



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Efeitos do *laser* terapêutico de baixa intensidade e do treinamento resistido no metabolismo ósseo em ratos com Diabetes Mellitus tipo I

Effects of laser therapy and low-intensity and resistance training on bone metabolism in rats with type I Diabetes Mellitus

TATIANE LOPES PATROCÍNIO DA SILVA

SÃO CARLOS – SP

2013

TATIANE LOPES PATROCÍNIO DA SILVA

Efeitos do *laser* terapêutico de baixa intensidade e do treinamento resistido no metabolismo ósseo em ratos com Diabetes Melitus tipo I

Effects of laser therapy and low-intensity and resistance training on bone metabolism in rats with type I Diabetes Mellitus

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^a.Dr. Ana Cláudia Muniz Rennó

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizoto

SÃO CARLOS – SP

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586eL

Silva, Tatiane Lopes Patrocínio da.

Efeitos do *laser* terapêutico de baixa intensidade e do treinamento resistido no metabolismo ósseo em ratos com Diabetes Mellitus tipo I / Tatiane Lopes Patrocínio da Silva. - São Carlos : UFSCar, 2013.
132 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Estreptozotocina. 3. Exercício resistido. 4. Fisioterapia. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Tatiane Lopes Patrocínio da Silva

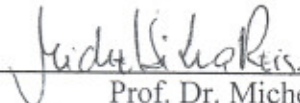
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 14/06/2013

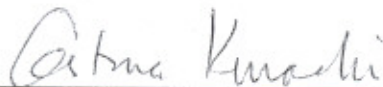
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Muniz Renno (Orientadora)
(Universidade Federal de São Carlos)



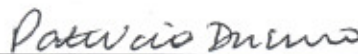
Prof. Dr. Michel Silva Reis
(Universidade Federal do Rio de Janeiro)



Prof.^a Dr.^a Cristina Kurachi
(Universidade de São Paulo)



Prof.^a Dr.^a Daniela Cristina Carvalho de Abreu
(Universidade de São Paulo)



Prof.^a Dr.^a Patrícia Driusso
(Universidade Federal de São Carlos)

DEDICATÓRIA

*A minha família, Nelson, Vália e Camila, meu porto seguro;
Ao meu marido, Fábio, meu lindo.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profª Drª Ana Cláudia Muniz Rennó por ser minha orientadora e amiga. Minha maior incentivadora a seguir a área acadêmico-científica. Obrigada pela amizade e confiança, pelos ensinamentos ao longo desses anos de convivência também profissional.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, meu orientador, obrigada pela confiança em mim depositada e por abrir-me as portas da ciência, mostrando-se sempre disposto em contribuir para o meu engrandecimento no aspecto profissional e pelos conhecimentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, por ter me guiado, me dado força e serenidade para seguir adiante ao longo dessa jornada.

A toda a minha família, que mesmo com a distância, sempre entendeu as ausências e deu apoio.

A todos os docentes que compuseram a banca examinadora desta tese e da sua qualificação, que, com suas contribuições científicas, permitiram meu crescimento profissional e acadêmico.

À chefia e membros da UNITAU, pelo afastamento parcial concedido e principalmente, pelo apoio durante este período, por acreditarem no meu trabalho, e por cada gesto e palavra de incentivo ao longo do desenvolvimento desta tese, muito obrigada!

As amigas, Kelly, Angela, Juliana, Renato, Renan, Hueliton Kido e Carla Tim, pelo companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela amizade cultivada.

Ao amigo Paulo, pela ajuda durante o período experimental e na finalização deste trabalho.

Aos alunos de graduação do curso de Fisioterapia da UNIFESP, André Fogaça, Raul Loopi, Jussan Oliveira, Carolina Fuirini e Bruna Dreys, pelo auxílio durante o período experimental deste trabalho.

A todos os amigos componentes do grupo de pesquisa pela amizade e bons momentos compartilhados.

As grandes amigas Renata e Karina Nogueira, pelo enorme incentivo para que eu me envolvesse nesta área de pesquisa, pelo apoio ao longo do trabalho e todas as sugestões dadas.

A Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka por disponibilizar o equipamento para a realização do ensaio biomecânico dos estudos desta tese.

A Prof^a Dr^a Rosa Maria Rodrigues Pereira por disponibilizar o equipamento para a realização da densitometria nesta tese.

A Prof^a Dr^a Márcia Nagaoka, pela ajuda durante a realização do experimento e análises bioquímicas, além de sua amizade.

Ao Prof. Dr. Daniel Araki, pela ajuda durante as análises deste trabalho, além de sua amizade.

Aos funcionários da UNIFESP – campus baixada santista, pela atenção e ajuda.

À Cláudia, secretária do PPG-Biotec/UFSCar, pela presteza e auxílio em todos os momentos necessários.

Aos meus amigos, minha família de escolha, muito obrigada a cada um de vocês, simplesmente por fazerem parte da minha vida, a tornarem muito mais feliz e completa.

A família do meu esposo, Milton, Sônia, Gabriela, Priscila, Pawel e Alicja, pelo apoio e por serem mais um porto seguro na minha caminhada.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, caracterizada pela deficiência na secreção ou ação da insulina, levando a uma série de modificações fisiológicas, que determinam alterações do funcionamento normal de diversos órgãos e tecidos, dentre os quais, o tecido ósseo é afetado, levando à fragilidade óssea. Neste contexto, alguns tratamentos têm demonstrado melhorar o metabolismo ósseo. O Exercício Resistido (ER) é recomendado para indivíduos diabéticos e dentre seus efeitos benéficos promove o aumento da densidade mineral óssea. A terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) é capaz de estimular a atividade dos osteoblastos, e aumentar as propriedades biomecânicas ósseas. No entanto, seus efeitos sobre o metabolismo ósseo de animais diabéticos não estão completamente esclarecidos, bem como sua ação associado ao ER. Diante disso, este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos de um protocolo de exercícios resistidos e da LLLT, aplicados individualmente ou em associação no metabolismo ósseo de ratos diabéticos. Cinquenta ratos Wistar machos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (N=10 cada grupo): Grupo Controle não diabético (GC), grupo controle diabético (GD), grupo Irrradiado com *Laser* diabético (GL), grupo treinado diabético (GT) e grupo treinado e *laser* diabético (GTL). No primeiro estudo foram avaliados os efeitos da LLLT no osso diabético em 3 grupos: GC, GD e GL. O GL foi submetido à irradiação *laser* Ga-Al-As, 808 nm, 100 mW, 3,57W/cm², 0,028cm², 120J/cm², 33s, durante 18 sessões, em dias alternados, por 6 semanas. Como resultados o GL mostrou aumento da área cortical e imunexpressão de RUNX-2 aumentada em comparação o GD. Além disso, a LLLT produziu um aumento significativo na força de fratura, densidade e conteúdo mineral ósseo (DMO e CMO), em comparação com GD. Portanto a LLLT estimulou a formação óssea, reduzindo a osteopenia dos animais. O segundo estudo avaliou os efeitos da LLLT associado ao ER em animais diabéticos, a partir de 4 grupos: GC, GD, GT e GTL. O ER consistiu em escaladas, com carga atrelada à cauda dos animais, e estas cargas foram aumentadas semanalmente ao longo das sessões de treinamento, no GTL ao final de cada sessão de ER os animais foram irradiados com *laser* Ga-Al-As. Realizados durante 6 semanas, 3 vezes por semana, totalizando 18 sessões. O GT e GTL mostraram aumento da área cortical, DMO e propriedades biomecânicas. O CMO, a força de fratura e rigidez foram maiores no grupo GTL em relação ao GT. Ainda, a análise imunohistoquímica revelou que GT e GTL apresentaram imunexpressão de RUNX-2, aumentada em relação à GD. Já a imunexpressão de RANK-L foi moderada no GD e fraca nos demais grupos experimentais. Como conclusão, o exercício resistido promoveu ativação osteoblástica, com o aumento nas propriedades biomecânicas e na densidade mineral óssea. A associação de exercícios físicos e LLLT, promoveu efeito adicional ao potencial osteogênico do ER realizado isoladamente. Consequentemente, estes dados evidenciam o potencial do exercício físico no tratamento da perda óssea devido à DM. Outros estudos devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre os efeitos da LLLT como terapia coadjuvante ao exercício resistido.

Palavras-chave: diabetes mellitus, tecido ósseo, exercício resistido, terapia *laser* de baixa intensidade.

ABSTRACT

The DM is a chronic metabolic disorder characterized by a deficiency in the secretion or action of insulin, leading to a series of physiological changes that determine changes in normal operation of various organs and tissues, among which bone tissue is affected, leading to bone fragility. In this context, several treatments have been shown to accelerate bone metabolism. The Resistance Exercise (ER) is highly recommended for diabetics and among its beneficial effects promotes increased bone mineral density. The low-level laser therapy (LLLT) is able to stimulate the activity of osteoblasts, as well as increase the biomechanical properties of bone. However, its effects on bone metabolism in diabetic animals are not completely understood, and its action associated with the ER. Therefore, this study aimed to investigate the action of a protocol and resistance exercises LLLT applied individually or in combination on bone metabolism in diabetic rats. Fifty male Wistar rats were randomly divided into 5 experimental groups (N = 10): non-diabetic control group (CG), diabetic control (GD), diabetic group irradiated with laser (GL), trained diabetic group (TG) and trained group laser and diabetic (GTL). In the first study we evaluated the effects of LLLT on bone diabetic in three groups: GC, GD and GL. The GL was subjected to laser irradiation Ga-Al-As, 808 nm, 100 mW, 3.57 W/cm², 0.028 cm², 120J/cm², 33s, for 18 sessions, on alternate days for 6 weeks. As the GL results showed increased cortical area and RUNX-2 immunoreactivity increased compared to GD. Furthermore, LLLT produced a significant increase in the strength of fracture, and bone mineral density (BMD and BMC), compared with DG. Therefore LLLT stimulated bone formation, reducing osteopenia animals. The second study evaluated the effects associated with ER LLLT in diabetic animals from group 4: GC, GD, GT and GTL. The ER consisted of climbing, load tied to the tail of the animal, and these loads were increased weekly throughout the training sessions, the GTL at the end of each session ER animals were irradiated with laser Ga-Al-As. Performed 6 weeks, 3 times per week, totaling 18 sessions. The GT and GTL showed increased cortical area, BMD and biomechanical properties. The BMC, fracture strength and stiffness were higher in GTL over the GT. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that GT and GTL immunoassayed for RUNX-2 increased relative to GD. Already RANK-L immunoreactivity was moderated at GD and week on the others experimental groups. In conclusion, resistance exercise promoted osteoblast activation, with the increase in the biomechanical properties and BMD. The combination of exercise and LLLT, promoted the osteogenic potential additional effect of ER performed alone. Consequently, these data highlight the potential of exercise in the treatment of bone loss due to DM. Further studies should be conducted to provide additional information on the effects of LLLT as adjuvant therapy resistance exercise.

Keywords: *diabetes mellitus, bone tissue, resistance exercise, low intensity laser therapy.*

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas e técnicas
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGEs	<i>Produtos da glicação avançada</i>
AH	análise histológica
AM	Análise morfométrica
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosine Triphosphate
ATT	Área tibial total
BF	Bone fracture
BMC	<i>Bone Mineral Content</i>
BMD	<i>Bone Mineral Density</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CG	<i>Control Group</i>
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
CMT	Carga Máxima de Treinamento
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro Quadrado
cm/min	Centímetro por Minuto
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTA	Cortical tibial area
DEXA	<i>Dual Energy X-Ray Absorptiometry</i>
DG	<i>diabetic group</i>
DM	Diabetes Mellitus
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	desvios padrões
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ER	Exercício Resistido

g	Gramas
g/cm ²	Gramas por centímetro quadrado
GaAIA	Arseneto de Gálio e Alumínio
GC	Grupo Controle
GD	grupo diabético
GF	Glicose final
GH	<i>Growth Hormone</i>
GI	glicose inicial
GL	grupo <i>laser</i>
GLT	grupo <i>laser</i> treinado
GT	grupo treinado
HbA1c	hemoglobina glicosilada
HE	Hematoxilina e eosina
HeNe	Hélio Neônio
Hz	Hertz
IGF-1	Insulina como fator de crescimento
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
KN	Kilo Newton
LF	lactato final
LFR	Lactato final em repouso
LG	<i>Laser group</i>
LI	lactato inicial
LIR	lactato inicial em repouso
LLLT	Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade
MC	Massa corporal
MCF	Massa corporal final
MCI	Massa corporal inicial
N/mm	Newton por milímetros
M	Mol
mg/kg	Miligrama por Quilograma de Massa Corporal

Mm	Milímetro
mW	MiliWatts
mW/cm ²	MiliWatts por centímetro quadrado
N	Newton
OPG	osteoprotegerina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i>
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor K-B</i>
RANK-L	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor K-B Ligand</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RUNX-2	<i>Runt Related Transcription Factor-2</i>
S	Segundo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SP	São Paulo
STZ	Streptozotocina
TCM	Teste de Carga Máxima
TG	<i>Training group</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TTA	Total tibial área
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNICAMP	Universidade de Campinas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
US	Ultra som
W	Watts
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado
WHO	<i>World Health Organization</i>
Mm	Micrômetro
µm ²	Micrômetro Quadrado
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TREINAMENTO RESISTIDO.....	36
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISTRIBUIÇÃO DOS OSSOS EM RELAÇÃO ÀS ANÁLISES.	36
FIGURA 3. FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS. OSTEÓCITOS (SETA FINA) E ÁREAS DE REABSORÇÃO (SETAS GROSSAS). A - GRUPO CONTROLE, B - GRUPO CONTROLE DIABÉTICO; C – GRUPO DIABÉTICO TRATADO COM LASER.	54
FIGURA 4. RESULTADOS DA MORFOMETRIA. ATT: ÁREA TOTAL TIBIAL; ACT: ÁREA CORTICAL TIBIAL; GC: GRUPO CONTROLE, GD: GRUPO DIABÉTICO; GL: DIABÉTICO TRATADO COM LASER (* GC VS GLE GD; # GL VS GD; P ≤ 0,05).	55
FIGURA 5. SECÇÕES REPRESENTATIVAS DA IMUNOHISTOQUÍMICA DE RUNX-2. A IMUNOCOLORAÇÃO DE RUNX-2 (SETA). A - GRUPO CONTROLE, B - GRUPO DIABÉTICO; C - DIABÉTICO TRATADO COM LASER.	56
FIGURA 6. SECÇÕES REPRESENTATIVAS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA DE RANK-L. A IMUNOCOLORAÇÃO DE RANK-L (SETA). A - GRUPO CONTROLE, B - GRUPO DIABÉTICO; C - DIABÉTICO TRATADO COM LASER.	56
FIGURA 7. RESULTADO DA ANÁLISE DE CONTEÚDO MINERAL ÓSSEO MOSTRANDO RESULTADOS INFERIORES NO GD COMPARANDO AO GL E GC. GC (GRUPO CONTROLE), GD (GRUPO DIABÉTICO); GL (GRUPO TRATADO COM LASER);. * P ≤ 0,05.	58
FIGURA 8. RESULTADO DA ANÁLISE DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA MOSTRANDO RESULTADOS INFERIORES NO GD COMPARANDO AO GL E GC. GC (GRUPO CONTROLE), GD (GRUPO DIABÉTICO); GL (GRUPO TRATADO COM LASER). # P ≤ 0,05.	58
FIGURA 9. ÁREA TOTAL TIBIAL (ATT) E ÁREA CORTICAL TIBIAL (ACT). O GRUPO CONTROLE (GC), GRUPO DIABÉTICO (GD), GRUPO TREINADO DIABÉTICO (TG) E GRUPO TREINADO E IRRADIADO COM LASER DIABÉTICO (TLG); (P ≤ 0,05 * VS GC E # VS GD).	82
FIGURA 10. IMUNOEXPRESSÃO DE RUNX-2; A - GRUPO CONTROLE, B - GRUPO CONTROLE DIABÉTICO; C -GRUPO TREINADO DIABÉTICO E D - GRUPO TREINADO E IRRADIADO LASER DIABÉTICO, (→) SETAS INDICAM IMUNOEXPRESSÃO RUNX-2.....	83
FIGURA 11. IMUNOEXPRESSÃO DE RANK-L; A - GRUPO CONTROLE, B - GRUPO CONTROLE DIABÉTICO; C - GRUPO TREINADO DIABÉTICO E D - GRUPO TREINADO E IRRADIADO LASER DIABÉTICO, (→) SETAS INDICAM IMUNOEXPRESSÃO RANK-L.....	84
FIGURA 12. DENSITOMETRIA ÓSSEA: CONTEÚDO MINERAL ÓSSEO (CMO). GRUPO CONTROLE (GC), GRUPO CONTROLE DIABÉTICO (GD), GRUPO TREINADO DIABÉTICO (TG) E GRUPO TREINADO E IRRADIADO COM LASER DIABÉTICO (GTL); (P ≤ 0,05 * VS GTL E # VS GD).	86
FIGURA 13. DENSITOMETRIA ÓSSEA: DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO GRUPO CONTROLE (GC), GRUPO CONTROLE DIABÉTICO (GD), GRUPO TREINADO DIABÉTICO (TG) E GRUPO TREINADO E IRRADIADO COM LASER DIABÉTICO (GTL); (P ≤ 0,05 # VS GD).	86
FIGURA 14. MASSA CORPORAL (MC) DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL. GC: GRUPO CONTROLE; GD: GRUPO DIABÉTICO; GT: GRUPO TREINADO; GTL: GRUPO TREINADO E TRATADO COM LASER; P ≤ 0,05; (* VS GC E # VS GD).	124
FIGURA 15. NÍVEIS GLICÊMICOS DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL. GC: GRUPO CONTROLE; GD: GRUPO DIABÉTICO; GT: GRUPO TREINADO; GTL: GRUPO TREINADO E TRATADO COM LASER; P ≤ 0,05; (* VS GC E # VS GD).	124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PROTOCOLO DE TREINO RESISTIDO DE ESCALADA NO PERÍODO DE TREINAMENTO.	35
TABELA 2. MÉDIA E DESVIOS PADRÕES DA MASSA CORPORAL E NÍVEIS DE GLICOSE.	53
TABELA 3. RESULTADOS DA ANÁLISE BIOMECÂNICA EM MÉDIA E DESVIO PADRÃO.....	57
TABELA 4. MÉDIA E DESVIOS PADRÕES DA MASSA CORPORAL E NÍVEIS DE GLICOSE.	81
TABELA 5. MEDIAS E DP DA ANÁLISE BIOMECÂNICA.	85

APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese de doutorado foi elaborada na forma de dois estudos e redigida em três partes, escritas de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A primeira parte consiste em Contextualização, Objetivo e Materiais e Métodos, com detalhamento da metodologia utilizada.

Na segunda parte são apresentados dois estudos fundamentados na primeira parte exposta acima. O primeiro estudo avaliou o efeito da LLLT no tecido ósseo de animais diabéticos e intitula-se “Os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade sobre o tecido ósseo em ratos diabéticos”. O segundo estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico e a associação deste com a LLLT no metabolismo ósseo de animais diabéticos e é intitulado “Exercício físico resistido associado à terapia *laser* de baixa intensidade estimula o metabolismo ósseo em ratos diabéticos”.

A terceira parte consiste em Conclusão, Considerações Finais, Perspectivas Futuras, Referências Bibliográficas e Anexos.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
APRESENTAÇÃO DA TESE	
PARTE I.....	17
1. CONTEXTUALIZAÇÃO: Diabetes mellitus e metabolismo ósseo.....	18
2. OBJETIVO	30
2.1. Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Animais Experimentais	31
3.2. Modelo Experimental de DM 1	32
3.3. Delineamento Experimental	32
Os 50 animais foram dispostos aleatoriamente em 5 grupos com 10 animais cada:	32
3.4. Aplicação do laser de baixa intensidade	33
3.5. Protocolo de treinamento físico resistido	33
3.6. Eutanásia	36
3.7. Análises.....	37
3.7.1 Avaliação de glicemia e ponderal	37
3.7.2. Avaliação histológica e histomorfométrica	37
3.7.3. Imunoistoquímica	38
3.7.4. Avaliação Biomecânica	39
3.7.5. Densitometria Óssea	40
3.8. Análise estatística.....	40
PARTE II.....	41
4. ESTUDO I.....	42
Resumo	42
1. Introdução.....	44
2. Metodologia	46
2.1. Delineamento experimental	46
2.2. Indução de DM	47
2.3. Irradiação do laser	47
2.4. Procedimentos histológicos	48
2.5. Avaliação histológica e histomorfométrica	48
2.6. Imunohistoquímica.....	49
2.7. Análise Biomecânica	51
2.8. Densitometria	51
2.9. Análise estatística.....	52
3. Resultados.....	52
3.1. Achados Gerais.....	52
3.2. Caracterização da amostra.....	53
3.3. Avaliação histológica e histomorfométrica	53
3.4. Imunohistoquímica.....	55

3.5. Análise Biomecânica	57
3.6. Densitometria Óssea	57
4. Discussão	59
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7. ESTUDO 2	68
Resumo	68
1. Introdução	70
2. Método	73
2.1. Delineamento experimental	73
2.2. Indução de DM e avaliação de massa corporal	73
2.3. Protocolo de treino resistido e da determinação da carga máxima	74
2.4. Irradiação do laser	75
2.5. Procedimentos histológicos	76
2.6. Avaliação histomorfométrica	76
2.7. Imunohistoquímica	77
2.8. Análise Biomecânica	79
2.9. Densitometria	79
2.10. Análise estatística	80
3. Resultados	80
3.1. Observação geral de que os animais experimentais	80
3.2. Caracterização da amostra	81
3.3. Análise morfométrica	82
3.4. Imunohistoquímica	83
3.5. Análise Biomecânica	84
3.6. Densitometria Óssea	85
4. DISCUSSÃO	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
PARTE III	99
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	100
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXO I	124
ANEXO II	125
ANEXO III	127

PARTE I

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

2. OBJETIVO

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONTEXTUALIZAÇÃO: Diabetes mellitus e metabolismo ósseo

A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crônica, caracterizada pela deficiência na secreção ou ação da insulina, ocasionando a hiperglicemia (NAKAGAMI, 2004). A DM pode ser classificada em diferentes tipos, no entanto, são dois os mais frequentemente estudados: o tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2). O DM1 acomete principalmente indivíduos menores de 20 anos e é caracterizado por insuficiência na secreção da insulina, decorrente de uma destruição auto-imune das células β do pâncreas (EXPERT COMMITTEE, 2003; KRONENBERG, 2008). A DM1 é considerada dependente de insulina, no qual o portador necessita de injeções de insulina periodicamente. Já o DM2 é não dependente de insulina e acomete principalmente indivíduos acima dos 35 anos, com maior incidência em pessoas obesas. A DM2 é caracterizada pela resistência da ação da insulina, associada a uma resposta compensatória na secreção deste hormônio, podendo ser controlada com dieta, exercícios físicos e diminuição ponderal (AMD, 2009; RETZEPI e DONOS, 2010).

De acordo com dados apresentados em 2011, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 346 milhões de indivíduos no mundo eram acometidos por DM. Ainda, em recente revisão sistemática avaliando estudos epidemiológicos realizados em 199 países, houve um aumento de 153 para 347 milhões de pessoas com essa doença, entre os anos de 1980 e 2008 (DANAIEI *et al*, 2011). No Brasil, em 1980, cerca de 8% da população acima de 40 anos apresentavam essa condição clínica. Já em 2005, essa porcentagem subiu para 11% e estima-se que em 2030, 11,3 milhões de brasileiros sejam acometidos por essa doença (WILD, 2004; RATHMANN e GIANI, 2004)

Em termos gerais, a DM pode culminar em uma série de modificações fisiológicas, que determinam alterações do funcionamento normal de diversos órgãos e tecidos (BOS e AGYEMANG, 2013). O indivíduo com DM pode apresentar desidratação e lesões teciduais devido ao aumento de glicose sanguínea, aumento da utilização de gorduras e acidose metabólica que pode levar ao coma diabético e a morte. Além disso, a DM provoca a depleção de proteínas e gorduras corporais devido à exploração desses substratos energéticos, assim, indivíduos com DM grave, não tratados sofrem diminuição ponderal e astenia (ATKINSON e EISENBARTH, 2001). De acordo com o Consenso Brasileiro sobre Diabetes, a DM crônica provoca alterações microvasculares, as quais levam à diminuição do aporte sanguíneo aos tecidos, diminuindo a perfusão de oxigênio e então ocasionando complicações crônicas como nefropatias, neuropatias, úlceras plantares e amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica (SBD, 2006; BOS e AGYEMANG, 2013). A DM também está associada à doenças macrovasculares ateroscleróticas, que afetam as artérias coronarianas, encefálicas e de extremidades inferiores (NARAYANAN *et al*, 2013).

A retinopatia diabética é outra complicação microvascular que afeta os pacientes com DM. Nessa afecção ocorrem alterações progressivas na microvasculatura da retina, levando a áreas de ausência de perfusão no tecido, aumento da permeabilidade vascular e proliferação intravascular patológica de vasos da retina. As complicações associadas ao aumento da permeabilidade vascular, edema macular e neovascularização não controlada, são denominadas retinopatia diabética proliferativa (RDP), e podem resultar em perda da visão de forma permanente (KLEIN *et al*, 1998; STRATTON *et al*, 2000).

Estudos mostram que há elevação de duas a três vezes no risco de doença aterosclerótica clinicamente evidente em pacientes com DM 2 em comparação aos não diabéticos (MEIGS *et al*, 2000, COCA *et al*, 2012). Outro trabalho, conduzido na Finlândia, mostrou que pacientes com DM 2 sem infarto prévio do miocárdio (IAM), apresentavam maiores taxas de IAM ao longo de 7 anos em relação ao grupo não diabético. Neste estudo a letalidade após um episódio de IAM também foi substancialmente mais elevada em pacientes com diabetes (HAFFNER *et al*, 1998).

Outra complicação associada a DM são as neuropatias diabéticas, sendo a forma mais comum de neuropatia, responsáveis por mais hospitalizações do que todas as outras complicações diabéticas combinadas. São responsáveis por 50 a 75% das amputações não traumáticas e por fraqueza e ataxia, com aumento estimado da probabilidade de queda de até 15 vezes do que a população não afetada (VINIK *et al*, 2003; MONTEIRO-SOARES *et al*, 2011).

A ulceração do pé é frequentemente observada em associação às neuropatias periféricas, doença vascular periférica, calos, deformidades e altas pressões nos pés, e ocorre em cerca de 5 a 10% dos pacientes diabéticos (PENDSEY, 2010). Tais ulcerações podem evoluir para infecções de difícil resolução, necrose tecidual ou até amputação, sendo que, mais de 80% das amputações são precedidas por úlceras nos pés (CAMPBELL, 2011). Um estudo realizado no Reino Unido mostrou uma incidência anual de ulceração de aproximadamente 2%, esse percentual sobe para 7% naqueles com neuropatia diabética conhecida, e chega a 50% naqueles com antecedentes de úlcera cutânea (BOULTON *et al*, 2006).

Além dessas complicações, o tecido ósseo é severamente afetado pela hiperglicemia (HERRERO *et al*, 1998; LU *et al*, 2003; GANDHI *et al*, 2006; DINIZ *et al*,

2008; YANG *et al*, 2010). A atividade dos osteoblastos é afetada pela insulinopenia e pela consequente diminuição da secreção do hormônio paratireodiano e pelas alterações no metabolismo da vitamina D e na absorção do cálcio. Com isso, em indivíduos diabéticos há uma diminuição da atividade dos osteoblastos e redução da formação óssea (GOODMAN e HORI, 1984; BLAKYTTY *et al*, 2011). Ainda, em indivíduos com DM, a atividade dos osteoblastos também está afetada devido a alterações na secreção do hormônio de crescimento (GH), estando este intimamente relacionado com a densidade mineral óssea. O GH estimula a produção de IGF-1 (fator de crescimento do tipo insulina 1), produzido no fígado e em alguns tecidos como músculo e osso. As concentrações de IGF-1 no tecido ósseo são controladas pela glândula paratireoide, 1,25 dihidroxivitamina D₃, citocinas e fatores de crescimento. O IGF-1 no tecido ósseo tem como função diminuir a degradação do colágeno, aumentar a deposição de matriz óssea (Moyer-Mileur *et al*, 2008), além de ter uma ação crucial na replicação e diferenciação de osteoblastos (Avnet *et al*, 2012).

As proteínas IGFBPs (*IGF binding proteins*) são ligantes do IGF, consequentemente, estas regulam a disponibilidade tecidual e a ação do IGF-1 (Moyer-Mileur *et al*, 2008). A insulina inibe a ligação do IGF-1 ao IGFBP-1, que tem ação em diferentes células, incluindo os osteoblastos (Merlotti *et al*, 2010). No caso da DM1, a deficiência de insulina faz com que a concentração de IGFBP-1 aumente, inibindo a atividade osteoblástica (Moyer-Mileur *et al*, 2008; Merlotti *et al*, 2010). No entanto, pode-se ressaltar que as complicações ósseas na DM1 são decorrentes da alteração do sistema GH/IGF-1, associado a uma resistência parcial do GH, diminuição na ação do IGF-1 e alterada atividade IGFBP (Moyer-Mileur *et al*, 2008).

