

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS PIPGCF UFSCar – UNESP

KARINA ANA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DOS TREINAMENTOS AERÓBICO, RESISTIDO E  
COMBINADO SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICAS E  
BIOMECÂNICAS ÓSSEAS DE RATOS OBESOS COM DIABETES  
*MELITTUS* TIPO 2 EXPERIMENTAL.**

SÃO CARLOS  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS PIPGCF UFSCar - UNESP

KARINA ANA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DOS TREINAMENTOS AERÓBICO, RESISTIDO E  
COMBINADO SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICAS E  
BIOMECÂNICAS ÓSSEAS DE RATOS OBESOS COM DIABETES  
*MELITTUS* TIPO 2 EXPERIMENTAL.**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Ciências Fisiológicas.

Orientação: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS  
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586i Silva, Karina Ana da  
Influência dos treinamentos aeróbico, resistido e combinado sobre as propriedades físicas e biomecânicas ósseas de ratos obesos com diabetes melittus tipo 2 experimental. / Karina Ana da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
85 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Exercício. 2. Fratura de fêmur. 3. Hiperglicemia. 4. Matriz óssea. 5. Ratos. I. Título.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

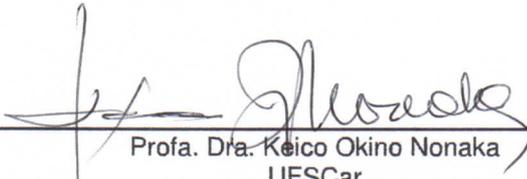
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

## Folha de Aprovação

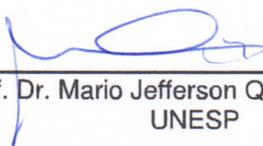
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Karina Ana da Silva, realizada em 12/08/2016:



---

Prof. Dra. Keiko Okino Nonaka  
UFSCar



---

Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada  
UNESP



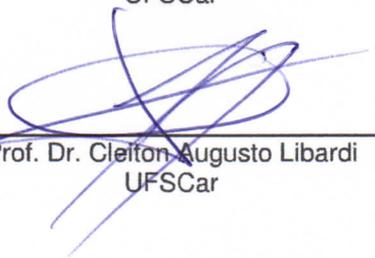
---

Prof. Dra. Fernanda Oliveira Duarte  
USP



---

Prof. Dra. Patricia Driusso  
UFSCar



---

Prof. Dr. Cleiton Augusto Libardi  
UFSCar

*Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!*

*Chico Xavier*

*Aos meus pais, Adão Horta e Maria Aparecida, pelo amor, carinho, educação,  
dedicação, incentivo e apoio incondicional nessa jornada.*

*Ao meu irmão, Paulinho pelo suporte e apoio nesta caminhada.*

AMO VOCÊS!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus, por sua presença constante, o apoio, força e direção a todos os objetivos conquistados até então;

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado neste programa de pós-graduação sob sua orientação;

Aos meus pais, Adão Horta e Maria Aparecida por tudo que fizeram e fazem por mim para que eu sempre esteja certa de que sou capaz de chegar onde quiser e por terem me dado suporte de todas as formas ao longo dessa caminhada acadêmica;

Ao meu irmão, Paulo Henrique, que apesar de distantes geograficamente, estamos sempre perto de coração apoiando-nos em tudo;

A minha grande amiga Cynthia Castro, companheira da graduação, mestrado e doutorado pelos momentos de alegrias, de tristezas, pelo apoio e conselhos memoráveis ao longo de todos esses anos.

Ao meu namorado Paulo Madiolo por ter suportado minhas chatices nos últimos anos dessa caminhada;

Às amigas feitas em São Carlos e especialmente as duas grandes amigas Fernanda Duarte e Marcela Fiorese pela parceria, risadas e indispensáveis auxílios durante essa caminhada.

As amigas do Califórnia, por sempre compreenderem a minha ausência desde o início da graduação até hoje;

Aos meus amigos G8 companheiros de graduação por vibrarem a cada passo dado e a cada objetivo conquistado ao longo de todos esses anos. TAMO JUNTO SEMPRE!!!

Aos alunos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Bruna Gabriele Biffe, Victor Fabrício e Leandro Dias Gonçalves Ruffoni pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Em especial a Bruna e o Victor pelo companheirismo, pelas conversas, troca de idéias, alegrias, tristezas e divertimentos compartilhados durante esse processo;

Aos alunos e colaboradores do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado ao Exercício José Alves (Fernande), Jorge Oishi, Caio e Bruno pelos auxílios e momentos de descontração durante o período experimental.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, especialmente ao Sr. Sérgio Dias, técnico do laboratório de Neuroendocrinologia. E ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar Alexandre Prata Vieira Chiva pelo apoio, esclarecimentos e presteza durante os anos de doutoramento.

À profa. Dr. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte pela parceria, amizade e por ter disponibilizado o Laboratório (Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado ao Exercício) para execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e a aluna Carol (Ana Carolina Baptista Moreno Martin) por ter disponibilizado o laboratório (Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar) e ajudado nas análises de zimografia.

Ao Prof. Dr. Mário Jefferson Louzada e a grande amiga Bruna Gabrielle Biffe pela realização da análise de densitometria óssea na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia, no departamento do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Araçatuba - SP.

A capes pelo auxílio financeiro (bolsa) concedido para o doutoramento.

## RESUMO

A obesidade é uma condição caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, sendo considerada o maior fator relacionado ao diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). O DMT2, um estado de hiperglicemia e resistência à insulina, frequentemente está associado a aumento do risco de fraturas ósseas. **Objetivos:** Investigar se três diferentes protocolos de exercício físico poderiam proteger o tecido ósseo de animais obesos com diabetes mellitus tipo 2 experimental. **Métodos:** Foram utilizados 80 ratos (45 dias de idade inicial) distribuídos em 2 grupos: dieta padrão (n=40) e dieta hiperlipídica (n=40). O diabetes foi induzido após 4 semanas de dieta hiperlipídica. Os ratos do grupo dieta hiperlipídica receberam uma dose de estreptozotocina (35 mg/kg) intraperitonealmente, e os animais do grupo dieta padrão receberam uma dose de tampão citrato (1ml/kg) intraperitonealmente, com jejum prévio. Foram considerados diabéticos animais com glicemia  $\geq 250$  mg/dL. Então foram distribuídos em 8 grupos (n=10 por grupo): controle sedentário saudável (CSS); treinamento resistido saudável (TRS); treinamento aeróbico saudável (TAS); treinamento combinado saudável (TCS); controle sedentário diabético (CSD); treinamento resistido diabético (TRD); treinamento aeróbico diabético (TAD); treinamento combinado diabético (TCD). O treinamento iniciou-se após a indução do diabetes e teve duração de 10 semanas, 3 dias por semana. **Resultados:** A massa corporal dos grupos diabéticos foi menor quando comparado aos animais dos grupos saudáveis ao final do experimento, apesar das calorias consumidas pelos animais com DMT2 experimental ter sido maior. O conteúdo mineral ósseo dos animais diabéticos foi menor do que o grupo sem diabetes. A densidade mineral óssea só não foi menor no grupo TRD. A rigidez e a carga máxima foi menor em todos os grupos com diabetes experimental quando comparada aos animais dos grupos sem diabetes. Os grupos com diabetes apresentaram menores valores para a atividade da MMP-2 em comparação aos grupos que não diabéticos. O diabetes parece induzir uma deterioração da qualidade óssea e o exercício resistido parecer proteger o tecido ósseo contra esses danos. **Conclusão:** Diabetes mellitus tipo 2 experimental afeta as propriedades biomecânicas, biofísicas do fêmur de ratos wistar e o treinamento de resistência atenua esses efeitos.

**Palavras chave:** exercício, resistência óssea, fratura de fêmur, hiperglicemia, matriz óssea e ratos.

## ABSTRACT

**Background:** Obesity is a condition characterized by an excessive amount of fat and has been considered an important factor for T2DM (type II Diabetes Mellitus) development. The T2DM, a state of hyperglycemia and insulin resistance, is often associated to an increased risk of bone fracture. **Research question:** investigate if three different physical exercise protocols could protect the bone tissue in obese rats with experimental type 2 diabetes mellitus. **Type of study:** Randomized controlled study **Methods:** Eighty male Wistar rats (45 days age at beginning of the experiment) were used. The animals were randomly distributed into 2 groups: control rats fed with standard diet (n=40) and rats fed palatable hyperlipidic diet. After 4 weeks of treatment to induce diabetes, high-fat diet rats received, with previous fasting, a dose of Streptozotocin 35 mg/kg body weight, intraperitoneally. Control rats received, with previous fasting, a dose of citrate buffer solution (1ml/kg) intraperitoneally. The animals were assigned to one of the ten groups (n=10 per group): non-diabetic sedentary (CSS); non-diabetic resistance training (TRS); non-diabetic aerobic training (TAS); non-diabetic combined training (TCS), Sedentary diabetic (CSD); resistance training diabetic (TRD); aerobic training diabetic (TAD); combined training diabetic (TCD). The training procedures were realized after induction of diabetes, during 10 weeks, 3 days/week. **Results:** Body mass of diabetic groups was lower when compared to those groups without diabetes, in spite of greater calories consumed. Diabetic groups showed lower bone mineral content values when compared non-diabetic group. The bone mineral density was lower in TRD group. The maximal load and stiffness in diabetic groups was lower than their respective groups without diabetes. Groups with experimental diabetes present lower values for MMP-2 activity compared non-diabetic groups. Diabetes seems to induce reduced bone quality and the resistance training demonstrated protect the bone from it. **Conclusion:** Experimental *diabetes mellitus* type 2 affects the biomechanical properties of femurs of Wistar rats and the resistance training improve such effects.

**Key Words:** exercise, bone resistance, femur fracture, hyperglycemia, bone matrix and rats.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Determinação das propriedades estruturais do tecido ósseo (adaptado de Ferreti et al., 2001). .....	26
Figura 2. representação esquemática do delineamento experimental .....	37
Figura 3. Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos.. .....	44
Figura 4. Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas .....	47
Figura 5. Representação gráfica dos valores da evolução ponderal da massa corporal .....	51
Figura 6. Representação gráfica dos valores de consumo alimentar diário (g/dia) e energético (KJ/g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: .....	52
Figura 7. Representação gráfica dos valores de glicemia pós dieta (mg/dL), pré exercício (mg/dL), e final (mg/dL), dos animais dos diferentes grupos experimentais: .....	53
Figura 8. Representação gráfica dos valores de insulinemia (ng/ml), dos animais dos diferentes grupos experimentais: .....	55
Figura 9. Representação gráfica dos valores de Área sob a curva (ASC) e glicemia (mg/ml), dos animais dos diferentes grupos experimentais .....	54
Figura 10. Representação gráfica dos valores de área (cm <sup>2</sup> ), conteúdo mineral ósseo (g) e densidade mineral óssea (g/cm <sup>2</sup> ) do fêmur direito dos animais dos diferentes grupos experimentais. ....	56
Figura 11. Representação gráfica dos parâmetros biométricos comprimento (mm), diâmetro menor (mm) e diâmetro maior (mm) do fêmur direito, dos animais dos diferentes grupos experimentais. ....	57
Figura 12. Representação gráfica dos parâmetros biofísicos porcentagem de água (%), porcentagem de material mineral (%), porcentagem de material orgânico (%), densidade mineral (g/cm <sup>3</sup> ), volume ósseo (cm <sup>3</sup> ) e densidade óssea (g/cm <sup>3</sup> ) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	60
Figura 13. Representação gráfica dos parâmetros biomecânicos carga máxima (N), rigidez (N/mm), carga máxima de fratura (N), tenacidade (J), resiliência (J) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	62
Figura 14. Representação gráfica dos parâmetros bioquímicos, cálcio (mg de cálcio <sup>++</sup> /osso) e fósforo (mg de P/osso) do fêmur direito dos animais dos diferentes grupos experimentais: .....	63

Figura 15. Análise da atividade proteolítica do extrato de tecido ósseo (tíbias esquerdas) por zimografia dos animais dos diferentes grupos experimentais .....64

Figura 16. Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais .....65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pesos dos femures utilizados nas fórmulas do princípio de Arquimedes. .58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

BMP (do inglês: bone morphogenetic protein)

C<sub>1</sub> Carga no Limite Elástico

C<sub>2</sub> Carga Máxima

C<sub>3</sub> Carga de Fratura

Ca Cálcio

Ca<sup>2+</sup> Cálcio Divalente

CaCl<sub>2</sub> Cloreto de Cálcio

Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> Hidroxiapatita

CEEA Comitê de Ética em Experimentação Animal

cm Centímetro

cm<sup>3</sup> Centímetro Cúbico

CMO conteúdo mineral ósseo

D<sub>1</sub> Deformação no Limite Elástico

D<sub>2</sub> Deformação na Carga Máxima

D<sub>3</sub> Deformação no Ponto de Fratura

D3 1,25-dihidroxivitamina

DM diabetes mellitus

DMO densidade mineral óssea

DMT1 diabetes *mellitus* tipo 1

DMT2 diabetes *mellitus* tipo 2

DNA ácido desoxirribonucleico

GLUT 4 transportador de glicose 4

EP Erro Padrão

g Gramas

GLUT 4 transportador de glicose 4

H<sub>2</sub>O Água

HFD do inglês *high fat diet*

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-1 interleucina 1

IL-2 interleucina 2

IL-6 interleucina 6

J Joules

kDa Quilo Dawton  
kg Quilogramas  
kgf Quilograma força  
MC Massa Corporal  
MED Média  
mg Miligramas  
min Minuto  
mm Milímetros  
mM Micro Molar  
MMP Metaloproteinases  
MMP-2 Metaloproteinases Tipo 2  
MMP-9 Metaloproteinases Tipo 9  
OMS Organização Mundial da Saúde  
2 N Dois Normal  
n Número de Animais  
N Newton  
OPG Osteoprotegerina  
pH Potencial de Hidrogênio  
Pi Peso Imerso  
Pm Peso do Material Mineral (cinzas)  
Ps Peso Seco  
PTH Hormônio da Paratireóide  
Pu Peso úmido  
RANK receptor ativador fator nuclear kB  
RANKL ligante do receptor ativador fator nuclear kB  
STZ estreptozotocina  
T Inclinação da Reta  
TNF- alfa fator de necrose tumoral alfa  
UA Unidades Arbitrárias  
v Volume  
vs Versus  
°C Graus Celsius  
μl Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
2.1 Geral.....	34
2.2 Específicos.....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 Modelos do Estudo .....	35
3.2 Animais.....	35
3.3 Protocolo Experimental.....	35
3.4 Eutanásia.....	37
3.5 Dieta .....	37
3.5.1 Dieta padrão.....	37
3.5.2 Dieta hiperlipídica.....	38
3.6 Indução do Diabetes tipo 2 .....	38
3.7 Controle de Massa Corporal e Consumo Alimentar .....	38
3.8 Controle da Glicemia.....	38
3.8.1 Teste de Tolerância à Insulina (ITT).....	39
3.8.2 Insulinemia .....	39
3.9 Protocolos de Treinamento .....	39
3.9.1 Treinamento Aeróbico .....	40
3.9.2 Treinamento Resistido .....	40
3.9.3 Treinamento Combinado.....	41
3.10 Experimentos e Coleta de Amostras.....	41
3.11 Densidade Mineral Óssea e Conteúdo Mineral Ósseo .....	41
3.12 Parâmetros biométricos.....	42
3.12.1 Massa corporal dos animais.....	42
3.12.2 Medidas do comprimento do fêmur direito .....	42
3.12.3 Medidas das espessuras das diáfises femorais .....	42
3.13 Parâmetros Biofísicos .....	42
3.14 Parâmetros biomecânicos ósseos.....	44
3.15 Bioquímica óssea .....	47
3.15.1 Cálcio e Fósforo .....	47
3.16 Zimografia de Gelatina .....	48
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
5.1 Massa Corporal.....	50

5.2 Consumo Alimentar e energético.....	52
5.3 Controle da Glicemia.....	52
5.4 Teste de Tolerância à Insulina (ITT) .....	53
5.5 Insulinemia.....	55
5.6 Densitometria Óssea (Dexa) .....	55
5.7 Parâmetros Biométricos .....	56
5.8 Parâmetros Biofísicos .....	57
5.9 Parâmetros Biomecânicos.....	61
5.10 Parâmetros Bioquímicos.....	63
5.9 Zimografia de Gelatina .....	63
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO .....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade na população levou a uma epidemia sem precedentes de diabetes mellitus tipo 2 e poderá ser seguido por uma epidemia de indivíduos doentes com as complicações da doença (MARWICK et al., 2009).

A obesidade é uma doença caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, sendo considerada o maior fator relacionado a doenças cardiovasculares e o principal componente da síndrome metabólica (YAN, 2007). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2015) estima-se que no mundo 2.8 milhões de pessoas morrem a cada ano, em decorrência do sobrepeso e obesidade. No Brasil, segundo a ABESO (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA-2010) na Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008-2009, realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e o Ministério da Saúde, analisando 188 mil brasileiros de todas as idades, mostrou que a obesidade e o sobrepeso tem aumentado drasticamente em todas as faixas etárias nos últimos anos. Dos números encontrados, 50% dos homens e 48% das mulheres se encontram com sobrepeso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres apresentam obesidade.

Tal síndrome, a obesidade, está amplamente associada a vários fatores de risco, que envolvem problemas cardíacos e outras doenças crônico-degenerativas, tais como dislipidemia, hiperinsulinemia, esteatose hepática não alcoólica e em especial o *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), diminuindo assim a expectativa de vida (FOSTER-SCHUBERT; CUMMINGS, 2006; MOHAMMAD; AHMAD, 2007).

