea pelos osteoblastos, além de promover o acúmulo intracelular de aminoácidos em ossos. Fatores de crescimento semelhantes à insulina promovem a síntese do colágeno ósseo e aumentam a deposição de cálcio no esqueleto, ou seja, se houver redução dos níveis de insulina, a síntese da matriz óssea é inadequada, impedindo a calcificação adequada do osso (BILEZIKIAN et al., 2008), justificando a falta de evidência do aumento da CMO nos animais diabéticos exercitados. A atividade física, sem a presença da

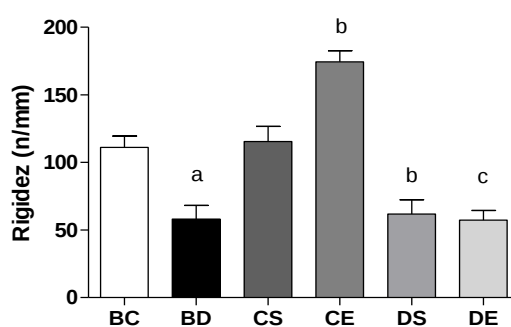
insulina, não é capaz de manter ou aumentar o CMO de ossos nos animais diabéticos.

5.3. Propriedades mecânicas do fêmur

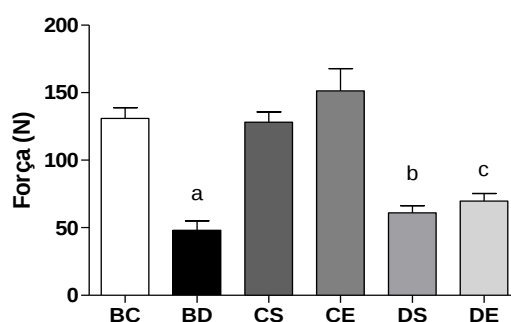
5.3.1. Propriedades mecânicas do colo do fêmur

O grupo BD apresentou rigidez à flexão na região do colo do fêmur significativamente menor (48%), quando comparado ao BC (Figura 7A), indicando que o diabetes aos 45 dias prejudicou a deposição mineral desses animais. O grupo CE evidenciou uma rigidez significativamente maior (34%) que o CS, o que prenuncia que o protocolo de natação utilizado afetou de forma benéfica esse parâmetro. Os animais DS demonstraram valores significativamente menores (47%) que os CS, expondo, mais uma vez, que, ao final do experimento, o prejuízo do diabetes continuou, assim como ocorreu aos 45 dias. O grupo DE evidenciou valores inferiores (33%) em comparação com o CE, demonstrando que o diabetes interfere na ação do exercício sobre o parâmetro analisado (Figura 7A).

A



B



C

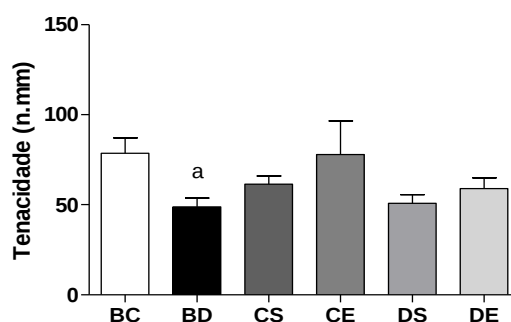


Figura 7 - Rigidez (A); Força máxima de fratura (B); e Tenacidade (C), no colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP. (BC) *Baseline* controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (^a) diferente de BC ($p < 0,05$); (^b) diferente de CS; e (^c) diferente de CE ($p < 0,05$)

Em relação à força máxima aplicada, o grupo BD apresentou valores significativamente menores (63%), quando comparado ao BC (Figura 7B), significando que aos 45 dias o diabetes já comprometia a estrutura óssea dos animais diabéticos. O grupo DS também evidenciou valores significativamente inferiores (52%), quando comparado ao CS, o que indicou que ao final do

experimento, os danos causados pelo diabetes permaneceram nesses ratos. Os animais do grupo DE apresentaram valores inferiores (54%) quando comparados aos do grupo CE, indicando que o exercício não foi eficiente em aumentar a força máxima à flexão, em uma situação de carência de insulina.

Para a tenacidade óssea no colo do fêmur (Figura 7C), a única diferença encontrada foi para o grupo BD que apresentou valores significativamente menores (38%), quando comparados ao BC, o que evidencia que a tenacidade óssea desses animais estava prejudicada aos 45 dias pelo diabetes. Não houve diferença estatística entre os grupos DE e CE.