Tal alteração é evidenciada pela menor expressão de fatores relacionados a diferenciação osteoblástica como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas),

TGF-1 (fator transformador de crescimento), bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e colágeno tipo I (WEISS *et al*, 1981; KATAYAMA *et al*, 1996; SANTANA *et al*, 2003).

Também é possível verificar no tecido ósseo diabético aumento na atividade dos osteoclastos (BLAKYTHONY *et al*, 2011). Este fato está relacionado com a elevada concentração de citocinas pro-inflamatórias circulantes, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 e interleucina-2, que promovem a ativação de osteoclastos através do receptor ativador nuclear K- β (RANK) com o RANK ligante (RANKL) (GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al*, 2012). A maior atividade osteoclástica associada à alteração no sistema GH/IGF-1 e menor atividade osteoblástica, determinam um desequilíbrio no *turnover* ósseo, o que pode culminar na diminuição da deposição de matriz óssea, bem como diminuição da densidade mineral (DMO) (MOYER-MILEUR *et al*, 2008). Esses fatores predisõem o surgimento de quadros de osteopenia e osteoporose, principalmente no DM1, além de contribuir exponencialmente para o aumento dos riscos de fraturas e atrasos na consolidação óssea (SANTANA *et al*, 2003; HE *et al*, 2004; CHOI *et al*, 2012; SCHWETZ, PIEBER e OBERMAYER-PIETSCH, 2012; GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al*, 2012).

A diminuição da massa óssea na presença da condição clínica de DM vem sendo demonstrada por vários autores, tanto em estudo experimentais quanto clínicos (SHIRES *et al*, 1981; EINHORN *et al*, 1988; KATAYAMA *et al*, 1996; LU *et al*, 2003; BOLOLIN *et al*, 2005; MOTYL e MCCABE, 2009). A DM1 em curto espaço de tempo leva a diminuição de 24% na densidade e 69% no volume ósseo, avaliados por microtomografia, tal redução foi associada à diminuição dos níveis de marcadores da maturação dos osteoblastos e aumento nos níveis de marcadores da adipogênese (BOLOLIN *et al*, 2005, LU *et al*, 2003;

COE *et al*, 2013). Lozano *et al* (2009) demonstraram que 4 semanas após a indução de DM1, por administração de estreptozotocina (STZ), houveram reduções significativas no osso trabecular confirmadas por densitometria e microtomografia do fêmur intacto destes animais. Ainda, Silva *et al* (2009) verificaram a diminuição progressiva da massa óssea através de avaliações sucessivas após 4, 8 e 12 semanas da indução de DM1. Erdal *et al* (2012) afirmam que a DM1 induzida por STZ leva a deteriorização das propriedades biomecânicas ósseas com reduções significativas da carga máxima, tensão máxima e resistência ósseas.

Evidências também desmonstram diminuição da massa óssea em indivíduos com DM. Thrailkill *et al.* (2005) realizaram uma revisão sistemática a respeito da ação do DM no tecido e metabolismo ósseo em humanos e observaram que dos 15 estudos levantados, 13 apontaram que a DM leva a reduções significativas na DMO em relação aos grupos controle. Ainda, Starup-Linde (2013) em uma meta análise de estudos que avaliaram as evidências sobre a relação entre DM e marcadores ósseos em comparação à indivíduos não-diabéticos, mostra que ao longo do tempo, o controle glicêmico inadequado pode resultar em uma queda do cálcio urinário, redução nos níveis séricos de osteocalcina e colágeno tipo I (HAMILTON *et al.*, 2012, ABDELDAYEM *et al*, 2011; OKUNO *et al.*, 2013).

Diante do exposto, torna-se evidente a importância prevenção e entendimento da DM atualmente, principalmente pelo grande número de indivíduos acometidos e pelas conseqüências associadas a essa doença. Com isso, vários recursos não medicamentosos surgem na tentativa de estimular o metabolismo ósseo e aumentar a massa óssea (BAYAT *et al*, 2009; MEHTA *et al.*, 2010). Dentre esses, podem ser citados os efeitos de tratamentos como a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas (YAOITA *et al.*, 2000),

o ultrassom de baixa intensidade (RUTTEN *et al.*, 2007) e o uso de campos eletromagnéticos (PICKERING e SCAMMELL, 2002). Ainda, vêm se destacando mais recentemente as propriedades osteogênicas da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) (PRETEL *et al.*, 2007; RENNÓ *et al.*, 2007; ABOELSAAD *et al.*, 2009) e de protocolos de exercícios físicos (DE ALGELLIS *et al.*, 2006; ELHABASHY *et al.*, 2011; MAGGIO *et al.*, 2011; GEIRSDOTTIR *et al.*, 2012).

A LLLT é um recurso que vem sendo amplamente utilizado para estimular o metabolismo tecidual, inclusive do tecido ósseo (NICOLAU *et al.*, 2003). A LLLT tem sido utilizada, desde 1960, com fins terapêuticos, como um tratamento seguro e efetivo para uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos. Dentre os principais efeitos da LLLT nos tecidos podemos citar sua ação anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (MACEY *et al.*, 1989; OZAWA *et al.*, 1998; KARU, 1998; VLADIMIROV *et al.*, 2004).

O uso potencial da LLLT na biomodulação do tecido ósseo, por meio de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas, tem sido estudado e seus efeitos na estimulação da osteogênese e na redução do tempo de consolidação óssea vêm sendo evidenciados (NICOLAU *et al.*, 2003; SILVA e CAMILLI, 2006; MATSUMOTO *et al.*, 2009). Rennó *et al.* (2007), avaliaram os efeitos da LLLT em culturas de osteoblastos e demonstraram que o *laser* com comprimento de onda de 830nm (30mW, 10J/cm²), aumentou significativamente a proliferação dos osteoblastos. De forma similar, Hamajima *et al.* (2003) em um estudo *in vitro* observaram que o laser 830NM promoveu aumento significativo da expressão do gene da osteoglicina em cultura de osteoblastos.

Além disso, vários estudos demonstraram que esse recurso também pode ser utilizado na aceleração do processo de consolidação de fraturas (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; BLAYA *et al.*, 2008; KAZEM SHAKOURI *et al.*, 2010). A LLLT promove uma

série de modificações metabólicas e estruturais, que em conjunto, são responsáveis pelo aumento da osteogênese, como por exemplo, estímulo à angiogênese, maior formação de tecido de granulação, estimulação de fibroblastos, maior deposição de colágeno, aumento na síntese de ATP e estimulação de células ósseas (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; KREISLER, *et al.*, 2003; KHADRA *et al.*, 2004; LIRANI-GALVÃO *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; BLAYA *et al.*, 2008; KAZEM SHAKOURI *et al.*, 2010).

Os efeitos da LLLT também vêm sendo evidenciados no aumento da massa óssea e na aceleração do processo de reparo de fraturas em modelos animais com DM1 (ABDI *et al.*, 2009; JAVADIEH *et al.* 2009; PARK e KANG, 2010). Abdi *et al.* (2009) avaliaram o efeito do *laser* de He–Ne 632,8 nm, modo contínuo, 10mW, 0,0314cm², aplicado em duas doses 369,4 e 66,8J/cm², por 1166 e 210s, respectivamente, em osteotomia na tíbia de ratos com DM1, o *laser* foi aplicado por 6 semanas 3 vezes por semana e constataram aumento da força máxima na análise biomecânica e aumento na densidade lamelar óssea na análise histológica, com a dose de 369,4 J/cm². Javadieh *et al.* (2009) utilizaram o mesmo *laser*, no entanto, 890nm, em modo pulsado 3000Hz, 70W, 1cm², também em duas doses 23,3 e 11,6J/cm², por, respectivamente, 530 e 265s, sob o defeito osteocondral induzido em coelhos com DM1 em diferentes tempos experimentais e observaram melhora na energia de absorção obtida pela análise biomecânica, 4 semanas após irradiação *laser* com dose 11,6J/cm².

Recentemente, Park e Kang (2010) avaliaram o efeito da LLLT GaAIs (980 nm, 60s, 300 µm, 0.01 W, 0.043 cm², 13.95 J/cm²) no osso alveolar, após extração dentária, em ratos com DM1 induzida por STZ. Como resultados, constataram os efeitos osteogênicos da LLLT com redução de células inflamatórias, proliferação de fibroblastos, osteoblastos e maior expressão de RUNX-2, Colágeno tipo I e osteocalcina.

Ainda, Bayat *et al* (2009) ao avaliar os efeitos do *laser* de He-Ne, aplicado por 14 dias consecutivos, em um modelo experimental de ratos com DM1 induzida por STZ, concluíram que, nos grupos irradiados, houve aumento a densidade mineral do osso cortical, avaliada através da histologia, bem como aumento da força máxima na avaliação biomecânica, em relação aos ossos não irradiados.

Apesar da existência de alguns estudos investigando os efeitos da LLLT no metabolismo ósseo na presença de DM (BAYAT *et al*, 2009; JAVADIEH *et al*, 2009; ABDI *et al*, 2009; PARK E KANG, 2010), ainda existe na literatura uma divergência entre os parâmetros utilizados, o que dificulta a definição dos melhores protocolo de tratamento para ser utilizado na prática clínica. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para determinar os parâmetros ideais da LLLT no metabolismo ósseo em modelo animal diabético, bem como, uma abordagem mais profunda acerca das modificações moleculares e metabólicas produzidas pela LLLT que determinam a estimulação do metabolismo das células ósseas em condições de hiperglicemia e ausência de insulina.

Da mesma forma, o exercício físico, tanto aeróbico quanto resistido, é uma importante ferramenta utilizada no manejo e tratamento das consequências advindas do DM (ALBRIGTH *et al*, 2000; ADA, 2009; MARWIK *et al*, 2009; COLBERG *et al*, 2010; SONE *et al*, 2013). O exercício físico regular, juntamente com a insulinoterapia e o planejamento alimentar, tem como objetivo aproximar as condições metabólicas do indivíduo com DM1 a um estado fisiológico normal, conseqüentemente prevenindo ou retardando as complicações crônicas do DM (DE ALGELLIS *et al*, 2006).

Os efeitos do exercício aeróbico em indivíduos com DM são bem evidenciados na literatura e resultam em redução na hemoglobina glicosilada (HbA1c), aumento no VO₂max e aumento da sensibilidade à insulina (KENNEDY *et al*, 2013). Em uma recente meta-

análise, Tonoli *et al* (2012) relataram que estudos que utilizam o exercício aeróbico como forma de intervenção na DM evidenciam a redução da HbA1c. Além do melhor controle glicêmico, o exercício aeróbico em indivíduos com DM leva a reduções estatisticamente significativas da lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), CT / HDL e triglicérides (TG) (KELLEY e KELLEY, 2007).

Yardley *et al* (2013) compararam os efeitos agudos dos exercício aeróbico e resistido (ER) em indivíduos com DM1 e relatam que o ER resultou em um declínio menor na glicose sanguínea do que o exercício aeróbico ou nenhum exercício. Os exercícios de resistência também foram associados com concentração de glicose relativamente estável após o exercício. Assim, a realização de exercício resistido pode representar uma estratégia alternativa para evitar o declínio agudo nos níveis de glicose no sangue observados com exercícios aeróbicos. Ainda tem-se que, o treinamento físico combinado resulta em uma adicional mudança na HbA1c, se comparado com o treinamento aeróbio ou treinamento resistido isolados (ZANUSO *et al*, 2009; UMPIERRE *et al*, 2013).

Considerando-se as evidências disponíveis, parece que o ER constitui uma intervenção eficaz no controle glicêmico, podendo interferir positivamente no metabolismo ósseo alterado na DM. Neste sentido, alguns autores evidenciaram os efeitos benéficos do exercício físico no metabolismo ósseo tanto em estudos experimentais com animais quanto em estudos clínicos (VERHAEGHE *et al*, 2000; HERRIOTT *et al*, 2004; DALY *et al*, 2005; ELHABASHY *et al*, 2011; MAGGIO *et al*, 2011; GEIRSDOTTIR *et al*, 2012). Daly *et al*. (2004) avaliaram os efeitos de 12 meses de um protocolo de exercício resistido associado à dieta para diminuição de massa corporal em indivíduos com DM2 e constataram aumento na DMO, bem como, aumento na massa e força muscular. Ainda Maggio *et al* (2012) examinaram o efeito do treinamento físico na DMO em crianças com DM1,

mostrando que 9 meses de exercício resistido associado á atividade aeróbica e alongamentos, realizados por 90 minutos, 3 vezes / semana, melhoraram a DMO.

A contração muscular durante o ER promove alterações no metabolismo ósseo, por efeito direto (ação mecânica) ou indireto (via fatores hormonais) (OSCARINO, 2004, TURNER e ROBLING, 2005; ELHABASHY *et al*, 2011; MAGGIO *et al*, 2011). A imposição de uma determinada carga sobre o tecido ósseo gera sinais endógenos que são captados por um sistema mecanossensorial no qual o osteócito é a principal célula responsável por traduzir a força mecânica em sinais bioquímicos que regulam o remodelamento ósseo (JU *et al*, 2013). Acredita-se que a deformação celular causada pela força direta sobre a célula, o aumento da pressão intracanalicular provocado pela força dinâmica e o incremento da velocidade do fluxo do fluido intersticial sejam fatores que afetam diretamente o osteócito. Com isso, o aumento das conexões entre os osteócitos parecem determinar a deformação da matriz extracelular e alterações nas membranas celulares, o que em leva a maior atividade dos osteoblastos e conseqüente melhora no *turnover* ósseo (CHERIAN *et al*, 2003).

As evidências acerca dos benefícios do exercício físico aeróbico e do treinamento aeróbico e resistido combinado, sobre o metabolismo ósseo apoiam a utilização deste tipo de exercício físico na população com DM1 (CHAU *et al*, 2003; HOFBAUER *et al* 2007; RÄKEL *et al*, 2008; BERGSTRÖM *et al*, 2012). Vanni *et al*, (2010) comprovaram que um protocolo de 28 semanas de ER realizados 3 vezes por semana promoveu a manutenção da DMO em mulheres na pré menopausa. Além do aumento da DMO Bergström *et al* (2012) também evidenciaram aumento nos níveis séricos de Osteoprotegerina (OPG), após 1 ano de treinamento resistido, realizado 3 vezes por semana, associados a caminhadas de 30 minutos, em mulheres na pré menopausa com osteopenia. Assim,

pode-se afirmar que o ER é um instrumento eficaz para aumentar a DMO (MILLIKEN *et al*, 2003; BERGSTRÖM *et al*, 2008; THOMAS *et al*, 2010; VANNI *et al*, 2010; SINAKI *et al*, 2012), no entanto ainda não há estudos conclusivos em relação à sua capacidade de modular a massa óssea na situação de DM1.

No entanto, da mesma forma que a LLLT, apesar da existência de evidências que suportam o uso do ER no tecido ósseo, estudos que investigam os mecanismos de ação desse tipo de exercício no tecido ósseo diabético ainda são escassos. Assim, há necessidade de realização de mais investigações acerca dos seus efeitos no DM1, visto que, o tipo de exercício, bem como a intensidade do estímulo, tempo e frequência de aplicação podem influenciar de maneira diferente o metabolismo ósseo (WINTERS-STONE *et al*, 2013).

Como exposto acima, tanto o LLLT quanto protocolos de exercício físicos, são recursos promissores para serem utilizados no manejo da perda de massa óssea mediante a condição clínica de DM. No entanto, ainda não existe um consenso entre os melhores protocolos para serem utilizados. Ainda, não foi encontrado na literatura, estudos que investigassem a associação dos 2 recursos no tecido ósseo diabético. Neste contexto, foi levantada a hipótese de que tanto LLLT quanto um protocolo de exercícios resistido, utilizados isoladamente, seriam capazes de aumentar o metabolismo ósseo em animais diabéticos, culminando na maior atividade dos osteoblastos e conseqüentemente o aumento da massa óssea. Ainda, foi levantada a hipótese de que a associação de ambos os recursos poderia constituir uma terapêutica com um maior potencial osteogênico, constituindo um tratamento mais efetivo para o aumento da massa óssea na presença desse processo patológico.

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da LLLT e treinamento resistido, associados ou não, na morfologia/morfometria óssea, na expressão de fatores de crescimento e de transcrição relacionados à formação e reabsorção óssea, nas propriedades biomecânicas e na densitometria óssea no fêmur e tíbia de ratos com DM induzida por streptozotocina.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da indução do DM por streptozotocina nas propriedades morfométricas, morfológicas, imunohistoquímicas, biomecânicas, e na densidade mineral óssea no fêmur e tíbia de cobaias com DM induzida por streptozotocina.
- Avaliar o efeito do LLLT nas propriedades morfométricas, morfológicas, imunohistoquímicas, biomecânicas, e na densidade mineral óssea no fêmur e tíbia de cobaias com DM induzida por streptozotocina.
- Avaliar o efeito do exercício resistido nas propriedades morfométricas, morfológicas, imunohistoquímicas, biomecânicas, e na densidade mineral óssea no fêmur e tíbia de cobaias com DM induzida por streptozotocina.
- Avaliar o efeito da associação do LLLT e exercício resistido nas propriedades morfométricas, morfológicas, imunohistoquímicas, biomecânicas, e na densidade mineral óssea no fêmur e tíbia de cobaias com DM induzida por streptozotocina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado no laboratório Multidisciplinar do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) campus baixada santista. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (CEP: 1589/10).

3.1. Animais Experimentais

Para a realização desse estudo foram utilizados 50 ratos machos da linhagem *Wistar*, com três meses de idade e com massa corporal entre 300 e 350 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biociências da UNIFESP – Baixada Santista. Permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, ambiente higienizado, temperatura de 19° a 23°C e ventilação adequada) e com acesso irrestrito à água e ração comercial.

Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório Multidisciplinar do Departamento de Biociências da UNIFESP – Baixada Santista. A manipulação dos animais e os procedimentos cirúrgicos foram realizados estritamente de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Esse estudo foi conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (2010/145).

3.2. Modelo Experimental de DM 1

O DM 1 foi induzido por injeção intravenosa na veia peniana de STZ, toxina de células β -pancreáticas (Sigma-Aldrich ®, Brasil) (60 mg / kg de peso corporal), dissolvido em tampão citrato estéril. Os ratos do GC receberam uma injeção de tampão de citrato sem princípio ativo. O procedimento foi realizado sob anestesia/analgesia de acordo com a massa corporal dos animais, com injeção intraperitoneal de uma combinação de cloridrato de ketamina (Agener®) (80mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (Syntec®) (10mg/kg). Uma semana após o procedimento, os níveis de glicose foram registrados e DM foi definida como a concentração de glicose no sangue superior a 250 mg / dL em uma amostra de sangue (Accutrend ® Plus, Roche, São Paulo-Brasil) (BAYAT *et al*, 2009). O nível de glicose sanguíneo foi monitorado uma vez por semana durante todo o estudo. Semanalmente os animais eram pesados para monitoramento de sua massa corpórea (BAYAT *et al*, 2009).

3.3. Delineamento Experimental

Os 50 animais foram dispostos aleatoriamente em 5 grupos com 10 animais cada:

Grupo Controle (GC): os ratos deste grupo não receberam nenhum tipo de tratamento, somente a injeção de solução tampão de citrato.

Grupo Controle com DM (GD): os ratos deste grupo foram submetidos à indução de DM, com a injeção de estreptozotocina em solução tampão de citrato, mas não receberam nenhum tipo de tratamento.

Grupo Treinamento com DM (GT): os ratos deste grupo foram submetidos à indução de DM e ao treinamento físico resistido.

Grupo tratado com *laser* com DM (GL): os ratos deste grupo foram submetidos à indução de DM e ao tratamento com *laser* ($\lambda = 808 \text{ nm}$).

Grupo tratado com *laser* e exercício com DM (GTL): os ratos deste grupo foram submetidos à indução de DM, tratados com *laser* ($\lambda = 808 \text{ nm}$) e treinados segundo modelo de treinamento descrito.

3.4. Aplicação do *laser* de baixa intensidade

O tratamento com LLLT teve início uma semana após a indução do DM. Foi utilizado o equipamento de *laser* Ga-Al-As de baixa intensidade modelo portátil de *Laser* DMC, classe 3B Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda 808 nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, densidade de potência de $3,57 \text{ W/cm}^2$, área do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, divergência de 1.5° , na fluência de 120 J/cm^2 e com tempo de irradiação de 33s, energia por ponto 3.3.J. A irradiação foi realizada através da técnica de contato pontual, com a caneta posicionada perpendicularmente ao tecido, no ponto médio de ambas as tíbias e fêmures (4 pontos no total). O tratamento com *laser* foi realizado por 18 sessões, 3 vezes por semana, em dias não consecutivos (MEDALHA *et al*, 2010).

3.5. Protocolo de treinamento físico resistido

O protocolo de exercício utilizado consistiu em um modelo de escalada utilizando uma escada de metal (1,1 x 0,18 m, a grade de 2cm, 80° de inclinação) com um compartimento (20 x 20 x 20 cm), na parte superior. A dimensão da escada induziu os animais a realizarem 8-12 movimentos dinâmicos por subida do início da escada até o

compartimento. Para a realização do treinamento, um dispositivo de carga permanecia fixado envolvendo a porção proximal da cauda, com uma fita adesiva, e permitia adição de pesos de chumbo de 20 a 50 gramas (HORNBERGER e FARRAR, 2004).

O treinamento teve início com duas sessões de familiarização com 24 horas entre elas, a primeira sem qualquer peso fixado à cauda dos animais e a segunda com peso atrelado a cauda correspondente a 50% da massa corporal do animal. Estas sessões tiveram como objetivo ensinar a escalada ao animal consistiram de 3 a 5 escaladas consecutivas ao topo, com um intervalo de 60 segundos de descanso entre elas. O procedimento foi realizado até que os animais subissem voluntariamente sem estímulo sonoro ou manual. Após esse procedimento os animais descansaram por 1 dia e foram submetidos a teste de carga máxima (TCM).

O TCM consistiu em sucessivas escaladas, com transporte de cargas progressivamente mais pesadas. Para a subida inicial no TCM, a carga transportada foi de 50% da massa corporal do animal. Depois disso, 30 g de peso foram adicionados, até que uma carga máxima (CMT) fosse atingida, tal carga era determinada quando os animais não conseguiam subir todo o comprimento da escada, mesmo após três estímulos manuais sucessivos na cauda.

A carga mais elevada alcançada com sucesso em todo o comprimento da escada foi considerada a capacidade máxima do rato de transporte para a sessão de treino. A sessão de exercício físico consistiu em 9 subidas, com intervalo de descanso de 60 segundos, sempre com 80% da CMT. Ao término de 3 sessões de treinamento era realizado novo TCM e no dia seguinte implementado novos pesos. O treinamento resistido foi realizado ao final da tarde, devido aos hábitos noturnos dos animais, em um total de 18 sessões, 3

vezes por semana em dias não consecutivos (TABELA 1). O TCM para a determinação da carga máxima foi repetido após o protocolo de treino resistido (FIGURA 1).

No GTL as irradiações de LLLT foram realizadas logo após o treino, sendo utilizada a técnica pontual de contato, com a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente a região medial de ambos os fêmures e tíbias. No grupo GT foram realizadas aplicações *sham* da LLLT, com o aparelho desligado, nos mesmo pontos e pelo mesmo tempo, também após o treinamento.

Tabela 1. Protocolo de treino resistido de escalada no período de treinamento.

Dias da semana	familiarização: 1 ^o semana	Treinamento: 2 ^o to 6 ^o semanas
Segunda-feira	Adaptação sem carga	Treino +carga = 80% CMT
Quarta-feira	Adaptação + carga =50% da massa corporal	Treino +carga = 80% CMT
Quinta-feira	TCM + níveis de glicose	TCM + níveis de glicose
Sexta-feira	Treino +carga = 80% CMT	Treino +carga = 80% CMT

(CMT= carga máxima do teste, TCM= teste de carga máxima).

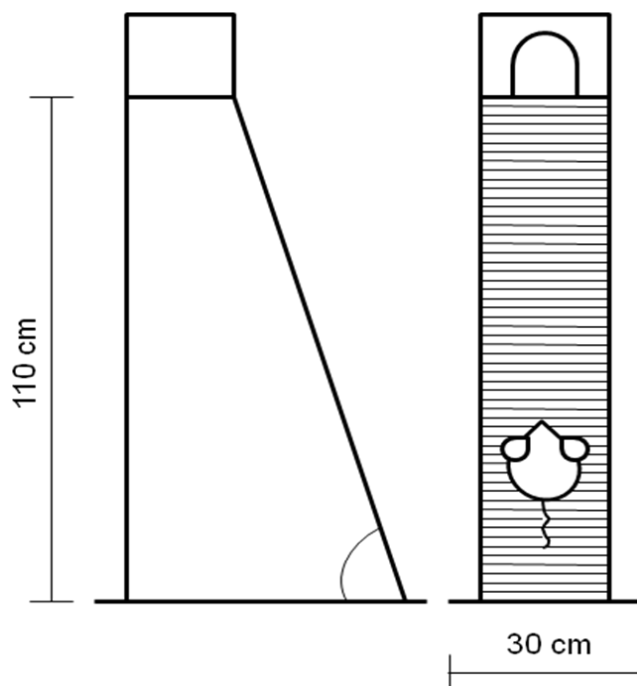


Figura 1. Representação esquemática do treinamento resistido.

3.6. Eutanásia

Vinte e quatro horas após a última sessão de tratamento, os ratos foram eutanasiados por asfixia com CO₂. Imediatamente após, foi realizada a ressecção cirúrgica completa das tíbias e fêmures para processamento das análises.

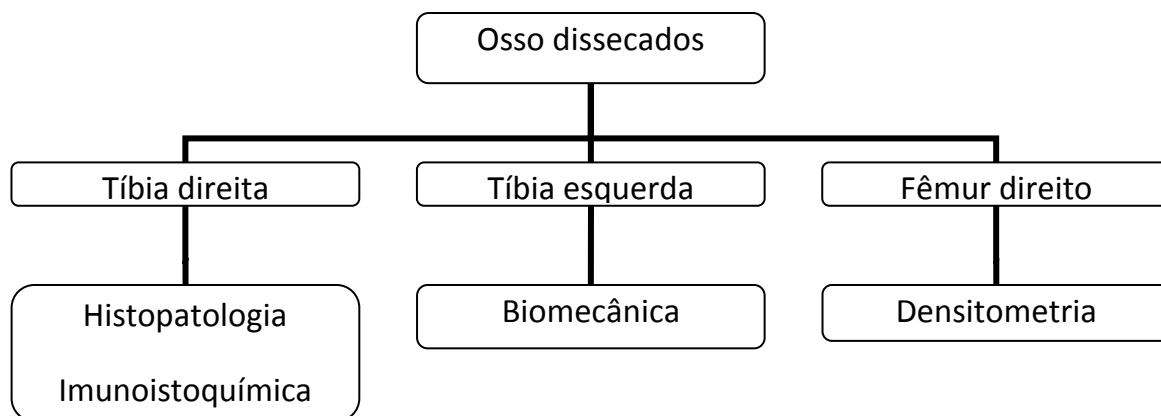


Figura 2. Representação esquemática da distribuição dos ossos em relação às análises.

3.7. Análises

3.7.1 Avaliação de glicemia e ponderal

Para determinar o nível de glicose no sangue, os animais foram imobilizados manualmente e um pequeno corte foi feito na cauda para obter 25 µl de sangue. Este procedimento foi realizado uma semana após a inoculação de STZ e semanalmente ao longo do período experimental de 6 semanas (Accutrend® Plus, Roche, São Paulo-Brasil) (COOMBE *et al.*, 2001). Além disso, a massa corporal foi monitorada semanalmente em uma balança analítica (Kern® 440-21A; Balingen-Frommern alemão).

3.7.2. Avaliação histológica e histomorfométrica

Para a realização da análise histopatológica, as tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, descalcificadas em solução de EDTA a 4% (Merck) e, posteriormente, incluídas em blocos de parafina. Na seqüência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, com espessura padronizada de 5µm e os cortes foram montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa das tíbias foi realizada por meio de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram avaliadas, a estrutura do tecido e as zonas de reabsorção e formação óssea. Pelo menos, três secções de cada espécime foram examinadas e dois observadores experientes realizaram a avaliação de forma cega.

A morfometria da área total (ATT) e área cortical (ATC) foram mensuradas utilizando um sistema de análise de imagem Pro-imagem (Wetzlar, Alemanha). Para tal, foram

captadas imagens através de uma câmara digital (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha), com uma ampliação de 2,5 x, e a um computador equipado com sistema de análise de imagem (Leica ® Qwin sistema de análise de Pro-imagem, Wetzlar, Alemanha). A partir das micrografias, foram obtidas as áreas internas (AI) e externas (AE) das tíbias, em micrômetros quadrados (μm^2). A área tibial total correspondeu ao valor da AE enquanto a área tibial cortical correspondeu a AE menos AI. Dois observadores experientes realizaram a avaliação de forma cega (HONGBING *et al*, 2004; RENNO *et al*, 2006; MEDALHA *et al*, 2010).

3.7.3. Imunoistoquímica

Para a realização da avaliação imunoistoquímica, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 5 μm de espessura nas tíbias direitas dos animais. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram então incubadas com anti-RUNX2 e anti-RANK-L anticorpo primários monoclonais (Santa Cruz Biotechnology, EUA) com uma concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada. Em seguida, os

cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora . Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris.

Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários. Estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada.

3.7.4. Avaliação Biomecânica

A análise biomecânica foi realizada na tíbia esquerda, este teste foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka. As propriedades biomecânicas dos fêmures foram determinadas por um teste de inclinação de três pontos em uma Máquina Universal de Testes Instron (Instron Corp, Canton, MA, modelo 4444). Anteriormente ao teste, os ossos foram descongelados em temperatura ambiente. Cada osso foi colocado em um dispositivo de sustentação com dois suportes localizados a uma distância de 13 mm. Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1KN e pré-carga de 5N em velocidade constante de 0,5cm/min. A força aplicada e o deslocamento do edentador foram monitorados e registrados por meio de um *software* do equipamento (Instron Series IX). A

partir da curva de carga-deformação foram obtidos: a força máxima (KN), a rigidez estrutural (N/mm), resiliência (J) e tenacidade (J) (TAJALI *et al*, 2003).

3.7.5. Densitometria Óssea

O método utilizado neste estudo para analisar a medida da densidade mineral óssea por meio de seu conteúdo e, assim, determinar a resistência dessa estrutura foi a densitometria óssea. Os fêmures direitos foram submetidos a essa análise. O exame foi realizado na Disciplina de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, em aparelho DEXA Hologic (Bedford, MA, EUA), e analisados por um software específico para pequenos animais. O coeficiente de variação do método foi avaliado pela análise da variação de duas medidas consecutivas após reposicionamento dos 30 animais. A análise da densitometria óssea foi feita por um investigador que não teve o conhecimento a qual grupo cada amostra pertencia (MEDALHA *et al*, 2010).

3.8. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade Shapiro–Wilk's *W* test foi utilizado para todas as variáveis. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA two-way), seguida do teste *post-hoc* de Duncan. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas, o nível de significância utilizado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

PARTE II

3. ESTUDO 1

“Os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade no tecido ósseo em ratos diabéticos”

4. ESTUDO 2

“Exercício físico resistido associado à terapia *laser* de baixa intensidade estimula o metabolismo ósseo em ratos diabéticos”

4. ESTUDO I

Efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade no tecido ósseo em ratos diabéticos

Resumo

A DM leva à diminuição da massa óssea e aumenta o risco de desenvolvimento de osteoporose. Neste contexto, vários tratamentos têm demonstrado acelerar o metabolismo ósseo, dentre eles destaca-se a terapia LLLT, que é capaz de estimular a atividade dos osteoblastos, melhorando as propriedades biomecânicas ósseas. No entanto, seus efeitos sobre o tecido ósseo em animais diabéticos insulina dependentes não estão completamente esclarecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da LLLT no tecido ósseo em ratos diabéticos, através da imunoexpressão de fatores osteogênicos, propriedades biomecânicas e parâmetros densitométricos. Trinta ratos *Wistar* machos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (GC), grupo diabético (GD) e grupo diabético tratado com *laser* (GL). DM foi induzida por estreptozotocina (STZ) e após uma semana deu-se início ao tratamento com *laser*. Foi utilizado um *laser* Ga-Al-As, 808 nm, 100 mW, 3,57W/cm², 0,028cm², 120J/cm², 34s realizado durante 18 sessões, por 6 semanas. Ao fim do experimento, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO₂ e as tíbias e os fêmures foram dissecados para análise. A análise morfométrica demonstrou que a área cortical do GD foi menor que o GC, já o GL apresentou área cortical maior que GD, no entanto menor que o GC. A análise imuno-histoquímica revelou que LLLT produziu uma expressão aumentada de RUNX-2 em comparação aos outros grupos. A imuno-expressão de RANK-L foi similar em todos os grupos. Além disso, a irradiação com *laser* produziu aumento significativo na força de fratura, densidade e conteúdo mineral ósseo (DMO e CMO) em comparação com GD. Os resultados deste estudo indicam que o modelo de SZT produziu diminuição no diâmetro cortical, propriedades biomecânicas e de variáveis densitométrica e que a LLLT foi capaz de reduzir estes efeitos melhorando a osteogênese. Novos estudos devem ser desenvolvidos para fornecer informações adicionais sobre os mecanismos de ação da laserterapia no osso diabético em ensaios experimentais e clínicos.

Palavras-chave: estreptozotocina, tecido ósseo, terapia *laser* de baixa intensidade.

Abstract

DM leads to decreased bone mass and increases the risk of developing osteoporosis. In this context, several treatments have been shown to accelerate bone metabolism, among which stands out LLLT therapy, which is capable to stimulate osteoblast activity and by improving the biomechanical properties of bone. However, its effects on bone tissue in insulin-dependent diabetic animals are not completely understood. The aim of this study was to evaluate the LLLT effects on bone tissue by immunoexpression of osteogenic factors, biomechanical and densitometric parameters in diabetic rats. Thirty male Wistar rats were randomly divided into three experimental groups: control group (CG), diabetic group (DG) and diabetic group laser treated (LG). Diabetes was induced by streptozotocin (STZ) and after a week was initiated to laser treatment. Was used a laser Ga-Al-As, 808 nm, 100 mW, 3.57 W/cm², 0, 028cm², 120J/cm², 34s performed during 18 sessions over 6 weeks. At the end of the experiment, the animals were euthanized by CO₂ asphyxiation and the tibias and femurs were dissected for analysis. The morphometric analysis showed that the cortical area of the DG was lower than the CG, since the LG showed cortical area greater than DG, but lower than the CG. Immunohistochemical analysis revealed that LLLT produced an increased expression of RUNX-2 compared to other groups. The immuno-experessão RANK-L was similar in all groups. Moreover, the laser irradiation produced a significant increase in the strength of fracture, and bone mineral density (BMD and BMC) compared with DG. The results of this study indicate that the model SZT produced a decrease in cortical diameter, biomechanical and densitometric variables and that LLLT was able to reduce these effects by improving osteogenesis Further studies should be developed to provide additional information about the mechanisms of action of laser therapy in diabetic bone in experimental and clinical trials.

Keywords: streptozotocin, bone tissue, low level laser therapy.

1. Introdução

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada pela insuficiente secreção de insulina e conseqüente hiperglicemia crônica (EINHORN *et al*, 1988; MATHIASSEN *et al*, 1990; SUZUKI *et al*, 2003). Essa doença está freqüentemente associada à disfunção de uma série de órgãos e os indivíduos acometidos sofrem com as complicações crônicas associadas à DM, incluindo doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, neuropatias, nefropatias e retinopatias (NALYSNYK *et al*, 2010; VAN DOOREN *et al*, 2013). Além disso, o tecido ósseo também é afetado pela DM, apresentando redução da atividade dos osteoblastos e desequilíbrio entre o metabolismo de formação e reabsorção óssea (BLAKYTNY *et al*, 2011). Esse desequilíbrio pode determinar uma diminuição significativa da densidade mineral óssea (DMO) (KAYAL *et al*, 2007), o que pode culminar no aparecimento do quadro clínico de osteoporose e (HE *et al*, 2004), e conseqüentemente, aumento do risco de fratura (SANTANA *et al*, 2003; HE *et al*, 2004).

Nesse contexto, há necessidade de desenvolvimento de tecnologias capazes de estimular o metabolismo ósseo, prevenindo a perda e aumentando a massa óssea mediante a essa situação clínica. Um tratamento promissor é o uso da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) devido a seu potencial osteogênico e efetividade em acelerar o processo de consolidação de fraturas (KARU, 1989; PRETEL *et al.*, 2007; TAJALI *et al*, 2010).

O mecanismo de ação do *laser* terapêutico é baseado na absorção da luz pelos tecidos, que produz alterações no metabolismo celular. Quando o *laser* é aplicado nos tecidos, a luz é absorvida por fotorreceptores localizados nas células, denominados

cromóforos (DORTBUDAK, 2000). Uma vez absorvida, a luz pode modular as reações químicas celulares, que estimularão a respiração mitocondrial, a produção de oxigênio molecular e a síntese de ATP (KARU, 1998; STEIN *et al.*, 2005). Esses efeitos podem aumentar a síntese de DNA, RNA e proteínas reguladoras do ciclo celular, estimulando a proliferação celular (DORTBUDAK, 2000).

Em estudos *in vitro* com células osteoblásticas foi demonstrado que a LLLT promoveu o aumento da atividade mitocondrial (PIRES-OLIVEIRA *et al.*, 2008), da síntese de DNA e RNA (STEIN *et al.*, 2005), da expressão gênica de osteocalcina e osteopontina (LIU *et al.*, 2007) e da atividade da fosfatase alcalina (RENNÓ *et al.*, 2007). Além disso, a LLLT tem mostrado ser capaz de acelerar o processo de reparo de fraturas em ratos e coelhos, aumentando o volume do calo e a densidade mineral óssea (LIRANI-GALVÃO *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; PRETEL *et al.*, 2007).

Alguns autores investigaram a ação desse recurso no aumento da massa óssea em ratos diabéticos (BAYAT *et al.*, 2009; JAVADIEH *et al.*, 2009; ABDI *et al.*, 2009; PARK E KANG, 2010). Bayat *et al.* (2009) avaliaram os efeitos da LLLT (He-Ne *laser*, 632,8 nm, a 28,6 e 382,2 J/cm²) em defeitos ósseos na tíbia de animais com DM induzida por estreptozotocina (STZ), sendo que após 14 dias consecutivos de irradiação, pode-se observar aumento na propriedades biomecânicas ósseas. Além disso, Abdi *et al.* (2009) investigaram os efeitos da LLLT na osteotomia em ratos diabéticos e observaram propriedades biomecânicas significativamente superiores na área do calo ósseo, após irradiação do *laser* (HeNe, 369nm, 4 J/cm²).

Dentro deste contexto, a LLLT constitui um recurso promissor para acelerar o metabolismo ósseo e aumentar a massa óssea na presença de DM (BAYAT *et al.*, 2009; PARK E KANG, 2010). Apesar de alguns estudos demonstrarem os efeitos positivos da

LLLT no tecido ósseo em ratos diabéticos, o seu uso como um tratamento nesta condição ainda é escasso (COOMBE *et al*, 2001; JAVADIEH *et al*, 2009). Além disso, os parâmetros ideais de aplicação da LLLT no tecido ósseo de animais diminuição da densidade óssea não foram definidos. Tendo em vista o acima mencionado, foi levantada a hipótese de que a irradiação do *laser* sobre o tecido ósseo em ratos diabéticos pode aumentar a atividade dos osteoblastos e diminuir o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, evitando a perda de massa óssea e o desenvolvimento de osteoporose. Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da LLLT em tíbias e fêmures de ratos diabéticos, analisando parâmetros microscópicos e macroscópicos do metabolismo ósseo. Para isso, ratos Wistar foram distribuídos em três grupos distintos: grupo controle (GC), diabético grupo (GD) e grupo diabético tratado com LLLT (GL) e a resposta tecidual foi avaliada por meio de histologia, imuno-histoquímica, densitometria e análise biomecânica.

2. Metodologia

2.1. Delineamento experimental

Trinta ratos machos *Wistar* (idade de 12 semanas e pesando $310 \pm 6,8$ g) foram utilizados neste estudo. Os ratos foram divididos em 3 grupos (n=10): grupo controle (GC), grupo controle diabético (GD) e grupo diabético com irradiação de LLLT (GL). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (22 ± 2 ° C), períodos de claro-escuro de 12 horas, e acesso irrestrito à água e ração comercial. A manipulação dos animais e os procedimentos invasivos foram realizados estritamente de acordo com o Guia de Cuidados

e Uso de Animais de Laboratório. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (2010/145).

2.2. Indução de DM

O DM foi induzido por injeção intravenosa na veia peniana de STZ toxina de células de β -pancreáticas (Sigma-Aldrich ®, Brasil) (60 mg / kg de peso corporal), dissolvido em tampão citrato estéril. Os ratos do GC receberam uma injeção de tampão de citrato. Uma semana após o procedimento, os níveis de glicose foram registrados e DM foi definida como a concentração de glicose no sangue superior a 250 mg / dL em uma amostra de sangue (Accutrend ® Plus, Roche, São Paulo-Brasil) (COOMBE *et al*, 2001). O nível de glicose sanguíneo foi monitorado uma vez por semana durante todo o estudo.

2.3. Irradiação do *laser*

O tratamento com *laser* iniciou-se uma semana após a indução do DM. Foi utilizado o equipamento de *laser* Ga-Al-As modelo portátil de *Laser* DMC, classe 3B Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda 808 nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, densidade de potência de 3,57W/cm², área do feixe de 0, 028cm², divergência de 1.5°, na fluência de 120J/cm², tempo de irradiação de 33s e energia por ponto 3.3 J. A irradiação foi realizada em técnica de contato pontual, no ponto médio de ambas as tíbias e fêmures (4 pontos no total) (MEDALHA *et al*, 2010). O tratamento com *laser* foi realizado por 18 sessões, 3 vezes por semana, em dias não consecutivos. Vinte e quatro horas após a

última sessão de tratamento, os ratos foram eutanasiados por asfixia com CO₂ e os ossos foram removidos para análise.

2.4. Procedimentos histológicos

A análise histológica foi realizada na tibia esquerda dos animais. Após coleta, as amostras foram fixadas em formalina a 10%, durante 2 dias, descalcificadas em EDTA 4% (Merck) e embebidas em blocos de parafina. Seções finas (5 µm) foram preparadas no eixo perpendicular medial-lateral utilizando um micrótomo (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha). Pelo menos, três seções de cada espécime foram coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck) (RENNO *et al*, 2006).

2.5. Avaliação histológica e histomorfométrica

Para a realização da análise histopatológica, as tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, descalcificadas em solução de EDTA a 4% (Merck) e, posteriormente, incluídas em blocos de parafina. Na seqüência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, com espessura padronizada de 5µm e os cortes foram montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa das tíbias foi realizada por meio de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram avaliadas, a estrutura do tecido e as zonas de reabsorção e formação óssea. Pelo menos, três seções de cada espécime foram examinadas e dois observadores experientes realizaram a avaliação de forma cega.

A morfometria da área total tibial (ATT) e área cortical tibial (ACT) foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Pro-imagem (Wetzlar, Alemanha). Para tal, foram captadas imagens através de uma câmara digital (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha), com uma ampliação de 2,5 x, e a um computador equipado com sistema de análise de imagem (Leica ® Qwin sistema de análise de Pro-imagem, Wetzlar, Alemanha). A partir das micrografias, foram obtidas as áreas internas (AI) e externas (AE) das tíbias, em micrômetros quadrados (μm^2). A ATT correspondeu ao valor da AE enquanto a ACT correspondeu a AE menos AI. Dois observadores experientes realizaram a avaliação de uma forma cega (HONGBING *et al*, 2004; RENNO *et al*, 2006; MEDALHA *et al*, 2010).

2.6. Imunohistoquímica

Para a realização da avaliação imunohistoquímica, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de $5\mu\text{m}$ de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram então incubadas com anti-Runx2 e anti-RANK-L anticorpo primários monoclonais (Santa Cruz Biotechnology, EUA) com uma concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de

dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris.

Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários. Estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada (ANANDARAJAH, 2009; MEDALHA *et al*, 2010).

Posteriormente, as lâminas foram analisadas por meio de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan). Foram avaliados três campos de cada corte e observada a presença e localização da imunomarcagem dos fatores analisados. Quando presente foi determinada se a imunomarcagem era localizada nas células ou na matriz extracelular.

Além disso, foi mensurada a imunoexpressão por percentual da área do campo avaliado: leve para imunomarcagem positiva, porém em área menor do que de 35% do campo analisado, moderada para imunomarcagem positiva em área entre 35% a 65% do campo avaliado e intensa, para área com imunoexpressão positiva do fator analisado maior do que 65% do campo avaliado.

2.7. Análise Biomecânica

As propriedades biomecânicas dos fêmures foram determinadas por um teste de inclinação de três pontos em uma Máquina Universal de Testes Instron (Instron Corp, Canton, MA, modelo 4444). Anteriormente ao teste, os ossos foram descongelados em temperatura ambiente. Cada osso foi colocado em um dispositivo de sustentação com dois suportes localizados a uma distância de 13 mm. Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1KN e pré-carga de 5N em velocidade constante de 0,5cm/min. Finalmente, a amostra foi submetida a uma força de flexão, com taxa de deformação constante de 0,5cm/min até o momento da fratura. A partir da curva de carga-deformação, foram obtidos os valores de carga máxima (KN), tenacidade (J), resiliência (J), a carga máxima de fratura (N) e rigidez (N / mm) (BAYAT *et al*, 2009).

2.8. Densitometria

O método utilizado neste estudo para analisar a medida da densidade mineral óssea por meio de seu conteúdo e, assim, determinar a resistência dessa estrutura foi a densitometria óssea. Os fêmures direitos foram submetidos a essa análise. O exame foi realizado na Disciplina de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, em aparelho DEXA Hologic (Bedford, MA, EUA), e analisados por um software específico para pequenos animais. O coeficiente de variação do método foi avaliado pela análise da variação de duas medidas consecutivas após reposicionamento dos 30 animais. A análise

da densitometria óssea foi feita por um investigador que não teve o conhecimento a qual grupo cada amostra pertencia (MEDALHA *et al*, 2010; D'LOZANO *et al*, 2001).

2.9. Análise estatística

Todas as variáveis foram organizadas por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvio-padrão (DP). A normalidade da distribuição das variáveis foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk's. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. Para as comparações entre os grupos foi realizada a análise de variância (ANOVA, one-way), complementada pelo teste *post-hoc* de Tukey. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

3.1. Achados Gerais

Dos 30 animais incluídos neste estudo, dois foram perdidos devido a uma depressão respiratória induzida por anestesia. O restante dos animais se recuperou sem intercorrências da indução do DM e procedimento a *laser*. Sem sinais de inflamação ou respostas teciduais macroscópicas adversas durante o período experimental.

3.2. Caracterização da amostra

A Tabela 2 demonstra os valores da massa corporal inicial (MCI) (uma semana após a indução de DM) e final (MCF) e o nível de glicose no início (GI) e no fim do experimento (GF). Pode ser observado que a MCI foi significativamente menores nos animais diabéticos (GL e GD) quando comparado com GC. Ao final do tempo experimental, os valores de MCF foram significativamente menores nos animais diabéticos (GL e GD) quando comparado com GC. Ainda, os níveis de glicose foram significativamente maiores nos animais diabéticos (GL e GD) em comparação com a GC, ao início e no final do experimento (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvios padrões da Massa corporal e níveis de glicose.

	MCI (g)	MCF (g)	GI (mg/dl)	GF (mg/dl)
GC	305,00 ± 31,71	331,13 ± 28,98	131,13 ± 33,34	162 ± 6,33
GD	278,78 ± 32,87 ^a	191,44 ± 8,88 ^a	393,22 ± 51,02 ^a	509,33 ± 56,33 ^a
GL	269,10 ± 17,97 ^a	231 ± 53,94 ^a	445,20 ± 83,75 ^a	495,70 ± 55,09 ^a

MCI=Massa corporal inicial; MCF=Massa corporal final; GI= glicose inicial; GF= Glicose final; p ≤ 0,05; a vs GC.

3.3. Avaliação histológica e histomorfométrica

Os cortes histológicos representativos de todos os grupos experimentais, no final do experimento são mostrados na Figura 1. A análise histopatológica qualitativa revelou que o GC demonstrou presença de osteócitos com morfologia sem alterações (Figura 3A). Animais diabéticos não tratados apresentaram extensas áreas de reabsorção óssea

(Figura 3B). Além disso, a área do osso cortical do GD apresentou-se menor em relação ao GC. Os animais diabéticos irradiados mostraram áreas esporádicas de reabsorção e área cortical com uma aparência sem alterações. A espessura do osso cortical deste grupo foi semelhante a do GC (Figura 3C).

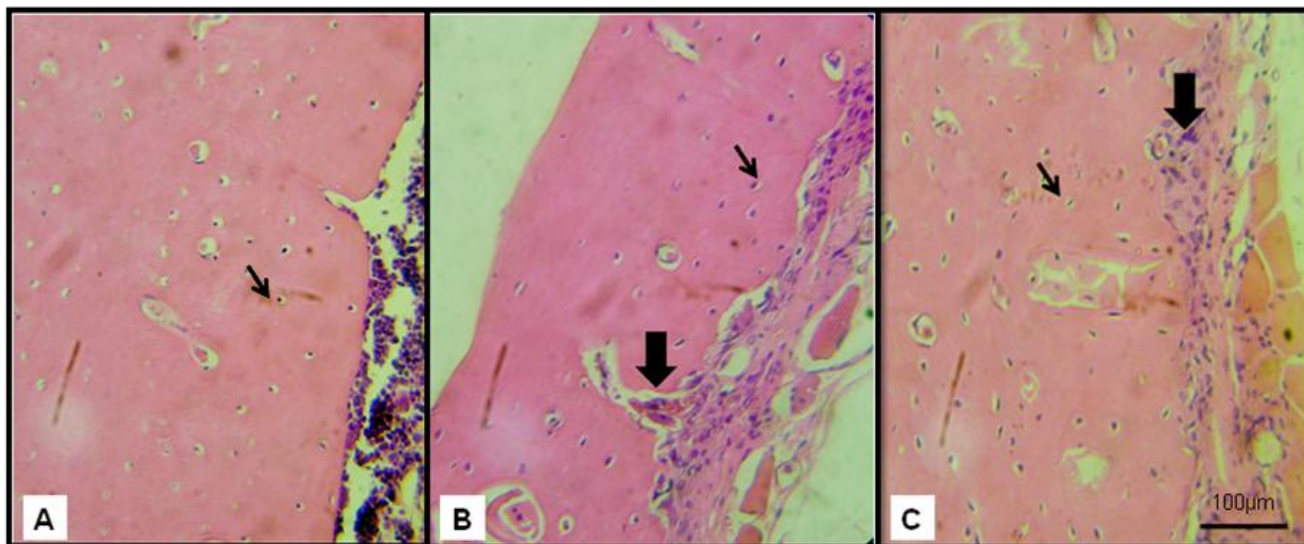


Figura 3. Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. Osteócitos (seta fina) e áreas de reabsorção (setas grossas). A - grupo controle, B - grupo controle diabético; C – grupo diabético tratado com laser.

A avaliação morfométrica evidenciou valores estatisticamente maiores no ATT e ACT no GC em comparação com os grupos diabéticos tratados e não tratados. Além disso, o ACT foi estatisticamente maior no GL em comparação com o GD (Figura 4).

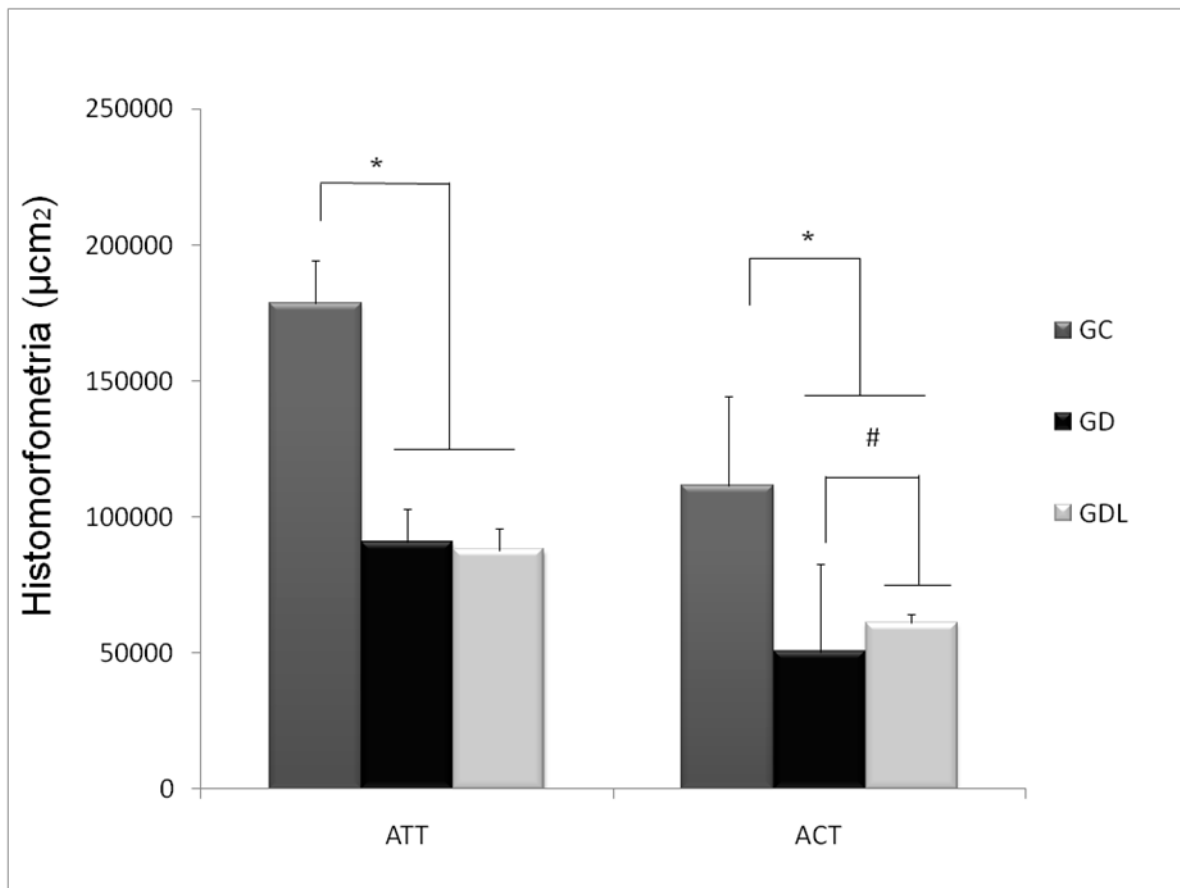


Figura 4. Resultados da morfometria. ATT: Área total tibial; ACT: Área cortical tibial; GC: grupo controle, GD: grupo diabético; GL: diabético tratado com laser (* GC vs GLe GD; # GL vs GD; $P \leq 0,05$).

3.4. Imunohistoquímica

A imunomarcção de Runx-2 para todos os grupos experimentais pode ser observada na Figura 5. O Runx-2 foi detectado predominantemente no citoplasma das células ósseas, em todos os grupos. No GC, foi notada forte imunoexpressão de Runx-2, principalmente em células do tecido da medula (Figura 5A). Nos ratos diabéticos não tratados, foi detectada fraca imunoexpressão de Runx-2 (Figura 5B). Os animais diabéticos tratados a *laser* apresentaram Runx-2 fortemente expresso (Figura 5C).

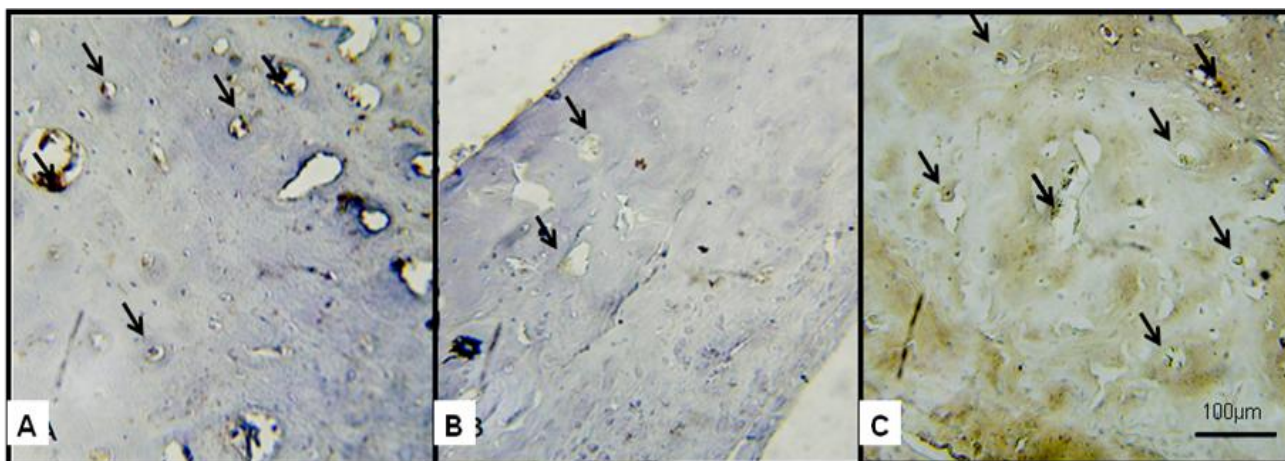


Figura 5. Seções representativas da imunohistoquímica de Runx-2. A imunocoloração de Runx-2 (seta). A - grupo controle, B - grupo diabético; C - diabético tratado com laser.

Na análise imunohistoquímica do RANK-L, no GC (Figura 6A), GD (Figura 6B) e GL (Figura 6C) células imunopositivas foram moderadamente detectadas no tecido ósseo sem diferenças notáveis entre grupos.