A obesidade e o sobrepeso são os maiores fatores de risco associados à pacientes com diabetes mellitus (DM). Em 2014, estimava-se que havia no mundo 422 milhões de adultos com diabetes, contra 108 milhões em 1980. A prevalência global de diabetes quase duplicou desde 1980, passando de 4,7% para 8,5% na população adulta. Isso reflete um aumento dos fatores de risco associados, tais como o sobrepeso ou obesidade. Durante a última década, a prevalência de diabetes aumentou mais rapidamente nos países em desenvolvimento do que nos países desenvolvidos. Ainda, segundo a OMS (2016), o diabetes provocou 1,5 milhões de mortes em 2012. A glicose sanguínea acima do ideal causou um

adicional de 2,2 milhões de mortes aos números citados anteriormente, adicionalmente este quadro aumentou os riscos de doenças cardiovasculares entre outras complicações. Quarenta e três por cento desses 3,7 milhões de mortes ocorrem antes da idade de 70 anos. A percentagem de mortes atribuíveis à hiperglicemia ou diabetes que ocorre antes dos 70 anos é maior em países de baixa e média renda do que nos países de alta renda (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Em função do crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, aumento da obesidade e do sedentarismo, o número de diabéticos vem aumentando em larga escala nos últimos anos. Dessa forma, quantificar a prevalência da doença permite um melhor planejamento afim de melhor distribuir recursos. No Brasil, estimava-se a prevalência de DM na população adulta em 7,6% no final da década de 1980, e dados mais recentes demonstram números mais elevados, como 13,5% em São Carlos-SP e de 15% em Ribeirão Preto-SP. Em 2013, a estimativa era que mais de 11 mil pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos, estavam com diabetes no Brasil. Em um estudo multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes no Brasil apresentou que a idade tem grande influência na prevalência de DM e observou incremento de 2,7% na faixa etária de 30 a 59 anos para 17,4% na de 60 a 69 anos, ou seja, um aumento de 6,4 vezes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

O diabetes *mellitus* é um grupo de doenças metabólicas caracterizada por hiperglicemia resultando da inadequada ação ou, secreção da insulina, ou ambos. A hiperglicemia crônica, efeito comum no diabetes, resulta na alteração no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas podendo promover, a longo prazo, danos a outros órgãos como coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos. Dessa forma o DM requer contínuos cuidados médicos com estratégias multifatoriais além do controle glicêmico. Assim a educação e o auto cuidado do paciente, além do apoio ao mesmo são essenciais para a prevenção e redução de complicações agudas futuras (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015; THOMAS; PHILIPSON, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

### *Tipos de Diabetes Mellitus*

Até pouco tempo a classificação conceitual era que havia dois tipos principais de DM, o auto-imune e o não auto-imune, denominados, diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) e diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), respectivamente. Outros distúrbios metabólicos que provocavam alterações da regulação da glicemia eram classificadas em categorias especiais, principalmente aos relacionados a DMT2 tais como: monogênico, gestacional, induzido por esteróides, fibrose cística relacionada a pós- pancreactomia, associados à acromegalia, HIV, hepatite C, síndrome do ovários policístico e diabetes suscetível à cetose (THOMAS; PHILIPSON, 2015).

Atualmente segundo American Diabetes Association (2015) o *diabetes mellitus* pode ser classificado nas seguintes categorias: diabetes tipo 1 (devido à destruição das células b , geralmente levando a deficiência absoluta de insulina ); diabetes tipo 2 (devido a um defeito de secreção de insulina progressiva no fundo de resistência à insulina); diabetes mellitus gestacional (DMG) (diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez que não é claramente detectado o diabetes); tipos específicos de diabetes devido a outras causas, por exemplo, síndromes monogênicas diabéticas (tais como diabetes neonatal e diabetes MODY do inglês maturity-onset diabetes of the young), doenças do pâncreas exócrino (tais como fibrose cística) utilização de drogas - ou diabetes induzida por químicos (tais como no tratamento do HIV / SIDA ou após transplante de órgãos).

O DMT1 presente em 5% a 10% dos casos, resulta da destruição de células betapancreáticas com conseqüente deficiência de insulina, com tendência a cetoacidose. Esta destruição, em grande parte, é mediada pela autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos como forma idiopática de DM1. Os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B) e antitransportador de zinco (Znt) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

A destruição das células beta pode ser a variável mais comumente acelerada em crianças e mais lenta e progressiva em adultos, sendo chamada de diabetes autoimune latente do adulto (LADA, do inglês, latent autoimmune diabetes in adults). Alguns indivíduos, principalmetne crianças e adolescentes, apresentam cetoacidose com manifestação primária da doença; outros podem apresentar

hiperglicemias modestas, podendo mudar rapidamente para severas hiperglicemias e, ou, cetoacidose, na presença de infecção e outros estresses. A destruição autoimune das células beta podem ter predisposições genéticas além de estar relacionadas a fatores ambientais ainda não esclarecidos totalmente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011, 2012, 2015). Indivíduos com DMT1 necessitam de administração de insulina para regular a glicemia, não há chances de sobrevivência caso isso não seja possível. Os sintomas neste caso incluem micção excessiva e sede, fome, perda de peso, alteração da visão e fadiga (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O DMT2 está presente em 90% a 95% dos casos diagnosticados e caracteriza-se pela inadequada ação e secreção de insulina. Por muitas razões, as células não conseguem metabolizar a glicose presente na corrente sanguínea, apesar da contínua produção de insulina pelo pâncreas. Essa anomalia é chamada de “resistência insulínica”. Entretanto ambas inadequações podem estar presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém um pode prevalecer sobre o outro. Em sua maioria, indivíduos com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, a cetoacidose raramente se desenvolve de modo espontâneo, ocorrendo apenas quando se associa a outras condições, como infecções. O DMT2 pode ocorrer em qualquer idade, mas geralmente pode ser diagnosticado após os 40 anos. A hiperglicemia no DMT2 geralmente se desenvolve de forma gradual, não sendo suficiente nos estágios iniciais para promover o aparecimento dos sintomas clássicos. A causa desse desenvolvimento gradual é a evolução da doença que se inicia com leve resistência à ação da insulina, podendo culminar com a deficiência da produção dessa (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009, 2011). Os indivíduos não são dependentes de insulina exógena para sobreviver, mas esse tratamento pode ser utilizado para um melhor controle metabólico (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

*O modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina e dieta hiperlipídica*

A ação diabetogênica da estreptozotocina (STZ), substância isolada do *Streptomyces achromogenes*, foi descrita inicialmente por Rakieten et al. (1963) e depois por Evans et al., (1965). A injeção intravenosa de soluções de STZ induziu

diabetes em ratos e cães e, a partir desses achados, o diabetes passou a ser induzido com sucesso em diferentes modelos experimentais. Os mecanismos da ação diabetogênica da STZ estão relacionados à citotoxicidade e glicosilação de proteínas das ilhotas pancreáticas, uma vez que STZ inibe seletivamente a enzima O-glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GLcNAC), responsável pela remoção de N-acetilglucosamina da proteína. Tal ação causa apoptose das células beta pancreáticas (KONRAD et al., 2001), e promove lesão das mesmas, por reduzir os níveis de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) disponível nessas células (AKBARZADEH et al., 2007).

Estudos relatam que animais que receberam uma dieta rica em gordura (HFD) desenvolvem resistência à insulina, mas não propriamente a hiperglicemia ou diabetes. Dessa forma tais estudos sugerem que a oferta da HFD pode ser uma maneira adequada para iniciar a resistência à insulina, uma das características importantes encontradas no DMT2. Assim sendo, a estreptozotocina é largamente utilizada para reproduzir tanto do DMT1 e DMT2 por induzir a morte celular por meio da  $\beta$  alquilação do DNA. Dessa forma a STZ quando administrada em baixa dose, adicionalmente, após um período de oferta de dieta hiperlipídica é eficiente para o desenvolvimento do quadro de DMT2 experimental em ratos (ZHANG et al., 2008).

Em um outro trabalho, SRINIVASAN et al., (2005) utilizaram ratos machos Sprague–Dawley que receberam dieta hiperlipídica e posteriormente uma dose intraperitoneal de STZ (35mg/ Kg de massa corporal) para simular o *diabetes mellitus* tipo 2, protocolo semelhante ao utilizado neste estudo. Os pesquisadores demonstraram que esta associação foi eficiente em provocar a doença nesses animais e pode ser utilizada como alternativa para o desenvolvimento de tratamentos para o *diabetes mellitus* tipo 2.

Quanto aos efeitos do *diabetes mellitus* tipo 2 sobre o tecido ósseo, segundo Antonopoulou et al. (2013), o *turnover* ósseo pode ser alterado pela glicemia, prejudicando a função dos osteoblastos, possivelmente promovendo fragilidade óssea em indivíduos com DMT2.

### *Tecido Ósseo*

O osso é um tecido conjuntivo dinâmico que proporciona a integridade mecânica, locomoção e proteção. E está envolvido com a manutenção da

homeostase metabólica mineral, e é local principal da hematopoiese (SUOMINEN, 2006). Além disso, os ossos são alavancas rígidas que devem ser capazes de resistir à deformação. Sendo metabolicamente ativo, esse tecido é capaz de adaptar sua estrutura a estímulos mecânicos e a energia absorvida, imposta pela carga do impacto, não pode ser destruída, armazenada ou dissipada. Assim, o osso também deve ser flexível ao absorver essa energia, alterando sua forma sendo capaz de sofrer compressão e tensão sem sofrer qualquer fissura. Dessa forma, o osso deve ser capaz de reparar danos estruturais através do processo de remodelação. Os ossos da maioria dos mamíferos possuem quatro superfícies ósseas onde a formação ou remoção do tecido pode ocorrer: perióstio, endocortical, trabecular e intracortical. Não obstante, o osso também deve ser leve para facilitar a mobilidade (BILEZIKIAN, J. P. , RAISZ, L. G. AND MARTIN, 2008; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006).

O tecido ósseo possui uma matriz extracelular composta por material mineral, colágeno, água, proteínas não colágenas e lipídios, que diminuem proporcionalmente dependendo da idade e espécie. Tais componentes têm funções metabólicas e mecânicas no osso (BOSKEY; ROBEY, 2013). A fase mineral ou inorgânica é constituída por pequenos cristais de hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO})_6(\text{OH})_2$ ] formados por cálcio, fosfato e carbonato, e quantidades reduzidas de magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor. A função da fase mineral é dar maior suporte ao colágeno, proporcionando maior resistência mecânica e servir como reservatório de cálcio, fosfato e ions magnésio para o equilíbrio mineral (BOSKEY; ROBEY, 2013; FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006). A fase orgânica, em conjunto com a mineral, determina a estrutura e as propriedades mecânicas e biomecânicas do osso. Formado por cerca de 98% de colágeno tipo I e proteínas não colágenas e os 2 % restantes determinados pelos três tipos células ósseas. Os osteoblastos, que são células de origem mesenquimal, secretam uma matriz não mineralizada denominada osteóide que, eventualmente, se mineraliza para a formação do osso maduro. Os osteoclastos, que são células ósseas de origem hematopoética, promovem a reabsorção óssea pela secreção de ácidos específicos e proteases. Os osteócitos são osteoblastos diferenciados que foram circundados por matriz mineralizada. Cada uma destas células se comunica umas com as outras de forma direta ou através de moléculas de sinalização. Essas células, em conjunto

são responsáveis pela reabsorção e formação deste tecido, conhecido como remodelamento ou *turnover* ósseo (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006).

O *turnover* ou remodelamento ósseo é importante para a manutenção da resistência óssea, regular a homeostase de cálcio e reparar microdanos ocorridos ao suportar pesos diariamente. Acredita-se que, por ano, ocorra 10% de renovação de todo o esqueleto. Esse remodelamento ocorre respeitando quatro etapas: ativação ou quiescência, reabsorção, reversão e formação, buscando principalmente o equilíbrio de cálcio e fósforo sistêmico e reparar danos causados no próprio tecido. O processo de remodelamento ósseo também é utilizado em casos excepcionais de necessidades fisiológicas de mobilização de cálcio (BRANDI, 2009; ROSEN, 2008).

Em situações normais, a reabsorção óssea e a formação óssea estão diretamente ligadas a processos temporários, que ocorrem por um grupo de osteoclastos e osteoblastos, que substituem ossos antigos por novos ossos, chamados de unidades básicas multicelulares (KLEIN-NULEND; BACABAC; MULLENDER, 2005).

O processo de remodelamento ósseo permite ao tecido adaptar sua estrutura e massa interna às solicitações mecânicas para garantir uma maior resistência com um mínimo de massa óssea. Além destas cargas mecânicas, a taxa de remodelamento ósseo e a atividade celular óssea são reguladas principalmente por hormônios como o estrogênio e o hormônio da paratireoide (PTH) (KLEIN-NULEND; BACABAC; MULLENDER, 2005). Estímulos sistêmicos como PTH ou locais como tensão mecânica ou microdanos, podem iniciar o processo de remodelamento ósseo. A liberação de hormônios PTH, 1,25 diidroxivitamina D e outras substâncias como interleucinas (IL) 1, 2, 6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) promovem aumento da produção de RANKL (ligante do receptor ativador fator nuclear kB) pelos osteoblastos, que se ligam ao seu receptor RANK nas membranas das células hematopoiéticas precursoras, tornando os osteoclastos ativos. Substâncias que promovem a inibição da reabsorção, como estrogênio e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), estimulam a produção de osteoprotegerina (OPG) inibidor de RANK, que captura o RANKL, impedindo sua ligação ao seu receptor, diminuindo dessa forma, os osteoclastos ativos e induzindo a apoptose de osteoclastos maduros (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006).

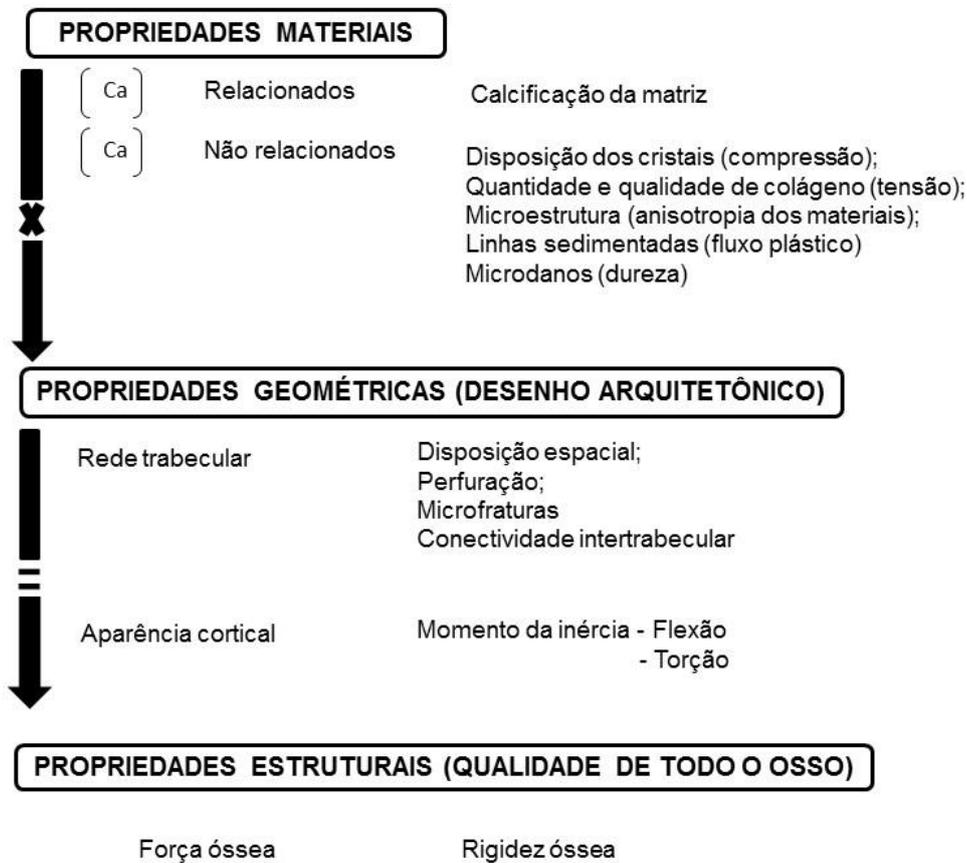
Com o passar dos anos o processo de formação e reabsorção óssea se altera dependendo do ciclo de vida dos indivíduos. Durante o seu

desenvolvimento, até por volta dos 30-35 anos, o processo de formação sobrepõe ao de reabsorção, promovendo o desenvolvimento do tecido ósseo. Após este período, até por volta dos 40 anos, ocorre a estabilização do processo, e a formação é semelhante à reabsorção. Após os 40 anos a reabsorção pode predominar, levando a uma diminuição da massa óssea, podendo acarretar em algumas doenças como a osteoporose (BERGLUND et al., 2000).

As propriedades mecânicas do osso incluem a rigidez, resistência e sua capacidade de absorver energia sem se deformar permanentemente. Essas propriedades são determinadas em dois níveis: no tecido (propriedades materiais), no órgão (propriedades estruturais) e a relação entre os dois, dado pela arquitetura óssea (propriedades geométricas). As propriedades materiais do tecido ósseo são determinadas por fatores diferentes. Pela calcificação da matriz (relacionado à mineralização) e pela composição e arranjo espacial dos cristais, fibras colágenas e as microlesões no interior do tecido calcificado. As propriedades materiais intrínsecas ósseas incluem a densidade mineral óssea (DMO), composição química e tamanho dos cristais de hidroxiapatita. A DMO e o conteúdo mineral ósseo (CMO) são determinados pelo genótipo. A DMO é o resultado do processo de remodelamento ósseo (formação e reabsorção) onde a formação reconstrói o osso deteriorado pela reabsorção. Aproximadamente 70% da variação da DMO tem relação com a hereditariedade, os 30% restantes relacionam-se com o fenótipo onde a atividade física e a nutrição podem induzir respostas fisiológicas que permitem aumento dessa massa óssea (VICENTE-RODRÍGUEZ et al., 2008).

As propriedades estruturais incluem tamanho do osso, geometria óssea e também propriedades microestruturais como orientação trabecular e porosidade cortical. Assim sendo as propriedades geométricas ósseas relacionam-se não apenas com a quantidade (massa, tamanho) mas também com a distribuição desse material calcificado, pois este confere à estrutura óssea a capacidade de sustentação como órgão de apoio (FERRETTI et al., 2001). Portanto uma análise de resistência adequada, deve envolver indicadores que relacionem tanto o material ósseo, como as propriedades e geometria do tecido ósseo (figura 1).

FIGURA 1. Determinação das propriedades estruturais do tecido ósseo.



Fonte: (adaptado de Ferreti et al., 2001).

### *Metaloproteinases de Matriz e Tecido Ósseo*

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases dependentes de cálcio e zinco, importantes para o processo de degradação e remodelamento da matrix extracelular (MEC), em vários processos fisiológicos e patológicos (CHAVEY et al., 2003; VARGHESE, 2006). As MMPs têm função central na regulação da osteogênese, remodelação óssea (MOSIG et al., 2007) e degrada colágenos dos tipos I, II e III (KUBOTA et al., 2002). Com função degradativas, são comumente encontrados nos tecidos como pró MMPs (72 kDa), enzimaticamente inativas e denominada de zimogênios (KJAER; KJÆR, 2004).