Os principais componentes do osso são carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, colágeno e água; os percentuais relativos desse material variam com a idade e a saúde do osso. Os minerais conferem ao osso sua rigidez e são os determinantes primários de sua resistência compressiva. O colágeno é uma proteína que atribui ao osso sua flexibilidade o que contribui para sua resistência tensiva (resistência à tração) (HALL, 2005). A integridade do osso é importante para a fratura. A menor rigidez, força e tenacidade óssea aumentam a probabilidade do risco de fraturas, que é grande problema de saúde pública, pois essas estão associadas à morbidade, mortalidade e alto custo econômico (GALVÃO; CASTRO, 2010).

A região mineralizada do osso controla a rigidez, enquanto o colágeno, a força máxima e a tenacidade do osso. Estudos indicaram que a composição relativa dos minerais e da matriz de colágeno é deslocada pelo exercício em favor da região óssea mais mineralizada (ISAKSSON et al., 2009). A rede de colágeno também pode ser afetada pela estimulação mecânica, sendo aumentada como resultado do exercício, principalmente durante o crescimento e maturação. O exercício pode afetar o conteúdo de colágeno no tecido ou a sua estabilidade molecular, mudar o ritmo de remodelação das suas redes e alterar a produção de colágeno; conseqüentemente, as propriedades mecânicas do osso (ISAKSSON et al., 2009).

Neste estudo, a rigidez, força máxima e tenacidade dos animais de controles não diabéticos foram positivamente afetadas pelo programa de natação. Entretanto, nos animais diabéticos, o exercício não produziu os mesmos efeitos. Uma possível justificativa para esse fato é a deficiência de insulina nesses animais, pois esse hormônio participa da deposição mineral, que resulta em uma melhor saúde óssea. A participação da insulina no

metabolismo ósseo já foi descrita na literatura e sabe-se que os osteoblastos contêm receptores para essa e sua ação no crescimento somático ocorre via alterações na expressão genética e biossíntese protéica, que culminam da transdução dos sinais iniciados na membrana celular (PRICE et al., 1994 apud SOUZA et al., 2005). A deficiência de insulina prejudica a ação osteoblástica, o que resulta em redução na deposição mineral, alterando o CMO e, conseqüentemente, a rigidez.

5.3.2. Ensaio mecânico da diáfise do fêmur

A rigidez à flexão na diáfise do fêmur não foi diferente entre os grupos BC e BD; entretanto, nos animais CS foi maior (57%) que nos BC (Figura 8A); indicando que o tempo afeta a deposição mineral óssea para indivíduos normais. O grupo DS apresentou rigidez menor (49%) em relação ao CS, o que evidenciou que, ao final do experimento, o DM causou prejuízo à deposição mineral óssea nesses ratos. Os resultados encontrados nos animais do grupo DE foram menores (58%) que os encontrados nos do CE, expondo a ineficiência do exercício, quando há carência de insulina. Todavia, o programa de natação não alterou esse parâmetro nos animais de controles ou diabéticos.

A força máxima até a fratura na diáfise do fêmur foi menor (47%) no grupo BD que no BC (Figura 8B); em 45 dias de hiperglicemia, a força óssea à fratura desses animais estava prejudicada. O grupo CS apresentou valores maiores (18%) que o grupo BC, o que indica que os animais de controle, ao final do experimento, tiveram maior deposição de minerais, em razão da idade. A força de fratura do grupo DS foi menor (55%) que a do CS, demonstrando que ao final do experimento, o diabetes comprometeu a deposição mineral nesses animais, como ocorreu com o grupo diabético, aos 45 dias de experimento (Figura 8B). Os animais do grupo DE apresentaram valores inferiores (60%), quando comparados aos do grupo CE, indicando que o exercício não é eficiente quando há deficiência de insulina. Porém, o programa de natação não alterou esse parâmetro nos animais de controles ou diabéticos.

Para a tenacidade da diáfise do fêmur, o grupo BD apresentou valores menores (56%) que o BC (Figura 8C), corroborando que aos 45 dias já havia prejuízo ósseo causado pelo diabetes experimental. Os animais do grupo DS apresentaram valores (63%) que os do grupo CS, evidenciando que, ao final do

experimento, o prejuízo identificado aos 45 dias nos grupos comprometidos pelo diabetes ainda permanecia (Figura 8C). O grupo DE demonstrou valores inferiores (51%), quando comparados ao CE, indicando que o diabetes interfere na ação positiva do exercício no osso. Entretanto, o programa de natação não alterou este parâmetro nos animais de controles ou diabéticos.