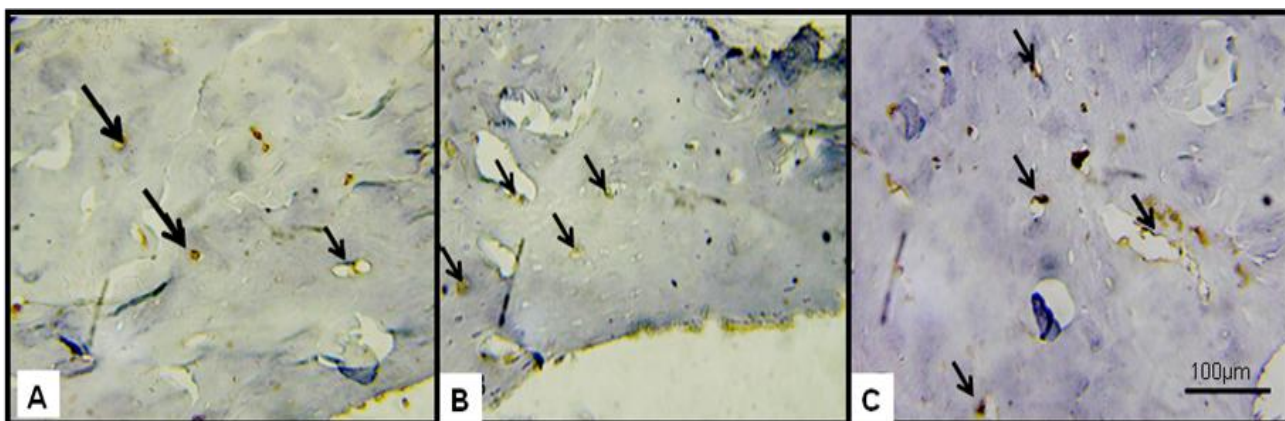


Figura 6. Seções representativas da imuno-histoquímica de RANK-L. A imunocoloração de RANK-L (seta). A - grupo controle, B - grupo diabético; C - diabético tratado com laser.

3.5. Análise Biomecânica

Análise biomecânica evidenciou que o GC apresentou valores significativamente maiores para a força máxima, tenacidade, rigidez e força de fratura em comparação com GD e GL. O GL mostrou valores significativamente maiores de força fratura em comparação com o GD (Tabela 3). Não foram encontradas outras diferenças entre os grupos para as demais variáveis.

Tabela 3. Resultados da análise biomecânica em média e desvio padrão.

	Força Máxima (KN)	Tenacidade (J)	Rigidez (N/mm)	Força de fratura (KN)
GC	0,0743± 0,004	0,079 ± 0,007	161,6 ± 1,79	0,054 ± 0,001
GD	0,055 ± 0,001 ^a	0,049 ± 0,008 ^a	138,67± 0,94 ^a	0,03 ± 0,001 ^a
GL	0,061 ± 0,006 ^a	0,048 ± 0,01 ^a	136,73 ± 8,194 ^a	0,044 ± 0,006 ^a

GC (grupo controle), GD (grupo diabético); GL (grupo tratado com *laser*); a: GC vs GD and GL ($p \leq 0,05$).

3.6. Densitometria Óssea

A densitometria revelou que os valores de CMO e DMO do GD foram estatisticamente inferiores em relação ao GC e GL. Achados similares das variáveis densitométricas (CMO e DMO) foram observados em GL e GC (Figuras 5 e 6).

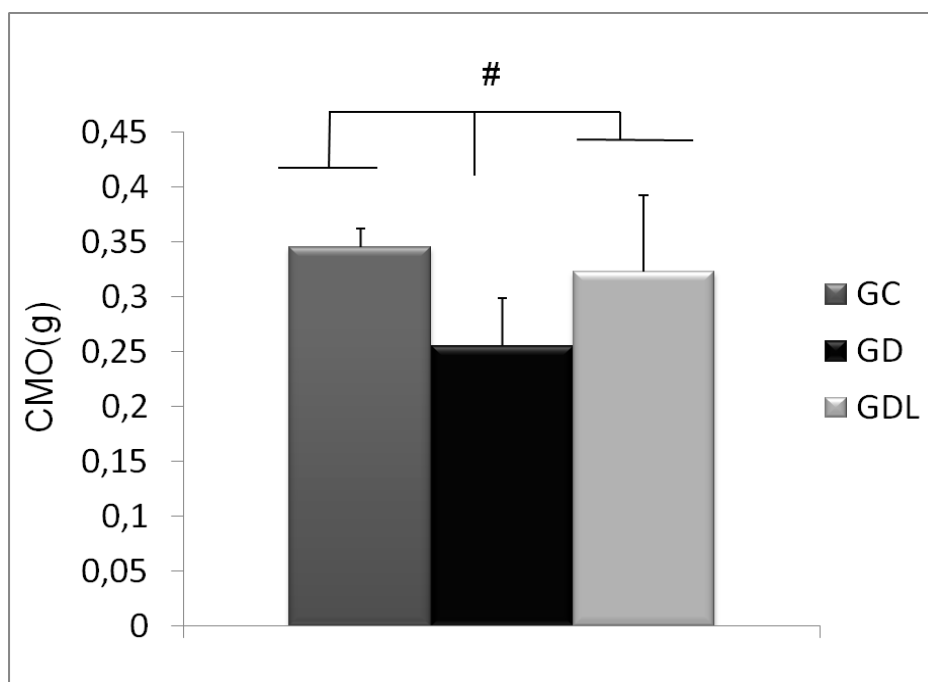


Figura 7. Resultado da análise de conteúdo mineral ósseo mostrando resultados inferiores no GD comparando ao GL e GC. GC (grupo controle), GD (grupo diabético); GL (grupo tratado com laser); * $P \leq 0,05$.

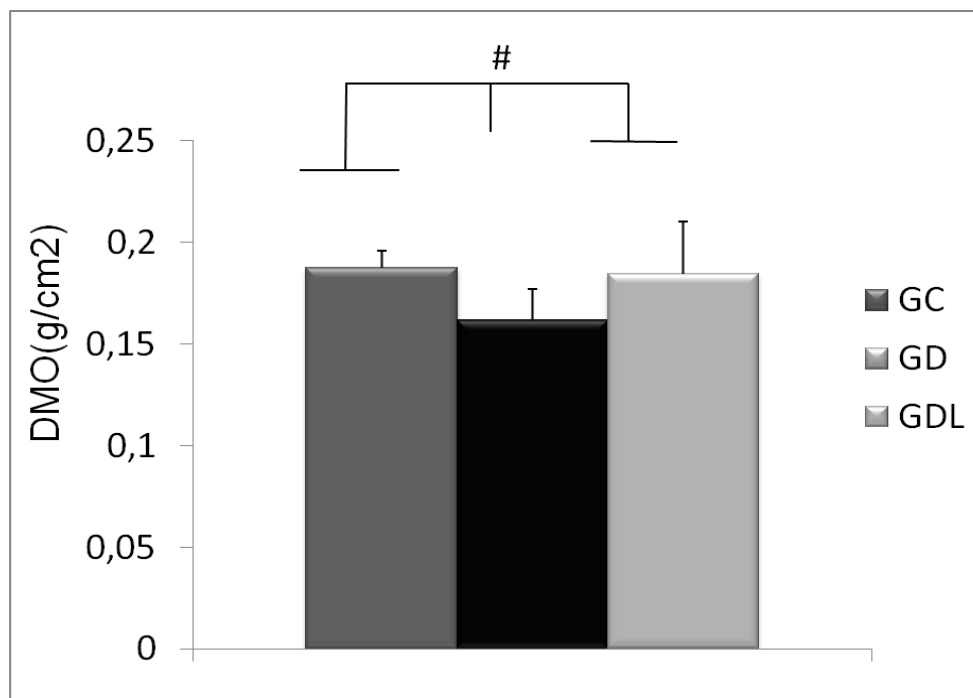


Figura 8. Resultado da análise da densidade mineral óssea mostrando resultados inferiores no GD comparando ao GL e GC. GC (grupo controle), GD (grupo diabético); GL (grupo tratado com laser). # $P \leq 0,05$.

4. Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da LLLT no tecido ósseo de ratos diabéticos. Os resultados histológicos demonstraram que a DM induziu um aumento das áreas de reabsorção do osso cortical e que a laserterapia foi capaz de modular este desequilíbrio. Além disso, os animais diabéticos irradiados com LLLT mostraram aumento da área cortical em relação ao grupo diabético não tratado. A análise imunohistoquímica demonstrou uma maior imunoexpressão de RUNX-2 no GL em comparação GD e a imunoexpressão de RANK-L foi similar em todos os grupos experimentais. Além disso, a LLLT foi capaz de aumentar a força de fratura, CMO e DMO nos ratos diabéticos.

As alterações histológicas observadas nos ratos diabéticos não tratados corroboram com os dados encontrados na literatura que indicam que o remodelamento ósseo está alterado no DM devido ao aumento da atividade osteoclástica e menor ação osteoblástica (WONGDEE e CHAROENPHANDHU, 2011; JOSHI *et al*, 2013). Evidências apontam que a insulina tem uma ação osteogênica, aumentando a proliferação de células ósseas, a atividade da fosfatase alcalina e da síntese do colágeno e osteocalcina (CORNISH *et al*, 1996; HUANG *et al*, 2010), fato este demonstrado através da redução significativa da Área tibial total nos grupos diabéticos do presente estudo. Portanto, os níveis reduzidos de insulina observados na situação clínica de DM podem levar ao desenvolvimento de osteoporose (HIGGINS *et al*, 2010; BLAKYTNY *et al*, 2011) Interessantemente, a laserterapia foi capaz de prevenir a perda de massa óssea relacionada ao DM, modulando as áreas de reabsorção e aumentando a área cortical óssea. Estes resultados podem ser associados com os efeitos estimuladores de LLLT sobre a proliferação das células teciduais e do metabolismo ósseo (RENNO *et al*, 2006; BAYAT *et al*, 2009; FÁVARO-PÍPI

et al, 2011). A LLLT é conhecido por aumentar a atividade mitocondrial (PIRES-OLIVEIRA *et al*, 2008), síntese de DNA e RNA osteoblástico, formação do calo ósseo (STEIN *et al*, 2005.), expressão do gênica de osteocalcina e osteopontina (YAOITA *et al*, 2000;RENNO *et al*, 2007), que culmina com a estimulação da proliferação das células e aceleração do metabolismo ósseo (FAVARO-PIPI *et al*, 2011). Neste contexto, a hipótese de que a laserterapia pode ter agido na estimulação da atividade dos osteoblastos e no desequilíbrio na modulação da remodelação óssea, relacionada com a hiperglicemia, pode ser confirmada.

De modo semelhante, expressão aumentada RUNX-2 foi observada no GL em comparação com GD. RUNX-2 é essencial para a diferenciação dos osteoblastos e a osteogênese e regula a expressão de vários genes de proteínas da matriz extracelular durante a proliferação celular óssea (KOMORI *et al*, 2011). Pode-se sugerir que a melhor organização do tecido observada nos animais diabéticos tratados pode ser um resultado da expressão constante de RUNX-2, induzida pela estimulação do *laser*, suportando a hipótese do elevado potencial osteogênico desta terapia. Estes resultados corroboram com outros estudos que descrevem o aumento da imunexpressão de RUNX-2, associado à laserterapia, em modelos animais com defeitos ósseos induzidos (FAVARO-PIPI *et al*, 2011, BOSSINI *et al*, 2012).

RANK-L é um membro da família das citocinas fator de necrose tumoral (TNF), que é um ligante para o receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANK) e osteoprotegerina (OPG). Ele funciona como um fator-chave para a diferenciação e ativação dos osteoclastos (KEARNS *et al*, 2008; ANANDARAJAH, 2009). A análise imunohistoquímica demonstrou que a mesma intensidade de imunomarcção de RANK-L foi encontrada para todos os grupos experimentais. Este fato sugere que a DM não influenciou a quantidade de

macrófagos / osteoclastos no tecido ósseo e a presença de áreas de reabsorção muito mais intensas nos grupos diabéticos pode estar relacionada com a diminuição da atividade dos osteoblastos.

A avaliação biomecânica mostrou que DM induziu uma redução significativa nas propriedades mecânicas do osso. Estudos anteriores demonstraram que a hiperglicemia e diminuição dos níveis de insulina podem levar a alterações na microestrutura do osso, resultando numa diminuição de suas propriedades biomecânicas (REDDY *et al*, 2001; BAYAT *et al*, 2009). Nyman *et al* (2011) observaram uma diminuição nas propriedades biomecânicas do osso em ratos diabéticos. Embora quase todas as propriedades biomecânicas da GL mostrarem-se semelhantes aos do GD, a força de fratura foi significativamente maior, sugerindo um possível efeito positivo da irradiação *laser*. Bayat *et al* (2009) investigando os efeitos da radiação *laser* HeNe sobre as propriedades biomecânicas do osso de ratos diabéticos, observou um aumento da resistência máxima em relação aos animais do grupo controle (YU *et al*, 1999; NISSAN *et al*, 2006).

Além disso, os valores de DMO e CMO foram semelhantes entre o GC e GL. Estes resultados são uma evidência direta da atividade osteogênica da LLLT e confirma a hipótese levantada anteriormente de que esta terapia aumentou a atividade dos osteoblastos, que pode culminar com a maior deposição de massa óssea.

Assim, os resultados do presente estudo confirmam a hipótese de que a LLLT pode estimular o metabolismo ósseo alterado como na DM, podendo constituir um tratamento promissor para aumentar a massa óssea e as propriedades biomecânicas. Como limitações para este estudo tem-se o relativo curto prazo de avaliação do desempenho da LLLT, assim o desempenho à longo prazo da irradiação *laser* continua a ser objeto de estudo.

Além disso, embora os efeitos da LLLT no osso de ratos diabéticos tenham sido evidenciados em alguns estudos, não há consenso sobre os parâmetros do *laser* ideais a serem utilizados em animais diabéticos (REDDY *et al*, 2001; ABDI *et al*, 2009; AKYOL e GÜNGÖRMÜŞ, 2010). Bem como os estudos posteriores não utilizaram a associação de análises microscópicas e macroscópicas com as utilizadas no presente estudo. Assim, estes dados preliminares sugerem uma indicação de possíveis utilizações do *laser* no tecido ósseo diabético, com o objetivo de estimular o metabolismo ósseo e do aumento da DMO. No entanto, as razões para tal efeito promotor e os parâmetros a serem utilizados em seres humanos ainda não estão claros o que necessitam de mais investigação.

5. CONCLUSÃO

Em síntese pode-se concluir que a laserterapia tem potencial osteogênico, estimulando a atividade dos osteoblastos, evidenciada pela maior imunexpressão de RUNX-2 no GL, resultando em aumento da área cortical, força de fratura, CMO e DMO. Esses dados destacam o enorme potencial do uso de laserterapia para melhorar o metabolismo ósseo. Outros estudos de longo prazo devem ser desenvolvidos para fornecer informações adicionais sobre os estágios finais da estimulação do *laser* no tecido ósseo diabético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EINHORN, T.A.; BOSKEY, A.L.; GUNDBERG, C.M.; VIGORITA, V.J.; DEVLIN, V.J.; BEYER, M.M. The mineral and properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res.* V.6, p.317-323, 1988.
2. MATHIASSEN, B.; NIELSEN, S.; JOHANSEN, J.S.; HARTWELL, D.; DITZEL, J.; RODBRO, P.; CHRISTIANSEN, C. Long-term bone loss in insulin-dependent diabetic patients with microvascular complications. *J Diabet Complications.* V.4, p.145-149, 1990.
3. SUZUKI, K.; MIYAKOSHI, N.; TSUCHIDA, T.; KASUKAWA, Y.; SATO, K.; ITOI, E. Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone.* V.33, p.108-114, 2003.
4. NALYSNYK, L.; HERNANDEZ-MEDINA, M.; KRISHNARAJAH, G. Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes Metab.* V.12(4), p.288-98, 2010.
5. VAN DOOREN, F.E.; NEFS, G.; SCHRAM, M.T.; VERHEY, F.R.; DENOLLET, J.; POWWER, F. Depression and risk of mortality in people with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* V.8(3), p.e57058, 2013.
6. BLAKYTNY, R.; SPRAUL, M.; JUDE, E.B. Review: The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds.*v.10(1), p.16-32, 2011.
7. KAYAL, R.A.; ALBLOWI, J.; NANARAO KROTHAPALLI, E.M.; SILKMAN, L.; GERSTENFELD, L.; EINHORN, T.A.; GRAVES, D.T. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone.* V.44, p.357-363, 2009.
8. HE, H.; RONGKUN, L.; TESFAHUN, D.; CATALDO, L.; LOUIS, C.; DANA T. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinol.* V.145, p.447-452, 2004.

9. SANTANA, R.B.; XU, L.; CHASE, H.B.; AMAR, S.; GRAVES, D.T.; TRACKMAN, P.C. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*. V.52, p.1502-10, 2003.
10. KARU, T.I. Molecular mechanisms of the therapeutic effects low intensity laser radiation. *Lasers Life Sciences*. V.2, p.53-74, 1989.
11. PRETEL, H.; LIZARELLI, R.F.; RAMALHO, L.T. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med*. V.39(10), p.788-96, 2007.
12. TAJALI, S.B.; MACDERMID, J.C.; HOUGHTON, P.; GREWAL, R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. V.4, p.5-1, 2010.
13. DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MALLATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. V.11(6), p.540-5, 2000.
14. KARU, T. *The science of low power laser therapy*. Amsterdam: Gordon and Breach, 1998.
15. STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts in Vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.23(2), p.161-6, 2005.
16. PIRES OLIVEIRA, D.A.; DE OLIVEIRA, R.F.; ZANGARO, R.A.; SOARES, C.P. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg*. V.26(4), p.401-4, 2008.
17. LIRANI-GALVÃO, A.P.; JORGETTI, V.; DA SILVA, O.L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg*. V.24(6), p.735-40, 2006.
18. LIU, X.; LYON, R.; MEIER, H.T.; THOMTZ, J.; HAWORTH, S.T. Effect of low-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed. Laser Surg*. V.25, p.487–494, 2007.
19. RENNO, A.C.M.; McDoNNELL, P.A.; PARIZOTTO, N. A; LAAKSO, E.L. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation In Vitro. *Photomedicine Laser Surg*. V.25(4), p.275-80, 2007.
20. BAYAT, M.; ABDI, S.; JAVADIEH, S.; MOHSENIFAR, Z.; RASHID, M.R. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Bone in Diabetic and Nondiabetic Rats *Photomedicine and Laser Surgery*. V.27(5), p.703–708, 2009.
21. JAVADIEH, F.; BAYAT, M.; ABDI, S.; MOHSENIFAR, Z.; RAZI, S. The effects of infrared low-level laser therapy on healing of partial osteotomy of tibia in

- streptozotocin-induced diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* V.27(4), p.641–646, 2009.
22. ABDI, S.; BAYAT, M.; JAVADIEH, F.; MOHSENFAR, Z.; REZAIE, F.; BAYAT, M. The effects of helium-neon light therapy on healing of partial osteotomy of the tibia in streptozotocin induced diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery.* V.27, p.907-12, 2009.
23. PARK, J.J.; KANG, K.L. Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med Sci.* v.27(1), p.223-302, 2012.
24. COOMBE, A. R.; HO, C-T. G.; DARENDELILER, M. A.; HUNTER, N.; PHILIPS, J. R.; CHAPPLE, C.C.; YUM L.W.P. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res.* 4, 3–14, 2001.
25. MEDALHA, C.C., AMORIM, B.O., FERREIRA, J.M., ET AL. Comparison of the effects of electrical field stimulation and low-level laser therapy on bone loss in spinal cord-injured rats. *Photomed Laser Surg.* V.28(5), p.669-674, 2010.
26. RENNO, A.C.; DE MOURA, F.M.; DOS SANTOS, N.S.; TIRICO, R.P.; BOSSINI, P.S.; PARIZOTTO, N.A. Effect of 830-nm laser light on preventing bone loss after ovariectomy. *Photomed Laser Surg.* V.24, p.642–645, 2006.
27. HONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA (2004): ONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinol.* V.145, p.447-452, 2004.
28. ANANDARAJAH, A.P. Role of RANKL in bone diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* V.20, p.88-94, 2009.
29. D'LOZANO, L.; FERNÁNDEZ-DE-CASTRO, S.; PORTAL-NÚÑEZ, A.; LÓPEZ-HERRADÓN, S.; DAPÍA, E.; GÓMEZ-BARRENA; ESBRIT, P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia *Br J Pharmacol.* V.162(6), p.1424–1438, 2011.

30. JOSHI, A.; VARTHAKAVI, P.; CHADHA, M.; BHAGWAT, N. A study of bone mineral density and its determinants in type 1 diabetes mellitus. *J Osteoporos.* V.2013, p.397814, 2013.
31. WONGDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Osteoporosis in diabetes mellitus: possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes.* V.2(3), p.41-48, 2011.
32. CORNISH, J.; CALLON, K.E.; REID, I.R. Insulin increases histomorphometric indices of bone formation In vivo. *Calcif Tissue Int.* v.59, p.492-495, 1996.
33. HUANG, S.; KAW, M.; HARRIS, M.T.; EBRAHEIM, N.; MCINERNEY, M.F.; NAJJAR, S.M.; LECKA-CZERNIK, B. Decreased osteoclastogenesis and high bone mass in mice with impaired insulin clearance due to liver-specific inactivation to CEACAM1. *Bone.* V.46, p.1138-1145, 2010.
34. HIGGINS, T.F.; JOHNSON, B.D. Effect of exogenous IGF-1 on chondrocyte apoptosis in a rabbit intraarticular osteotomy model. *J Orthop Res.* 28, 125-130, 2010.
35. FÁVARO-PÍPI, E.; RIBEIRO, D.A.; RIBEIRO, J.U.; BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; TIM, C.; DE ARAÚJO, H.S.; RENNO, A.C. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomedicine and Laser Surgery.* V.29, p.311-7, 2011.
36. YAOITA, H.; ORIMO, H.; HIRAI, Y.; SHIMADA, T. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* V.18, p.63-70, 2000.
37. KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and Tissue Research.* V.339, p.189-195, 2010.
38. BOSSINI, P.S.; RENNO, A.C.M.; RIBEIRO, D.A.; FANGEL, R.; RIBEIRO, A.C.; LAHOZ, M.A.; PARIZOTTO, N.A. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Experimental Gerontology.* V.47, p.136-42, 2012.
39. KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENIUK, P.J. Activator of Nuclear Factor B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocrine Reviews.* V.29, p.155-92, 2008.

40. REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photo stimulation accelerates wound healing in diabetic rat. *Wound Repair and Regeneration*. V.9, p.248–255, 2001.
41. NYMAN, J.S.; EVEN, J.L.; JO, C.H.; HERBERT, E.G.; MURRY, M.R.; COCKRELL, G.E.; WAHL, E.C.; BUNN, R.C.; LUMPKIN, C.K. JR.; FOWLKES, J.L.; THRAILKILL, K.M. Increasing duration of type 1 diabetes perturbs the strength-structure relationship and increases brittleness of bone. *Bone*. V.48(4), p.733-40, 2011.
42. NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS, M.D.; YAFFE, A.; BINDERMAN, I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defect in rats. *J. Oral Rehabil.* V.33, p.619–624, 2006.
43. YU, W.; NAIM, J.O.; LANZAFAME, R.J. Effects of photo stimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg. Med.* V.20, p.56–63, 1999.
44. AKYOL, U.K.; GÜNGÖRMÜŞ, M. Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* V.28(3), p.411-6, 2010.

7. ESTUDO 2

Exercício físico resistido associado à terapia *laser* de baixa intensidade estimula o metabolismo ósseo em ratos diabéticos

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico, associado ou não a terapia *laser*, em tíbias e fêmures de ratos com DM induzida por estreptozotocina (STZ). Quarenta ratos Wistar machos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: Grupo Controle (GC), grupo diabético (GD), grupo diabético treinado (GT) e grupo diabético treinado e irradiado com *laser* (GTL). A DM foi induzida por injeção de STZ na veia peniana e após uma semana, tiveram início os protocolos de tratamento (exercício físico e terapia *laser*). Estes foram realizados durante 6 semanas, 3 vezes por semana, totalizando 18 sessões. O exercício resistido (ER) consistiu em escaladas com carga atrelada a cauda dos animais, e estas cargas foram aumentadas semanalmente ao longo das sessões de treinamento, no GTL ao final de cada sessão de ER os animais foram irradiados com *laser* Ga-Al-As, 808 nm, 100 mW, 3,57W/cm², 0,028cm², 120J/cm², 34s em cada ponto. Ao fim do experimento, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO₂ e as tíbias e os fêmures foram dissecados para análises da imunopressão de fatores osteogênicos, propriedades biomecânicas e parâmetros densitométricos. O GT e GTL mostraram aumento da área cortical, densidade mineral óssea e propriedades biomecânicas. O conteúdo mineral ósseo, a força de fratura e rigidez foram maiores no grupo GTL em relação ao GT. Ainda, a análise imunohistoquímica revelou que GT e GTL apresentaram imunopressão de RUNX-2 aumentada em relação à GD. Já a imunopressão de RANK-L foi moderada no GD e fraca nos demais grupos experimentais. Como conclusão, o exercício resistido promoveu ativação osteoblástica, o que culminou com o aumento nas propriedades biomecânicas e na densidade mineral óssea. A associação de exercícios físicos e LLLT promoveu efeito adicional ao potencial osteogênico do ER realizado isoladamente. Conseqüentemente, estes dados evidenciam o potencial do exercício físico no tratamento da perda óssea devido à DM. Outros estudos devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre os efeitos da LLLT como terapia coadjuvante ao exercício resistido.

Palavras-chave: streptozotocina, exercício resistido, terapia *laser* de baixa intensidade.

Abstract

The present study aimed to evaluate the effects of an exercise protocol, with or without laser therapy in tibias and femurs of rats with diabetes induced by streptozotocin (STZ). Forty male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control group (CG), diabetic group (DG), trained diabetic group (TG) and trained diabetic group and irradiated with laser therapy (TLG). Diabetes was induced by injection of STZ in the penile vein and after a week, began treatment protocols (exercise and laser therapy). These were done for 6 weeks 3 times per week, for a total of 18 sessions. Resistance exercise (RE) consisted of climbing with load tied to the tail of the animal, and these loads were increased weekly throughout the training sessions, the TLG at the end of each session ER animals were irradiated with laser Ga-Al-As , 808 nm, 100 mW 3.57 W/cm², 0, 028cm², 120J/cm², 34s at each point. At the end of the experiment, the animals were euthanized by CO₂ asphyxiation and the tibias and femurs were dissected for analysis of immunostaining of osteogenic factors, biomechanical and densitometric parameters. The T Gand TLG showed increased cortical area, bone mineral density and biomechanical properties. The bone mineral density, fracture strength and stiffness were higher in TLG over the TG. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that TG and TLG immunoassayed for RUNX-2 increased relative to DG. Already immunoreactivity RANK-L was moderate in GD and weak in the other groups. In conclusion, resistance exercise promoted osteoblast activation, which culminated with the increase in the biomechanical properties and bone mineral density. The combination of exercise and LLLT, promoted the osteogenic potential additional effect of ER performed alone. Consequently, these data highlight the potential of exercise in the treatment of bone loss due to DM. Further studies should be conducted to provide additional information on the effects of LLLT as adjuvant therapy resistance exercise.

Keywords: *streptozotocin, resistance exercise, low intensity laser therapy.*

1. Introdução

Diabetes Mellitus tipo 1 é uma doença crônica caracterizada por extensas alterações bioquímicas provocadas pela falta ou diminuição no nível de insulina (EINHORN *et al.*, 1988). É estimado que essa doença afeta cerca de 6 a 8% da população mundial e leva ao desenvolvimento de diversas complicações entre elas, retinopatia, nefropatia e doenças cardiovasculares (MATHIASSEN *et al.*, 1990).

Além disso, diversos autores relatam que indivíduos diabéticos apresentam também alterações no metabolismo ósseo, com uma diminuição da atividade dos osteoblastos e aumento da atividade dos osteoclastos, o que resulta em alterações entre a formação e a absorção óssea, podendo culminar em redução da densidade mineral óssea (DMO) (THRAILKILL *et al.*, 2005;. HONGBING *et al.*, 2004; WONGDEE e CHAROENPHANDHU, 2011) .

Vários estudos demonstraram evidências que animais diabéticos apresentam redução significativa da DMO e uma taxa de aumento da incidência de diminuição de massa óssea (JANGHORBANI *et al.*, 2005; VESTERGAARD, 2007; KAYAL *et al.*, 2009; JOSHI *et al.*, 2013; STARUP-LINDE, 2013). Conseqüentemente, fraturas ósseas associadas à reduzida DMO têm incidência aumentada na presença de ambos os tipos de DM (WONGDEE e CHAROENPHANDHU, 2011). Além disso, vários outros autores também verificaram diminuição das propriedades biomecânicas e diminuição do conteúdo mineral ósseo (com redução das concentrações séricas de cálcio e fosfato) em animais diabéticos (BOTUSHANOV e ORBETZOVA, 2009; BLAKYTNY, 2011).

Uma vez que a DM tornou-se um dos problemas mais importantes de saúde pública, é necessário o desenvolvimento de tratamentos eficazes, capazes de estimular a formação óssea. Dentro deste contexto, um dos tratamentos mais promissores para estimular o metabolismo ósseo e modular a perda óssea na situação clínica do DM é o exercício físico (DUNCAN, *et al*, 1998; SIGAL *et al*, 2007; DALY e PETIT, 2007; CAIXETA *et al*, 2008).