Dessa forma, para que ocorra a ativação enzimática é necessária a remoção do domínio pró-peptídeo, por meio da sua degradação, por outras proteases, tais como plasmina, ou por MT-MMPs (MMPs do tipo membrana)

(MURPHY; NAGASE, 2009) gerando assim uma MMP intermediária inativa de 64 kDa (HADLER-OLSEN et al., 2011). O aumento da atividade de MMPs, geralmente, indica degradação de matriz, processo necessário para que ocorra o desenvolvimento tecidual. Sendo assim a presença de MMP-2, na sua forma ativa (62 kDa) é um bom indicativo da preservação da massa óssea, uma vez que regula a osteogênese, o remodelamento ósseo (INOUE et al., 2006; MOSIG et al., 2007) e também pode degradar colágenos tipo I, II e III ((KJAER; KJÆR, 2004; KUBOTA et al., 2002).

A expressão das MMPs é finamente regulada por inibidores específicos do tipo TIMPs (inibidores teciduais de MMPS). Assim o controle da remodelação e degradação da matriz se deve ao equilíbrio entre as MMPs ativas e TIMPs (MURPHY, NAGASE, 2008). Além disso, para que a matriz seja cuidadosamente degradada, outros estímulos atuam nessa regulação como hormônios, estresse oxidativo, fatores de crescimento, além de todas as citocinas presentes durante o processo de remodelação tecidual (PAGE-MCCAW, EWALD, WERB, 2007).

### *Diabetes Mellitus e Tecido Ósseo*

Diabetes *mellitus* e osteoporose são doenças complexas comumente associadas, à meia-idade e idosos aumentando da mortalidade e morbidade dos indivíduos afetados, sendo um problema de saúde. Neste sentido, muitos estudos evidenciam o risco de fraturas tanto no diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) quanto no diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) (MERLOTTI et al., 2010).

Essa associação provavelmente ocorre em função dos efeitos deletérios do metabolismo da glicose. A insulinopenia como ocorre no diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) ou resistência às ações metabólicas da insulina, como ocorre no diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT 2), estão associadas a vários efeitos deletérios para a saúde do esqueleto. Além disso, a hiperglicemia com glicosúria (presença de glicose na urina) típico tanto do DMT1 quanto no DMT2 pode causar hipercalcúria provocando um balanço negativo de cálcio e perda óssea. Ainda nesse sentido a hiperglicemia pode afetar o osso, como afeta outros órgãos, por meio de mecanismos como aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), e glicosilação

não-enzimática de proteínas importantes para o tecido ósseo (MERLOTTI et al., 2010; THRAILKILL et al., 2005a).

Dessa forma sugere-se que o aumento do risco de fratura pode ser devido ao comprometimento provocado pelo *diabetes mellitus* tipo 2 sobre o tecido ósseo. Ao longo dos anos, estudos vem sendo realizados exaustivamente demonstrando a relação do DMT2 com os osso do quadril, vértebras e fratura de pulso. Quanto as fraturas de vértebras e pulso, ainda não estão totalmente claras se são mais frequentes ou não em indivíduos diabéticos. Mas quando se referem a fraturas em geral e no quadril, estas demonstram maiores números em indivíduos diabéticos tipo 2. Entretanto, o risco dessas fraturas parece ser aumentado em indivíduos que tem o quadro de DMT2 estabelecido há algum tempo, enquanto que em indivíduos apenas com o diagnóstico de intolerância a glicose ou glicemia de jejum alteradas, esse risco de fratura está diminuída ou comparada a indivíduos não diabéticos (DE WAARD et al., 2014). De uma forma geral os mecanismos que levam às fraturas podem ser classificados em 4 grupos: 1- aumento do número de quedas; 2- fragilidade óssea; 3- uma combinação desses dois fatores; 4- nem aumento das quedas nem ossos frágeis (DE WAARD et al., 2014).

Segundo Antonopoulou et al. (2013), o *turnover* ósseo pode ser alterado pela glicemia, existindo evidências que um quadro de hiperglicemia pode prejudicar a função dos osteoblastos. Além disso, indivíduos diabéticos são suscetíveis à deficiência de vitamina D, e a relação entre essa vitamina e a saúde óssea já está bem definida na literatura. Nesse sentido, o controle glicêmico inadequado influencia negativamente a resposta osteoblástica e osteoclástica para 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>, possivelmente promovendo fragilidade óssea em indivíduos com DMT2 (ANTONOPOULOU et al., 2013). DEDE et al. (2014) citam que volume ósseo reduzido pode ser confirmado pela análise histomorfométrica, uma vez que encontraram formação óssea reduzida, derivada principalmente por menor deposição de matriz ossea, e não uma mineralização inadequada associada a uma baixa atividade osteoclástica.

Dessa maneira, indivíduos com DMT2 apresentam um quadro de hiperinsulinemia e resistência à insulina, geralmente associado ao aumento da densidade óssea, com diminuição da resistência do osso, contribuindo para aumento do risco de fratura óssea (CARNEVALE et al., 2014; HOFBAUER et al., 2007; THRAILKILL et al., 2005b). Para que a resistência óssea seja adequada, a DMO e a

qualidade do material desse osso são fatores importantes, pois a matriz óssea é composta por uma fase mineral que fornece rigidez e as fibras colágenas fornecem força de tração, resistência, ductilidade e tenacidade. Tais propriedades são reguladas pelo remodelamento ósseo, atividade celular e os níveis de estresse oxidativo e glicação. A formação adequada do *cross-link* enzimático e não enzimático do colágeno, afeta diretamente não somente o processo de mineralização, mas também a resistência óssea. Assim sendo um *cross-linking* enfraquecido e, ou um aumento do *cross-link* não enzimático, na formação do colágeno ósseo têm sido apontados como um dos principais motivos da fragilidade óssea no envelhecimento, osteoporose e *diabetes mellitus* (SAITO; MARUMO, 2013).

Nesse contexto, a hiperglicemia crônica, comum nesses casos de diabetes, promovem a glicação avançada (AGE) e acumulação dos produtos finais desta glicação contribuindo para as complicações do diabetes. No tecido ósseo, os alvos principais da acumulação de AGE são os componentes estruturais da matriz do tecido conjuntivo. Tal acumulação pode prejudicar a função do colágeno e assim altera a função do osso. Ademais, altas concentrações de glicose podem prejudicar a síntese de osteocalcina pelas células osteoblásticas (proteína essencial à formação óssea), aparecendo diminuída em indivíduos com diabetes tipo 2 (KURRA; FINK; SIRIS, 2014).

### *Exercício Físico e Diabetes Mellitus Tipo 2*

O aumento do comportamento sedentário e a prevalência da obesidade, intervenções como o exercício físico tem se popularizado como uma possível alternativa do controle da doença. Também tem sido utilizado como uma ferramenta de investigação dos potenciais efeitos benéficos do mesmo aliados a uma adoção de um estilo de vida mais saudável. Profissionais da saúde tem prescrito exercícios físicos como forma de melhorar aspectos metabólicos destes indivíduos. Entretanto, sabe-se que apesar dos efeitos benéficos promovidos pelo exercício, este não beneficia da mesma forma todos os indivíduos diabéticos, sendo que alguns tem menos resultados positivos frente ao treinamento físico (STEPHENS; SPARKS, 2015).

Os efeitos do exercício sobre o controle metabólico de indivíduos diabéticos tipo 2, tem sido o foco principal na prescrição dos exercícios. Estudos anteriores descrevem como resultados dos exercícios melhora do controle metabólico através de análises como hemoglobina glicada, glicose sanguínea ou sensibilidade à insulina. De um modo geral, estes estudos que utilizam exercícios como forma de tratamento não farmacológico, demonstram falhas quanto aos benefícios específicos do tipo de intervenção utilizada, se o exercício é de baixa intensidade ou baixo volume ou quanto à aderência dos indivíduos nesta intervenção (MARWICK et al., 2009).

O mecanismo do controle metabólico conseguido pelo exercício físico em indivíduos diabéticos, mais claramente estabelecido, se refere às adaptações músculo-esqueléticas conseguidas em função dessa atividade. O exercício reduz a glicemia através do aumento do transporte de glicose para os músculos que estão em atividade. Tanto a insulina quanto o exercício promovem uma maior captação de glicose pelo músculo esquelético pela translocação do transportador de glicose 4 (GLUT 4), predominante no músculo, a partir de uma localização intracelular para a membrana da célula. O exercício e a insulina estimulam essa translocação através da sinalização de mecanismos distintos. A sinalização insulínica envolve a rápida fosforilação do receptor de insulina e do substrato receptor de insulina 1 e 2 em resíduos de tirosina e pela ativação da quinase fosfatidilinositol 3. O exercício por sua vez não estimula efeitos como os citados anteriormente promovidos pela insulina. A contração muscular aumenta as taxas de AMP/ATP e creatinina/fosfocreatina, que rapidamente ativam adenosina monofosfato proteína quinase (AMPK), um importante mediador de oxidação de ácidos graxos e transporte da glicose nas células de mamíferos (DE FEO et al., 2006; STANFORD; GOODYEAR, 2014).

Em indivíduos com DM2, a captação de glicose utilizando a insulina está prejudicada, enquanto a captação estimulada pelo exercício é normal, podendo atingir quase os níveis de normalidade. Diante disso, os mecanismos independentes da insulina no controle da absorção da glicose mediada pelo músculo-esquelético são de extrema importância como um potencial tratamento do diabetes em geral (STANFORD; GOODYEAR, 2014).

O exercício aeróbico tem sido considerado o mais adequado em provocar melhor captação de glicose, entretanto não está claro se a intensidade e a

frequência são fatores que devam ser considerados quando prescrito. Tais dados ainda são contraditórios na literatura. Quanto aos exercícios de resistência, estes podem provocar alterações favoráveis do musculo esquelético, aumentando a sua massa e dessa forma aumentando a capacidade de armazenamento da glicose bem como sua capacidade de captação da mesma.(HALL et al., 2013). Um estudo realizado por HALL et al., (2013), utilizaram 50 ratos distribuídos em 5 grupos: controle, controle diabético, diabético exercício de resistência, diabéticos exercício de esteira de alta e baixa intensidade. Os animais do grupo exercício de resistência foram submetidos a um protocolo de escada com sobrecarga e o grupo submetido ao protocolo de esteira foram submetidos a uma velocidade de 27 ou 15 m/min durante 6 semanas. Nas semanas 3 e 6 realizou-se o teste de tolerância à glicose, e os resultados obtidos demonstraram que os animais submetidos aos protocolos de exercício demonstraram menor área sob a curva quando comparado aos animais do grupo controle. Os animais que fizeram a esteira em alta intensidade precisaram de menor dose de insulina para o controle metabólico. Os pesquisadores concluíram que todos os exercícios foram eficientes em melhorar a glicemia, entretanto ocorre diferenças entre eles, principalmente quando ocorre alterações do conteúdo protéico muscular. Apesar de se tratar de um estudo com *diabetes mellitus* tipo 1, o comportamento para o controle do *diabetes mellitus* tipo 2 pode ser o mesmo.

Numa outra vertente, pesquisa realizada com 251 adultos entre 39 e 70 anos de idade com diabetes tipo 2 foram submetidos aos protocolos de exercício: Aeróbico, resistência e combinado, e um grupo controle sedentário foi incluído. O protocolo consistia na realização dos exercícios 3 vezes por semana por 22 semanas. Os primeiros resultados foram alterações da hemoglobina glicada, outros resultados apareceram na composição corporal, nos lipídeos sanguíneos e na pressão arterial. O grupo combinado demonstrou melhores alterações para hemoglobina glicada quando comparado aos grupos aeróbico e de resistência. A pressão arterial e os lipídeos não diferiram entre os grupos. Diante disso, os pesquisadores concluíram que, os exercícios aeróbico e de resistência sozinhos promove melhora do controle glicêmico no diabetes tipo 2. Entretanto, as alterações mais significativas foram nos grupos submetidos aos dois protocolos de exercício aeróbico mais o de resistência (SIGAL et al., 2007).

### *Exercício Físico e Tecido ósseo*

As cargas mecânicas são consideradas um fator importante para a regulação da homeostase esquelética. As cargas mecânicas estimulam a complexa interação entre os tecidos musculoesqueléticos incluindo osso, cartilagem articular, ligamentos e tendões. Essas cargas afetam o remodelamento ósseo dependente da intensidade aplicada. A falta de estimulação mecânica que ocorre em pacientes acamados ou astronautas durante uma missão espacial, leva a uma rápida perda da massa óssea, por outro lado uma sobrecarga mecânica pode causar fraturas ósseas (YOKOTA; LEONG; SUN, 2011; YUAN et al., 2015). Assim, o tecido ósseo é um tecido que responde a estímulos mecânicos como a atividade física (qualquer movimento corporal produzido pela contração muscular esquelética que promove um aumento do gasto de energia acima dos níveis basais) e ao exercício físico (movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo como objetivo de melhorar ou manter mais de um dos componentes da aptidão física) (BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2012; CHEUNG; GIANGREGORIO, 2012).

O ganho de massa óssea conseguido com o exercício físico ocorre, principalmente, em resposta a um aumento da tensão mecânica (TUREK, 1991). Durante o exercício, as forças de tensão, compressão e cisalhamento, associadas à deformação mecânica das contrações musculares, são capazes de provocar alterações da estrutura óssea. Acredita-se que correntes de baixa energia, geradas pela resposta piezoelétrica do cristal de hidroxiapatita ao estresse imposto a esse tecido, possam estar envolvidas nesse processo (TUREK, 1991). Além disso, sabe-se que o exercício físico pode promover uma série de respostas fisiológicas envolvendo os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônadas, resultando em adaptações do tecido ósseo. Assim marcadores bioquímicos podem ser uma forma útil de se verificar os efeitos agudos do exercício sobre a massa óssea (MAÏMOUN; SULTAN, 2010; YUAN et al., 2015)

Os treinamentos aeróbicos, como a corrida e a natação, bem como exercícios contra resistência, têm ações osteogênicas no tecido ósseo. Exercício com características aeróbicas tem sido utilizado para se promover a mineralização óssea, onde nesse exercício a formação do tecido ocorre em função de uma carga mecânica imposto a ele (HUANG et al., 2003, 2008; NOTOMI, 2000; SUOMINEN, 2006).

Estudos afirmam que independente do tipo de exercício, as cargas impostas ao osso, resultarão em ganhos localizados de DMO. Atletas praticantes de judô e rugby apresentam maior DMO que indivíduos não praticantes. Adolescentes ginastas apresentaram aumentos mais significantes da DMO que nadadoras no mesmo período pesquisado. Já as nadadoras apresentaram valores próximos às adolescentes não treinadas. Jogadores de tênis tem DMO maior em seu braço dominante quando comparado ao braço não dominante, provavelmente, pelos sucessivos impactos sofridos. Curiosamente esportes de *endurance* que usam o sistema de energia aeróbica (caminhada e corrida) resultam em menor ganho de massa óssea porque o sistema esquelético não é submetido a altos impactos.

Portanto, o tipo de exercício e a forma como é prescrito devem ser levados em consideração para melhorar a eficiência do treinamento. Todos estes aspectos sugerem que esportes que requerem maior movimentação, assim como maiores cargas ou impactos repetitivos estimulam a formação óssea (BOUDENOT; ACHIOU; PORTIER, 2015). Nesse sentido na tentativa de verificar um tipo de exercício que fosse adequado a indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2, e que além disso tivesse influência positiva sobre o tecido ósseo, que resolveu-se realizar três protocolos diferentes de exercício. Buscando identificar o efeito de cada um deles nos parâmetros ósseos em condições adversas como o *diabetes mellitus* tipo 2 ocasiona. Diante do exposto acreditamos que o *diabetes mellitus* tipo 2 experimental pode promover malefícios ao tecido ósseo, e que o exercício físico pode auxiliar ou atenuar os efeitos da doença neste tecido.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Verificar os efeitos de 3 diferentes protocolos de exercício físico (aeróbico, resistido e combinado) sobre as propriedades biomecânicas e biofísicas do tecido ósseo de ratos obesos com *diabetes mellitus* tipo 2, após 10 semanas de treinamento.

### 2.2 Específicos

Verificar os efeitos de 3 diferentes protocolos de exercício físico (aeróbico, força e combinado) sobre:

- a densidade mineral óssea e o conteúdo mineral ósseo;
- os parâmetros biométricos do osso;
- os parâmetros biomecânicos ósseos por meio do teste de flexão a três pontos;
- os marcadores bioquímicos, cálcio e fósforo, do metabolismo ósseo;
- a atividade das metaloproteinases ósseas

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Modelos do Estudo

Neste estudo experimental, o modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) Protocolo nº 067/2012.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 80 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, com 45 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e permaneceram no Biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício, pertencente ao Departamento de Educação Física e Motricidade Humana, em temperatura ambiente de 22-24°C e luz controlada em ciclo de 12h (claro/escuro). A água e o alimento foram oferecidos *ad libitum*.