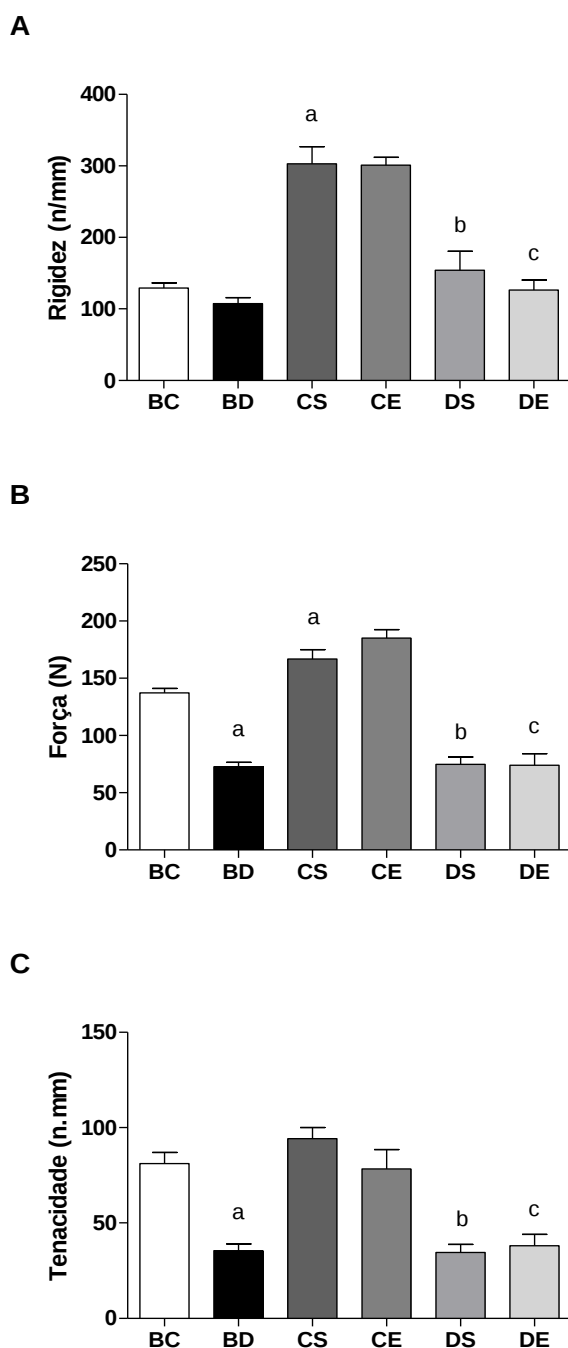


Figura 8 - Rigidez (A); força máxima (B) e tenacidade (C) na diáfise do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP. (BC) *Baseline* controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (^a) diferente de BC ($p < 0,05$); (^b) diferente de CS; e (^c) diferente de CE ($p < 0,05$).

Os dados da diáfise do fêmur apresentaram comportamento similar aos do colo do fêmur, observando-se maior fragilidade óssea para os grupos comprometidos pelo diabetes. Porém, os efeitos do programa de natação nos animais de controles não foram neste estudo.

A insulina tem participação no metabolismo ósseo, uma vez que, os osteoblastos contêm receptores para esse hormônio. A sua ação no crescimento somático, esta ligada às alterações na expressão genética e síntese de proteínas que ocorrem em razão, da transdução de sinais que se iniciam na membrana celular (PRICE et al., 1994 apud SOUZA et al., 2005). A insulina pode atuar como hormônio do crescimento, estimulando a síntese de colágeno e a multiplicação dos osteoblastos (CANALIS et al., 1980 apud SOUZA et al., 2005). Sendo assim, a deficiência de insulina comprometeu a saúde óssea dos animais diabéticos diminuindo a capacidade do osso em resistir à fratura.

Outros estudos demonstraram que a carga máxima suportada até a fratura no fêmur de ratos *Sprague-Dawley* diabéticos, com dez semanas de idade, foi menor que a de seus respectivos controle (REDDY et al., 2001; ERDAL et al., 2010), por causa das mudanças metabólicas causadas pelo distúrbio da insulina e IGF-1. Erdal et al. (2010), trabalhando com ratos Wistar machos albinos, com doze semanas de idade, afirmaram que ocorreu também alteração no metabolismo da rede de colágeno dos animais diabéticos.

O aumento da rigidez do grupo CS, em relação ao grupo BC, pode ser explicado pelo próprio crescimento dos animais, este crescimento associado ao ganho de peso, durante esse período, pode ter influência sobre os resultados encontrados.

5.4. Histomorfometria do fêmur.

Na Figura 9, são apresentadas fotomicrografias representativas do colo do fêmur dos animais dos grupos experimentais.