O exercício físico atua no metabolismo ósseo através da sobrecarga mecânica que induz uma deformação temporária, e constitui um estímulo adequado para ativar a formação óssea e aumentar a densidade mineral óssea (WOOD e O'NEILL, 2012). Alguns estudos evidenciaram que exercícios físicos podem controlar a perda de massa óssea em pacientes com DM (FUJIMURA *et al*, 1997; HENDERSON *et al*, 1998; NOTOMI *et al*, 2000; DALY *et al*, 2005; MAGGIO *et al*, 2011; ELHABASHY *et al*, 2011). Gomes *et al* (2006) observaram que, ratos diabéticos submetidos a um protocolo de exercício físico apresentaram um aumento dos níveis séricos de IGF-1, um maior comprimento da tíbia, e aumento do conteúdo mineral ósseo em relação ao grupo controle. Esses achados corroboram com os encontrados por Verhaeghe *et al*. (2000) e Daly *et al*. (2005) que puderam constatar aumento nos níveis de IGF-1 e sensibilidade à insulina e um aumento no CMO e DMO, respectivamente, após protocolo de exercícios físicos em DM.

De forma similar, alguns estudos investigaram a ação da LLLT na estimulação de tecidos biológicos, incluindo o tecido ósseo. A LLLT é capaz de modular o metabolismo celular e estimular a respiração mitocondrial, aumentando a produção de oxigênio molecular e a síntese de ATP (KARU, 2010, JAVADIEH *et al*, 2009; BAYAT *et al*, 2009). Estes efeitos produzem um aumento da síntese de DNA, de RNA e de proteínas, o que pode culminar no aumento da proliferação celular (STEIN *et al*, 2008; KARU, 2010).

No tecido ósseo a laserterapia tem um efeito benéfico e pode aumentar a proliferação celular e promover um estímulo à consolidação da fratura (RENNO *et al*, 2006; ABID *et al*, 2009, FÁVARO-PIPI *et al*, 2011; AKYOL e GÜNGÖRMÜŞ, 2011). Além disso, vários estudos demonstraram que a laserterapia tem efeitos positivos na massa óssea de ratos com osteoporose e ratos diabéticos (RENNO *et al*, 2006; ABDI *et al*, 2009; JAVADIEH *et al*, 2009; BAYAT *et al*, 2009; KARU *et al* 2010; FÁVARO- PIPI *et al*, 2011; BOSSINI *et al*, 2012). Bayat *et al* (2009) observaram que o *laser* He-Ne (632,8 nm, 10 mW) produziu um aumento significativo nas propriedades biomecânicas da tíbia e camada cortical óssea em ratos diabéticos.

Embora os efeitos positivos do exercício físico e da LLLT no tecido ósseo em ratos diabéticos tenham sido evidenciados, a associação de ambos os recursos na massa óssea de animais nesta condição clínica ainda não foi investigada. Tendo em vista o acima mencionado, foi levantada a hipótese de que a associação do ER com o LLLT constitui uma terapêutica com maior potencial osteogênico para influenciar positivamente o efeito do ER no tecido ósseo em ratos diabéticos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico, associado ou não à aplicação de *laser* terapêutico em tíbias e fêmures de ratos com DM. Para isso, ratos *Wistar* foram distribuídos em quatro grupos diferentes (grupo controle, grupo de diabéticos, grupo diabético treinado e grupo *laser* treinado) e a resposta óssea foi avaliada por meio de uma análise histológica, imunohistoquímica, densitometria e análise biomecânica.

2. Método

2.1. Delineamento experimental

Quarenta ratos machos *Wistar* (idade de 8 semanas e pesando $310 \pm 12,8$ g) foram utilizados neste estudo. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n = 10 em cada grupo): Grupo Controle (GC), Grupo Diabético (GD), Grupo Diabético Treinado (GT) e grupo diabético treinado e submetido à irradiação *laser* (GTL). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (22 ± 2 ° C), períodos de claro-escuro de 12 horas, e acesso irrestrito à água e ração comercial. A manipulação dos animais e os procedimentos foram realizados estritamente de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (2010/145).

2.2. Indução de DM e avaliação de massa corporal

O DM foi induzido por injeção intravenosa na veia peniana de STZ toxina de células de β -pancreáticas (Sigma-Aldrich ®, Brasil) (60 mg / kg de peso corporal), dissolvido em tampão citrato estéril. Os ratos do GC receberam uma injeção de tampão de citrato. Uma semana após o procedimento, os níveis de glicose foram registrados e DM foi definida como a concentração de glicose no sangue superior a 250 mg / dL em uma amostra de sangue (Accutrend ® Plus, Roche, São Paulo-Brasil). Este procedimento foi repetido uma vez por semana ao longo do estudo (COOMBE *et al.*, 2001).

Adicionalmente, a massa corporal foi monitorada semanalmente em uma balança analítica (Kern ® 440-21A; Balingen-Frommern alemão). A massa corporal inicial (MCI) (considerado como a massa corporal de 7 dias após a indução do DM) e a massa corporal final (MCF) foram considerados para determinar a carga máxima suportada por cada animal durante o teste de carga máxima, no início e no final do período experimental.

2.3. Protocolo de treino resistido e da determinação da carga máxima

O protocolo de exercício utilizado consistiu em um modelo-de escalada utilizando uma escada de metal (1,1 x 0,18 m, a grade de 2cm, 80 ° de inclinação) com um compartimento (20 x 20 x 20 cm), na parte superior. A dimensão da escada induziu os animais a realizarem 8-12 movimentos dinâmicos por subida do início da escada até o compartimento. Um dispositivo de carga foi fixado envolvendo a porção proximal da cauda, com uma fita adesiva, e permitia adição de pesos de chumbo de 20 a 50 gramas (HORNBERGER e FARRAR, 2004).

O treinamento teve início com duas sessões de familiarização com 24 horas entre elas, sem qualquer peso fixado à cauda dos animais. Estas sessões tiveram como objetivo ensinar a escalada ao animal e consistiram de 3 a 5 escaladas consecutivas ao topo, com um intervalo de 60 segundos de descanso entre elas. O procedimento foi realizado até que os animais subissem voluntariamente sem estímulo sonoro ou manual. Após esse procedimento os animais descansaram por 1 dia e foram submetidos a teste de carga máxima (TCM).

O TCM consistiu em sucessivas escaladas, com transporte de cargas progressivamente mais pesadas. Para a subida inicial no TCM, a carga transportada foi de

50% da massa corporal do animal. Depois disso, 30 g de peso foram adicionados, até que uma carga máxima fosse atingida, tal carga era determinada quando os animais não conseguiam subir todo o comprimento da escada, mesmo após três estímulos manuais sucessivos na cauda.

A carga mais elevada alcançada com sucesso em todo o comprimento da escada foi considerada a capacidade máxima do rato de transporte para a sessão de treino. A sessão de exercício físico consistiu em 9 subidas, com intervalo de descanso de 60 segundos, sempre com 80% de carga. Ao término de 3 sessões de treinamento era realizado novo teste de carga máxima e no dia seguinte implementado novos pesos. O treinamento resistido foi realizado ao final da tarde, devido aos hábitos noturnos dos animais, em um total de 18 sessões, 3 vezes por semana em dias não consecutivos (FIGURA 1). O TCM para a determinação da carga máxima foi repetido após o protocolo de treino resistido (TABELA 1).

No GTL as irradiações de LLLT foram realizadas logo após o treino, sendo utilizada a técnica pontual de contato, com a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente a região medial de ambos os fêmures e tíbias. No grupo GT foram realizadas aplicações da LLLT *sham*, com o aparelho desligado, nos mesmo pontos e pelo mesmo tempo, também após o treinamento.

2.4. Irradiação do *laser*

O tratamento com *laser* iniciou-se uma semana após a indução do DM. Foi utilizado o equipamento de *laser* Ga-Al-As modelo portátil de *Laser* DMC, classe 3B Ga-Al-As diodo,

com comprimento de onda 808 nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, densidade de potência de $3,57\text{W}/\text{cm}^2$, área do feixe de $0,028\text{cm}^2$, divergência de 1.5° , na fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$, tempo de irradiação de 33s e energia por ponto 3.3 J. A irradiação foi realizada em técnica de contato pontual, no ponto médio de ambas as tíbias e fêmures (4 pontos no total) (MEDALHA *et al*, 2010). O tratamento com *laser* foi realizada por 18 sessões, 3 vezes por semana, em dias não consecutivos. Vinte e quatro horas após a última sessão de tratamento, os ratos foram eutanasiados por asfixia com CO_2 e os ossos foram removidos para análise.

2.5. Procedimentos histológicos

A análise histologica foi realizada na tíbia esquerda dos animais. Após coleta, as amostras foram fixadas em formalina a 10%, durante 2 dias, descalcificadas em EDTA 4% (Merck) e embebidas em blocos de parafina. Seções finas (5 μm) foram preparadas no eixo perpendicular medial-lateral utilizando um micrótomo (Leica Microsystems SP 1600, Nussloch, Alemanha). Pelo menos, três seções de cada espécime foram coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck).

2.6. Avaliação histomorfométrica

Para a realização da análise histopatológica, as tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, descalcificadas em solução de EDTA a 4% (Merck) e, posteriormente, incluídas em blocos de parafina. Na

seqüência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, com espessura padronizada de 5 μ m e os cortes foram montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa das tíbias foi realizada por meio de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram avaliadas, a estrutura do tecido e as zonas de reabsorção e formação óssea. Pelo menos, três secções de cada espécime foram examinadas e dois observadores experientes realizaram a avaliação de forma cega.

A morfometria da área total tibial (ATT) e área cortical tibial (ACT) foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Pro-imagem (Wetzlar, Alemanha). Para tal, foram captadas imagens através de uma câmara digital (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha), com uma ampliação de 2,5 x, e a um computador equipado com sistema de análise de imagem (Leica ® Qwin sistema de análise de Pro-imagem, Wetzlar, Alemanha). A partir das micrografias, foram obtidas as áreas internas (AI) e externas (AE) das tíbias, em micrômetros quadrados (μm^2). A área tibial total correspondeu ao valor da AE enquanto a área tibial cortical correspondeu a AE menos AI. Dois observadores experientes realizaram a avaliação de uma forma cega (HONGBING *et al*, 2004; RENNO *et al*, 2006; MEDALHA *et al*, 2010).

2.7. Imunohistoquímica

Para a realização da avaliação imunohistoquímica, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 5 μ m de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão

citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram então incubadas com anti-Runx2 e anti-RANK-L anticorpo primários monoclonais (Santa Cruz Biotechnology, EUA) com uma concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris.

Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários. Estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada (ANANDARAJAH, 2009; MEDALHA *et al*, 2010).

Posteriormente, as lâminas foram analisadas por meio de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan). Foram avaliados três campos de cada corte e observada a presença e localização da imunomarcação dos fatores analisados. Quando presente, foi determinada se a imunomarcação era localizada nas c elulas ou na matriz extracelular.

Além disso, foi mensurada a imunexpressão por percentual da área do campo avaliado: leve para imunomarcção positiva, porém em área menor do que de 35% do campo analisado, moderada para imunomarcção positiva em área entre 35% a 65% do campo avaliado e intensa, para área com imunexpressão positiva do fator analisado maior do que 65% do campo avaliado.

2.8. Análise Biomecânica

As propriedades biomecânicas da tíbia esquerda foram determinadas por um teste de inclinação de três pontos em uma Máquina Universal de Testes Instron (Instron Corp, Canton, MA, modelo 4444). Anteriormente ao teste, os ossos foram descongelados em temperatura ambiente. Cada osso foi colocado em um dispositivo de sustentação com dois suportes localizados a uma distância de 13 mm. Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1KN e pré-carga de 5N em velocidade constante de 0,5cm/min. Finalmente, a amostra foi submetida a uma força de flexão, com taxa de deformação constante de 0,5 cm/min até o momento da fratura. A partir da curva de carga-deformação, foram obtidos os valores de carga máxima (KN) e resiliência (J), tenacidade (J), força de fratura (N) e rigidez (N / mm) (BAYAT *et al*, 2009)

2.9. Densitometria

O método utilizado neste estudo para analisar a medida da densidade mineral óssea por meio de seu conteúdo e, assim, determinar a resistência dessa estrutura foi a densitometria óssea. Os fêmures direitos foram submetidos a essa análise. O exame foi

realizado na Disciplina de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, em aparelho DEXA Hologic (Bedford, MA, EUA), e analisados por um software específico para pequenos animais. O coeficiente de variação do método foi avaliado pela análise da variação de duas medidas consecutivas após reposicionamento dos 30 animais. A análise da densitometria óssea foi feita por um investigador que não teve o conhecimento a qual grupo cada amostra pertencia (MEDALHA *et al*, 2010; D'LOZANO *et al*, 2001).

2.10. Análise estatística

Todas as variáveis foram organizadas por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvio-padrão (DP). A normalidade da distribuição das variáveis foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk's. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. Para as comparações entre os grupos foi realizada a análise de variância (ANOVA- *one way*), complementada pelo teste *post-hoc* de Tukey. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

3.1. Observação geral de que os animais experimentais

Dos 40 animais disponíveis para este estudo, dois animais foram perdidos devido a uma depressão respiratória induzida por anestesia e seis animais foram perdidos após a

indução do DM. O restante dos animais se recuperou sem intercorrências do procedimento de indução de DM inicial, e demais tratamentos experimentais (*laser* e treinamento resistido). Nenhum sinal macroscópico de inflamação ou respostas teciduais adversas foi observado durante o período experimental.

3.2. Caracterização da amostra

A massa corporal final (MCF) mostrou-se significativamente maior no GC em comparação com os animais diabéticos ao final das semanas de protocolo experimental. Nenhuma diferença na MCF foi encontrada entre o GT e GLT após as 6 semanas. A MCF do grupo GD apresentou-se significativamente inferior aos demais grupos. Os níveis de glicose no sangue foram significativamente inferiores no GC em comparação com todos os grupos diabéticos, tanto no início e no fim do período experimental. Nenhuma outra diferença no nível de glicose inicial (GI) foi encontrada entre os grupos diabéticos. Em relação aos níveis de glicose final (GF), os grupos GT e GLT apresentaram valores significativamente menores em comparação com GD (Tabela 4). Nenhuma outra diferença foi observada nos níveis de glicose final.

Tabela 4. Média e desvios padrões da Massa corporal e níveis de glicose.

Variables	MCI (g)	MCF (g)	GI (mg/dl)	GF (mg/dl)
GC	305,00 ± 31,71	331,13 ± 28,98	256,13 ± 49,34	272 ± 14,33
GD	278,78 ± 32,87 ^a	191,44 ± 8,88 ^a	393,22 ± 51,02 ^a	509,33 ± 56,33 ^a
GT	269,44 ± 22,4 ^a	246,00 ± 29,7 ^{ab}	415,56 ± 79,2 ^a	396,44 ± 54,6 ^{ab}
GTL	267,9 ± 31,96 ^a	255,2 ± 32,6 ^{ab}	379,2 ± 74,8 ^a	377,4 ± 55,4 ^{ab}

GC: grupo controle; GD: grupo diabético; GT: grupo treinado; GTL: grupo treinado e tratado com *laser*; GI= glicose inicial; GF= Glicose final; MCI= massa corporal inicial; MCF= massa corporal final; a GC vs GD, GT e GTL, b GD vs GT e GLT (p ≤ 0,05).

3.3. Análise morfométrica

A Figura 1 demonstra os dados relativos à análise morfométrica. A ATT e ACT do GC apresentaram-se significativamente maiores em comparação com os demais grupos. Além disso, os grupos treinados (GT e GTL), com ou sem irradiação com *laser*, apresentaram valores significativamente maiores de ACT em comparação com animais do GD (Figura 1).

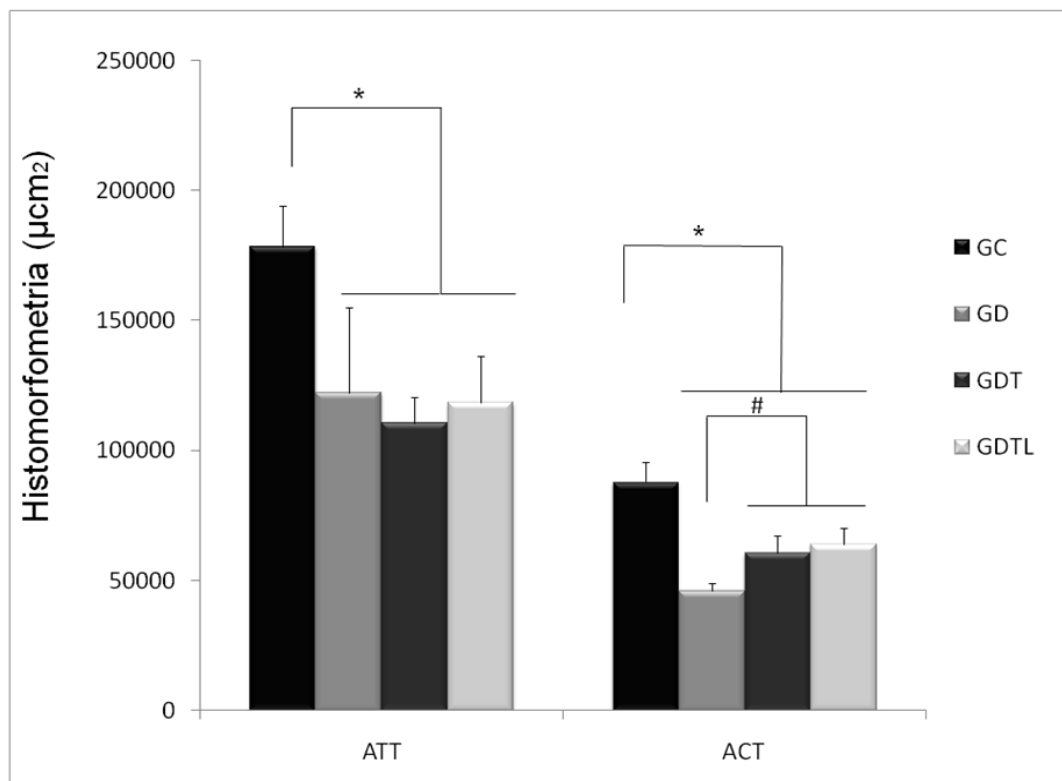


Figura 9. Área total tibial (ATT) e área cortical tibial (ACT). O grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo treinado diabético (TG) e grupo treinado e irradiado com laser diabético (TLG); ($p \leq 0,05$ * vs GC e # vs GD).

3.4. Imunohistoquímica

A imunopressão de RUNX-2 foi detectada no citoplasma das células ósseas. No GC uma expressão elevada foi detectada em relação aos demais grupos (Figura 11 A). Nos animais do GD, uma diminuição da imunopressão Runx-2 foi notada em relação ao GC (Figuras 11 B). Os grupos treinados (GT e GTL) apresentaram Runx-2 moderadamente expresso em relação ao GD (Figuras 11 C e D). RANKL foi fracamente expresso nas células ósseas dos grupos GT e GTL, sem diferenças entre estes grupos, e moderadamente expresso no GD e GC, em relação aos demais grupos experimentais (figura 12).

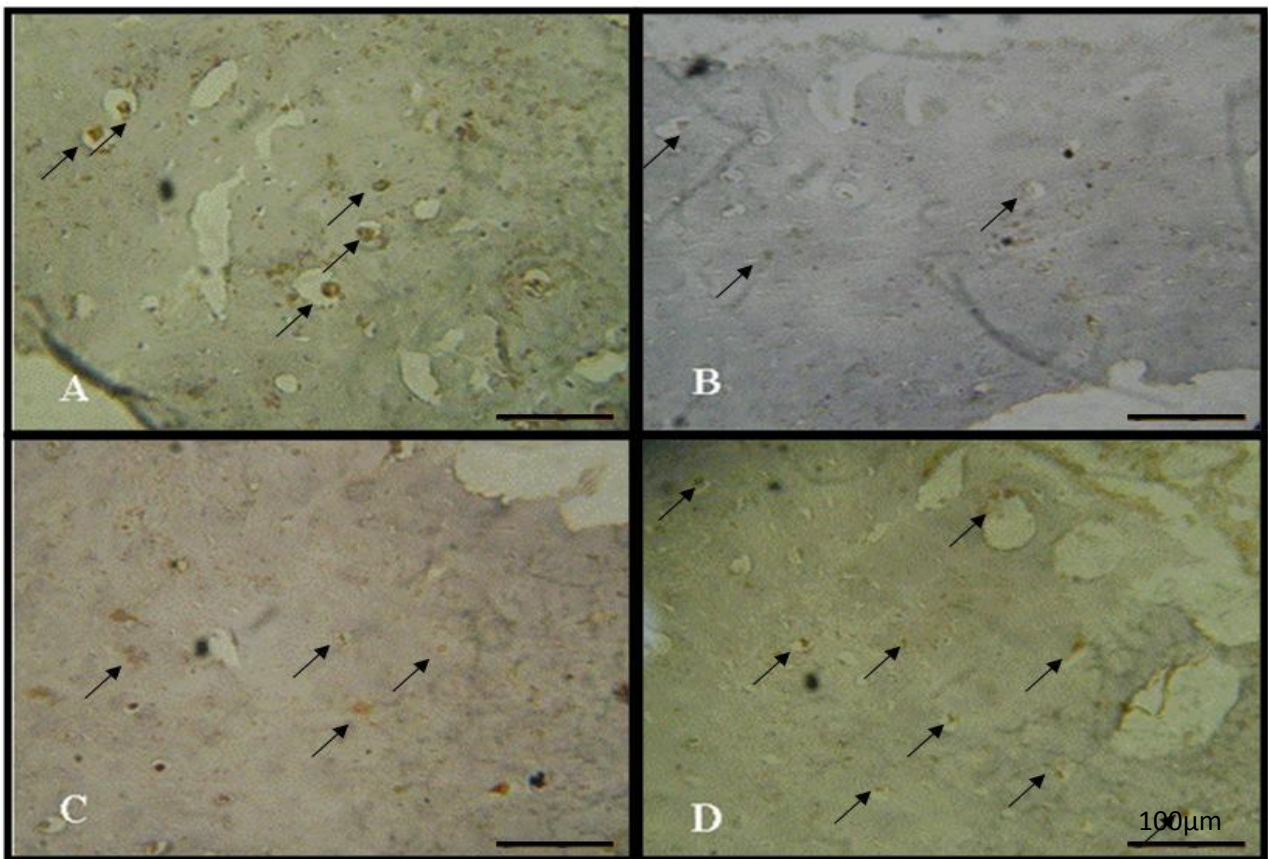


Figura 10. Imunopressão de RUNX-2; A - grupo controle, B - grupo controle diabético; C - grupo treinado diabético e D - grupo treinado e irradiado laser diabético, (→) setas indicam imunopressão RUNX-2.

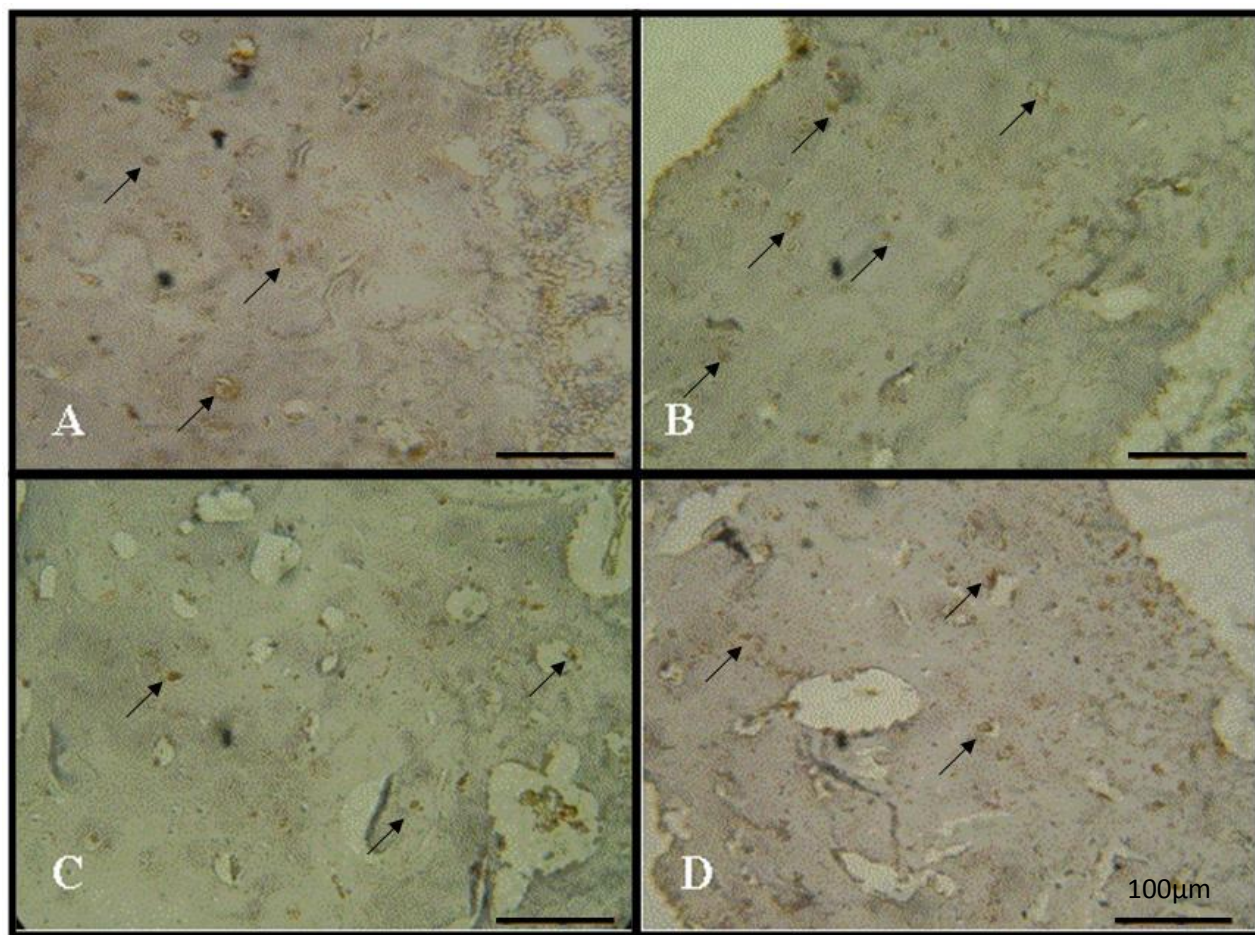


Figura 11. Imunoexpressão de RANK-L; A - grupo controle, B - grupo controle diabético; C - grupo treinado diabético e D - grupo treinado e irradiado laser diabético, (→) setas indicam imunoexpressão RANK-L.

3.5. Análise Biomecânica

A Tabela 2 mostra os valores das propriedades biomecânicas. A força máxima, tenacidade e resiliência foram significativamente menores em todos os grupos diabéticos em comparação ao GC. Os valores de rigidez foram significativamente maiores no GC e GTL em comparação com GD e GT. A força de fratura do GC, GT e GTL foram significativamente maiores em comparação com GD.

Tabela 5. Médias e DP da análise biomecânica.

	Força Máxima (KN)	Resistência (J)	Resiliência (J)	Rigidez (N/mm)	Força de fratura (KN)
GC	0,073 ± 0,004	0,079 ± 0,007	0,028 ± 0,004	161,863 ± 1,798	0,054 ± 0,001
GD	0,055 ± 0,001 ^a	0,049 ± 0,008 ^a	0,024 ± 0,002 ^a	138,675 ± 0,944 ^a	0,030 ± 0,001 ^b
GT	0,062 ± 0,003 ^a	0,051 ± 0,008 ^a	0,022 ± 0,002 ^a	142,944 ± 7,268 ^a	0,043 ± 0,004
GTL	0,060 ± 0,004 ^a	0,052 ± 0,003 ^a	0,018 ± 0,001 ^a	154,607 ± 5,801	0,042 ± 0,005

GC: grupo controle; GD: grupo diabético; GT: grupo treinado; GTL: grupo treinado e tratado com laser; a GC vs GD, GT, GTL; b GD vs GC, GL, GTL

3.6. Densitometria Óssea

A análise densitométrica demonstrou que o GC e os grupos diabéticos treinados (com ou sem laser) apresentaram CMO significativamente mais elevado em comparação com GD (Figura 13). Além disso, o CMO do TLG foi superior em comparação com TG (Figura 13). A Figura 14 mostra a DMO em todos os grupos, e permite visualizar que no GD, a DMO, foi significativamente menor em relação aos demais grupos ($p = 0,00056$, $0,00014$ e $0,00076$ para CG, TG e TGL, respectivamente).