#### 3.3 Protocolo Experimental

Os 40 animais do grupo diabético receberam dieta hiperlipídica palatável para o desenvolvimento da obesidade e os outros 40 animais do grupo saudável receberam dieta padrão. Quando completaram 90 dias de idade, os animais foram distribuídos randomicamente em 8 grupos experimentais:

*Controle sedentário saudável (CSS)*: Composto por 10 animais sedentários saudáveis não consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma dose de intraperitoneal de tampão citrato (1ml/kg) não tendo nenhuma participação nos protocolos de treinamento;

*Treinamento resistido saudável (TRS)*: Composto por 10 animais submetidos ao treinamento resistido. Não consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma dose de intraperitoneal de tampão citrato (1ml/kg);

*Treinamento aeróbico saudável (TAS):* Composto por 10 animais submetidos ao treinamento aeróbico. Não consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma dose intraperitoneal de tampão citrato (1ml/kg);

*Treinamento combinado aeróbico/resistido saudável (TCS):* Composto por 10 animais submetidos ao treinamento combinado aeróbico/resistido. Não consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma intraperitoneal de tampão citrato (1ml/kg)

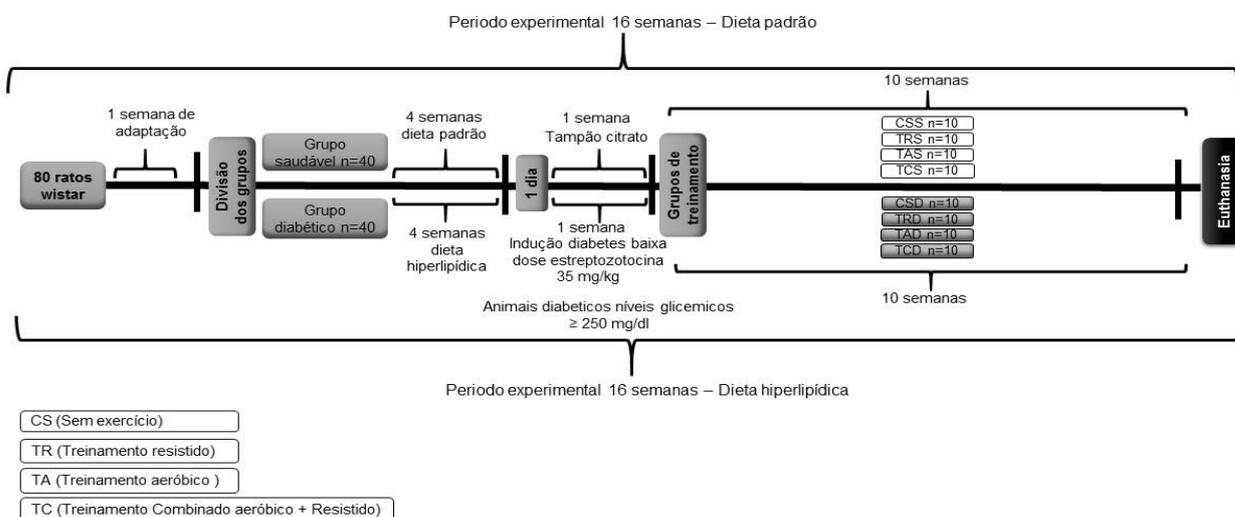
*Sedentário obeso/diabético (CSD):* Composto por 10 animais sedentários que consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma dose de estreptozotocina (35mg/kg) intraperitoneal não tendo nenhuma participação nos protocolos de treinamento;

*Treinamento resistido obeso/diabético (TRD):* Composto por 10 animais submetidos ao treinamento resistido. Consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma dose intraperitoneal de estreptozotocina (35mg/kg);

*Treinamento aeróbico obeso/diabético (TAD):* Composto por 10 animais submetidos ao treinamento aeróbico. Consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma dose intraperitoneal de estreptozotocina (35mg/kg);

*Treinamento combinado aeróbico/resistido obeso/diabético (TCD):* Composto por 10 animais submetidos ao treinamento combinado aeróbico/resistido. Consumiram a dieta hipercalórica e receberam uma dose intraperitoneal de estreptozotocina (35mg/kg).

FIGURA 2. Representação esquemática do delineamento experimental.



### 3.4 Eutanásia

Ao final do período experimental (dezesesseis semanas), segundo o delineamento experimental, realizou-se a decapitação dos animais, com subsequente coleta e dissecações do material ósseo (fêmures, tíbias), os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$  para as subseqüentes análises.

### 3.5 Dieta

#### 3.5.1 Dieta padrão

Consistiu de ração balanceada da marca PRIMOR (São Paulo, Brasil) contendo a cada 100g: 23g de proteína, 49g de carboidrato, 4g de gordura, 5g de fibra, 7g de cinza, e 6g de vitaminas, conforme fornecido pelo fabricante.

### **3.5.2 Dieta hiperlipídica**

A dieta hiperlipídica foi oferecida aos animais dos respectivos grupos para a indução da obesidade até o momento da eutanásia. A dieta hiperlipídica, capaz de desenvolver obesidade em ratos, é uma dieta preparada por uma mistura hiperlipídica, na seguinte proporção: 15g de ração balanceada da marca PRIMOR; 10g de amendoim torrado; 10g de chocolate ao leite; 5g de bolacha maisena. Esses constituintes moídos e misturados na proporção de 3:2:2:1. Cada 100 g desta dieta contém 20g de proteína, 20g de gordura, 48g de carboidratos e 4g de fibras. A densidade calórica (Kcal/g de alimento) das dietas foi determinada através do calorímetro adiabático (IKA-C400) sendo de 5,12 Kcal/g para a dieta hiperlipídica e 4,07 Kcal para a dieta padrão (ESTADELLA et al., 2004).

### **3.6 Indução do Diabetes tipo 2**

Os animais dos grupos diabéticos, após receber dieta hiperlipídica por 4 semanas, receberam, com jejum prévio, uma dose de estreptozotocina (Sigma®) de 35 mg/kg de peso do animal, via intraperitoneal e dissolvida em veículo solução de citrato de sódio 0,01M, pH = 4,5. Considerou-se diabéticos os animais que apresentaram glicemia  $\geq 250$  mg/dl (SRINIVASAN et al., 2005).

### **3.7 Controle de Massa Corporal e Consumo Alimentar**

A massa corporal de cada animal foi mensurada semanalmente, durante todo o período experimental, bem como o consumo alimentar foi medido diariamente, sendo também analisada a eficiência alimentar dos animais. Os valores obtidos para cada variável foram anotados em fichas individuais.

### **3.8 Controle da Glicemia**

Os níveis sanguíneos de glicose foram avaliados semanalmente com sangue colhido da cauda do animal, com o uso de um glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA).

### 3.8.1 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

O teste de tolerância à insulina (ITT do inglês *Insulin tolerance test*) foi realizado após a indução do diabetes na sexta semana e após as 10 semanas de treinamento. Após um jejum de 12 horas, os animais receberam uma injeção intraperitoneal contendo insulina humana 1U/Kg de peso corporal. As amostras de sangue foram retiradas da cauda do animal antes da injeção e depois da injeção de insulina nos tempos seguintes 0,15,30 e 45 min (ROPELLE et al., 2006). As medidas sanguíneas foram realizadas utilizando-se do glicosímetro.

### 3.8.2 Insulinemia

Para a análise insulínica, após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado e acondicionado em tubos sem anticoagulante por aproximadamente 2 horas até a sua coagulação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. O soro foi aliquoteado em microtubo e congelado a -80°C. Os níveis séricos de insulina foram mensurados pelo método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), seguindo as especificações correspondentes ao Kit *Insulin Rat Elisa kit* (Abnova, Catalogo KA3811). A reação foi bloqueada com 50 µl de solução *stop* e a leitura realizada no espectrofotômetro 450 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de insulina e as concentrações finais expressas em ng/ml.

### 3.9 Protocolos de Treinamento

Os treinamentos aeróbicos e de resistência foram iniciados após o período prévio de oferta da dieta hiperlipídica e a indução com STZ e tiveram duração de 10 semanas. Todos os protocolos de exercício foram realizados três vezes/semana nos animais dos grupos treinados.

### 3.9.1 Treinamento Aeróbico

Para a realização do exercício aeróbico foi utilizado um protocolo de corrida em esteira. Na primeira semana de treinamento os animais passaram por um processo de adaptação à corrida. Logo após, iniciou-se protocolo de corrida propriamente dito, 3 dias por semana, chegando ao final do experimento a 30 minutos diários com uma velocidade de 16 metros por minutos, por 10 semanas consecutivas (IRIGOYEN et al., 2005).

### 3.9.2 Treinamento Resistido

O protocolo de HORNBERGER e FARRAR, (2004) foi adaptado para as necessidades e execução da pesquisa. Inicialmente os ratos foram familiarizados com o treinamento de força que consiste em subida de escadas (1,1 x 0,18m, 2-cm espaçamento entre os degraus da grade, 80° de inclinação) com uma carga de aparatos fixados em suas caudas. O aparato foi fixado à cauda dos animais envolvendo a parcela proximal da mesma com uma tira autoadesiva (1,5cm, 3M Tartan). Inicialmente, os animais foram incentivados a escalar aplicando-se em sua cauda um estímulo (pinçar dos dedos) para iniciar o movimento. No topo da escada, encontraram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os ratos voluntariamente subissem a escada três vezes consecutiva, sem o incentivo do estímulo na cauda.

Foi realizado um teste de Carga Máxima nos três dias seguintes à familiarização com a escada, onde após o teste os grupos experimentais começaram o exercício resistido progressivo de alta intensidade. A primeira sessão de treinamento consistiu em escalar de quatro a oito vezes carregando progressivamente cargas mais pesadas. Na escalada inicial foi aplicado 75% do peso do corpo do animal. Após completar o carregamento desta carga com sucesso, um peso adicional de 30 gramas foi adicionado ao aparato. Este procedimento foi sucessivamente repetido até que a carga alcançasse um peso que não permitia que o rato escalar, ponto no qual foi considerada a carga máxima dos ratos para aquela sessão. As sessões de treinos subsequentes consistiram de quatro a nove escaladas. Durante as primeiras quatro escaladas, os ratos carregaram 50%, 75%,

90% e 100% de sua carga máxima. Durante as subsequentes escaladas, um adicional de 30 gramas foi adicionado até que o rato obtivesse uma nova capacidade máxima de carregamento. Este treinamento foi repetido uma vez a cada três dias, durante dez semanas.

### **3.9.3 Treinamento Combinado**

Para a realização do exercício combinado os animais fizeram o protocolo de escada e o de esteira no mesmo dia. Na primeira semana de treinamento os animais passaram por um processo de adaptação à corrida e à escada. Os animais foram submetidos a um programa de exercício 3 dias/semana, por 10 semanas consecutivas.

### **3.10 Experimentos e Coleta de Amostras**

Os animais sofreram eutanásia por decapitação em guilhotina ao final das dez semanas de treinamento, 72 horas após a última sessão de exercício. Após a decapitação, o sangue foi coletado e foi feita a dissecação femoral e tibial (direita e esquerda), para coleta do material ósseo, os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C para as subsequentes análises.

### **3.11 Densidade Mineral Óssea e Conteúdo Mineral Ósseo**

As análises da densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo foram realizados pelo Densitômetro Ósseo de Raios-X (DPX-Alpha Lunar, EUA), equipado com software para pequenos animais. As análises foram realizadas no laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, SP.

### **3.12 Parâmetros biométricos**

#### **3.12.1 Massa corporal dos animais**

Durante o período experimental os animais foram pesados semanalmente para o acompanhamento do desenvolvimento e verificação da saúde dos mesmos.

#### **3.12.2 Medidas do comprimento do fêmur direito**

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

#### **3.12.3 Medidas das espessuras das diáfises femorais**

Foram mensurados com o paquímetro, os diâmetros maiores (realizado na posição látero-lateral) e menores (realizado na posição ântero-posterior) da diáfise femoral, seguindo a padronização referencial: base do terceiro trocânter.

### **3.13 Parâmetros Biofísicos**

Após a verificação dos parâmetros biométricos dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, mantiveram-se os ossos imersos em água destilada, em um dessecador, por um período de 24 horas objetivando a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida obtiveram-se os pesos imerso ( $P_i$ ) e úmido ( $P_u$ ). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo. As amostras foram armazenadas em uma estufa na temperatura de 100° C durante 24 horas com o intuito de desidratação e, posteriormente, obteve-se o peso seco ( $P_s$ ). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral -  $P_m$ ), os ossos foram colocados em uma mufla na temperatura de 800° C por um período de

24 horas (NORDSLETTEN et al., 1994). Todas as medidas citadas foram obtidas por meio de uma balança eletrônica de precisão.

Baseando-se no Princípio de Arquimedes, calcularam-se o volume ósseo e subsequentemente densidade óssea e mineral, percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, por meio das fórmulas citadas abaixo (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100 \times (P_u - P_s)}{P_u}$$

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

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

Onde:

$P_u$  = peso úmido ósseo

$P_s$  = peso ósseo da amostra desidratada

$P_i$  = peso imerso ósseo

$P_m$  = peso do material mineral (cinzas)

$\rho$  = densidade da água

### 3.14 Parâmetros biomecânicos ósseos

Por meio do teste de flexão a três pontos, as propriedades biomecânicas dos fêmures direito foram mensuradas utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444, cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kgf (aproximadamente 1 kN) (AKHTER et al., 2003). Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, gerando uma curva: carga x deformação. Da análise das curvas foram obtidas as seguintes propriedades biomecânicas: deformação (deslocamento) máxima, deformação (deslocamento) no ponto da fratura, carga (força) máxima e carga (força) de fratura, resiliência, tenacidade e rigidez.

FIGURA 3. Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos.

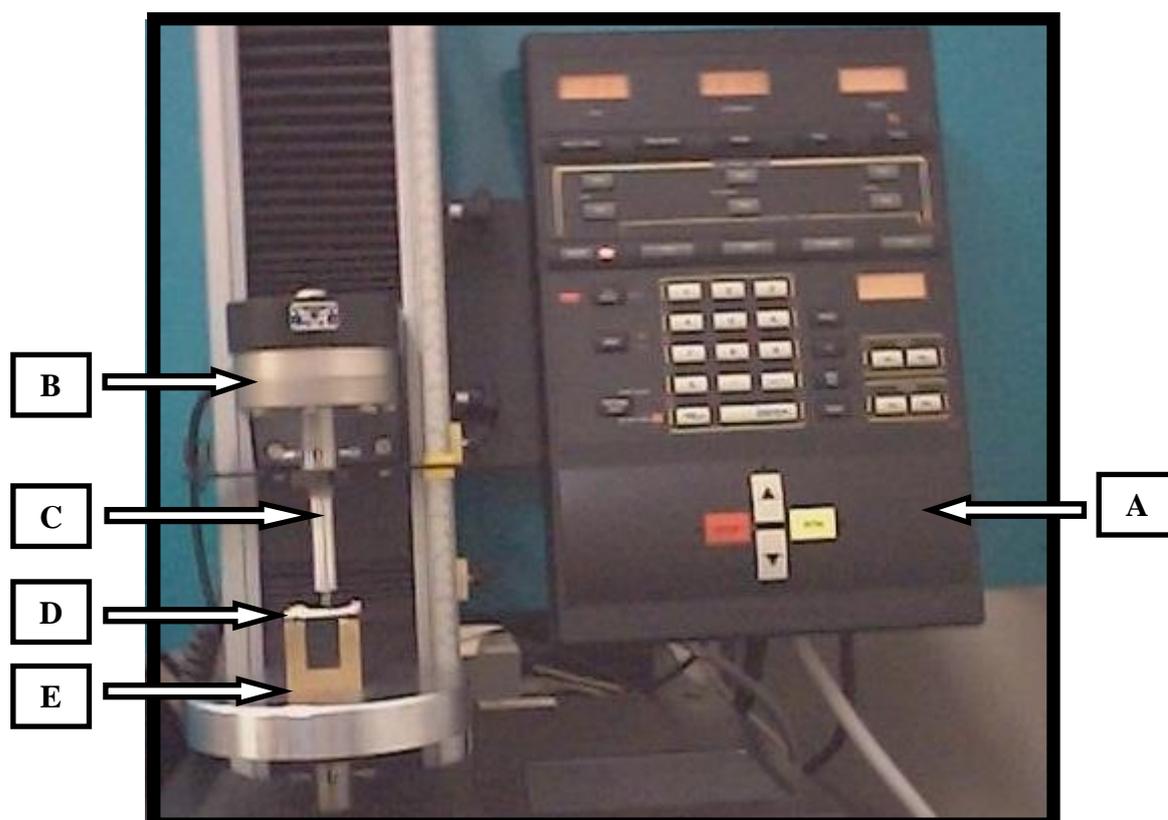


Figura A: painel de controle; B: célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); C: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); D: osso (fêmur de rato); E: suporte.

Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, gerando uma curva: carga x deformação (Figura 4). Da

análise das curvas foram obtidas as seguintes propriedades biomecânicas: carga (força) máxima, resiliência, tenacidade e rigidez.

### **Deformações (mm)**

Corresponde a distância movida pelo cilindro de carga registrada pelo equipamento: no limite elástico, no ponto de carga máxima e de fratura ( $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_3$  respectivamente, na figura 4).

### **Carga no Limite Elástico (N)**

Corresponde a carga que separa a fase elástica da plástica ( $C_1$ , na figura 4). Para o tecido ósseo a fase elástica corresponde à porção linear da curva e a fase plástica, a parte não linear da mesma (KAGEL; EINHORN, 1996). O ponto de união das duas corresponde ao limite elástico.

### **Carga Máxima (N)**

Corresponde a maior carga suportada pela amostra (fêmur) durante o ensaio ( $C_2$ , na figura 4).

### **Carga de Fratura (N)**

Corresponde a carga aplicada no momento da fratura da amostra (fêmur) ao longo do ensaio ( $C_3$ , na figura 4).