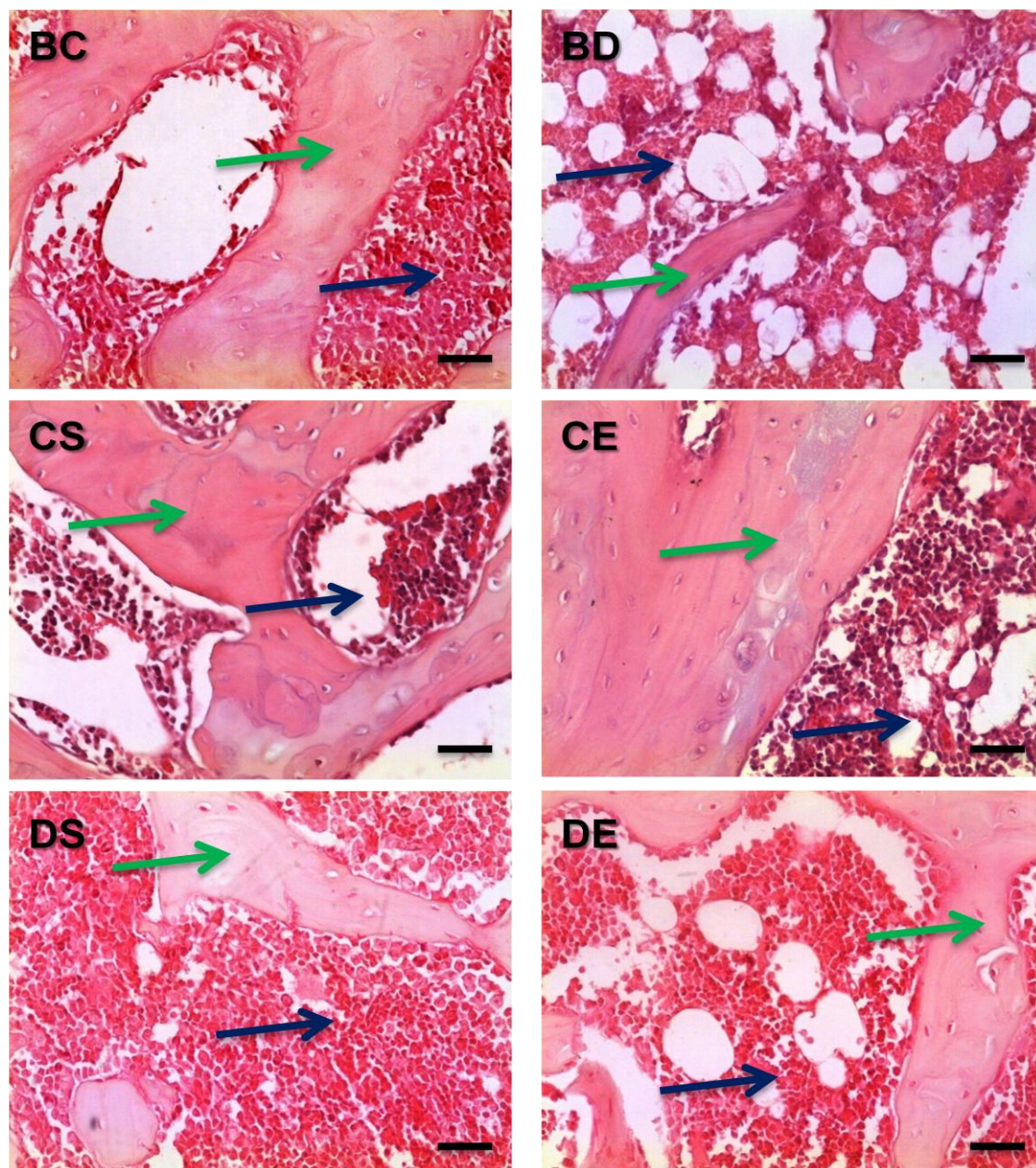


Figura 9 - fotomicrografias da região do colo do fêmur de animais dos grupos experimentais. *Baseline* de Controle (BC); *Baseline* Diabético (BD); Controle Sedentário (CS); Controle Exercitado (CE); Diabético Sedentário (DS) e Diabético Exercitado (DE). Trabéculas ósseas (setas verdes), medula óssea (setas azuis). Hematoxilina e Eosina (HE) 200x Barra 100 μ m.

As trabéculas evidenciaram-se mais delgadas nos grupos BD, DS e DE, quando comparadas as do BC, CS e CE, respectivamente. Esse resultado indica reabsorção aumentada e deposição diminuída por efeito do diabetes experimental. Também ficou evidente que o desequilíbrio entre a formação e a reabsorção induz a redução na espessura trabecular e maior porosidade, caracterizada por espaços em branco entre o tecido ósseo e a medula.

Na Figura 10, estão apresentados os dados médios do volume trabecular ósseo (VTO) dos grupos experimentais. Os animais do grupo BD evidenciaram valores menores (38%), quando comparado ao BC (Figura 10), significando que aos 45 dias, o diabetes prejudicou a estrutura óssea desses animais. O grupo CS apresentou VTO menor (26%) que o BC, indicando que o tempo é fator relevante para a saúde do tecido esponjoso. No grupo CE os valores de VTO foram maiores (23%) que os encontrados em CS, expondo que o programa de natação afetou positivamente as trabéculas ósseas com deposição mineral nessa região. Para os animais do grupo DS os valores de VTO foram menores (27%) que os dos CS, o que demonstra que o diabetes comprometeu a estrutura óssea ao final do experimento (Figura 10). Os animais do grupo DE apresentaram valores de VTO inferiores (41%), quando comparados aos dos CE, indicando que a deficiência de insulina influencia na ação do exercício sobre o osso. Todavia, o programa de exercício não influenciou o VTO dos animais diabéticos.