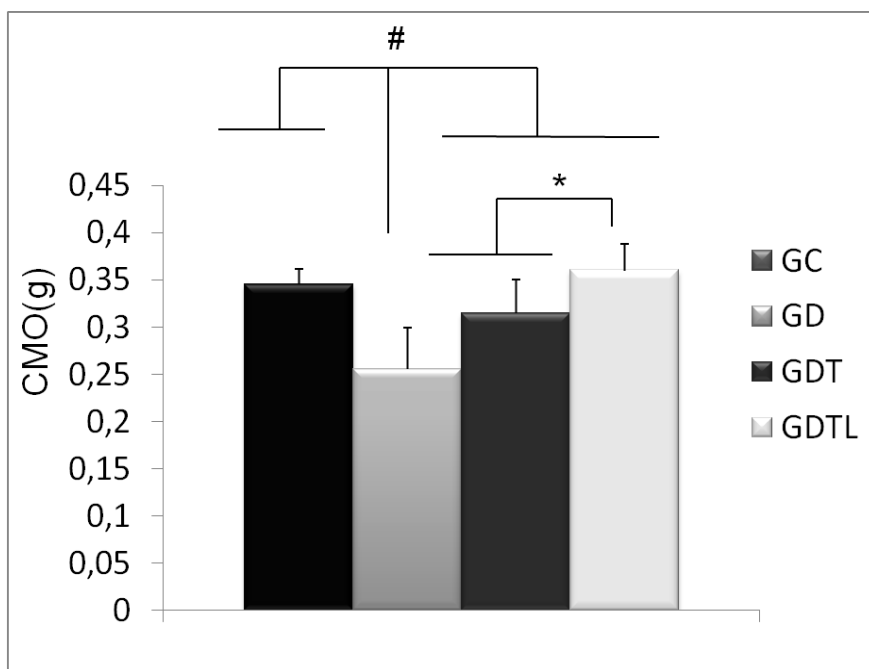


Figura 12. Densitometria óssea: Conteúdo mineral ósseo (CMO). Grupo controle (GC), grupo controle diabético (GD), grupo treinado diabético (TG) e grupo treinado e irradiado com laser diabético (GTL); ($p \leq 0,05$ * vs GTL e # vs GD).

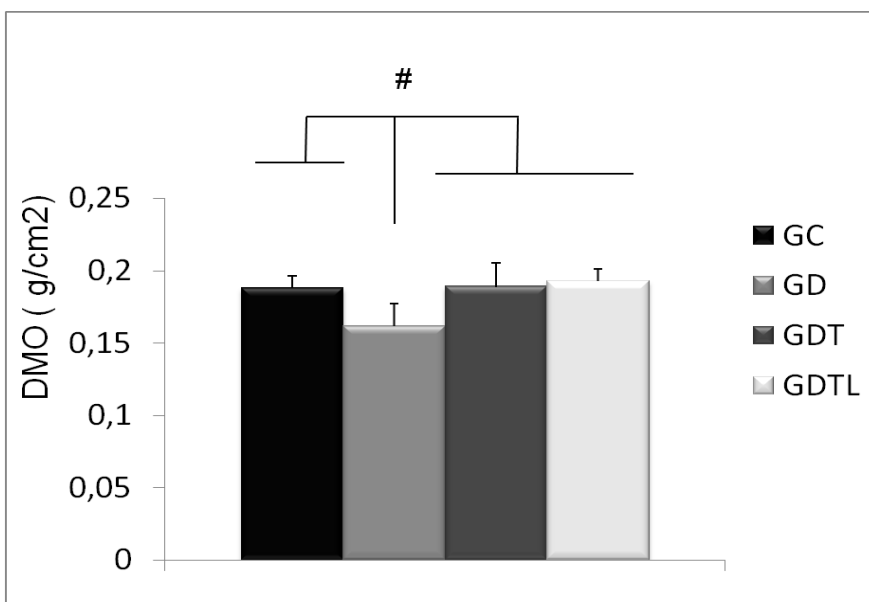


Figura 13. Densitometria óssea: Densidade mineral óssea (DMO Grupo controle (GC), grupo controle diabético (GD), grupo treinado diabético (TG) e grupo treinado e irradiado com laser diabético (GTL); ($p \leq 0,05$ # vs GD).

4. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta do tecido ósseo a um treinamento de resistência, associado ou não a laserterapia, em ratos diabéticos induzidos por STZ. Os principais resultados demonstraram que ambos os grupos treinados mostraram maior valor para a área cortical, imunexpressão RUNX-2, força de fratura, CMO e DMO comparado com o grupo controle diabético. Além disso, a LLLT associada ao ER foi capaz de aumentar o CMO, a rigidez e a força de fratura nos animais treinados de maneira mais expressiva.

No presente estudo, os animais submetidos ao treinamento físico resistido (ambos tratados e não tratados com LLLT) apresentaram aumento na ACT. A contração muscular durante o ER promove sinais endógenos que são captados principalmente pelos osteócitos, responsáveis por traduzir a força mecânica em sinais bioquímicos que regulam o remodelamento ósseo (TURNER e ROBLING, 2005; ELHABASHY *et al*, 2011; MAGGIO *et al*, 2011; JU *et al*, 2013). Assim, o aumento da ACT, após ER, pode ser associado ao aumento destes sinais endógenos determinando a deformação da matriz extracelular e alterações nas membranas celulares, o que culmina com a maior atividade dos osteoblastos e conseqüente melhora no *turnover* ósseo (TURNER e ROBLING, 2005; CHERIAN *et al*, 2003). No entanto, a laserterapia não mostrou um efeito adicional na análise morfométrica. Talvez os parâmetros utilizados neste estudo, possam ser a explicação para similaridade entre os grupos treinados. A ausência de estudos anteriores com a associação da LLLT ao ER em animais diabéticos dificulta a comparação dos resultados, em relação aos parâmetros dosimétricos do *laser* em relação aos empregados no presente estudo.

A fim de compreender os mecanismos moleculares da associação da LLLT ao ER, a imunexpressão de RUNX-2 e RANK-L foram analisadas. RUNX-2 é essencial para a diferenciação dos osteoblastos e a osteogênese, e regula a expressão de vários genes responsáveis por expressar proteínas durante a diferenciação das células ósseas (KOMORI, 2003). Na presença de DM, uma redução funcional dos osteoblastos é observada, com diminuição na expressão RUNX-2 (WONGDEE e CHAROENPHANDHU, 2011). Os resultados do presente estudo demonstraram que o treinamento de resistência estimulou a expressão deste imunomarcador, indicando o potencial bioestimulador do ER em provocar maior maturação e atividade osteoblástica. No entanto, a LLLT não foi capaz de aumentar a expressão de RUNX-2 nos animais treinados. Não é claro nesta fase por que estes resultados tenham ocorrido, mas pode ser sugerido que os parâmetros do *laser* utilizados em associação ao protocolo de exercício resistido, ou ainda o tempo experimental de 6 semanas não foram suficientes para estimular ainda mais a expressão de RUNX-2.

O RANK-L, uma citocina membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), foi analisado, visto que é um fator-chave para a diferenciação e ativação dos osteoclastos (KEARNS *et al*, 2008; ANANDARAJAH, 2009). A análise imunohistoquímica demonstrou resultados semelhantes de expressão de RANK-L nos grupos controle e treinados, no entanto expressão moderada foi observada no GD. Estes achados sugerem que o treinamento, com ou sem a irradiação *laser*, teve influência na linhagem monócito-macrófago, incluindo os macrófagos e os osteoclastos, que mantiveram sua função preservada no processo de remodelamento ósseo.

Lappin *et al*, 2009 avaliaram as concentrações plasmáticas de alguns marcadores ósseos como RANK-L e OPG em indivíduos com DM1 e observaram aumento na

concentração de RANK-L em relação aos indivíduos não diabéticos. Estudos que avaliaram a maior fragilidade óssea observada na DM1 atribuem esta alteração ao desequilíbrio no sistema RANK-L/OPG, que ocorre pela diminuição nos níveis séricos de osteoprotegerina (OPG) e pelo aumento na expressão de RANK-L (STARUP-LINDE, 2013). Bergström *et al.* (2012) observaram em seu estudo que o exercício físico aumentou os níveis de OPG, o que conseqüentemente agiu de forma inibitória em relação ao RANK-L e à osteoclastogênese, gerando aumento na DMO em mulheres após a menopausa. A DMO nos grupos treinados no presente estudo também se apresentou aumentada, o que pode ser atribuído a manutenção da atividade celular na reabsorção óssea, visto que houve a manutenção da expressão de RANK-L nos grupos treinados em relação ao GC.

O teste de flexão de três pontos mostrou que a DM induziu uma diminuição de propriedades biomecânicas do osso. Muitos estudos têm demonstrado que o metabolismo ósseo em diabéticos apresenta-se alterado, principalmente devido ao acúmulo dos produtos de glicação avançada (AGEs) e de adipócitos, que aliados à alteração microvascular e menor formação e atividade de osteoblastos, interferem negativamente nas propriedades mecânicas (WONGDEE e CHAROENPHANDHU, 2011; WANG *et al.*, 2008;. REDDY *et al.*, 2001). O tecido ósseo responde a forças externas e é capaz de adaptar-se a elas para aumentar a capacidade de suportar condições incrementais de carga (TURNER e ROBLING, 2003). Com o tempo, este processo conduz a um aumento da densidade óssea bem como suas propriedades biomecânicas em condições normais e patológicas, tais como a osteoporose e DM (BELOTTO *et al.*, 2010).

Da mesma forma, Erdal *et al.* (2011) investigaram as propriedades biomecânicas do fêmur e tíbia de ratos com DM induzida experimentalmente e descobriram que a DM reduziu a carga máxima, deformação na carga máxima e energia absorvida pelo fêmur e

tíbia em comparação aos controles, assim como no presente estudo no qual os animais com DM1 induzida por STZ apresentaram redução nas propriedades biomecânicas. O exercício físico de forma isolada promoveu aumento na força de fratura óssea, no entanto não interferiu nas demais propriedades biomecânicas. Estes resultados corroboram os de Verhaeghe *et al.* (2000), que também observaram que os animais diabéticos exercitados não apresentaram aumento nas propriedades biomecânicas do fêmur e tíbia. No entanto, a associação da LLLT aos exercícios resistidos foi eficaz em aumentar rigidez e força de fratura dos animais com DM, o que evidencia o efeito osteogênico da LLLT. Os efeitos da associação da LLLT e ER no metabolismo ósseo de animais com DM1 ainda não foram investigados, o estudo de Rennó *et al* (2006) avaliou os efeitos da associação da LLLT e do ER em animais osteopênicos, porém não evidenciou aumento adicional na propriedades biomecânicas ósseas após a terapia combinada, os autores atribuem a ausência de efeito adicional do LLLT à dose utilizada.

Diversos autores observaram diminuição da DMO na DM, o que predispõe à osteopenia e conseqüentemente à maior incidência de fraturas (THRAILKILL *et al.*, 2005; WONGDEE e CHAROENPHANDHU, 2011; STARUP-LINDE, 2013). A densitometria é um método confiável para analisar a massa óssea e o conteúdo mineral ósseo, Zhang *et al.* (2008) demonstraram uma diminuição da DMO femoral em animais diabéticos. Da mesma forma, a DM reduziu significativamente os valores densitométricos no presente estudo, fato que evidencia a ação negativa da hiperglicemia e insulinopenia no metabolismo ósseo.

Farrel *et al* (1999) demonstraram que oito semanas de treinamento físico resistido em ratos com DM por STZ resultaram em redução da glicemia e aumento de massa muscular. Visto que a contração muscular é um potente estímulo à formação óssea, com ER agindo na melhora do trofismo muscular (JOSHI *et al*, 2013;) tem-se um efeito direto

no metabolismo ósseo, culminado com o aumento da DMO, observada no presente estudo. Este resultado corrobora com os de Mathey *et al* (2001) que observaram que um protocolo de exercícios em esteira aumentou a DMO em ratos diabéticos obesos.

Entre as teorias que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais observados na DM, a formação dos AGEs é considerada uma das mais importantes (WONGDEE e CHAROENPHANDHU, 2011). O aumento na formação dos AGEs pode conduzir a deterioração das propriedades estruturais e mecânicas do osso, e, eventualmente, a uma diminuição da resistência do osso (SAITO *et al*, 2010). Assim, o controle glicêmico inadequado, e conseqüente aumento dos AGEs, contribui para diminuição na DMO na DM1 (JOSHI *et al*, 2013). Neste sentido o protocolo de exercícios, associado ou não ao LLLT utilizado, foi eficaz em reduzir a glicemia dos animais e assim diminuir o efeito negativo dos AGEs sobre o metabolismo ósseo, aumentando a DMO e CMO. Ainda tem-se, no presente estudo, que o CMO dos animais irradiados com *laser* e treinados mostrou-se elevado em comparação com GT, o que pode indicar um efeito adicional do *laser* ao treinamento resistido. Portanto, o aumento do CMO, associado à maior rigidez óssea no GTL, sugerem que houve uma maior deposição de matriz óssea pelas células osteoblásticas durante o remodelamento ósseo.

Assim, os resultados do presente estudo confirmam a hipótese de que o protocolo de exercício de resistência pode melhorar o metabolismo ósseo e reverter a diminuição da massa óssea devido a condição diabética. Já a hipótese de que a LLLT associado ao ER pudesse ter um efeito osteogênico potencializado não foi totalmente confirmada, uma vez que a laserterapia foi eficaz em potencializar somente alguns efeitos positivos do exercício, como o CMO e rigidez óssea.

Neste contexto, o ER melhorou o metabolismo ósseo em ratos diabéticos. Consequentemente, esta intervenção pode ser promissora para estimular o tecido ósseo em condições patológicas, como DM. Ainda, a LLLT foi capaz de melhorar todos os efeitos positivos do exercício físico. Como limitações, este estudo tem o relativo curto prazo de avaliação dos efeitos do exercício físico e a utilização de apenas uma fluência *laser*, assim, a informação sobre o desempenho em longo prazo destas terapias e maior quantidade de energia *laser* permanecem foco de estudo.

Em conclusão, o exercício de resistência melhorou o metabolismo do tecido ósseo, o que culminou com o aumento da densidade óssea. Além disso, a associação de exercícios físicos e laserterapia foi capaz de acelerar a atividade das células do osso e massa óssea. Consequentemente, estes dados evidenciam o potencial do exercício físico no tratamento da perda óssea devido à DM. Outros estudos de longo prazo devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre os estágios finais da terapia, sua interação com tecidos e outros parâmetros do *laser*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EINHORN, T.A.; BOSKEY, A.L.; GUNDBERG, C.M.; VIGORITA, V.J.; DEVLIN, V.J.; BEYER, M.M. The mineral and properties of bone in chronic experimental diabetes. J Orthop Res. V.6, p.317-323, 1988.
2. MATHIASSEN, B.; NIELSEN, S.; JOHANSEN, J.S.; HARTWELL, D.; DITZEL, J.; RODBRO, P.; CHRISTIANSEN, C. Long-term bone loss in insulin-dependent diabetic patients with microvascular complications. J Diabet Complications. V.4, p.145-149, 1990.

3. HONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA (2004): ONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis iabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinol.* V.145, p.447-452, 2004.
4. THRAILKILL K.M.; LUMPKIN, C.K.; BUNN, R.C.; KEMP, S.F.; FOWLKES, J.L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues *Am J Physiol Endocrinol Metab.* V.289, p.E735-E745, 2005.
5. WONGDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Osteoporosis in diabetes mellitus: possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes.* V.2(3), p.41-48, 2011.
6. JANGHORBANI, M.; VAN DAM, R.M.; WILLETT, W.C.; HU, F.B. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol.* V.166, p.495-505, 2007.
7. VESTERGAARD, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes-a meta-analysis. *Osteoporos Int.* v.18, p.427-444, 2007.
8. JOSHI, A.; VARTHAKAVI, P.; CHADHA, M.; BHAGWAT, N. A study of bone mineral density and its determinants in type 1 diabetes mellitus. *J Osteoporos.* V.2013, p.397814, 2013.
9. KAYAL, R.A.; ALBLOWI, J.; NANARAO KROTHAPALLI, E.M.; SILKMAN, L.; GERSTENFELD, L.; EINHORN, T.A.; GRAVES, D.T. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair. *Bone.* V.44(2), p.357-63, 2009.
10. STARUP-LINDE, J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol.* v.4, p.21, 2013.
11. BOTUSHANOV, N.P.; ORBETZOVA, M.M. Bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Folia Medica.* v.51, p.12-7, 2009.
12. BLAKYTNY, R.; SPRAUL, M.; JUDE, E.B. Review: The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds.* v.10(1), p.16-32, 2011.
13. DALY, R.; PETIT, M. Optimizing Bone Mass and Strength. The Role of Physical Activity and Nutrition during Growth. *Medicine Sports Science.* V.51, p.33-49, 2007.

14. SIGAL, R.J.; KENNY, G.P.; BOULEO, N.G.; WELLS, G.A.; PRUD'HOMME, D.; FORTIER, M.; REID, R.D.; TULLOCH, H.; COYLE, H.; PHILLIPS, P.; JENNINGS, A.; JAFFEY, J. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in Type 2 diabetes. *Ann Intern Med.* V.147, p.357–369, 2007.
15. CAIXETA, L.F.; ALEIXA A.A.R.; ABRAHÃO, G.S.; DE SIQUEIRA, D.P.P.; CARVALHO, L.C.; MATHEUS, J.P.C.; SHIMANO, A.C. Impact of the physical activity on mass bony of rats osteopenicas. *Revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP, Campinas*, v. 6, p. 261-271, 2008.
16. DUNCAN, N.D.; WILLIAMS, D.; LYNCH, G.S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology.* V.4, p.372-378, 1998.
17. WOOD, R.J.; O'NEILL, E.C. Resistance Training in Type II Diabetes Mellitus: Impact on Areas of Metabolic Dysfunction in Skeletal Muscle and Potential Impact on Bone. *Journal of Nutrition and Metabolism.* V.1, p.1-13, 2012.
18. FUJIMURA, R.; ASHIZAWA, N.; WATANABE, M.; MUKAI, N.; AMAGAI, A.; FUKUBAYASHI, T. et al. Effect of Resistance Exercise Training on Bone Formation and Resorption in Young Male Subjects Assessed by Biomarkers of Bone Metabolism. *Journal of Bone and Mineral Research.* V.12, p.656–662, 1997.
19. HENDERSON, N.K.; WHITE, C.P.; EISMAN, J.A. The roles of exercise and fall risk reduction in the prevention of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* V.27, p.369-87, 1998.
20. NOTOMI, T.; LEE, S.J.; OKIMOTO, N.; OKAZAKI, Y.; TAKAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, M. Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. *Eur J Appl Physiol.* V.82, p.268–274, 2000.
21. MAGGIO, A.B.R.; RIZZOLI, R. R. MARCHAND, L. M. FERRARI, S. BEGHETTI, M. FARPOUR-LAMBERT, N.J. Physical activity increases bone mineral density in children with type 1 diabetes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.44(7), p. 1206–1211, 2012.
22. ELHABASHY S.A.; SAID, O.M.; AGAIBY, M.H.; ABDELRAZEK, A.A.; ABDELHAMID, S. Effect of Physical Exercise on Bone Density and Remodeling in Egyptian Type 1 Diabetic Osteopenic Adolescents. *Diabetol Metab Syndr.* V.3, p.25, 2011.

23. GOMES, R.J.; MELLO, M.A.; CAETANO, F.H.; SIBUYA, C.Y.; ANARUMA, C.A.; ROGATTO, G.P.; PAULI, J.R.; LUCIANO, E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Hormone & IGF Research*. V.16, p.326-31, 2006.
24. VERHAEGHE, J.; THOMSEN, J.R.; VAN BREE, R.; VAN HERCK, E.; BOUILLON, R.; MOSEKILDE, A. Effects of Exercise and Disuse on Bone Remodeling, Bone Mass, and Biomechanical Competence in Spontaneously Diabetic Female Rats. *Bone*. V.27, p.249–256, 2000.
25. DALY, R.M.; DUNSTAN, D.W.; OWEN, N.; JOLLEY, D.; SHAW, J.E.; ZIMMET, P.Z. Does high-intensity resistance training maintain bone mass during moderate weight loss in older overweight adults with type 2 diabetes? *Osteoporos Int*. v.16(12), p.1703-12, 2005.
26. KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.28, p.159-160, 2010.
27. BAYAT, M.; ABDI, S.; JAVADIEH, S.; MOHSENIFAR, Z.; RASHID, M.R. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Bone in Diabetic and Nondiabetic Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.27(5), p.703–708, 2009.
28. JAVADIEH, F.; BAYAT, M.; ABDI, S.; MOHSENIFAR, Z.; RAZI, S. The effects of infrared low-level laser therapy on healing of partial osteotomy of tibia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. V.27(4), p.641–646, 2009.
29. STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts in Vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.23(2), p.161-6, 2005.
30. RENNO, A.C.; DE MOURA, F.M.; DOS SANTOS, N.S.; TIRICO, R.P.; BOSSINI, P.S.; PARIZOTTO, N.A. Effect of 830-nm laser light on preventing bone loss after ovariectomy. *Photomed Laser Surg*. V.24, p.642–645, 2006.
31. FÁVARO-PÍPI, E.; RIBEIRO, D.A.; RIBEIRO, J.U.; BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; TIM, C.; DE ARAÚJO, H.S.; RENNO, A.C. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.29, p.311-7, 2011.

32. ABDI, S.; BAYAT, M.; JAVADIEH, F.; MOHSENFAR, Z.; REZAIE, F.; BAYAT, M. The effects of helium-neon light therapy on healing of partial osteotomy of the tibia in streptozotocin induced diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.27, p.907-12, 2009.
33. AKYOL, U.K.; GÜNGÖRMÜŞ, M. Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. V.28(3), p.411-6, 2010.
34. COOMBE, A. R.; HO, C-T. G.; DARENDELILER, M. A.; HUNTER, N.; PHILIPS, J. R.; CHAPPLE, C.C.; YUM L.W.P. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res*. 4, 3–14, 2001.
35. HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology*. V. 29, p.16-31, 2004.
36. MEDALHA, C.C., AMORIM, B.O., FERREIRA, J.M., ET AL. Comparison of the effects of electrical field stimulation and low-level laser therapy on bone loss in spinal cord-injured rats. *Photomed Laser Surg*. V.28(5), p.669-674, 2010.
37. ANANDARAJAH, A.P. Role of RANKL in bone diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. V.20, p.88-94, 2009.
38. HONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA (2004): HONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinol*. V.145, p.447-452, 2004.
39. D'LOZANO, L.; FERNÁNDEZ-DE-CASTRO, S.; PORTAL-NÚÑEZ, A.; LÓPEZ-HERRADÓN, S.; DAPÍA, E.; GÓMEZ-BARRENA; ESBRIT, P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia *Br J Pharmacol*. V.162(6), p.1424–1438, 2011.
40. WOOD, R.J.; O'NEILL, E.C. Resistance Training in Type II Diabetes Mellitus: Impact on Areas of Metabolic Dysfunction in Skeletal Muscle and Potential Impact on Bone. *Journal of Nutrition and Metabolism*. V.1, p.1-13, 2012.

41. WEISS, R.E.; GORN, A.H.; NIMNI, M.E. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes*. V.30, p.670-7, 1981.
42. BELOTTO, M.F.; MAGDALON, J.; RODRIGUES, H.R.; VINOLO, M.A.R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C.; HATANAKA E. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*. V.162, p.237–243, 2010.
43. GORMAN, E.; CHUDYK, A.M.; MADDEN, K.M.; ASHE, M.C. Bone Health and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review *Physiother Can*. V.63(1), p.8–20, 2011.
44. KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENUK, P.J. Activator of Nuclear Factor B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocrine Reviews*. V.29, p.155-92, 2008.
45. WANG, W.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; YANG, J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*. V.338, p.115-122, 2010.
46. RATHMANN, W.; GIANI, G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. V.27(10), p.1047-1053, 2004.
47. REDDY, K. Photo biological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J. Clin. Laser Med. Surg*. V.22, p.141–150, 2004.
48. TURNER, C.H.; ROBLING, A.G. Exercises for improving bone strength. *British Journal of Sports Medicine*. V.39, p.188-189, 2005.
49. ERDAL, N.; GÜRGÜL, S.; KAVAK, S.; YILDIZ, A.; EMRE, M. Deterioration of Bone Quality by Streptozotocin (STZ)-Induced Type 2 DM in Rats. *Biological Trace Element Research*. V.140, p.342-353, 2011.
50. ZHANG, X.; FEI, Y.; ZHANG, M.; WEI, D.; LI, M.; DING, W. et al. Reversal of osteoporotic changes of mineral composition in femurs of diabetic rats by insulin. *Biological Trace Element Research*. V.121, p.233-42, 2008.
51. MATHEY, J.; HORCAJADA-MOLTENI, M.N.; CHANTERANNE, B.; PICHERIT, C.; PUEL, C.; LEBECQUE, P.; CUBIZOLES, C.; DAVICCO, M.J.; COXAM, V.; BARLET, J.P. Bone mass in obese diabetic. Zucker rats: Influence of treadmill running. *Calcil. Tissue Int*. v.70, p.305-11, 2002.

52. LAPPIN, D.F.; EAPEN, B.; ROBERTSON, D.; YOUNG, J.; HODGE, P.J. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* V.36(8), p.634-41, 2009.
53. FARRELL, P.A.; FEDELE, M.J.; HERNANDEZ, J.; FLUCKEY, J.D.; MILLER, J.L.; LANG, C.H. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. *J Appl Physiol.* V.87, p.1075-82, 1999.
54. SAITO, M.; MARUMO, K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* v.21, p.195-214, 2010.

PARTE III

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. ANEXOS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no modelo experimental utilizado neste estudo e nos resultados encontrados, pode-se concluir:

- A terapia *laser* Ga-Al-As de baixa intensidade (*Laser* DMC, classe 3B Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda 808 nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, densidade de potência de $3,57\text{W}/\text{cm}^2$, área do feixe de $0,028\text{cm}^2$, divergência de 1.5° , na fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$ e com tempo de irradiação de 33s, energia por ponto 3.3.J.), aplicada por 6 semanas, 3 vezes por semana, tem potencial osteogênico, estimulando a atividade dos osteoblastos e conseqüentemente aumentando a DMO.
- O modelo de ER em escalada melhorou o metabolismo do tecido ósseo, o que culminou com o aumento da DMO. Estes dados evidenciam o potencial do exercício físico no tratamento da perda óssea devido à DM.
- A associação de exercícios físicos e laserterapia levaram ao aumento no CMO e algumas da rigidez, no entanto não foi capaz de acelerar a atividade das células do osso ou aumentar a DMO. Outros estudos de longo prazo devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre os estágios finais da terapia, sua interação com tecidos e outros parâmetros do *laser*.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Em relação às perspectivas futuras, estudos realizando análises moleculares precisam ser desenvolvidos, com o intuito de melhor elucidar os mecanismos moleculares ativados pela irradiação *laser* durante o processo de diminuição de massa óssea na DM1. Assim como, estudos envolvendo modelos experimentais em humanos são necessários para confirmar os efeitos da LLLT associado ou não ao treinamento físico resistido, encontrados em animais e cultura de células, ajudando na seleção de protocolos de tratamento para a reabilitação do indivíduo com diabetes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. ABDI, S.; BAYAT, M.; JAVADIEH, F.; MOHSENIFAR, Z.; REZAIE, F.; BAYAT, M. The effects of helium-neon light therapy on healing of partial osteotomy of the tibia in streptozotocin induced diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.27, p.907-12, 2009.
11. ABOELASRAR, M.; FARID, S.; ELMARAGHY, M.; MOHAMEDEEN, A. Serum osteocalcin , zinc nutritive status and bone turnover in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr. Diabetes*. V.11, p.50, 2010.
12. ADA: American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care*. V.26, p.917-932, 2003.
13. AKYOL, U.K.; GÜNGÖRMÜŞ, M. Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. V.28(3), p.411-6, 2010.
14. ALBRIGHT, A.; FRANZ, M.; HORNSBY, G.; KRISKA, A.; MARRERO, D.; ULLRICH I. ACSM position stand on exercise and type 2 diabetes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 32(7), p.1345–1360, 2000.
15. AMD: AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Standards of medical care in diabetes-2009, *Diabetes Care*, v. 32, p. S13–S61, 2009.
16. ANANDARAJAH, A.P. Role of RANKL in bone diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. V.20, p.88-94, 2009.
17. ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type-1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. v. 358(9277), p.221-229, 2001.
18. BALDI, J.C.; SNOWLING, N. Resistance training improves glycaemic control in obese type 2 diabetic man. *Int J Sports Med*. V.24, p.419–423, 2003.
19. BAYAT, M.; ABDI, S.; JAVADIEH, S.; MOHSENIFAR, Z.; RASHID, M.R. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Bone in Diabetic and Nondiabetic Rats *Photomedicine and Laser Surgery*. V.27(5), p.703–708, 2009.