### **Resiliência (J)**

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

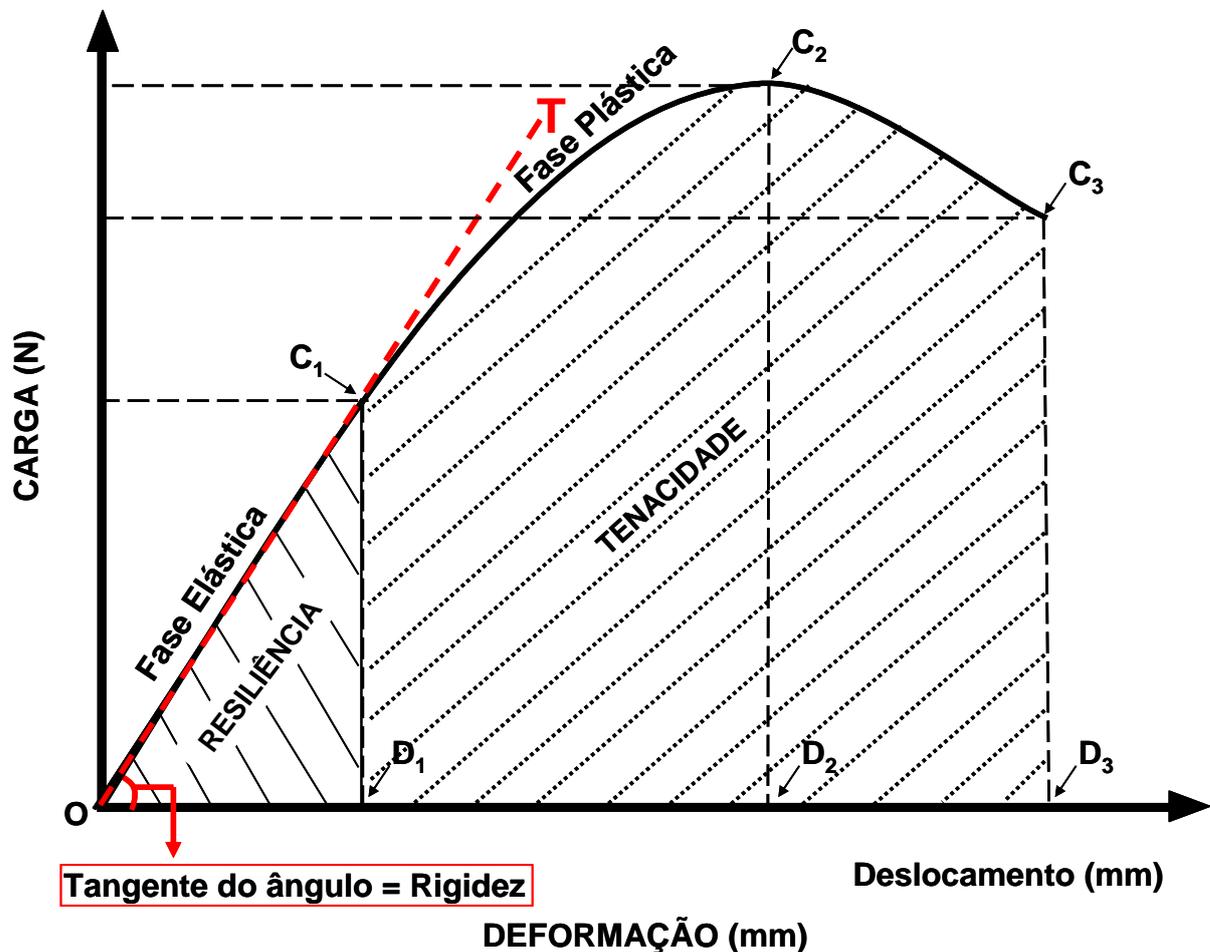
**Tenacidade (J)**

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

**Rigidez (N/mm)**

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

FIGURA 4. Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas.



C<sub>1</sub>: Carga no Limite Elástico; D<sub>1</sub>: Deformação (deslocamento) no Limite Elástico; C<sub>2</sub>: Carga Máxima; D<sub>2</sub>: Deformação (deslocamento) na Carga Máxima; C<sub>3</sub>: Carga de Fratura; D<sub>3</sub>: Deformação (deslocamento) na Carga de Fratura (máxima); O/C<sub>1</sub>/D<sub>1</sub>: a área desta região corresponde a Resiliência (a energia absorvida na fase elástica); O/C<sub>3</sub>/D<sub>3</sub>: a área desta região corresponde à tenacidade (energia absorvida até o ponto de ruptura); T: tangente da região O/C<sub>1</sub> da curva, corresponde a Rigidez (a capacidade de resistir a deformações).

### 3.15 Bioquímica óssea

#### 3.15.1 Cálcio e Fósforo

Com a obtenção do material mineral do fêmur da pata direita dos animais, realizou-se solubilização em ácido clorídrico 2N. Posteriormente, por meio

de ensaio colorimétrico o conteúdo de cálcio e fósforo dos ossos foi determinado, com a utilização do kit comercial específico Labtest® cat. 90, e 12 respectivamente.

### 3.16 Zimografia de Gelatina

Os procedimentos para determinação da atividade de metaloproteinases das tíbias esquerdas foram realizados segundo protocolo estabelecido por MARQUETI et al., (2008) e adaptado para esse estudo. Com a limpeza da tíbia, foi realizada a remoção do tecido periférico (tecido muscular e demais membranas visíveis) e 200 mg do terço proximal da tíbia (abaixo da epífise de crescimento) foi macerado sob nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em 1,5 ml de tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO<sub>3</sub> e 0,01% de Triton X-100] a 4°C por um período de 24 horas. Após este tempo o tampão de extração foi coletado por centrifugação (20 minutos, 4°C em 13.000 rpm). As amostras foram concentradas de maneira que cada poço do gel de zimografia tinha 10 µg de proteína e 10 µl de tampão de amostra sem β-mercapto (agente redutor), totalizando 20 µl de solução por poço. As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de policriamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 2mg/ml. Após a eletroforese, o gel foi lavado uma vez durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> mM e NaN<sub>3</sub> 0,02%), a 37°C, durante 20 horas. Após este tempo, os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad®) por 1 h e 30 minutos e descorados posteriormente com ácido acético:metanol:água (1:4:5, v:v:v:) para visualização das áreas de atividade da MMP. A atividade gelatinolítica foi visualizada como faixas claras no gel corado. Os géis foram revelados em um fotodocumentador Chemidoc™ MP System (Bio Rad). As médias de intensidade de banda foram mensuradas por meio do software Imagem Lab™ Software (Bio Rad). Os dados foram expressos como a concentração da MMP-2 (ou seja, a totalidade da densidade óptica integrada para a MMP-2 intermediária e ativa). As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

#### 4. Análise Estatística

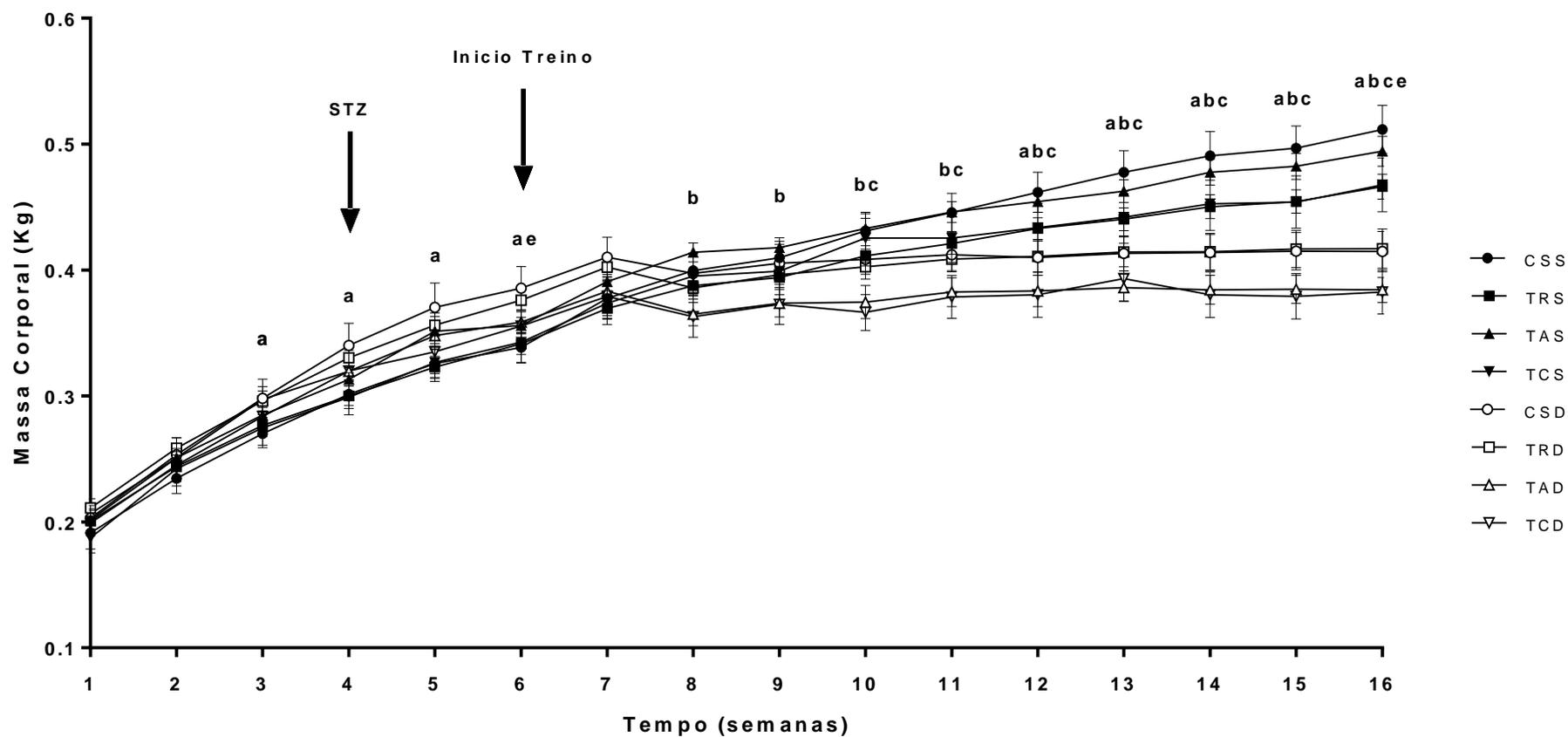
Os dados de cada grupo estão representados em média  $\pm$  erro padrão (E.P.M). E foram comparados entre si por meio do teste paramétrico *Two Way* Anova e o teste de comparações múltiplas *Tukey*. Toda a análise foi realizada por meio do software Sigma-Plot 12.0 adotando-se um nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Massa Corporal

Na figura 5 estão expressos os valores da evolução ponderal da massa corporal (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Para os valores de massa corporal inicial (Figura 5) pode-se verificar que não houve diferença entre os grupos. Da semana 3 a semana 6, os animais do grupo CSD apresentaram maiores valores que os animais dos grupos CSS. Na semana 6, adicionalmente, os animais do grupo TRD também apresentaram maiores valores quando comparado ao seu controle sem diabetes, sem diferença na 7<sup>a</sup> semana. Na semana 8 e 9 menores valores foram encontrados entre os grupos TAD *versus* TAS. Na semana 10 e 11, a massa se apresentou reduzida nos grupos TAD, TCD em comparação aos grupos TAS, TCS. Da semana 12 até a 15, a redução da massa corpórea se mostrou entre os grupos CSD, TAD e TCD quando comparado aos grupos CSS, TAS e TCS e finalmente na última semana todos os grupos diabéticos apresentaram menores valores para o parâmetro analisado em comparação com os grupos saudáveis.

FIGURA 5. Representação gráfica dos valores da evolução ponderal da massa corporal (g) dos diferentes grupos experimentais.

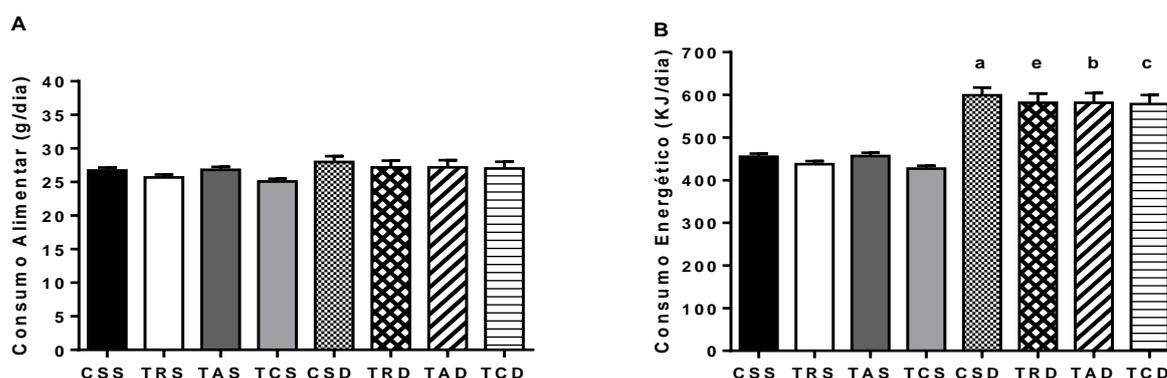


Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS; c vs. TCS, e vs. TRS,  $p < 0,05$ .

## 5.2 Consumo Alimentar e energético

O consumo alimentar (g/dia) e energético (KJ/dia), dos diferentes grupos experimentais, estão expressos na figura 6. O consumo alimentar (Figura 6A) dos animais foi semelhante nos diferentes grupos experimentais. Entretanto, quando o consumo energético (Figura 6B) foi calculado, verificou-se que os animais que consumiram a dieta hiperlipídica CSD, TRD, TAD e TCD, a ingesta calórica foi maior quando comparado aos animais do grupo sem diabetes experimental CSS, TRS, TAS, TCS.

FIGURA 6. Representação gráfica dos valores de consumo alimentar diário (g/dia) e energético (KJ/g) dos animais dos diferentes grupos experimentais



Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS; c vs. TCS; e vs. TRS,  $p < 0,05$ .

## 5.3 Controle da Glicemia

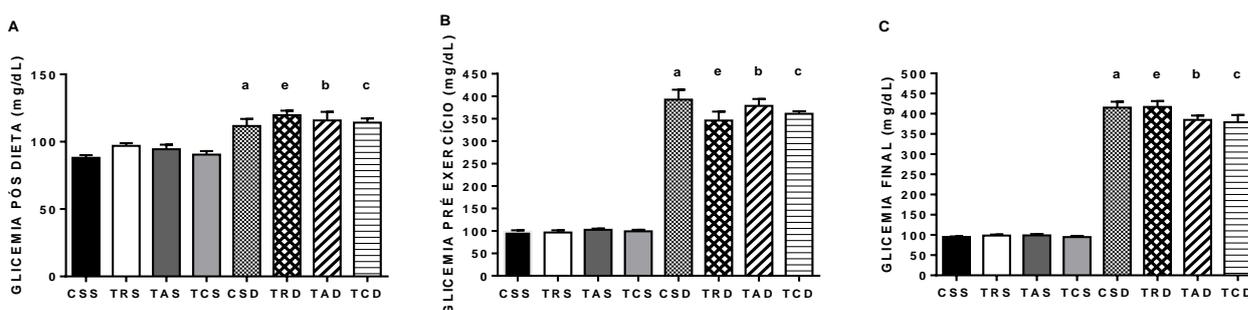
A figura 7 apresenta a glicemia de jejum (mg/dL) dos períodos pós dieta, pré exercício e ao final do período experimental dos animais dos diferentes grupos experimentais (CSD, TRD, TAD, TCD, CSS, TRS, TAS, TCS).

O período pós dieta (Figura 7A) foi considerado a fase após a oferta da dieta hiperlipídica para os animais dos grupos diabéticos CSD, TRD, TAD, TCD e os grupos saudáveis CSS, TRS, TAS, TCS. Os animais já demonstram nesse momento um aumento da glicemia sugerindo uma certa resistência à insulina, o que pode ter

vido provocada pela dieta. O período pré exercício (Figura 7B) se refere ao momento anterior ao início do protocolo de treinamento. Neste momento pode-se verificar que a glicemia de jejum dos animais dos grupos com diabetes experimental CSD, TRD, TAD, TCD é mais elevada quando comparada aos animais dos grupos saudáveis CSS, TRS, TAS, TCS.

O período final (Figura 7C) se refere ao momento após o protocolo de treinamento finalizando o período experimental. Pode-se notar que os animais dos grupos diabéticos CSD, TRD, TAD, TCD apresentam glicemia mais elevada em relação aos animais que consumiram dieta padrão CSS, TRS, TAS, TCS.

FIGURA 7. Representação gráfica dos valores de glicemia pós dieta (mg/dL), pré exercício (mg/dL), e final (mg/dL), dos animais dos diferentes grupos experimentais.

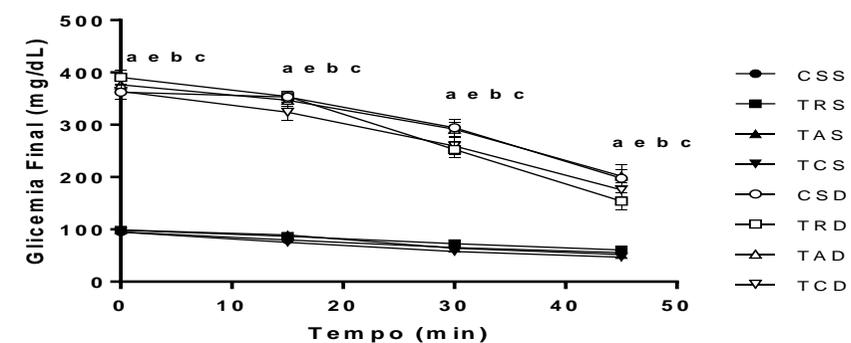
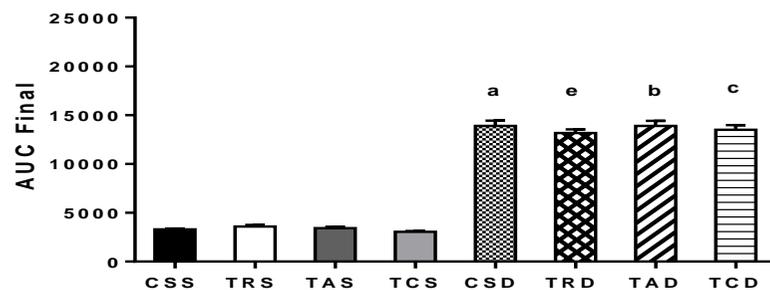
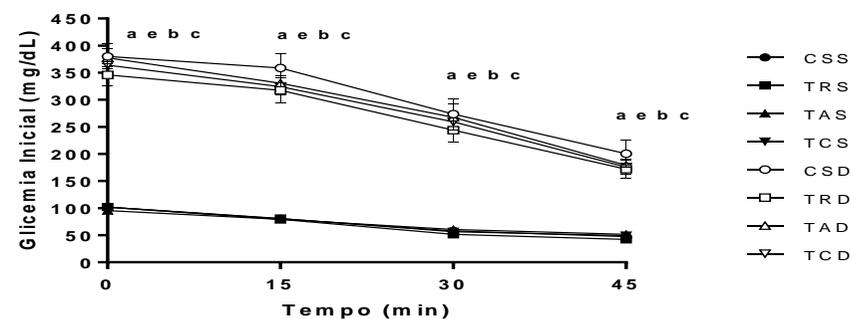
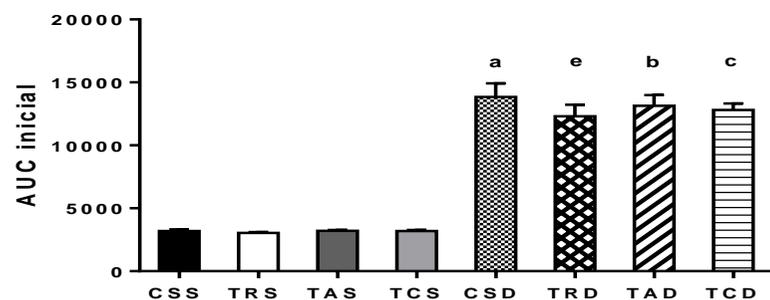


Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS; c vs. TCS e vs. TRS,  $p < 0,05$

#### 5.4 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

O teste de tolerância à insulina (ITT do inglês insulin tolerance test) foi realizado antes do protocolo de treinamento e após o mesmo. Os resultados apresentados pelos grupos experimentais (CSS, TRS, TAS, TCS, CSD, TRD, TAD e TCD) estão demonstrados na Figura 9. Os resultados demonstram que tanto antes do protocolo de treinamento quanto após o período experimental todos os animais diabéticos CSD, TRD, TAD e TCD demonstram um aumento da área sob a curva (AUC do inglês area under the curve) quando comparado aos valores dos respectivos grupos sem diabetes CSS, TRS, TAS, TCS.