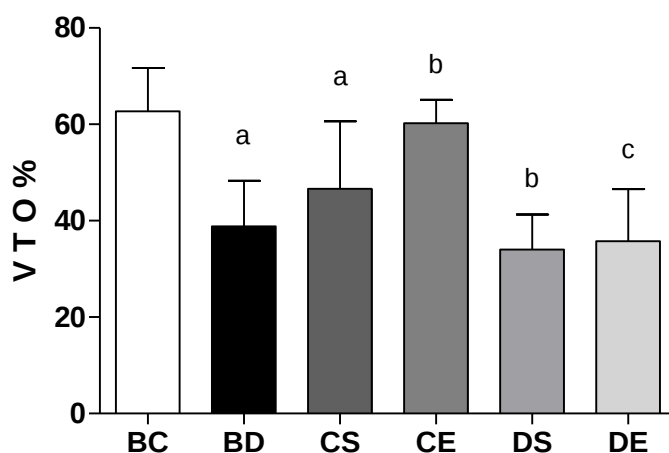


Figura 10 - Volume trabecular ósseo (VTO) da epífise do fêmur dos animais dos grupos experimentais. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP. (BC) *Baseline* controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (^a) diferente de BC ($p < 0,05$); (^b) diferente de CS; e (^c) diferente de CE ($p < 0,05$).

Esses efeitos foram causados pela deficiência de insulina do DM tipo 1. Esse hormônio é necessário para a saúde óssea, uma vez que os osteoblastos contêm em sua membrana receptores para insulina (OGATA et al., 2000). A insulina age nos receptores contidos nos osteoblastos e esses realizam o

processo de deposição mineral importante para a manutenção óssea (YAMAGUCHI et al., 2005).

A remodelação ocorre tanto no osso cortical como no trabecular; porém, é mais intensa no trabecular, em razão da 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).

A perda de osso trabecular, por causa do diabetes, foi observada em outros estudos com ratos machos *Wistar* com cerca de 60 dias de idade, e camundongos machos BDA/2J (SILVA et al., 2009; NYMAN et al., 2011). Nos camundongos machos BDA/2J, além da diminuição do volume trabecular, houve diminuição do número de trabéculas causando, assim, fragilidade óssea significativa (NYMAN et al., 2011).

Estudos relataram alterações na geometria do osso de animais treinados com natação, como maior aposição periosteal, crescimento longitudinal do osso, aumento do conteúdo mineral ósseo e força óssea, refletindo em uma distribuição mais favorável do tecido ósseo, capaz de fortalecer essa estrutura (HART et al., 2001). A contração muscular atua direta ou indiretamente sobre os ossos, produzindo estímulo osteogênico. Mais de 70% da tensão sofrida pelo osso são transmitidas pela força muscular e não pelo peso corporal (IWAMOTO et al., 1999). Bourrin et al. (1992) mostraram que o exercício de natação reduziu a reabsorção e a superfície osteoide, sugerindo uma diminuição do *turnover* ósseo.

A presença da insulina no metabolismo ósseo já foi descrita na literatura; consequentemente, os osteoblastos possuem receptores para essa participação. A ação das células osteoblásticas no crescimento somático ocorre pelas alterações na expressão gênica e pela biossíntese proteica, resultante da transdução dos sinais iniciados na membrana (PRICE et al., 1994 apud SOUZA et al., 2005). Além de outras ações, evidencia-se que a insulina participa como hormônio do crescimento, estimulando a síntese de colágeno e a multiplicação dos osteoblastos (CANALIS et al., 1980 apud SOUZA et al., 2005). Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o *diabetes mellitus* experimental comprometeu a saúde óssea dos animais, diminuindo o volume de osso esponjoso, por esse ser mais sensível às alterações metabólicas, quando comparado ao osso cortical.

Para a espessura cortical, o grupo BD apresentou valores menores (51%) que o BC (Figura 11), indicando que, aos 45 dias, havia prejuízo ósseo causado pelo *diabetes mellitus*. Os animais do grupo CS demonstraram valores maiores (14%) que do BC, o que indica que a espessura cortical pode ter sido influenciada pela idade e, bem como pelo aumento de peso desses em virtude do crescimento ao final do experimento. A espessura cortical do grupo DS foi menor (46%), quando comparado ao CS, evidenciando que os efeitos do diabetes permaneceram ao final do experimento. Os resultados apresentados pelos animais do grupo DE foram menores (57%) quando comparados com os do grupo CE, demonstrando que a deficiência em insulina interfere na ação do exercício sobre o osso. Entretanto, o programa de natação não alterou esse parâmetro nos animais de controles ou diabéticos.