20. BELOTTO, M.F.; MAGDALON, J.; RODRIGUES, H.R.; VINOLO, M.A.R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C.; HATANAKA E. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*. V.162, p.237–243, 2010.
21. BERGSTRÖM, I.; BRINCK, J.; SÄÄF, M. Effects of physical training on bone mineral density in fertile women with idiopathic osteoporosis. *Clin Rheumatol*. V.27(8), p.1035-8, 2008.
22. BERGSTRÖM, I.; PARINI, P.; GUSTAFSSON, S.A.; ANDERSSON, G.; BRINCK, J. Physical training increases osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. V.30(2), p.202-7, 2012.
23. BLAKYTTY, R.; SPRAUL, M.; JUDE, E.B. Review: The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds*.v.10(1), p.16-32, 2011.
24. BLAYA, D.S.; GUIMARÃES, M.B.; POZZA, D.H.; WEBER, J.B.; DE OLIVEIRA, M.G. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract*. V.1;9(6), p.41-8, 2008.
25. BOS, M.; AGYEMANG, C. Prevalence and complications of diabetes mellitus in Northern Africa, a systematic review *BMC Public Health*. V.13, p.387, 2013.
26. BOSSINI, P.S.; RENNÓ, A.C.M.; RIBEIRO, D.A.; FANGEL, R.; RIBEIRO, A.C.; LAHOZ, M.A.; PARIZOTTO, N.A. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Experimental Gerontology*. V.47, p.136-42, 2012.
27. BOTOLIN, S.; FAUGERE, M.C.; MALLUCHE, H.; ORTH, M.; MEYER, R.; MCCABE, L.R. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology*. v.146(8), p.3622–3631, 2005.
28. BOTUSHANOV, N.P.; ORBETZOVA, M.M. Bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Folia Medica*. v.51, p.12-7, 2009.

29. BOULE, N.G.; KENNY, G.P.; HADDAD, E.; WELLS, G.A.; SIGAL, R.J. Meta-analysis of the effect of structured exercise training on cardiorespiratory fitness in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. V.46, p.1071–1081, 2003.
30. BOULTON, A.J.M.; What you can't feel can hurt you. *J Vasc Surg*. V.52(3), p.28S-30S, 2010.
31. CAIXETA, L.F.; ALEIXA A.A.R.; ABRAHÃO, G.S.; DE SIQUEIRA, D.P.P; CARVALHO, L.C.; MATHEUS, J.P.C.; SHIMANO, A.C. Impact of the physical activity on mass bony of rats osteopenicas. *Revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP, Campinas*, v. 6, p. 261-271, 2008.
32. CAMPBELL, I. W. Diabetic Foot Disease New Thoughts on Prevention and Treatment *British Journal of Diabetes and Vascular Disease*. V.11(2), p.53-54, 2011.
33. CASTANEDA, C.; LAYNE, J.E.; MUNOZ-ORIAN, L.; GORDON, P.L.; WALSMITH, J.; FOLDVARI, M.; ROUBENOFF, R.; TUCKER, K.L.; NELSON, M.E. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. V.25, p. 2335-41, 2002.
34. CHAU, D.L.; EDELMAN, S.V. CHANDRAN, M. Osteoporosis and diabetes. *Current Diabetes Reports*, v. 3(1), p. 37– 42, 2003.
35. CHERIAN, P.P.; CHENG, B.; GU, S.; SPRAGUE, E.; BONEWALD, L.F.; JIANG, J.X. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem*. V.278, p.43146-56, 2003.
36. CHOI, Y.J.; YANG, S.O.; SHIN, C.S.; CHUNG, Y.S. The importance of morphometric radiographic vertebral assessment for the detection of patients who need pharmacological treatment of osteoporosis among postmenopausal diabetic Korean women *Osteoporosis International*. V.23(8), p. 2099-2105, 2012.
37. COCA, S.G.; ISMAIL-BEIGI, F.; HAQ, N.; KRUMHOLZ, H.M.; PARIKH, C.R. Role of intensive glucose control in development of renal end points in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis intensive glucose control in type 2 diabetes. *Arch Intern Med*. V.28, p.761-9, 2012.

38. COE, L.M.; ZHANG, J.; MCCABE, L.R. Both spontaneous Ins2(+/-) and streptozotocin-induced type I diabetes cause bone loss in young mice. *J Cell Physiol.* V.228(4), p.689-95, 2013.
39. COLBERG, S. R.; SIGAL, R. J.; FERNHALL, B.; REGENSTEINER, J.G.; BLISSMER, B.J.; RUBIN, R.R.; CHASAN-TABER, L.; ALBRIGHT, A.L.; BRAUN, B. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and The American Diabetes Association: joint position statement executive summary. *Diabetes Care*, v. 33(12), p. 2692–2696, 2010.
40. COOMBE, A. R.; HO, C-T. G.; DARENDELILER, M. A.; HUNTER, N.; PHILIPS, J. R.; CHAPPLE, C.C.; YUM L.W.P. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res.* 4, 3–14, 2001.
41. CORNISH, J.; CALLON, K.E.; REID, I.R. Insulin increases histomorphometric indices of bone formation In vivo. *Calcif Tissue Int.* v.59, p.492-495, 1996.
42. D'LOZANO, D.E.; CASTRO, L.F.; DAPÍA, S.; ANDRADE-ZAPATA, I.; MANZARBEITIA, F.; ALVAREZ-ARROYO, M.V.; GÓMEZ-BARRENA, E.; ESBRIT, P. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology.* V.150(5), p.2027-35, 2009.
43. D'LOZANO, L.; FERNÁNDEZ-DE-CASTRO, S.; PORTAL-NÚÑEZ, A.; LÓPEZ-HERRADÓN, S.; DAPÍA, E.; GÓMEZ-BARRENA; ESBRIT, P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia *Br J Pharmacol.* V.162(6), p.1424–1438, 2011.
44. DA SILVA, R.V.; CAMILLI, J.A. Repair of Bone Defects Treated with Autogenous Bone Graft and Low-Power Laser. *J CranioFac Surg*, v. 17, p. 297-301, 2006.
45. DALY, R.M.; DUNSTAN, D.W.; OWEN, N.; JOLLEY, D.; SHAW, J.E.; ZIMMET, P.Z. Does high-intensity resistance training maintain bone mass during moderate weight loss in older overweight adults with type 2 diabetes? *Osteoporos Int.* v.16(12), p.1703-12, 2005.
46. DALY, R.; PETIT, M. Optimizing Bone Mass and Strength. The Role of Physical Activity and Nutrition during Growth. *Medicine Sports Science.* V.51, p.33-49, 2007.

47. DANAIEI, G.; FINUCANE, M.M.; LU, Y.; SINGH, G.M.; COWAN, M.J.; PACIOREK, C.P.; LIN, J.K.; FARZADFAR, F.; KHANG, Y. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. V.378, p.31–40, 2011.
48. DANIELSON, K.K.; ELLIOTT, M.E.; LECAIRE, T.; BINKLEY, N.; PALTA, M. Poor glycemic control is associated with low BMD detected in pre- menopausal women with type 1 diabetes. *Osteoporos. Int.* v.20, p.923–933, 2009.
49. DE ANGELIS, K.; OGAWA, T.; SANCHES, I.C.; RIGATTO, K.V.; KRIEGER, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Impairment on cardiac output and blood flow adjustments to exercise in Lname-induced hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. V.47(3), p.371-6, 2006.
50. DINIZ, J.S.; NICOLAU, R.A.; DE MELO, O.N.; DO CARMO MAGALHAES, F. DE OLIVEIRA PEREIRA, R.D.; SERAKIDES, R. Effect of low-power galliumaluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*. v.24, p.347-52, 2009.
51. DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MALLATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. V.11(6), p.540-5, 2000.
52. DUNCAN, N.D.; WILLIAMS, D.; LYNCH, G.S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. V.4, p.372-378, 1998.
53. DUNSTAN, D.W.; DALY, R.M.; OWEN, N.; JOLLEY, D.; DE COURTEN, M.; SHAW, J.; ZIMMET, P. High-intensity resistance training improves glycemic control in older patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. V.25, p.729–1736, 2002.
54. EINHORN, T.A.; BOSKEY, A.L.; GUNDBERG, C.M.; VIGORITA, V.J.; DEVLIN, V.J.; BEYER, M.M. The mineral and properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res*. V.6, p.317-323, 1988.

55. EINHORN, T.A.; BOSKEY, A.L.; GUNDBERG, C.M.; VIGORITA, V.J.; DEVLIN, V.J.; BEYER, M.M. The mineral and properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res.* V.6, p.317-323, 1988.
56. ELHABASHY S.A.; SAID, O.M.; AGAIBY, M.H.; ABDELRAZEK, A.A.; ABDELHAMID, S. Effect of Physical Exercise on Bone Density and Remodeling in Egyptian Type 1 Diabetic Osteopenic Adolescents. *Diabetol Metab Syndr.* V.3, p.25, 2011.
57. ERDAL, N.; GÜRGÜL, S.; DEMIREL, C.; YILDIZ, A. The effect of insulin therapy on biomechanical deterioration of bone in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Diabetes Res Clin Pract.* V.97(3), p.461-7, 2012.
58. ERDAL, N.; GÜRGÜL, S.; KAVAK, S.; YILDIZ, A.; EMRE, M. Deterioration of Bone Quality by Streptozotocin (STZ)-Induced Type 2 DM in Rats. *Biological Trace Element Research.* V.140, p.342-353, 2011.
59. ERIKSSON, J.; TAIMELA, S.; ERIKSSON, K.; PARVIAINEN, S.; PELTONEN, J.; KUJALA, U. Resistance training in treatment of non-insulindependent diabetes mellitus. *Int J Sports Med.* V.18, p.242–246, 1997.
60. ERIKSSON, J.; TUOMINEN, J.; VALLE, T.; SUNDBERG, S.; SOVIJARVI, A.; LINDHOLM, H.; TUOMILEHTO, J.; KOIVISTO, V. Aerobic endurance exercise or circuittype resistance training for individuals with impaired glucose tolerance? *Horm Metab Res.* V.30, p.37-41, 1998.
61. EXPERT COMMITTEE: The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* V.26, p.3160-3167, 2003.
62. FARRELL, P.A.; FEDELE, M.J.; HERNANDEZ, J.; FLUCKEY, J.D.; MILLER, J.L.; LANG, C.H. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. *J Appl Physiol.* V.87, p.1075-82, 1999.
63. FÁVARO-PÍPI, E.; RIBEIRO, D.A.; RIBEIRO, J.U.; BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; TIM, C.; DE ARAÚJO, H.S.; RENNO, A.C. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomedicine and Laser Surgery.* V.29, p.311-7, 2011.

64. FERRARESI, C.; OLIVEIRA, T.B.; ZAFALON, L.O.; REIFF, R.B.M.; BALDISSERA, V.; ANDRADE, S.E.P.; MATHEUCCI, J.R.E. PARIZOTTO, N.A. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. *Lasers Medicine Science*. V.26, p.349-58, 2011.
65. FUJIMURA, R.; ASHIZAWA, N.; WATANABE, M.; MUKAI, N.; AMAGAI, A.; FUKUBAYASHI, T. et al. Effect of Resistance Exercise Training on Bone Formation and Resorption in Young Male Subjects Assessed by Biomarkers of Bone Metabolism. *Journal of Bone and Mineral Research*. V.12, p.656–662, 1997.
66. GANDHI, A.; DOUMAS, J.C.; O'CONNOR, J.P.; PARSONS, R.; LIN, S.S. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healin. *Bone*. V.38(4), p.540–546, 2006.
67. GARAVELLO, I.; BARANAUSKAS, V.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol*. V.19(1), p.43-8, 2004.
68. GARAVELLO-FREITAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO, P.P. Low power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J. Photochem. Photobiol*. V.70, p.81–89, 2003.
69. GARCÍA-HERNÁNDEZ, A.; ARZATE, H.; GIL-CHAVARRÍA, I.; ROJO, R.; MORENO-FIERROS, L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*. V.50(1), p.276-88, 2012.
70. GEIRSDOTTIR, O.G.; ARNARSON, A.; BRIEM, K.; RAMEL, A.; JONSSON, P.V.; THORSDOTTIR, I. Effect of 12-week resistance exercise program on body composition, muscle strength, physical function, and glucose metabolism in healthy, insulin-resistant, and diabetic elderly Icelanders. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. v.67(11), p.1259-65, 2012.
71. GOMES, R.J.; MELLO, M.A.; CAETANO, F.H.; SIBUYA, C.Y.; ANARUMA, C.A.; ROGATTO, G.P.; PAULI, J.R.; LUCIANO, E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Hormone & IGF Research*. V.16, p.326-31, 2006.

72. GOODMAN, W.G.; HORI, M.T. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*. V.33, p.825-31, 1984.
73. GORMAN, E.; CHUDYK, A.M.; MADDEN, K.M.; ASHE, M.C. Bone Health and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review *Physiother Can*. V.63(1), p.8–20, 2011.
74. HAFFNER, S.M.; LEHTO, S.; RÖNNEMAA, T.; PYÖRÄLÄ, K.; LAAKSO, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. v. 339(4), p. 229-234, 1998.
75. HAMADA, Y.; KITAZAWA, S.; KITAZAWA, R.; FUJII, H.; KASUGA, M.; FUKAGAWA, M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone*. V.40, p.1408-1414, 2007.
76. HAMAJIMA, S.; HIRATSUKA, K.; KIYAMA-KISHIKAWA, M.; TAGAWA, T.; KAWAHARA, M., OHTA, M.; SASAHARA, H.; ABIKO, Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Medical Science*. V.18(2), p.78-82, 2003.
77. HAMED, E.A.; FADDAN, N.H.; ELHAFEEZ, H. A.; ANDSAYED, D. Parathormone–25(OH)-vitamin D axis and bone status in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr. Diabetes*. V.12, p.536–546, 2011.
78. HAMILTON, E.J.; RAKIC, V.; DAVIS, W. A.; CHUBB, S.A.P.; KAMBER, N.; PRINCE, R.L. A five-year prospective study of bone mineral density in men and women with diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Acta Diabetol*. V.49, p.153–158, 2012.
79. HE, H.; RONGKUN, L.; TESFAHUN, D.; CATALDO, L.; LOUIS, C.; DANA T. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinol*. V.145, p.447-452, 2004.
80. HENDERSON, N.K.; WHITE, C.P.; EISMAN, J.A. The roles of exercise and fall risk reduction in the prevention of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. V.27, p.369-87, 1998.

81. HERRERO, S.; CALVO, O.M.; GARCIA-MORENO, C.; MARTÍN, E.; SAN ROMÁN, J.I.; MARTÍN, M.; GARCÍA-TALAVERA, J.R.; CALVO, J.J.; DEL PINO-MONTES, J. Low bone density with normal bone turnover in ovariectomized and streptozotocin-induced diabetic rats. *Calcif Tissue Int.* v.62, p.260-265, 1998.
82. HERRIOTT, M.T.; COLBERG, S.R.; PARSON, H.K.; NUNNOLD, T.; VINIK, A.I. Effects of 8 weeks of flexibility and resistance training in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* V.27(12), p.2988-9. 2004.
83. HIGGINS, T.F.; JOHNSON, B.D. Effect of exogenous IGF-1 on chondrocyte apoptosis in a rabbit intraarticular osteotomy model. *J Orthop Res.* 28, 125-130, 2010.
84. HOFBAUER, L.C.; BRUECK, C.C.; SINGH, S.K.; DOBNIG, H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus, *Journal of Bone and Mineral Research*, v.22(9), p. 1317–1328, 2007.
85. HOLTEN, M.K.; ZACHO, M.; GASTER, M.; JUEAL, C.; WOJTASZEWSKY, J.F.; DELA, F. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signalling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* V.53, p.294–305, 2004.
86. HOLZHAUSEN, M.; GARCIA, D.F.; PEPATO, M.T.; MARCANTONIO, JR. E. The influence of short-term DM and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *JPeriodontal Res.* V.39, p.188-93, 2004.
87. HONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA (2004): ONGBING, H., L. RONGKUN, D. TESFAHUN, L. CATALDO, C. LOUIS, T. DANA. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis iabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinol.* V.145, p.447-452, 2004.
88. HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology.* V. 29, p.16-31, 2004.

89. HUANG, S.; KAW, M.; HARRIS, M.T.; EBRAHEIM, N.; MCINERNEY, M.F.; NAJJAR, S.M.; LECKA-CZERNIK, B. Decreased osteoclastogenesis and high bone mass in mice with impaired insulin clearance due to liver-specific inactivation to CEACAM1. *Bone*. V.46, p.1138-1145, 2010.
90. JANGHORBANI, M.; VAN DAM, R.M.; WILLETT, W.C.; HU, F.B. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*. V.166, p.495-505, 2007.
91. JAVADIEH, F.; BAYAT, M.; ABDI, S.; MOHSENFAR, Z.; RAZI, S. The effects of infrared low-level laser therapy on healing of partial osteotomy of tibia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. V.27(4), p.641–646, 2009.
92. JOO, Y.I.; SONE, T.; FUKUNAGA, M.; LIM, S.G.; ONODERA, S. Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone*. V.33, p.485–493, 2003.
93. JOSHI, A.; VARTHAKAVI, P.; CHADHA, M.; BHAGWAT, N. A study of bone mineral density and its determinants in type 1 diabetes mellitus. *J Osteoporos*. V.2013, p.397814, 2013.
94. JU, Y.; SONE, T.; OHNARU, K.; CHOI, H.; CHOI, K.; FUKUNAGA, M. Jump exercise during hindlimb unloading protect against the deterioration of trabecular bone microarchitecture in growing young rats. *SpringerPlus*. V.2, p.35, 2013.
95. JUSSI, T.; TUOMINEN, O.P.; PUUKKA, P.; MPOLSC, T.R. Bone Mineral Density in Patients With Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. V.22, p.1196–1200, 1999.
96. KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.28, p.159-160, 2010.
97. KARU, T. The science of low power laser therapy. Amsterdam: Gordon and Breach, 1998.
98. KARU, T.I. Molecular mechanisms of the therapeutic effects low intensity laser radiation. *Lasers Life Sciences*. V.2, p.53-74, 1989.

99. KATAYAMA, Y.; AKATSU, T.; YAMAMOTO, M.; KUGAI, N.; NAGATA, N. Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res.* V.11, p.931–937, 1996.
100. KATAYAMA, Y.; AKATSU, T.; YAMAMOTO, M.; KUGAI, N.; NAGATA, N. Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res.* V.11(7), p.931-7, 1996.
101. KAYAL, R.A.; ALBLOWI, J.; NANARAO KROTHAPALLI, E.M.; SILKMAN, L.; GERSTENFELD, L.; EINHORN, T.A.; GRAVES, D.T. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone.* V.44, p.357-363, 2009.
102. KAZEM SHAKOURI, S.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKZAMANI, Y.; OSKUIE, M.R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* v.25(1), p.73-7, 2010.
103. KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENUIK, P.J. Activator of Nuclear Factor B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocrine Reviews.* V.29, p.155-92, 2008.
104. KELLEY, G.A.; KELLEY, K.S. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins in adults with type 2 diabetes a metaanalysis of randomized-controlled trials. *Public Health.* V.121(9), p.643–655, 2007.
105. KENNEDY, A.; NIRANTHARAKUMAR, K.; CHIMEN, M.; PANG, T.T.; HEMMING, K.; ANDREWS, R.C.; NARENDRAN, P. Does exercise improve glycaemic control in type 1 diabetes? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* V.8(3), p. e58861, 2013.
106. KHADRA, M.; KASEM, N.; HAANAS, H.R.; ELLINGSEN, J.E.; LYNGSTADES, S.P. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* V.97, p.693– 700, 2004.
107. KLEIN, R.; KLEIN, B.E.K.; MOSS, S.E.; CRUICKSHANKS, K.J. The Wisconsin epidemiological study of diabetic retinopathy: XVII. The 14-year incidence and

progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type I diabetes. *Ophthalmology*. V.105, p.1801-15, 1998.

108. KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and Tissue Research*. V.339, p.189-195, 2010.
109. KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAIA laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol*. V.30, p.353-8, 2003.
110. KRONENBERG, H.; et al. *Williams Textbook of ENDOCRINOLOGY*. Capítulo 32. 12ª ed. Canadá. Elsevier, 2008.
111. LAPPIN, D.F.; EAPEN, B.; ROBERTSON, D.; YOUNG, J.; HODGE, P.J. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. V.36(8), p.634-41, 2009.
112. LIRANI-GALVÃO, A.P.; JORGETTI, V.; DA SILVA, O.L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg*. V.24(6), p.735-40, 2006.
113. LIU, X.; LYON, R.; MEIER, H.T.; THOMTZ, J.; HAWORTH, S.T. Effect of low-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed. Laser Surg*. V.25, p.487–494, 2007.
114. LU, H.; KRAUT, D.; GERSTENFELD, L.C.; GRAVES, D.T. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. V.144, p.346–352, 2003.
115. MACEY, L.R.; KANA, S.M.; JINGUSHI, S.; TEREK, R.M.; BORRETOS, J.; BOLANDER, M.E. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am*. V.71, p.722-733, 1989.
116. MAGGIO, A.B.R.; RIZZOLI, R. R. MARCHAND, L. M. FERRARI, S. BEGHETTI, M. FARPOUR-LAMBERT, N.J. Physical activity increases bone mineral density in children with type 1 diabetes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.44(7), p. 1206–1211, 2012.

117. MARWICK, T.H.; HORDERN, M.D.; MILLER T.; CHYUN, D.A.; BERTONI, A.G.; BLUMENTHAL, R.S.; PHILIPPIDES, G.; ROCCHINI, A. Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the american heart association. *Circulation*. v.119(25), p.3244–3262, 2009.
118. MASTRANDREA, L.D.; WACTAWSKI-WENDE, J.; DONAHUE, R.P.; HOVEY, K.M.; CLARK, A.; QUATTRIN, T. Young women with type 1 diabetes have lower bone mineral density that persists over time. *Diabetes Care*. V.31(9), p.1729-35, 2008.
119. MATHEY, J.; HORCAJADA-MOLTENI, M.N.; CHANTERANNE, B.; PICHERIT, C.; PUEL, C.; LEBECQUE, P.; CUBIZOLES, C.; DAVICCO, M.J.; COXAM, V.; BARLET, J.P. Bone mass in obese diabetic. Zucker rats: Influence of treadmill running. *Calcil. Tissue Int*. v.70, p.305-11, 2002.
120. MATHIASSEN, B.; NIELSEN, S.; JOHANSEN, J.S.; HARTWELL, D.; DITZEL, J.; RODBRO, P.; CHRISTIANSEN, C. Long-term bone loss in insulin-dependent diabetic patients with microvascular complications. *J Diabet Complications*. V.4, p.145-149, 1990.
121. MATSUMOTO, M.A.; FERINO, R.V.; MONTELEONE, G.F.; RIBEIRO, D.A. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med. Sci*. v.24(2), p.195-20, 2009.
122. MEDALHA, C.C., AMORIM, B.O., FERREIRA, J.M., ET AL. Comparison of the effects of electrical field stimulation and low-level laser therapy on bone loss in spinal cord-injured rats. *Photomed Laser Surg*. V.28(5), p.669-674, 2010.
123. MEHTA, S.K.; BREITBART, E.A.; BERBERIAN, W.S.; LIPORACE, F.A.; LIN, S.S. Bone and wound healing in the diabetic patient. *Foot Ankle Clin*. V.15(3), p.411-37, 2010.
124. MEIGS, J.B.; MITTLEMAN, M.A.; NATHAN, D.M.; TOFLER, G.H.; SINGER, D.E.; MURPHY-SHEEHY, P.M.; LIPINSKA, I. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis. The Framingham Offspring Study. *JAMA*. v. 283(2), p. 221-228, 2000.

125. MILLIKEN, L.A.; GOING, S.B.; HOUTKOOPER, L.B.; FLINT-WAGNER, H.G.; FIGUEROA, A.; METCALFE, L.L.; BLEW, R.M.; SHARP, S.C.; LOHMAN, T.G. Effects of exercise training on bone remodeling, insulin-like growth factors, and bone mineral density in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int.* v.72(4), p.478-84, 2003.
126. MONTEIRO-SOARES, M.; BOYKO, E.J.; RIBEIRO, J.; RIBEIRO, I.; DINIS-RIBEIRO, M. Risk stratification systems for diabetic foot ulcers: a systematic review. *Diabetologia.* V.54, p.1190–1199, 2011.
127. MOTYL, K.; MCCABE, L.R. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol Proced Online.* V.11, p.296-315, 2009.
128. MOYER-MILEUR, L.J.; SLATER, H.; JORDAN, K.C.; MURRAY, M.A. IGF-1 and IGF-binding proteins and bone mass, geometry, and strength: relation to metabolic control in adolescent girls with type 1 diabetes. *J Bone Miner Res.* V.23, p.1884–1891, 2008.
129. NAKAGAMI, T. Hyperglycaemia and mortality from all causes and from cardiovascular disease in five populations of Asia origin. *Diabetologia.* v. 47(3), p.385-394, 2008.
130. NALYSNYK, L.; HERNANDEZ-MEDINA, M.; KRISHNARAJAH, G. Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes Metab.* V.12(4), p.288-98, 2010.
131. NARAYANAN, R.P.; SIDDALS, K.W.; HEALD, A.H.; GIBSON, J.M. Interactions of the IGF System with Diabetes and its Vascular Complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013 Feb 21. [Epub ahead of print]
132. NICOLAU, R.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M.T.T.; REIS, L.M. ZÂNGARO, R.A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Medical Science.* V.18, p.89-94, 2003.
133. NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS, M.D.; YAFFE, A.; BINDERMAN, I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defect in rats. *J. Oral Rehabil.* V.33, p.619–624, 2006.

134. NOTOMI, T.; LEE, S.J.; OKIMOTO, N.; OKAZAKI, Y.; TAKAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, M. Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. *Eur J Appl Physiol.* V.82, p.268–274, 2000.
135. NYMAN, J.S.; EVEN, J.L.; JO, C.H.; HERBERT, E.G.; MURRY, M.R.; COCKRELL, G.E.; WAHL, E.C.; BUNN, R.C.; LUMPKIN, C.K. JR.; FOWLKES, J.L.; THRAILKILL, K.M. Increasing duration of type 1 diabetes perturbs the strength-structure relationship and increases brittleness of bone. *Bone.* V.48(4), p.733-40, 2011.
136. OCARINO NM. Atividade física no tratamento da osteoporose: histomorfometria do esqueleto axial e apendicular de ratas (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária). Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG. 78p, 2004.
137. OKUNO, S.; ISHIMURA, E.; TSUBONIWA, N.; NORIMINE, K.; YAMAKAWA, K.; YAMAKAWA, T. Significant inverse relationship between serum undercarboxylated osteocalcin and glycemic control in maintenance hemodialysis patients. *Osteoporos. Int.* V.24, p.605–612, 2013.
138. Oz, S.G.; Guven, G.S.; Kilicarlan, A.; Calik, N.; Beyazit, Y.; Sozen, T. Evaluation of bone metabolism and bone mass in patients with type-2 diabetes mellitus. *J. Natl. Med. Assoc.* v.98, p.1598–1604, 2006.
139. OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. *Bone.* V.22(4), p.347-54, 1998.
140. PARK, J.J.; KANG, K.L. Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med Sci.* v.27(1), p.223-302, 2012.
141. PENDSEY, S.P. Understanding diabetic foot *Int J Diabetes Dev Ctries.* V.30(2), p.75–79, 2010.
142. PICKERING, S.A.W.; SCAMMELL, B.E. Electromagnetic Fields for Bone Healing. *Lower Extremity Wounds.* V.1(3), p.152-60, 2002.

143. PIRES OLIVEIRA, D.A.; DE OLIVEIRA, R.F.; ZANGARO, R.A.; SOARES, C.P. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg.* V.26(4), p.401-4, 2008.
144. PIRES-OLIVEIRA, D.A.; OLIVEIRA, R.F.; AMADEI, S.U.; PACHECO-SOARES, C.; ROCHA, R.F. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis. *Osteoporos Int.* v.21(12), p.2109-14, 2010.
145. PRETEL, H.; LIZARELLI, R.F.; RAMALHO, L.T. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med.* V.39(10), p.788-96, 2007.
146. RÄKEL, A.; SHEEHY, O.; RAHME, E.; LELORIER, J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism*, v.34(3), p. 193–205, 2008.
147. RÉ POPPI, R.; DA SILVA, A.L.; NACER, R.S.; VIEIRA, R.P.; DE OLIVEIRA, L.V.; SANTOS DE FARIA JÚNIOR, N.; DE TARSO, P.C.C. Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808 nm and 660 nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy. *Lasers Med Sci.* v.26(4), p.515-22, 2011.
148. REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photo stimulation accelerates wound healing in diabetic rat. *Wound Repair and Regeneration.* V.9, p.248–255, 2001.
149. REDDY, K. Photo biological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J. Clin. Laser Med. Surg.* V.22, p.141–150, 2004.
150. RENNO, A.C.; DE MOURA, F.M.; DOS SANTOS, N.S.; TIRICO, R.P.; BOSSINI, P.S.; PARIZOTTO, N.A. Effect of 830-nm laser light on preventing bone loss after ovariectomy. *Photomed Laser Surg.* V.24, p.642–645, 2006.
151. RENNO, A.C.M.; McDoNNELL, P.A.; PARIZOTTO, N. A; LAAKSO, E.L. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation In Vitro. *Photomedicine Laser Surg.* V.25(4), p.275-80, 2007.
152. RETZEPI, M.; DONOS N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin. Oral Impl. Res.* V.21, p.673–681, 2010.