FIGURA 8. Representação gráfica dos valores de Área sob a curva (AUC) e glicemia (mg/ml) no teste de tolerância à insulina dos animais dos diferentes grupos experimentais.

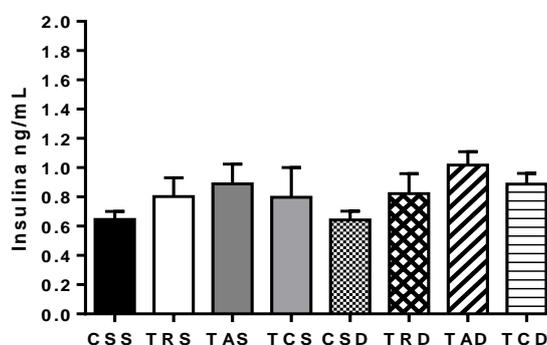


Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS c vs. TCS; e vs. TRS,  $p < 0,05$ .

## 5.5 Insulinemia

Os resultados de insulinemia nos diferentes grupos experimentais (CSS, TRS, TAS, TCS, CSD, TRD, TAD e TCD) estão representados na Figura 8. Neste parâmetro verifica-se que nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos diabéticos comparados aos grupos sem diabetes, bem como os grupos exercitados diabéticos e não diabéticos quando comparados aos seus controles sem exercício.

FIGURA 9. Representação gráfica dos valores de insulinemia (ng/ml), dos animais dos diferentes grupos experimentais:



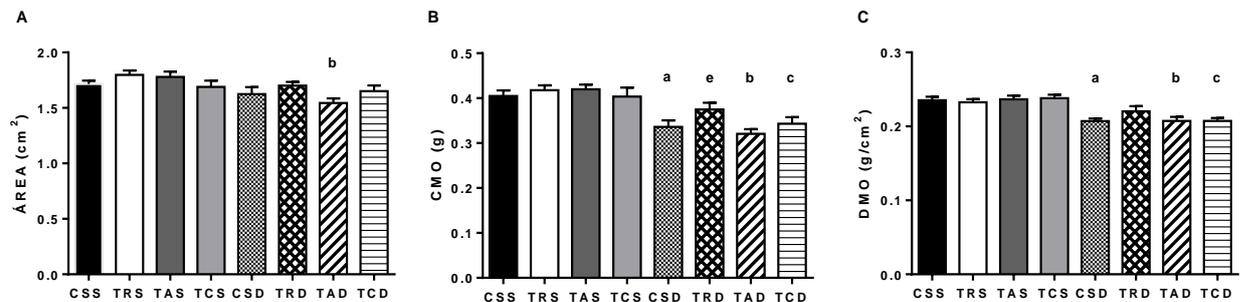
Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Sem diferença entre os grupos

## 5.6 Densitometria Óssea (Dexa)

Os dados de valores de área ( $\text{cm}^2$ ), conteúdo mineral ósseo (g) e densidade mineral óssea ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), do fêmur direito dos animais dos grupos experimentais (CSD, TRD, TAD, TCD, CSS, TRS, TAS, TCS), obtidos por densitometria óssea estão representados na figura 10. Quanto à área (Figura 10A), apenas o grupo TAD demonstrou menores valores em comparação aos grupos TAS. Para o CMO (Figura 10B), todos os grupos diabéticos CSD, TRD, TAD e TCD apresentaram menores valores quando comparado aos seus respectivos grupos sem diabetes experimental CSS, TRS, TAS e TCS. Quanto à densidade mineral óssea DMO (Figura 10C), nota-se que há diferenças entre os grupos CSD, TAD e

TCD comparado ao grupo CSS, TAS e TCS demonstrando valores reduzidos para estes parâmetros.

FIGURA 10. Representação gráfica dos valores de área ( $\text{cm}^2$ ), conteúdo mineral ósseo (g) e densidade mineral óssea ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) do fêmur direito dos animais dos diferentes grupos experimentais.

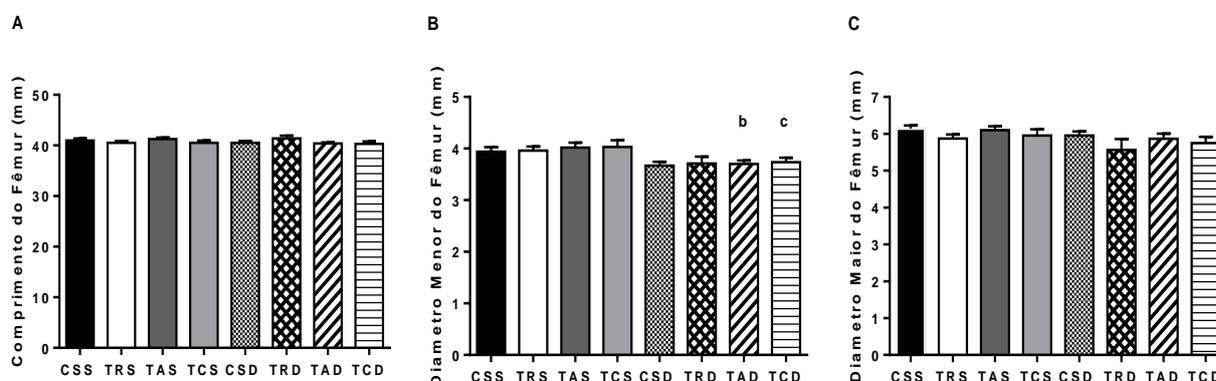


Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS; c vs. TCS; e vs. TRS,  $p < 0,05$ .

## 5.7 Parâmetros Biométricos

Na figura 11 estão expressos os valores em milímetros do comprimento do fêmur (Figura 11A), diâmetro menor do fêmur (Figura 11B) e diâmetro maior do fêmur (Figura 11C) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Identifica-se diferença apenas para a variável diâmetro menor do fêmur nos grupos TAD e TCD comparados aos seus pares normais TAS e TCS, não se observando diferença estatística entre os demais parâmetros analisados.

FIGURA 11. Representação gráfica dos valores dos parâmetros biométricos comprimento (mm), diâmetro menor (mm) e diâmetro maior (mm) do fêmur direito, dos animais dos diferentes grupos experimentais.



Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. b vs. TAS; c vs. TCS  $p < 0,05$ .

## 5.8 Parâmetros Biofísicos

Na tabela 1 estão expressos os valores dos parâmetros biofísicos, como peso úmido, peso seco, peso imerso, peso das cinzas. Para as variáveis analisadas peso imerso e peso úmido verifica-se diferença significativa para os grupos CSD e TAD apresentando menores valores quando comparado aos grupos CSS, TAS. O grupo TRD apresentou maiores valores quando comparado ao seu controle CSD. Quanto ao comportamento do peso seco e peso das cinzas para os grupos CSD, TAD e TCD demonstraram menores valores quando comparado aos seus respectivos grupos sem diabetes.

TABELA 1. Pesos dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Peso Imerso	Peso Úmido	Peso Seco	Peso das Cinzas
<b>CSS</b>	0,383 ± 0,012	1,100 ± 0,032	0,693 ± 0,019	0,469 ± 0,013
<b>TRS</b>	0,375 ± 0,012	1,049 ± 0,032	0,683 ± 0,019	0,461 ± 0,013
<b>TAS</b>	0,385 ± 0,012	1,071 ± 0,032	0,696 ± 0,019	0,474 ± 0,013
<b>TCS</b>	0,352 ± 0,013	1,029 ± 0,034	0,689 ± 0,020	0,466 ± 0,014
<b>CSD</b>	0,290 ± 0,013 <b>a</b>	0,925 ± 0,034 <b>a</b>	0,598 ± 0,020 <b>a</b>	0,404 ± 0,014 <b>a</b>
<b>TRD</b>	0,361 ± 0,012 <b>d</b>	1,069 ± 0,032 <b>d</b>	0,637 ± 0,019	0,436 ± 0,013
<b>TAD</b>	0,322 ± 0,013 <b>b</b>	0,966 ± 0,034 <b>b</b>	0,577 ± 0,020 <b>b</b>	0,396 ± 0,014 <b>b</b>
<b>TCD</b>	0,316 ± 0,013	0,964 ± 0,034	0,600 ± 0,020 <b>c</b>	0,403 ± 0,014 <b>c</b>

Os dados estão expressos como média ± erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS, c vs. TCS, d vs. CSD p<0,05.

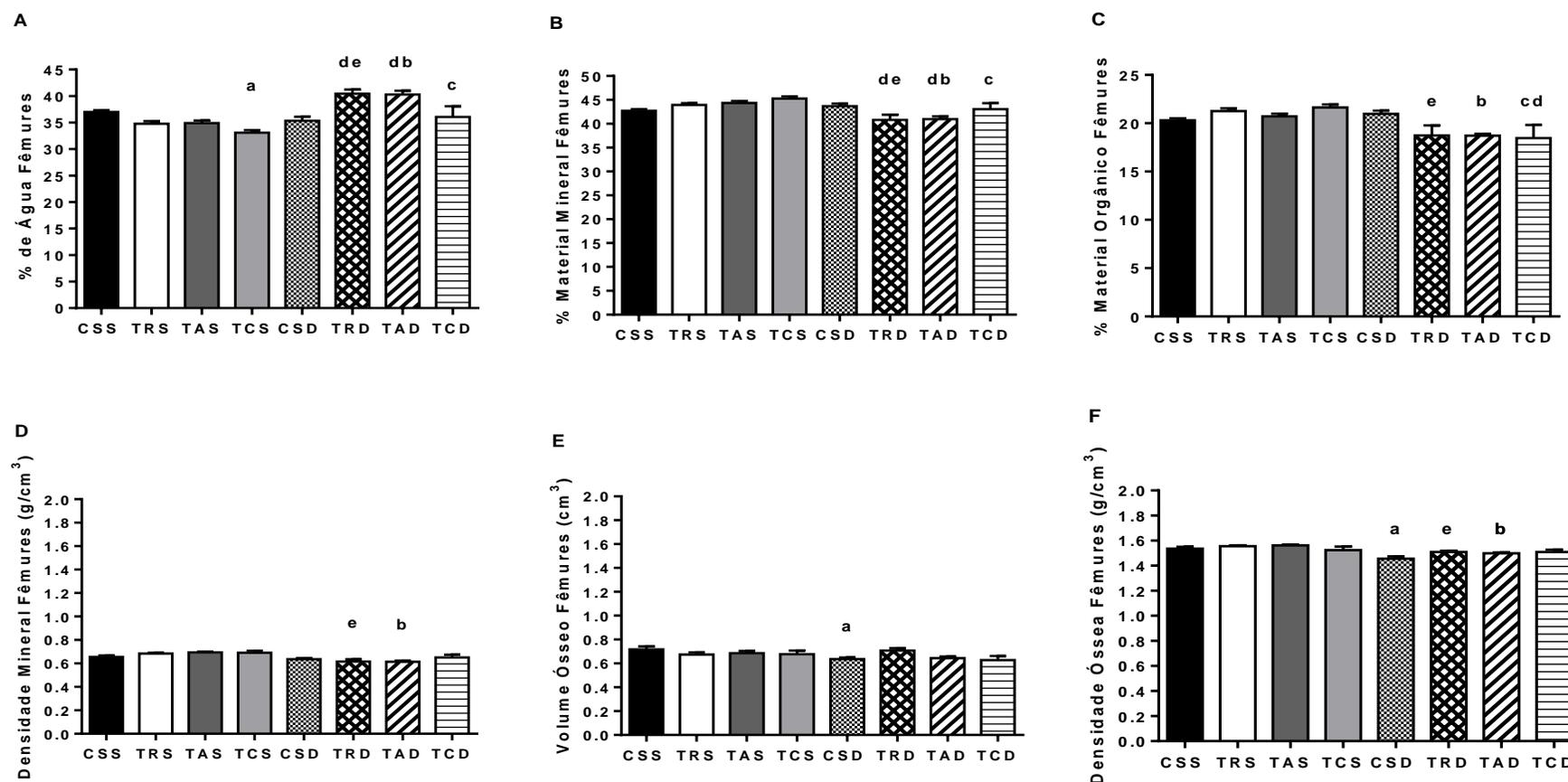
Na figura 12 estão representados os parâmetros biofísicos referentes à porcentagem de água (Figura 12A), porcentagem de material mineral (Figura 12B), porcentagem de material orgânico (Figura 12C), densidade mineral (Figura 12D), volume ósseo (Figura 12E), e densidade óssea (Figura 12F), dos fêmures dos animais dos grupos experimentais (CSD, TRD, TAD, TCD, CSS, TRS, TAS, TCS). No parâmetro analisado porcentagem de água (Figura 12 A) e material mineral (Figura 12 B) verificou-se diferença entre os grupos TRD, TAD e TCD quando comparado aos seus respectivos grupos saudáveis TRS, TAS e TCS. Os valores encontrados no grupo TCS para a porcentagem de água foi menor quando comparado ao grupo CSS. Já os grupos TRD e TAD quando comparado ao seu respectivo grupo controle CSD, apresentaram maiores valores para tal parâmetro.

Para a variável analisada porcentagem de material orgânico, os valores apresentaram-se reduzidos nos grupos TRD, TAD e TCD quando comparados aos grupos sem diabetes experimental TRS, TAS e TCS. No grupo TCD quando comparado ao seu respectivo grupo controle CSD também houve redução neste parâmetro. Não houve diferença entre os demais grupos.

Quanto à densidade mineral, os valores mostrados foram menores nos grupos TRD e TAD quando comparados aos respectivos grupos sem diabetes experimental TRS e TAS. O volume ósseo apresenta-se menor no grupo CSD em comparação ao grupo CSS, sem diferença para os demais grupos experimentais. Já

a densidade óssea foi menor nos grupos CSD, TRD e TAD quando comparado aos grupos CSS, TRS e TAS.

FIGURA 12. Representação gráfica dos parâmetros biofísicos porcentagem de água (%), porcentagem de material mineral (%), porcentagem de material orgânico (%), densidade mineral ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), volume ósseo ( $\text{cm}^3$ ) e densidade óssea ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.



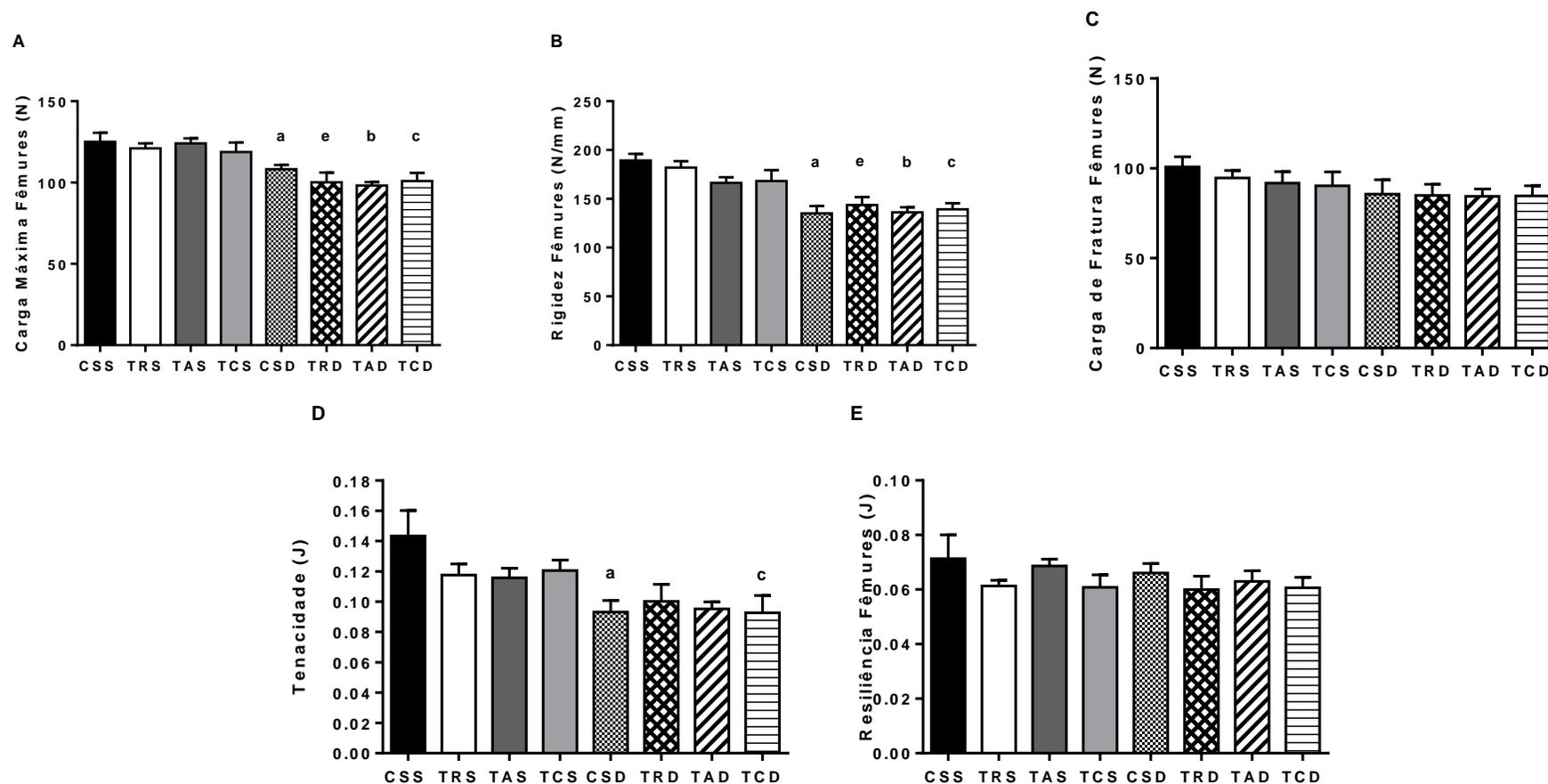
Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS; c vs. TCS, d vs. CSD e vs. TRS;  $p < 0,05$ .