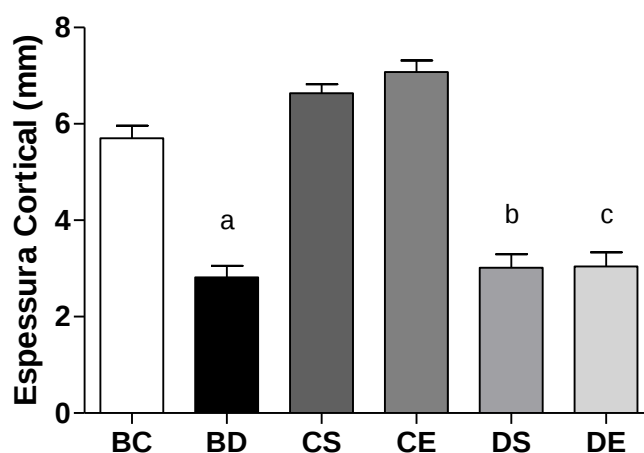


Figura 11 - Espessura cortical do fêmur dos animais dos grupos experimentais.. Os dados estão expressos em média $\pm$ DP. (BC) *Baseline* controle; (BD) *Baseline* diabético; (CS) controle sedentário; (CE) controle exercitado; (DS) diabético sedentário; (DE) diabético exercitado; (^a) diferente de BC ($p < 0,05$); (^b) diferente de CS; e (^c) diferente de CE ($p < 0,05$).

O osso cortical mais delgado nos animais diabéticos pode ser resultado da excessiva reabsorção óssea, sem a correspondente formação. Segundo Palmer (1993) e Doige e Weisbrode (1998), a reabsorção endosteal pode afetar o alargamento da cavidade medular. Essa diminuição do osso cortical nos animais diabéticos demonstra o efeito da deficiência de insulina no metabolismo ósseo desses animais.

Verifica-se que o exercício físico, quando há a deficiência de insulina, não é capaz de manter ou aumentar a deposição óssea. Esse hormônio é importante, pois, além de outras ações, atua como hormônio do crescimento, estimulando a síntese de colágeno e a multiplicação dos osteoblastos (CANALIS et al., 1980 apud SOUZA et al., 2005). A ausência da insulina inevitavelmente irá contribuir para uma degradação óssea, em virtude do mau funcionamento dos osteoblastos e da possível alteração na rede de colágeno.

Resultados similares aos deste estudo foram observados em camundongos DBA/2J diabéticos, com onze semanas de idade. O estudo apresentou que dez semanas de diabetes foi o suficiente para causar uma redução na área cortical da diáfise do fêmur desses animais (NYMAN et al., 2011). Silva et al. (2009) também demonstraram que ratos *Sprague-Dawley* diabéticos, com 11-12 semanas de idade, após o período experimental apresentaram menor área cortical em relação aos de controles. Essa diminuição de osso cortical foi causada por uma interrupção prematura do crescimento ósseo, evidenciado por um platô na área cortical nas quatro e oito semanas após a indução do diabetes; enquanto os ratos normais continuaram a adicionar osso cortical, durante todo o período do estudo, 12 semanas.

6 CONCLUSÕES

O protocolo de exercício utilizado não foi capaz de aumentar a densidade mineral óssea; o conteúdo mineral ósseo; a resistência óssea; a tenacidade e a rigidez, tanto no colo quanto na diáfise; e quanto à histomorfometria, os parâmetros analisados, do fêmur de animais com *diabetes mellitus* experimental.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p.1251.

AHMAD, T.; UGARPH-MORAWSKI, A.; LEWITT, M.S.; LI, J.,SÄÄF, M.; BRISMAR, K., Diabetic osteopathy and the IGF system in the Goto-Kakizaki rat. Growth Horm IGF Res., v.18, Apr p.404-411, 2008.

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, Sep p.60-64, 2007.

AMORIM, F.P.L.; ORNELAS, S.S.; DINIZ,S.F.; BATISTA, A.C.; SILVA,T.A.; Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetics rats. J.Mol.Hist. ,v.39, Jul., p. 401- 408. 2008.

BAYRAMOGLU, M.; SOZAY, S.; KARATAS, M. E.; KILINC, S. Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women. Rheumatol. Int.,v.25, n.7, Sep., p.513-7., 2005.

BILEZIKIAN, J. P., RAISZ, L. G., MARTIN, T.J. Principles of Bone Biology 3. ed, vol. 1 e 2 USA; Editora Elsevier ,2008.