153. RUTTEN, S.; NOLTE, P.A.; GUIT, G.L.; BOUMAN, D.E.; ALBERS, G.H. Use of low-intensity pulsed ultrasound for posttraumatic nonunions of the tibia: a review of patients treated in the Netherlands. *J Trauma*. V.62(4), p.902-8, 2007.
154. SAITO, M.; MARUMO, K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. v.21, p.195-214,2010.
155. SANTANA, R.B.; XU, L.; CHASE, H.B.; AMAR, S.; GRAVES, D.T.; TRACKMAN, P.C. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*. V.52, p.1502-10, 2003.
156. SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2006.
157. SCHWETZ, V.; PIEBER, T.; OBERMAYER-PIETSCH, B. The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. *Eur J Endocrinol*. V.166(6), p.959-67, 2012.
158. SHIRES, R.; TEITELBAUM, S.L.; BERGFELD, M.A.; FALLON, M.D.; SLATOPOLSKY, E.; AVIOLI, L.V. The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral homeostasis in the rat. *J Lab Clin Med*. V.97, p.231-240, 1981.
159. SHU, A.; YIN, M.T.; STEIN, E.; CREMERS, S.; DWORAKOWSKI, E.; IVES, R. Bone structure and turnover in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos. Int*. v.23, p. 635–641, 2012.
160. SIGAL, R.J.; KENNY, G.P.; BOULE0, N.G.; WELLS, G.A.; PRUD'HOMME, D.; FORTIER, M.; REID, R.D.; TULLOCH, H.; COYLE, H.; PHILLIPS, P.; JENNINGS, A.; JAFFEY, J. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in Type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. V.147, p.357–369, 2007.
161. 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 Miner Res*. V.24(9), p.1618-27, 2009.

162. SILVA, R. V.; CAMILLI, J.A. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *The Journal of Craniofacial Surgery*. V.17(2), p.297-301, 2006.
163. SIMS, N.A.; GOOI, J.H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. V.19, p.444-451, 2008.
164. SINAKI M. Exercise and osteoporosis. *Arch Phys Med Rehabil*. V.70, p.220-9, 1989.
165. SONE, H.; TANAKA, S.; TANAKA, S.; SUZUKI, S.; SEINO, H.; HANYU, O.; SATO, A.; TOYONAGA, T.; OKITA, K.; ISHIBASHI, S.; KODAMA, S.; AKANUMA, Y.; YAMADA, N. Japan Diabetes Complications Study Group. Leisure-time physical activity is a significant predictor of stroke and total mortality in Japanese patients with type 2 diabetes: analysis from the Japan Diabetes Complications Study (JDACS). *Diabetologia*. V.56(5), p.1021-30, 2013.
166. STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J.D.; WENTWORTH, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. v. 16(2), p. 434-444, 1993.
167. STARUP-LINDE, J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol*. v.4, p.21, 2013.
168. STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts in Vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*. V.23(2), p.161-6, 2005.
169. STRATTON, I.M.; ADLER, A.I.; NEIL, H.A.; MATTHEWS, D.R.; MANLEY, S.E.; CULL, C.A.; HADDEN, D.; TURNER, R.C.; HOLMAN, R.R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. V.12, p.405-12, 2000.
170. SUZUKI, K.; MIYAKOSHI, N.; TSUCHIDA, T.; KASUKAWA, Y.; SATO, K.; ITOI, E. Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone*. V.33, p.108-114, 2003.

171. TAJALI, S.B.; EBRAHIMI, E.; KAZEMI, S.; BAYAT, M.; AZARI, A.; AZORDEGAN, F.; KAMALI, M.; HOSEINIAN, M. Effects of He-Ne laser irradiation on osteosynthesis. *Osteosynthesis and Trauma Care*. V.11, p.S17-S20, 2003.
172. TAJALI, S.B.; MACDERMID, J.C.; HOUGHTON, P.; GREWAL, R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. V.4, p.5-1, 2010.
173. THOMAS, D.T.; WIDEMAN, L.; LOVELADY, C.A. Effects of calcium and resistance exercise on body composition in overweight premenopausal women. *J Am Coll Nutr*. V.29(6), p.604-11, 2010.
174. THRAILKILL K.M.; LUMPKIN, C.K.; BUNN, R.C.; KEMP, S.F.; FOWLKES, J.L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues *Am J Physiol Endocrinol Metab*. V.289, p.E735-E745, 2005.
175. TONOLI, C.; HEYMAN, E.; ROELANDS, B.; BUYSE, L.; CHEUNG, S.S.; BERTHOIN, S.; MEEUSEN, R. Effects of different types of acute and chronic (training) exercise on glycaemic control in type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Sports Med*. V.42, p.1059–1080, 2012.
176. TURNER, C.H.; ROBLING, A.G. Exercises for improving bone strength. *British Journal of Sports Medicine*. V.39, p.188-189, 2005.
177. UMPIERRE, D.; RIBEIRO, P.A.; SCHAAN, B.D.; RIBEIRO, J.P. Volume of supervised exercise training impacts glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-regression analysis. *Diabetologia*. V.56(2), p.242-51, 2013.
178. UMPIERRE, D.; RIBEIRO, P.A.; KRAMER, C.K.; LEITÃO, C.B.; ZUCATTI, A.T.; AZEVEDO, M.J.; GROSS, J.L.; RIBEIRO, J.P.; SCHAAN, B.D. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. V.305(17), p.1790-9, 2011.
179. VAN DOOREN, F.E.; NEFS, G.; SCHRAM, M.T.; VERHEY, F.R.; DENOLLET, J.; POWWER, F. Depression and risk of mortality in people with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. V.8(3), p.e57058, 2013.

180. VANNI, A.C.; MEYER, F.; DA VEIGA, A.D.; ZANARDO, V.P. Comparison of the effects of two resistance training regimens on muscular and bone responses in premenopausal women. *Osteoporos Int.* v.21(9), p.1537-44, 2010.
181. VERHAEGHE, J.; THOMSEN, J.R.; VAN BREE, R.; VAN HERCK, E.; BOUILLON, R.; MOSEKILDE, A. Effects of Exercise and Disuse on Bone Remodeling, BoneMass, and Biomechanical Competence in Spontaneously Diabetic Female Rats . *Bone.* V.27, p.249–256, 2000.
182. VESTERGAARD, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes-a meta-analysis. *Osteoporos Int.* v.18, p.427-444, 2007.
183. VINIK, A.I.; MASER, R.E.; MITCHELL, B.D.; FREEMAN, R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care.* V.26(5), p.1553-79, 2003.
184. VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*, v. 69, p. 81-90, 2004.
185. WANG, W.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; YANG, J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry.* V.338, p.115-122, 2010.
186. WEISS, R.E.; GORN, A.H.; NIMNI, M.E. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes.* V.30, p.670-7, 1981.
187. WESTERLIND, K.C.; FLUCKEY, J.D.; GORDON, S.T.; KRAEMER, W.J.; FARRELL, P.A.; TURNER, R.T. Effect of resistance exercise training on cortical and cancellous bone in mature rats. *J Appl Physiol.* V.84, p.459–464, 1998.
188. WHO: World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Org. 1999.

189. WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. V.27, p.1047-1053, 2004.
190. WINTERS-STONE, K.M.; DOBEK, J.; NAIL, L.M.; BENNETT, J.A.; LEO, M.C.; TORGRIMSON-OJERIO, B.; LUOH, S.W.; SCHWARTZ, A. Impact + resistance training improves bone health and body composition in prematurely menopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *Osteoporos Int*. v.24(5), p.1637-46, 2013.
191. WINTERS-STONE, K.M.; SCHWARTZ, A.; NAIL, L.M. A review of exercise interventions to improve bone health in adult cancer survivors. *J Cancer Surviv*. V.4(3), p.187-201, 2010.
192. WONGDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Osteoporosis in diabetes mellitus: possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes*. V.2(3), p.41-48, 2011.
193. WOOD, R.J.; O'NEILL, E.C. Resistance Training in Type II Diabetes Mellitus: Impact on Areas of Metabolic Dysfunction in Skeletal Muscle and Potential Impact on Bone. *Journal of Nutrition and Metabolism*. V.1, p.1-13, 2012.
194. YANG, J.; ZHANG, X.; WANG, W.; LIU, J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochem Funct*. V. 28, p.334-341, 2010.
195. YAOITA, H.; ORIMO, H.; HIRAI, Y.; SHIMADA, T. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. V.18, p.63-70, 2000.
196. YARDLEY, J.E.; KENNY, G.P.; PERKINS, B.A.; RIDDELL, M.C.; BALAA, N.; MALCOLM, J.; BOULAY, P.; KHANDWALA, F.; SIGAL, R.J. Resistance versus aerobic exercise: acute effects on glycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. V.36(3), p.537-42, 2013.
197. YU, W.; NAIM, J.O.; LANZAFAME, R.J. Effects of photo stimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg. Med*. V.20, p.56-63, 1999.

198. ZANUSO, S.; BALDUCCI, S.; JIMENEZ, A. Physical activity, a key factor to quality of life in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* v.2(1), p.S24-8, 2009.
199. ZHANG, X.; FEI, Y.; ZHANG, M.; WEI, D.; LI, M.; DING, W. et al. Reversal of osteoporotic changes of mineral composition in femurs of diabetic rats by insulin. *Biological Trace Element Research.* V.121, p.233-42, 2008.
200. ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, D.; WANG, J.; ANDYANG, H. Prevalence and predictors of osteopenia and osteoporosis in post menopausal Chinese women with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* V.90, p.261–269, 2010.

ANEXO I

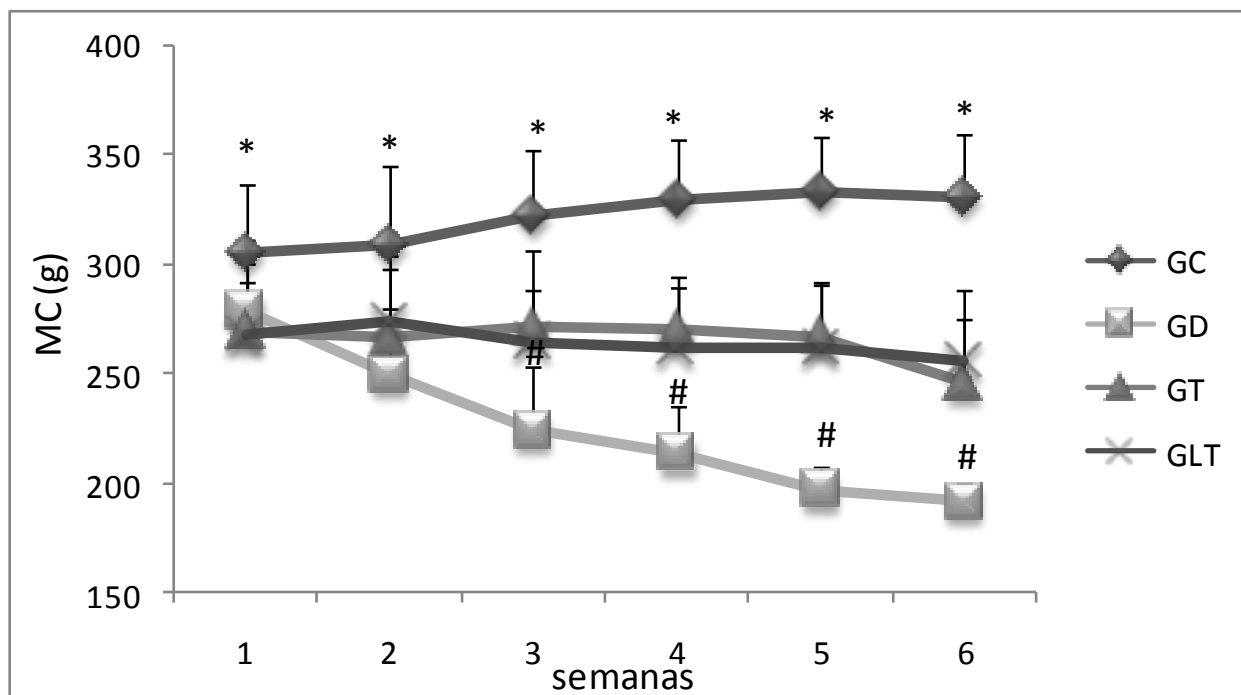


Figura 14. Massa corporal (MC) durante o período experimental. GC: grupo controle; GD: grupo diabético; GT: grupo treinado; GLT: grupo treinado e tratado com laser; $p \leq 0,05$; (* vs GC e # vs GD).

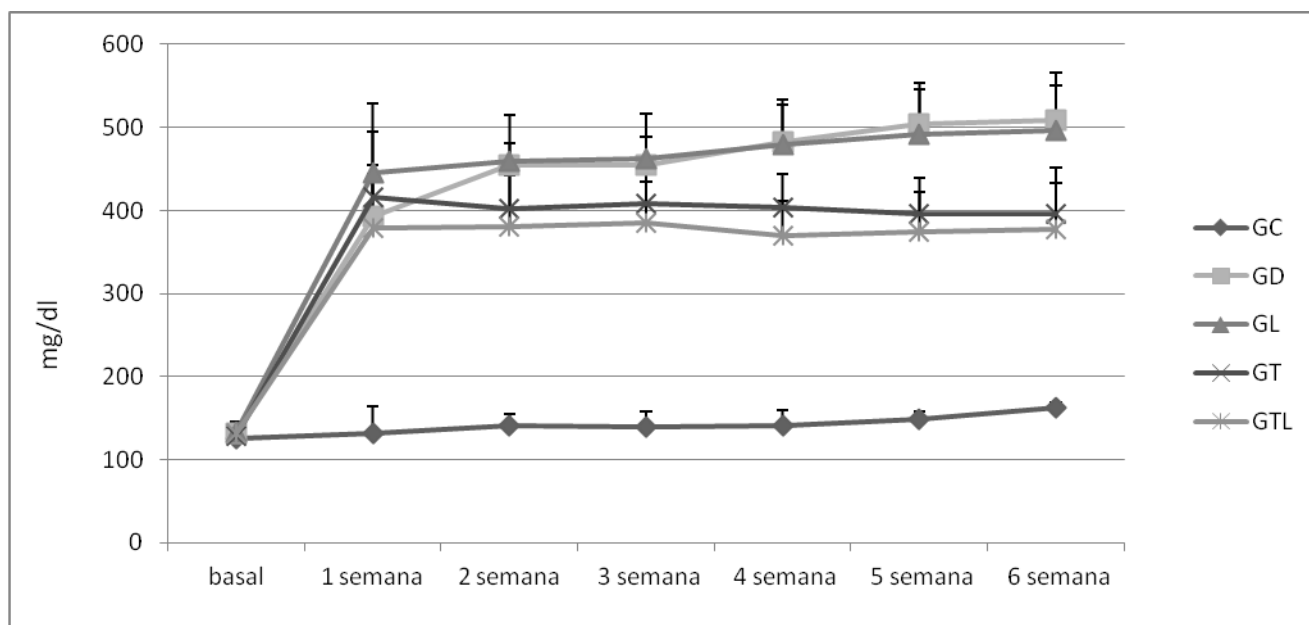


Figura 15. Níveis glicêmicos durante o período experimental. GC: grupo controle; GD: grupo diabético; GT: grupo treinado; GLT: grupo treinado e tratado com laser; $p \leq 0,05$; (* vs GC e # vs GD).

ANEXO II

Estudos sobre os efeitos do LLLT em metabolismo ósseo alterado.

Autor	Modelo experimental	Tempo experimental	Laser	Parâmetros laser	Principais resultados
Garavello <i>et al</i>, 2004	osteotomia	7 dias	He-Ne	633nm; 1mW; 31,5 e 94J/cm ²	Melhora na angiogênese
Rennó <i>et al</i>, 2006	ovarectomia	2 meses, 3 x por semana	Ga-Al-As	830nm; contínuo; 60 e 120J/cm ² ; 17 e 34s	↑ Força Máxima e Rigidez
Rennó <i>et al</i>, 2006	ovarectomia	2 meses, 3 x por semana	Ga-Al-As	830nm; contínuo; 120J/cm ² ; 34s	prevenir perda óssea de ratas ovariectomizadas.
Rennó <i>et al</i>, 2007	In vitro/ células ósseas	única dose	Ga-Al-As	830nm; 30, 50 e 10mW; 0,5, 1, 1,5 e 10J/cm ²	Aumento da proliferação de osteoblastos e da proliferação de osteosarcoma
Bayat <i>et al</i>, 2009	DM-STZ	14 dias consecutivos	He-Ne	632,8nm; contínuo; 10mW; 0,0314cm ² ; 28,6 e 382,2J/cm ² ; 90 e 1200s	↑ Força Máxima, Rigidez e Densidade lamelar na histologia
Javadieh <i>et al</i>, 2009	DM-STZ e osteotomia tibia	6 semanas, 3 x por semana	He-Ne	890nm; pulsado 3000Hz; 70W; 1cm ² ; 23,3 e 11,6J/cm ² ; 530 e 265s	↑ Força Máxima e Rigidez
Abdi <i>et al</i>, 2009	DM-STZ e osteotomia tibia	6 semanas, 3 x por semana	He-Ne	632,8nm; contínuo; 10mW; 0,0314cm ² ; 369,4 e 66,8J/cm ² ; 1166 e 210s	↑ Rigidez e Força Máxima

Diniz et al, 2009	Ovarectomia e bisfosfonato	8 semanas, a cada 48 horas	Ga-Al-As	830nm; contínuo; 50mW; 0,375cm ² ; 4J/cm ² ; 30s	Melhorou a osteopenia associado ao bisfosfonato
Medalha et al, 2010	lesão medular	4 semanas, 3 x por semana	GaAlAs	830 nm; contínuo; 0.028 cm ² ; 100mW; 30mW/cm ² ,	estímulo osteoblástico, melhora em alguns parâmetros biomecânicos
Park e Kang, 2010	DM-STZ , extração dental	3,5,7 e 14 dias, todos os dias	Ga-Al-As	980nm; contínuo; 100mW; 0,043cm ² ; 13,95J/cm ² ; 60s	Acelerou o processo de reparo ósseo
Pires-Oliveira et al, 2010	Ovarectomia e osteotomia tibia	21 dias, 11 sessões	AsGa	904nm; 50mW; 50mJ/cm ²	Acelerou o processo de reparo ósseo
Poppi et al, 2011	Ovarectomia e osteotomia fêmur	14 e 28 dias, diariamente	AsGaAl	808nm e 660nm; contínuo; 100mW; 0,03cm ² ; 133.3J/cm ² ; 40s	Acelerou o processo de reparo ósseo
Bossini et al, 2012	Ovarectomia e osteotomia tibia	imediatamente após a osteotomia e nos dias 2, 4, 6, 8, 10 and 12 após a cirurgia	AsGaAl	830nm; contínuo; 100mW; 0,028cm ² ; 60 e 120J/cm ² ; 17 e 34s	Acelerou o processo de reparo ósseo
Kang et al, 2012	lesão nervo ciático	2 semanas, 5 x por semana	minimally invasive laser needle system	660nm; contínuo; 10mW; 100µm; 30s	aumento camada cortical e DMO

ANEXO III

Estudos sobre os efeitos do exercício físico em metabolismo ósseo alterado.

Autor	Modelo experimental	Tempo experimental	Tipo de treinamento	Principais Resultados
Fujimura <i>et al</i>, 1997	humanos sedentários	4 meses 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação	↑ dos marcadores de formação óssea e DMO
Eliakim <i>et al</i>, 1997	ratos Sprague-Dawley	6 dias	treino aeróbico em esteira	↑ na IGF -I
Woitge <i>et al</i>, 1998	Homens Jovens	8 semanas, 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação ou treino aeróbico	↑ marcadores de formação óssea na unira
Umemura <i>et al</i>, 1997	ratos jovens	8 semanas, 5 x por semana	treino resistido com saltos	↑ massa e força óssea
Bennell <i>et al</i>, 2000	ratos Sprague-Dawley idosos	10 semanas; 3 x por semana	treino resistido de escalada	sem diferenças na análise biomecânica e raio-x
Verhaeghe <i>et al</i>, 2000	Ratas diabéticas	8 semanas, 5 x por semana	treino aeróbico em esteira	Perda óssea trabecular menos pronunciada
Kerr <i>et al</i>, 2001	Mulheres pós menopausa	2 anos, 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação	↑ na DMO
Notomi <i>et al</i>, 2001	ratos jovens	4 e 8 semanas, diariamente	escalada voluntária	↑ na DMO, CMO e formação óssea na análise histológica
Sinaki <i>et al</i>, 2002	Mulheres pós menopausa	2 anos, 3 x por semana	treino isométrico resistido	↑ na DMO, menos fraturas e manutenção da DMO após 8

				anos
Mathey et al, 2002	Ratos Zuker obesos e com DM II	89 dias, 6 x por semana	treino aeróbico em esteira	↑ na DMO
Matsuo et al, 2003	Ratos com injeção de glucocorticóides	8 semanas, diariamente	escalada voluntária e dieta hiperproteica	↑ conteúdo de cálcio ósseo e rigidez
Going et al, 2003	Mulheres pós menopausa com e sem reposição hormonal	12 semanas, 3 x por semana	treino resistido, treino aeróbico e alongamentos	↑ na DMO
Milliken et al, 2003	Mulheres pós menopausa com e sem reposição hormonal	1 ano, 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação	↑ na DMO sem alteração na IGF-I
Herriott et al, 2004	Humanos idosos com DM II	8 semanas, 3 x por semana	treino resistido e alongamentos	↑ de força e flexibilidade muscular
Yao et al, 2004	ratos jovens	5 semanas	treino aeróbico em esteira	↑angiogênese óssea
Stengel et al, 2005	Mulheres pós menopausa	12 semanas, 5 x por semana	treino resistido, treino aeróbico e alongamentos	↑ na DMO
Daly et al, 2005	Humanos idosos com DM II	6 meses, 3 x por semana	treino resistido e dietoterapia	Manutenção da DMO e CMO
Vieira et al, 2006	ratos jovens	5 semanas, 5 x por semana	treino aeróbico em esteira e LLLT	Otimização da via oxidativa, verificada pela inibição da lactato desidrogenase
Kerri et al, 2006	Mulheres pré menopausa	12 semanas, 3 x por semana	treino resistido com saltos	↑ na DMO
Renno et al, 2006	ratas ovariectomizadas	8 semanas, 3 x por semana	treino resistido com saltos LLLT (GaAIs contínuo, 830 nm, 0.6	↑ nas propriedades físicas e força óssea

			mm , 100 W/cm ² , 120 J/cm ² , 34s)	
Renno <i>et al</i>, 2007	ratas ovariectomizadas	8 semanas, 3 x por semana	treino resistido com saltos	↑ nas propriedades físicas e conteúdo de cálcio
Widrick <i>et al</i>, 2007	ratas ovariectomizadas	14 semanas, 5 x por semana	treino aeróbico em esteira e suplementação com alendronato	↑ massa e força muscular e força óssea
Caixeta <i>et al</i>, 2008	ovarectomia em ratas	9 semanas, 5 x por semana	treino aeróbico em esteira	manutenção das propriedades biomecânicas e homeostasia mineral
Bergström <i>et al</i>, 2008	humanos com osteoporose	12 meses, 5 x por semana	treino aeróbico de caminhada por 30min e treino resistido 25min	↑ na DMO
Kivelä <i>et al</i>, 2008	STZ-DM	um dia, 1 h	1 h exercício em esteira (21 m/min, 2.5° de inclinação)	↑ da capilaridade e ↑VEGF
Chuin <i>et al</i>, 2009	Mulheres pós menopausa	6 meses, 3 x por semana	treino resistido e antioxidantes	Manutenção da DMO
Teixeira <i>et al</i>, 2009	Mulheres pós menopausa com osteoporose	18 semanas, 2 x por semana	treino resistido, propriocepção e alongamentos	↑ na força muscular, equilíbrio, resposta motora e diminuição no número de quedas
Viboolvorakul <i>et al</i>, 2009	Ratos idosos	8 semanas, 5 x por semana	treino aeróbico de natação	↑ capilaridade vascular
Thomas <i>et al</i>, 2010	Mulheres pós menopausa	16 semanas, 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação e suplementação com cálcio	↑ na DMO e ↓ % gordura
Waltman <i>et al</i>, 2010	Mulheres pós menopausa sobreviventes de	24 meses, 2 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação e suplementação com cálcio, vitamina D e	↑ na DMO e fosfatase alcalina

	neoplasia em mama		risedronato	
Vanni <i>et al</i>, 2010	Mulheres pós menopausa	28 semanas, 3 x por semana	treino resistido em dois protocolos	↑ massa muscular e manutenção da DMO
Dominguez <i>et al</i>, 2010	ratos idosos	10 e 12 semanas, 5 x por semana	treino aeróbico em esteira e vasodilatador	↑ das propriedades ósseas e capilaridade óssea
Elhabashy <i>et al</i>, 2011	humanos com osteopenia e DM I	3 meses, 3 x por semana	treino aeróbico de caminhada	↑ da DMO e colágeno tipo 1 N-terminal
Ferraresi <i>et al</i>, 2011	humanos sedentários	12 semanas	treino resistido isocinético e LLLT	↑ da força muscular
Kukuljan <i>et al</i>, 2011	Homens Idosos	18 meses, 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação com suplementação de calcio-D3	↑ na DMO e força muscular
Bemben e Bemben, 2011	humanos idosos	40 semanas ; 2 e 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação	↑ na DMO
Winters-Stone <i>et al</i>, 2011	Mulheres pós menopausa sobreviventes de neoplasia em mama	1 ano, 3 x por semana	treino resistido, saltos e alongamentos	↑ na DMO e manutenção osteocalcina
MAGGIO <i>et al</i>, 2011	Crianças com DM I (7 a 12 anos)	9 meses, 2 x por semana	exercícios na educação física	↑ na DMO
Urtado <i>et al</i>, 2011	ratas ovariectomizadas	4 sessões a cada 3 dias	treino resistido de escalada associado ou não esteróides anabólicos androgênicos	↑ da sensibilidade a insulina
Geirsdottir <i>et al</i>, 2012	humanos com DM II	12 semanas, 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação	↑ da força muscular, sem alterações no metabolismo glicídico

De Marchi <i>et al</i>, 2012	humanos sedentários	única intervenção	teste ergométrico incremental em esteira e LLLT	Menor stress oxidativo e lesão muscular
Löfgren <i>et al</i>, 2012	Crianças 7 a 9 anos	4 anos, diariamente	exercícios na educação física	↑ na DMO
Bergström <i>et al</i>, 2012	Mulheres pós menopausa	1 ano, 3 x por semana	Exercício aeróbico e alongamentos	Manutenção da DMO, ↑OPG e melhora na OPG/RANK-L
Ju <i>et al</i>, 2013	ratos jovens	3 semanas, todos os dias	treino pliométrico, 30 pulos por dias	↑ do osso trabecular
Winters-Stone <i>et al</i>, 2013	Mulheres pós menopausa sobreviventes de neoplasia em mama	1 ano, 3 x por semana	treino resistido, saltos e alongamentos	↑ na DMO e massa muscular
Bocalini <i>et al</i>, 2013	Mulheres pós menopausa com e sem reposição hormonal	24 semanas, 3 x por semana	treino resistido em equipamentos de musculação	mudança na composição corporal, ↑ na força muscular e manutenção da DMO



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de Outubro de 2010.
CEP 1589/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANA CLAUDIA RENNO
Co-Investigadores:
Disciplina/Departamento: BIOCÊNCIAS/Eletrotermofototerapia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos do laser terapêutico de baixa intensidade e do treinamento resistido no metabolismo ósseo em ratos diabéticos".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental crônico em ratos machos Wistar (n=50).

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos do Laser Terapêutico de Baixa Intensidade -LLLT e treinamento físico associados ou não, na densidade mineral óssea, na expressão de fatores de crescimento e de transcrição relacionados à formação e reabsorção óssea, bem como na morfologia/morfometria e na resistência biomecânica óssea em ratos diabéticos.

RESUMO: Serão utilizados 50 ratos Wistar, com 3 meses de idade e com peso corporal entre 300-350 gramas no início do experimento, provenientes do CEDEME da Unifesp. Um grupo de 10 animais, após serem anestesiados, somente receberão a injeção de solução tampão citrato e irão compor o grupo controle sem diabetes (G1), os demais animais serão submetidos à indução do diabetes com streptozotocina; G2 controle com diabetes; G3, treinamento com diabetes; G4, diabetes com laser; G5, diabetes com laser e exercício. Os protocolos de tratamento com laser terapêutico de baixa intensidade se iniciarão 2 dias após a indução do diabetes e serão realizados a cada 3 vezes por semana em dias alternados. A irradiação será realizada do ponto médio de ambos os fêmures, entre o trôcanter maior e o côndilo lateral e no ponto medial de ambas as tíbias. A eutanásia dos animais acontecerá 12 horas após a última sessão de tratamento. O programa de treinamento consistirá de um programa de exercícios resistido, os ratos serão familiarizados com a escalada na escada de dedos com aparato com pesos seguro pela cauda. Um dia após o segundo procedimento de familiarização, os ratos dos grupos treinamento serão submetidos ao teste para determinação da carga de treinamento, com a medição do lactato plasmático antes e após o teste. A eutanásia dos animais será realizada por overdose de anestésico e acontecerá 12 horas após a última sessão de tratamento. Os resultados serão analisados estatisticamente.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A hipótese do estudo é de que o treinamento físico pode contribuir para a melhora da síntese e remodelamento ósseo, já que os benefícios do exercício físico são comprovados em indivíduos com



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

osteoporose, bem como que a atividade física é amplamente recomendado no tratamento de indivíduos com diabetes..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP.

CRONOGRAMA: 24 Meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Graduação.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 10/10/11 e 09/10/12.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1589/10