## 5.9 Parâmetros Biomecânicos

Na figura 13 estão representados os valores referentes aos parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos experimentais (CSD, TRD, TAD, TCD, CSS, TRS, TAS, TCS) como carga máxima (N), rigidez (N/mm), carga máxima de fratura (N), tenacidade (J) e resiliência (J). Nota-se que os parâmetros analisados carga máxima e rigidez são menores nos grupos com diabetes experimental CSD, TRD, TAD e TCD em comparação aos grupos sem diabetes experimental CSS, TRS, TAS e TCS.

Os grupos não apresentaram diferença de carga de fratura e resiliência. Já a tenacidade, a diferença encontrada foi no grupo CSD e TCD quando comparado ao grupo sem diabetes experimental CSS e TCS demonstrando uma redução neste parâmetro.

FIGURA 13. Representação gráfica dos parâmetros biomecânicos carga máxima (N), rigidez (N/mm), carga máxima de fratura (N), tenacidade (J), resiliência (J) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.

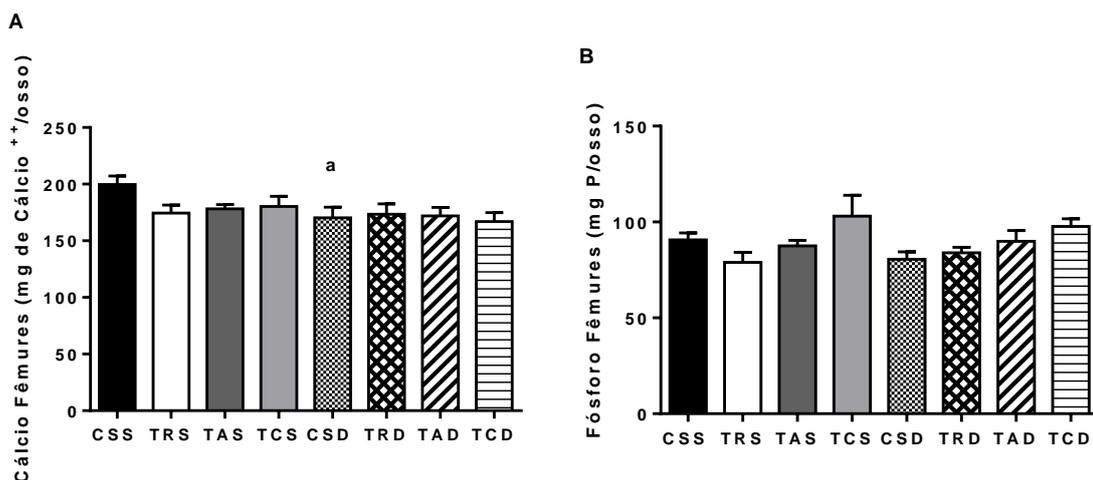


Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS; c vs. TCS e vs. TRS,  $p < 0,05$

## 5.10 Parâmetros Bioquímicos

Na figura 14 encontram-se os dados referentes às análises de cálcio (mg Ca<sup>2+</sup>/osso) e de fósforo (mgP/osso) dos fêmures dos animais dos grupos experimentais (CSD, TRD, TAD, TCD, CSS, TRS, TAS, TCS). Somente o grupo CSD apresentou redução dos valores de cálcio quando comparado ao seu respectivo grupo CSS. Não se identificou diferença estatística entre os grupos experimentais para o parâmetro fósforo.

FIGURA 14. Representação gráfica dos parâmetros bioquímicos, cálcio (mg de cálcio<sup>++</sup>/osso) e fósforo (mg de P/osso) do fêmur direito dos animais dos diferentes grupos experimentais:

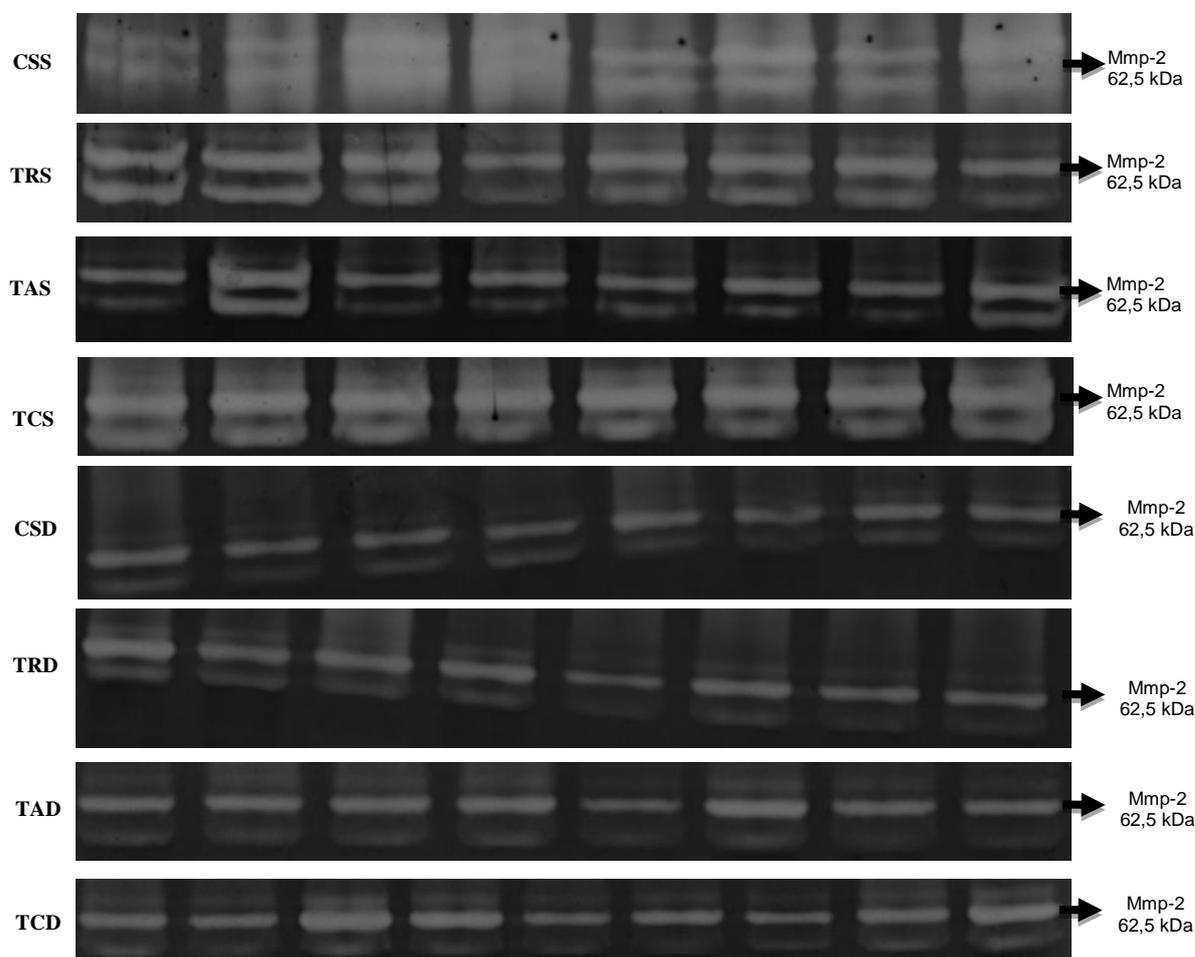


Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS,  $p < 0,05$ .

## 5.9 Zimografia de Gelatina

Na figura 15 estão reproduzidas fotos dos géis de zimografia para análise da atividade proteolítica da metaloproteinase-2 (MMP-2) do extrato de tecido ósseo (tíbias esquerdas) dos animais dos diferentes grupos experimentais (CSD, TRD, TAD, TCD, CSS, TRS, TAS, TCS).

FIGURA 15. Análise da atividade proteolítica do extrato de tecido ósseo (tíbias esquerdas) por zimografia das tíbias dos animais dos diferentes grupos experimentais.

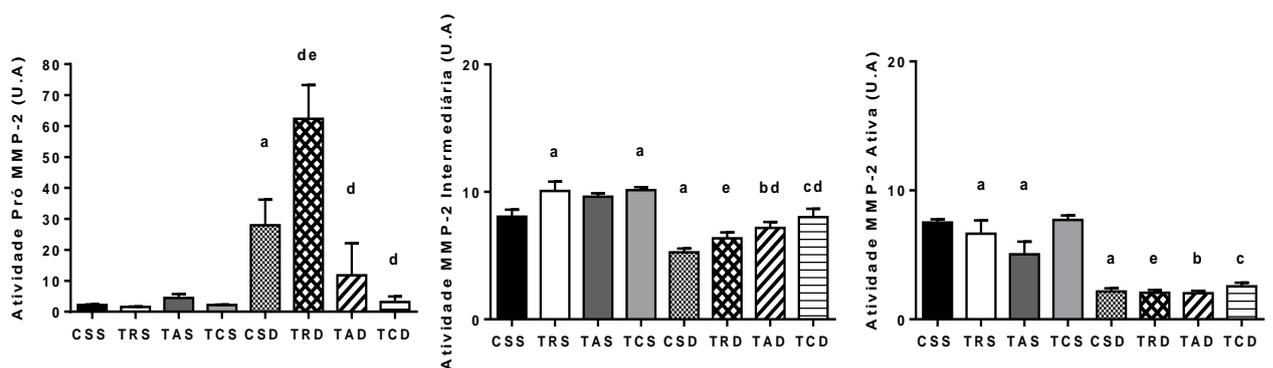


Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). bandas ativas PM = 62,5 kDa.

Na figura 16 estão expressas as intensidades médias das bandas de zimografia em unidades arbitrárias (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais (CSD, TRD, TAD, TCD, CSS, TRS, TAS, TCS). Na atividade proteolítica da pró MMP-2, os grupos CSD e TRD com diabetes experimental apresentaram maiores valores quando comparado aos grupos CSS e TRS sem diabetes experimental. O grupo TRD demonstrou maiores valores para esse parâmetro quando comparado ao seu controle diabético CSD, já os grupos TAD e TCD apresentaram menores valores da MMP-2 pró quando comparado ao grupo CSD. Sem diferença entre os grupos sem diabetes.

Para a atividade proteolítica da MMP-2 intermediária todos os grupos com diabetes experimental CSD, TRD, TAD, TCD diferiram dos seus correspondentes sem diabetes experimental CSS, TRS, TAS e TCS apresentando redução do parâmetro analisado. Além dessas diferenças, os grupos TAD e TCD também diferiram do seu grupo controle CSD, apresentando maiores valores. Os grupos sem diabetes TRS e TCS demonstraram maiores valores dessa MMP-2 quando comparado ao seu controle CSS. Quanto à atividade proteolítica da MMP-2 na sua forma ativa, os grupos CSD, TRD, TAD e TCD demonstraram menores valores dessa atividade quando comparados aos grupos CSS, TRS, TAS, TCS. Dentre os grupos normais, a diferença identificada foi menor nos grupos TRS e TAS quando comparado ao seu controle CSS.

FIGURA 16. Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais.



Controle Sedentário Saudável (CSS), Treinamento Resistido Saudável (TRS), Treinamento Aeróbico Saudável (TAS), Treinamento Combinado Saudável (TCS), Controle Sedentário Diabético (CSD), Treinamento Resistido Diabético (TRD), Treinamento Aeróbico Diabético (TAD), Treinamento Combinado Diabético (TCD). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. a vs. CSS; b vs. TAS; c vs. TCS, d vs. CSD e vs. TRS,  $p < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliaram-se os efeitos de três protocolos diferentes de exercício físico sobre as propriedades biofísicas e biomecânicas do fêmur de animais com *diabetes mellitus* tipo 2 experimental descompensado.

A massa corporal inicial dos animais semelhante nos grupos é importante quando a análise se refere ao sistema ósseo, pois este é diretamente afetado por esta variável, por causar uma sobrecarga e promover um estresse mecânico capaz de aumentar a massa óssea (TURNER et al., 2009). CASSILHAS et al. (2013) observaram aumento da massa corporal de animais sem diabetes submetidos ao protocolo de escada durante oito semanas de treinamento, estando de acordo com os dados encontrados neste estudo. Apesar das massas de tecidos adiposo e muscular não terem sido quantificadas neste estudo, é sabido que em indivíduos saudáveis a insulina, funcionando adequadamente, promove a síntese de lipídios e inibe a sua degradação (DIMITRIADIS et al., 2008). Sendo assim, acredita-se que a redução da massa corporal apresentada pelos grupos diabéticos que receberam dieta hiperlipídica, possivelmente se deve ao efeito do diabetes tipo 2 não controlado. Pois está claro na literatura, que a dieta hiperlipídica ofertada aos animais do grupo diabético durante todo o período experimental, é eficiente em desenvolver dislipidemias e obesidade nesses animais (DUARTE et al., 2008; SENE-FIORESE et al., 2008).

Além do efeito do diabetes experimental teve-se o efeito do estresse imposto pelo exercício nos grupos diabéticos, uma vez que esses mesmos efeitos não foram observados nos animais dos grupos sem diabetes experimental que receberam dieta padrão. Ademais, a glicemia dos grupos treinados com diabetes experimental não apresentou redução de seus valores até o fim do experimento. Resultados estes que divergem com a literatura, pois muito se sabe sobre os efeitos benéficos da atividade física para indivíduos com DMT2, como redução de massa corporal, com melhora da sensibilidade à insulina e captação de glicose em função da atividade musculoesquelética (COLBERG et al., 2010; STANFORD e GOODYEAR, 2014). Entretanto, atualmente também é sabido que este efeito positivo da atividade física para indivíduos com DMT2, talvez não aconteça da mesma forma para todos (STEPHENS e SPARKS, 2015), pois o descontrole

metabólico pode prejudicar os benefícios da contração muscular provocada pelo exercício físico, bem como a homeostase glicêmica.

Quanto aos exercícios de resistência, estes podem provocar alterações favoráveis no músculo esquelético aumentando sua massa, dessa forma aumentando a capacidade de captação e armazenamento da glicose (HALL et al., 2013). Sabe-se que o treinamento em escada é efetivo em aumentar a massa muscular. Em um estudo realizado por Cassilhas et al. (2013), foi observado aumento da secção transversa das fibras musculares do gastrocnêmio, flexor longo dos dedos e plantar, caracterizando uma hipertrofia muscular em ratos Wistar submetidos ao protocolo de escada durante oito semanas de treinamento. Outro estudo utilizando o mesmo protocolo de exercício e com o mesmo tempo de duração (8 semanas) também verificou nos animais exercitados aumento do volume muscular, demonstrando que este protocolo é efetivo em provocar hipertrofia muscular (LEE; FARRAR, 2003). Entretanto esse efeito benéfico do exercício não foi claramente identificado com a redução da glicemia nos grupos diabéticos submetidos ao protocolo de exercício realizado neste trabalho, talvez em função do consumo da dieta hiperlipídica durante todo o período experimental.

Durante todo o período experimental os animais sem diabetes experimental consumiram dieta padrão e os animais com diabetes experimental consumiram dieta hiperlipídica (cafeteria). Dessa forma acreditava-se que o consumo alimentar deste último grupo superaria o do grupo que recebeu dieta padrão, entretanto essa condição não foi observada neste trabalho no que se refere ao consumo em peso. A dieta hiperlipídica apresenta quantidade maior de calorias devido à proporção de gordura 5 vezes maior do que é ofertada na dieta padrão. Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes ao dos encontrados por Honors et al. (2012), que demonstraram maior consumo calórico entre os animais que consumiram a dieta rica em gordura quando comparado aos animais que não a consumiram. SINITSKAYA et al., (2008) utilizando ratos Sprague-Dawley, perceberam que os animais tiveram um consumo variado de dieta ao longo do experimento, entretanto, o consumo calórico dos animais que receberam a dieta hiperlipídica foi maior que a dos outros grupos experimentais, como aconteceu neste estudo.

A densitometria óssea é uma análise importante para se verificar a qualidade óssea (HUANG et al., 2010). Nesta análise pode-se identificar o efeito do

diabetes experimental sem demonstrar comprometimento do desenvolvimento destes animais.

Na literatura, já está bem claro que a sobrecarga mecânica é um fator importante para o desenvolvimento ósseo, assim como, adicionalmente, a sobrecarga imposta pelo exercício físico provoca benefícios ao tecido ósseo (HUANG et al., 2003). Deste modo, a DMO tem sido extensivamente utilizada para verificar os efeitos da atividade física sobre o sistema ósseo (MAÏMOUN; SULTAN, 2010). Em animais que foram submetidos ao protocolo de esteira de forma contínua e intermitente, essas atividades promoveram valores iguais ou menores para a área óssea (HUANG et al., 2008). Estes autores observaram CMO e DMO maiores nos animais controles ao serem comparados aos exercitados, tanto no protocolo contínuo quanto no intermitente. Resultados parecidos com os encontrados em nosso estudo, pois entre os grupos exercitados sem diabetes não houve aumento deste parâmetro. Além disso, nos grupos diabéticos os valores apresentados foram menores comparados aos grupos controle sem diabetes. Apesar de não se encontrar diferença estatística, um discreto aumento neste parâmetro foi observado no grupo diabético submetidos ao exercício resistido, comparado ao diabético não exercitado, possivelmente o exercício com características de força (exercício resistido) tem capacidade de produzir melhores efeitos ao tecido ósseo em indivíduos com *Diabetes Mellitus* tipo 2.

O exercício resistido demonstrou efeitos mais positivos sobre o osso, neste caso, justamente por impor uma maior tensão e deformação mecânica, melhorando a qualidade óssea além de minimizar os efeitos do diabetes (DE FEO et al., 2006). Uma vez que o ganho de massa óssea conseguido em função do exercício é, principalmente, em resposta a um aumento da tensão mecânica (TUREK, 1991). Pois durante o exercício, as forças de tensão, compressão e cisalhamento, associadas à deformação mecânica das contrações musculares, são capazes de provocar alterações da estrutura óssea. Contudo, segundo BOOTH et al. (2014), indivíduos diabéticos tem risco aumentado de fraturas mesmo com densidade mineral óssea normal ou maior que o normal, pois muitos fatores podem contribuir para essa contradição como, mudanças da arquitetura óssea, porosidade cortical ou até mesmo alterações do *turnover* ósseo.