BOURRIN, S.; GHAEMMAGHAMI, F.; VICO, L.; CHAPPARD, D.; GHARIB, C.; ALEXANDRE, C. Effect of a five-week swimming program on rat bone: a histomorphometric study. Calcif Tissue Int., v.51, n.2, Aug, p.137-42. 1992

BURKE, J.P.; FENTON, M.R.,SAADAT, M. Effect of exercise on bone mineral metabolism in diabetes. Journal of the American Podiatric Medical Association, v.86, n.1, p.38-42, 1996

CADORE, E. L.; BRETANO, M. A.; 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, Nov/Dec p. 373-379, 2005.

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 MELLITUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

DOIGE, C.E.; WEISBRODE, S.E. Doenças dos ossos e articulações. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. Patologia veterinária especial de Thomson. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, p. 448-485. 1998.

ERDAL,N.; GÜRGÜL, S.; KAVAK,S.; YILDIZ,A.; EMRE,M.; Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ)-Induced type 2 *diabetes mellitus* in rats. Biol Trace Elem Res, May, p.342-353, 2010.

EVANS, D. A. Conjoint Clinic on Drugs and Genes. J. Chronic. Dis, v.18, Jan, p.59-76.1965.

FEI, Y.; ZHANG,M., LI,M.; HUANG, Y.; HE,W.; DING,W.; YANG, J. Element analysis in femur of diabetic osteoporosis model by SRXRF microprobe. Micron v.38, Jan., p.637-642, 2007.

FERNANDES, B. B. Influência de diferentes tipos de exercício sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras. 2010. Dissertação (Mestrado em Educação Física), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de Histologia: em cores. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999, 426 p.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; ESPOSITO, K. Glucose metabolism and hyperglycemia. American Journal of Clinical Nutrition, v.87, p.217–222. 2008.

GOMES, R. J.; LEME, J. A.; DE MOURA, L. P.; DE ARAUJO, M. B.; ROGATTO, G. P.; DE MOURA, R. F.; LUCIANO, E. AND DE MELLO, M. A. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. Cell Biochem Funct, v.27, n.4, Jun, p.199-204. 2009.

GOMES, R.J.; MELLO, M.A.R.; CAETANO,F.H.; SIBUYA,C.Y.; ANARUMA,C.A.; ROGATTO, G.P.; OAULI, J.R.; LUCIANO,E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF- 1 axis in diabetics rats. Growth Horm IGF Res n.16,Oct, p.326-331. 2006.

GUADALUPE-GRAU, A.; FUENTES, T.; GUERRA, B.; CALBET, J. A. Exercise and bone mass in adults.Sports Med., v.39, n.6, May, p.439-68. 2009.

HALL, S., Biomecânica Básica. 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

HART, K.J.; SHAW,J.M.; VAJDA, E.; HEGSTED,M.; MILLER, S.C.; Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength and dynamics. J. Appl. Physiol., v.91, Sep, p.1663-1668, 2001.

HOFBAUER, L.; BRUECK, C.C.; SINGH,S.K.; DOBNIG,H. Osteoporosis in Patients With *Diabetes mellitus*. J. Bone and Miner Res., v.22 n.9, May, p.1317-1328. 2007.

HOSOI, T.,Genetic aspects of osteoporosis. J. Bone Mine Metab., v.28 n.6 Nov, p.601-7, 2010.

HUANG,T.H.; HSIEH,S.S.; 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.; 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. WELTMAN, A. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. Med. Sci. Sports Exerc, v.40, n.11, Nov, p.1863-72. 2008.

ISAKSSON, H.; TOLVANEN, V.; FINNILÄ, M.A.; IIVARINEN, J.; TUUKKANEN, J.; SEPPÄNEN, 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, p.247-56. 2009.

IWAMOTO, J.; YEH, J. K. ; ALOIA, J. F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. Bone, v.24, n.3, Mar, p.163-9. 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008. p.135-152.

KAGEL, E.M.; EINHORN, T., Alterations of fracture healing in the diabetic condition. Iowa Orthop. J., v.16, Jan, p. 147-152, 1996.

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

KHAN, K.; MCKAY, H.; KANNUS, P.; BAILEY, D.; WARK, J.; BENNELL, K. Physical Activity and Bone Health. [s.l.] Editora Human Kinetics, 2001.

KIERSZENBAUM, A.L., Histologia e Biologia Celular: uma Introdução à patologia. 2.ed, Rio de Janeiro: Elsevier 2008. p.696

KONRAD, R. J.; MIKOLAENKO, I.; TOLAR, J. F.; LIU, K. 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.

LIN, Y.; Z. SUN. Current views on type 2 diabetes. Journal of Endocrinology, v.204, Jan, p.1–11. 2010.

LIRANI-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.

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.

MAÏMOUN, L.; SULTAN, C. Effects of physical activity on bone remodeling. Metabolism Journal v.60, Mar, p. 1-16, 2010.

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

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. Fís.v.14, p.7-15, jan./jun. 2000.

MELLO,L.C.P. Características físicas, químicas e biomecânicas dos ossos de ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio. 2003.Doutorado em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. p. 36, 2003.

MENON, R. K.; STEPHAN, D. A.; RAO, R. H.; SHEN-ORR, Z.; DOWNS, L. S.; ROBERTS, JR. C. T.; LEROITH, D. PERLING, M. 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.

MIAZGOWSKI, T.; PYNKA, S.; NOWORYTA-ZIETARA, M. M.; KRZYZANOWSKA-SWINIARSKA, B.; PIKUL, R. Bone mineral density and hip structural analysis in type 1 diabetic men. European Journal of Endocrinology, Jan, p.123–127. 2007.

MILGROM C.; SIMKIN, A.; ELDAD, A.; NYSKA, M.; FINESTONE, A. Using Bone's Adaptation Ability to Lower the Incidence of Stress Fractures. The American Journal of Sports Medicine, v. 28 n.2, pp. 245-251, 2000.

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

MOTYL K.; MCCABE L.R. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. Biol. Proced Online., v.6, n.11, Mar p.296-315. 2009.

NYMAN, J. S.; EVEN, J. L.; JO, C.; HERBERT, E. G.; MURRY, M. R.; COCKRELL, G .E.; WAHL, E. C.; BUNN, R. C.; LUMPKIN Jr, 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. n.48, Apr, p.733-740,2011.

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

PALMER, N. Bones and joints. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. Pathology of domestic animals. v. 1 Orlando: Academic Press, 1993.

PAULA, F. J. A.; HOROWITZ, M. C.; ROSEN, C. J. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. Diabetes Metab. Res. Rev., v.26, Sep, p. 622–630. 2010

PROFF, P.; e RÖMER, P. The molecular mechanism behind bone remodeling: a review Clin Oral Invest n.13, Dec, p 355–362, 2009.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep, v.29, May, p.91-8.1963 .

RÄKEL, A.; SHEEHY, O.;RAHME, E.; LELORIER, J.; Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. Diabetes & Metabolism, v.34, Jun, p.193-205, 2008.

RETZEPI, M.; DONOS,N. The effect of *diabetes mellitus* on osseous healing. Clin Oral Impl. Res v.21, Jul, p.673-681, 2010.

REDDY G. K., The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice, n. 54, Oct, p.1-8 ,2001.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu. Rev. Biomed .Eng, v.8, Jul, p.455-98.2006.

ROSEN, C.; Bone Remodeling, Energy Metabolism, and the Molecular Clock, Journal Cell Metabolism, v. 7, Jan, p. 7-10, 2008.

ROSS, M. H., PAWLINA,W. Histologia Texto e Atlas. 5. Ed [s.l.]: Guanabara Koogan, 2008.

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

SCHWARTZ, A. V. *Diabetes mellitus*: Does it Affect Bone? Calcif Tissue International, v.73, May p.515–519. 2003.

SILVA, M.F. Efeitos do exercício físico sobre as propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos de ratos diabéticos. 2010 (Mestrado em Educação Física) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2010.

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 p.1618-1627, 2009.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia Humana: uma abordagem integrada. Porto Alegre: Artmed. 2010. p.992 .

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: Tratamento e acompanhamento do *diabetes mellitus*. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2008. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Diretrizes_SBD_2008_mar_12.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2009.

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

SOUZA, M.Z.; LUCIANO,E., Influências do Treinamento Físico sobre o crescimento Ósseo de Ratos Diabéticos. Saúde Rev. v.7, n.16, Maio/Agosto p.27-35, 2005.

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

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

THRAILKILL, K. M.; LUMPKIN, C. K.; JR., BUNN, R. B.; 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, Jun, p.735-745, 2005.

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

VERHAEGHE, J., E. HERCK, V. H., BREE, R., MOERMANS, K., BOUILLION, R., Decreased Osteoblast Activity in Spontaneously Diabetic Rats. Endocrine, v.7, Oct, p.165-17. 1997.

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

WARNER, S.E.; SHEA, J.E.; MILLER, S.C.; SHAW, J.M. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. Calcif Tissue, Int v.7, Dec, p. 395-403. 2006.

YAMAGUCHI, M.; OGATA, N.; SHINODA, Y.; AKUNE, T.; KAMEKURA, S.; TERAUCHI, Y.; KADOWAKI, T.; HOSHI, K.; CHUNG, U.; NAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, H. Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. Endocrinology, v. 146, n. 6, Jun, p.2620-2628, 2005.