Neste estudo, as análises biométricas indicam comprometimento do desenvolvimento dos animais durante o período experimental, mostrando que o

diabetes experimental afetou o desenvolvimento ósseo dos animais. Resultados parecidos foram vistos por VERHAEGHE et al. (2000), em ratos diabéticos exercitados em esteira. Estes animais demonstraram tamanho de fêmur reduzido quando comparados aos animais sem diabetes que exercitaram, e comparados aos animais com diabetes experimental que exercitaram. Já ERDAL et al. (2011) não verificaram diferença do comprimento do fêmur dos animais com diabetes experimental quando comparado aos seus respectivos controles. Nesse sentido, o diabetes experimental, neste estudo, foi capaz de comprometer o desenvolvimento ósseo quando se analisou variáveis biométricas (diâmetro menor de fêmures).

As variáveis biofísicas e biomecânicas ósseas nos dá indícios reais do desenvolvimento e da qualidade óssea. Composto por água, material mineral e orgânico, o tecido ósseo pode sofrer alterações de sua densidade resultantes de modificações de suas propriedades físicas. Diante disso, os parâmetros físicos dos fêmures dos animais experimentais foram analisados a partir da determinação do volume ósseo, de forma indireta por meio do princípio de Arquimedes (MARTIN, 1990; RENNO et al., 2007). A biomecânica está relacionada às propriedades ósseas como matriz calcificada, composição e arranjo dos cristais, as fibras colágenas, bem como das propriedades geométricas como o arranjo trabecular (ERDAL et al., 2011; FERRETTI et al., 2001).

Na análise biofísica, uma redução da porcentagem de material mineral e orgânico nos grupos diabéticos resistido e aeróbico foi observada, esses valores também podem demonstrar um comprometimento da saúde do tecido ósseo. Na biomecânica, a carga máxima de fratura e rigidez de todos os grupos com diabetes experimental apresentaram menores valores quando comparados aos grupos sem diabetes. BOYAR et al. (2003) demonstraram alterações dos tamanhos dos cristais da matriz óssea mineralizada de ratos diabéticos tanto no fêmur quanto tibia, usando um procedimento específico para esta análise. Também, ERDAL et al. (2011) e REDDY et al. (2001) verificaram redução da resistência biomecânica dos fêmures dos animais com diabetes tipo 2. Possivelmente, tal efeito foi devido à alteração da relação entre colágeno e composição mineral. Diante disso, alterações metabólicas como o diabetes podem afetar o metabolismo ósseo assim como promover formação inadequada da matriz extracelular, alterando as propriedades biomecânicas de ossos diabéticos e o exercício pode não ser capaz de prevenir ou reverter estes danos em diabéticos descompensados.

Estão bem estabelecidos os efeitos positivos promovidos pelo exercício sobre o metabolismo do tecido ósseo. As cargas mecânicas são fator importante na homeostase esquelética, pois estimulam a interação entre os tecidos musculoesqueléticos. Essas cargas afetam o remodelamento ósseo dependente da intensidade aplicada. A falta de estimulação mecânica leva a uma rápida perda da massa óssea, por outro lado uma sobrecarga mecânica pode causar fraturas ósseas (YOKOTA; LEONG; SUN, 2011; YUAN et al., 2015). Assim o tecido ósseo é um tecido que responde a estímulos mecânicos como a atividade física e ao exercício físico (CHEUNG; GIANGREGORIO, 2012).

Por outro lado, segundo ANTONOPOULOU et al. (2013), o *turnover* ósseo pode ser alterado pela glicemia sanguínea, já que evidências indicam que a hiperglicemia pode prejudicar a função dos osteoblastos. Ainda de acordo com esses autores, indivíduos diabéticos são suscetíveis à deficiência de vitamina D, e a relação entre essa vitamina e a saúde óssea já está bem definida na literatura. Nesse sentido, o controle glicêmico inadequado influencia negativamente a resposta osteoblástica e osteoclástica para 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>, possivelmente promovendo uma fragilidade óssea em indivíduos com DM2 (ANTONOPOULOU et al., 2013). O diabetes e a hiperglicemia crônica podem promover a glicação avançada (AGE) e acumulação dos produtos finais desta glicação contribuindo para as complicações do diabetes. No caso do tecido ósseo, os alvos principais da acumulação de AGE são os componentes estruturais da matriz do tecido conjuntivo; tal acumulação pode prejudicar a função do colágeno alterando assim a função do osso. Além disso, altas concentrações de glicose podem prejudicar a síntese de osteocalcina pelas células osteoblásticas (proteína essencial à formação óssea), aparecendo diminuídas em indivíduos com diabetes tipo 2 (KURRA; FINK; SIRIS, 2014). Nesse sentido pode-se ter um paradoxo: o exercício promovendo o remodelamento ósseo, e a hiperglicemia crônica prejudicando a mineralização óssea via osteoblasto.

O conteúdo de cálcio foi menor no grupo CSD em comparação ao CSS, e o conteúdo de fósforo não foi diferente entre os grupos experimentais, resultados que se opõem aos encontrados na análise biomecânica. Pois a rigidez está relacionada com a quantidade mineral depositada e nos grupos diabéticos, esta demonstrou estar alterada. Assim, sugere-se que a deposição destes minerais ocorra de maneira distinta nos ossos de animais diabéticos. Além disso, o que

também é questionável é a eficiência com que estes minerais se ligam ao colágeno do osso. ZHANG et al. (2009) não encontraram diferença das concentrações de cálcio e fósforo séricos em animais Goto-Kakizaki, que são espontaneamente diabéticos. Já KIMURA et al. (2012) verificaram aumento do cálcio urinário e sérico em animais Torii-Lepr<sup>fa</sup>, que também são espontaneamente diabéticos além de obesos. Tais resultados indicam alteração do metabolismo do cálcio. O cálcio urinário não foi mensurado neste trabalho.

É sabido que o turnover ósseo é um mecanismo para a manutenção da homeostase do cálcio, e é influenciado por diversos hormônios e vitaminas como o 1,25-diidroxicolecalciferol, PTH, calcitonina, estrógenos, andrógenos e fatores de crescimento, sendo todos estes fatores reguladores diretos da função celular óssea. A mineralização normal do osso é dependente da 1,25-diidroxicolecalciferol (vitamina D), os osteoblastos apresentam receptores para a vitamina D e PTH, e sintetizam osteocalcina, um marcador de formação óssea. O PTH aumenta os níveis de cálcio plasmático por meio da estimulação da reabsorção óssea (BERGLUND et al., 2000). A forma como o DMT2 afeta o osso tem sido atribuída à depressão osteoblástica. A falta de insulina (ZHANG et al., 2009) ou a hiperglicemia (ANTONOPOULOU et al., 2013) afeta a função osteoblástica e conseqüentemente a mineralização da matriz óssea. Alguns autores observaram redução das concentrações de osteocalcina em animais diabéticos, que poderiam implicar em menor atividade dos osteoblastos com reduzida formação óssea (ZHANG et al. 2009).

Considerando a relevante participação das metaloproteinases de matriz MMPs para integridade da massa óssea, neste estudo, analisamos a atividade das isoformas pró, intermediária e ativa da MMP-2, de ratos dos diferentes grupos experimentais. A isoforma ativa da MMP-2 demonstrou-se reduzida em todos os grupos com diabetes experimental e o exercício não foi capaz de reverter esse quadro. Dessa forma, frente a sua importância no processo de remodelamento ósseo sugere-se que a fisiologia óssea nesses grupos esteja afetada em função da expressão diminuída dessa MMP. A presença de MMP-2 na sua forma ativa (62,5 kDa) é um bom indicativo da preservação da massa óssea, por regular a osteogênese e o remodelamento ósseo (INOUE et al., 2006; MOSIG et al., 2007). Ainda nesse contexto, alguns estudos demonstram que a deficiência da MMP-2 provoca alterações no osso caracterizadas pela destruição do tecido ósseo na forma

de nódulos, artrites e osteólises (síndrome de NAO). Assim sendo, tais evidências sugerem um papel mais complexo dessa gelatinase no desenvolvimento e na manutenção óssea (MOSIG et al., 2007).

O estresse mecânico induzido pelo exercício físico regular e atividades físicas regulam o remodelamento ósseo através dos osteoblastos. Esse estresse provocado pelo exercício aumenta a resistência óssea por alterar a rede de colágeno quando ocorre a formação do novo tecido ósseo. O impacto no solo e a força de tensão promovida pelas diferentes contrações musculares durante o exercício pode produzir estimulação ao osso, além disso o estresse de cisalhamento aumenta significativamente os níveis de mRNA de colágeno 1 e metaloproteinases de matriz 1 e 3 melhorando as propriedades de resistência e biomecânica do tecido ósseo (YUAN et al., 2015).

SHIGUEMOTO et al. (2012) demonstraram que os grupos treinados de forma crônica (ratas intactas e ovariectomizadas treinadas por 12 semanas) apresentaram um aumento na atividade da MMP-2. O grupo ovariectomizado não exercitado apresentou redução da atividade da MMP-2 quando comparado ao seu respectivo par intacto. Assim os autores apresentam que a ovariectomia promove uma redução da atividade da MMP-2 e danifica o tecido ósseo. Por outro lado, o exercício crônico de resistência foi eficiente em reverter esses prejuízos.

Em um estudo com humanos realizado por LEWANDOWSKI et al. (2011), as concentrações séricas das metaloproteinases 2 e 9 foram menores em sujeitos com diabetes tipo 2 quando comparados com os controles não diabéticos. Segundo os autores, a regulação das MMPs parece complexa numa situação de hiperglicemia aguda, pois parece haver regulação seletiva de MMP-9 nesse quadro. Após a aplicação do teste de tolerância à glicose, onde ocorre aumento agudo da glicose, houve redução seletiva da MMP-9 após 120 minutos de teste, não ocorrendo o mesmo com a MMP-2. Dessa forma, pode-se sugerir que haja uma regulação diferencial das MMPs em resposta a alterações agudas da glicemia.

NYMAN et al., (2011) realizaram um estudo com camundongos com deficiência para MMP-9 e 2. As análises ósseas desses animais indicaram que as MMP's influenciam diretamente a resistência a fratura, particularmente, afetam a arquitetura trabecular, a estrutura do osso cortical e a composição do tecido. Adicionalmente os resultados encontrados pelos pesquisadores sugerem que as MMP's com substratos semelhantes podem ter efeitos diferenciados sobre as

propriedades mecânicas do tecido ósseo. Neste estudo os resultados ainda demonstraram que a redução da MMP-2 diminui a mineralização do tecido e um aumento na porosidade do mesmo. Já a redução da MMP-9 não afetou a resistência a flexão do fêmur dos animais, mas diminuiu a rigidez do osso. A causa exata desse efeito ainda permanece desconhecida, mas as condições do colágeno tipo 1 pode fragilizar o osso e a MMP-9 influencia diretamente a organização das proteínas da matriz extracelular encontrada no tecido ósseo. Assim sabe-se que o exercício pode afetar positivamente as MMP's do tecido ósseo e a hiperglicemia pode prejudicar a ação dessas MMP's como aconteceu neste estudo em animais com diabetes mellitus tipo 2 experimental não controlado.

Os mecanismos que provocam fragilidade do tecido ósseo em função do diabetes ainda não estão totalmente elucidados e podem diferir entre o *diabetes mellitus* tipo I e o tipo II. Ademais, o remodelamento ósseo acontece através dos osteoblastos (células responsáveis pela deposição óssea) e os osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção óssea), mantendo a calcemia e a integridade óssea. Esse processo dinâmico envolve vias complexas que sobre condições patológicas, como diabetes, podem sofrer alterações reduzindo a resistência óssea aumentando o risco de fraturas (MERLOTTI et al. 2010). As alterações metabólicas causadas pelo DMT2, descompensado, podem prejudicar o metabolismo ósseo promovendo modificações na formação da matriz extracelular e alterando as propriedades do tecido ósseo diabético. Quanto ao exercício físico, já está claro na literatura os seus benefícios para o sistema ósseo e para o controle glicêmico, por ser um tratamento não farmacológico capaz de auxiliar na redução da glicemia através da cascata de eventos provocados a partir da contração exercida pelo músculo esquelético. Muitas são as especulações acerca do mecanismo pelo qual o DMT2 afeta negativamente a qualidade óssea, e qual o exercício físico mais adequado e eficaz em atenuar tais efeitos, e os resultados encontrados na literatura ainda se mostram divergentes. Diante disso são necessárias investigações mais aprofundadas para se compreender exatamente esse processo, utilizando métodos como análises de marcadores moleculares de remodelamento ósseo, bem como analisar um possível dano tecidual através do estresse oxidativo provocado no próprio tecido ósseo.

## 7. CONCLUSÃO

O diabetes mellitus tipo dois experimental, não controlado, afeta as propriedades biofísicas, biomecânicas e MMP's dos fêmures e tíbias dos animais, e o treinamento resistido foi capaz de melhorar ou atenuar tais efeitos. Entretanto, os treinamentos aeróbico e combinado não foram capazes de reverter esses efeitos no presente estudo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARZADEH, A. et al. Induction of Diabetes By Streptozotocin in Rats. v. 22, n. 2, p. 60–64, 2007.

AKHTER, M. P. et al. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 21, n. 1, p. 14–19, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2009. **Diabetes Care**, v. 32, n. SUPPL. 1, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2011. **Diabetes Care**, v. 34, n. SUPPL.1, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2012. **Diabetes Care**, v. 35, n. SUPPL. 1, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetes Care. **The Journal of CLinical and Applied Research and Education**, v. 38, n. January, p. 99, 2015.

ANTONOPOULOU, M. et al. Diabetes and bone health. **Maturitas**, v. 76, n. 3, p. 253–259, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Atualizaçã{o das diretrizes para o tratamento Farmacol{ó}gico da obesidade e do sobrepeso. **Abeso**, v. 76, p. 4–18, 2010.

BERGLUND, M. et al. Metal-bone interactions. **Toxicology Letters**, v. 112-113, p. 219–225, 2000.

BILEZIKIAN, J. P. , RAISZ, L. G. AND MARTIN, T. J. Principles of Bone Biology. v. 1,2, n. 978-0-12-373884-4, 2008.

BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143–1211, 2012.

BOOTH, S. L.; CENTI, A. J.; GUNDBERG, C. Bone as an Endocrine Organ Relevant to Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 14, n. 12, p. 1–8, 2014.

BOSKEY, A.; ROBEY, P. G. The composition of bone. **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**, p. 49–58, 2013.

BOUDENOT, A.; ACHIOU, Z.; PORTIER, H. Does running strengthen bone? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 12, p. 1309–1312, 2015.

BOYAR, H.; TURAN, B.; SEVERCAN, F. FTIR spectroscopic investigation of mineral structure of streptozotocin induced diabetic rat femur and tibia. **Spectroscopy**, v. 17, n. 2-3, p. 627–633, 2003.

BRANDI, M. L. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 48, n. SUPPL.4, 2009.

SOGAARD, C. H., et al. A Comparison of the Effects of Two Anabolic Agents (Fluoride and PTH) on Ash Density and Bone Strength Assessed in an Osteopenic Rat Model. v. 20, n. 5, p. 439–449, 1997.

CARNEVALE, V. et al. Bone damage in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 24, n. 11, p. 1151–1157, 2014.

CASSILHAS, R. C. et al. Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 19, n. 1, p. 178–184, 2013.

CHAVEY, C. et al. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 11888–11896, 2003.

CHEUNG, A. M.; GIANGREGORIO, L. Mechanical stimuli and bone health: what is the evidence? **Current opinion in rheumatology**, v. 24, n. 5, p. 561–6, 2012.

DE FEO, P. et al. Exercise and diabetes. **Acta Biomedica de l'Ateneo Parmense**, v. 77, n. 1, p. 14–17, 2006.

DE WAARD, E. A. C. et al. Increased fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus: An overview of the underlying mechanisms and the usefulness of imaging modalities and fracture risk assessment tools. **Maturitas**, v. 79, n. 3, p. 265–274, 2014.

DEDE, A. D. et al. Type 2 diabetes mellitus and fracture risk. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 63, n. 12, p. 1480–90, 2014.

DIMITRIADIS, G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 91–97, 2008.

DUARTE, F. O. et al. Caloric restriction and refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. **Nutrition**, v. 24, p. 177–186, 2008.

ERDAL, N. et al. Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetes mellitus in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 140, n. 3, p. 342–353, 2011.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218–224, 2004.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I. et al. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal.**, v. 11, n. 2, p. 151–157, 2006.

FERRETTI, J. L. et al. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 2, p. 263–274, 2001.

FOSTER-SCHUBERT, K. E.; CUMMINGS, D. E. Emerging therapeutic strategies for obesity. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 7, p. 779–793, 2006.

HADLER-OLSEN, E. et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FEBS Journal**, v. 278, n. 1, p. 28–45, 2011.

HALL, K. E. et al. The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 62, n. 10, p. 1485–1494, 2013.

HOFBAUER, L. C. et al. Osteoporosis in Patients With Diabetes Mellitus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 9, p. 1317–1328, 2007.

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, n. 1, p. 16–31, 2004.

HUANG, T. H. et al. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **Journal of applied physiology**, v. 95, n. February 2003, p. 300–307, 2003.

HUANG, T. H. et al. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 350–357, 2008.

HUANG, T. H. et al. Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. **Calcified Tissue International**, v. 86, n. 2, p. 142–153, 2010.

INOUE, K. et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33814–33824, 2006.

IRIGOYEN, M. C. et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, 2, S, p. 998–1003, 2005.

KAGEL, E. M.; EINHORN, T. A. Alterations of fracture healing in the diabetic condition. **The Iowa orthopaedic journal**, v. 16, p. 147–152, 1996.

KIMURA, S. et al. Characteristics of bone turnover, bone mass and bone strength in Spontaneously Diabetic Torii-Lepr fa rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 30, n. 3, p. 312–320, 2012.

KJAER, M.; KJÆR, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiological reviews**, v. 84, n. 2, p. 649–98, 2004.

KLEIN-NULEND, J.; BACABAC, R. G.; MULLENDER, M. G. Mechanobiology of bone tissue. **Pathologie Biologie**, v. 53, n. 10, p. 576–580, 2005.

KONRAD, R. J. et al. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **The Biochemical journal**, v. 356, n. Pt 1, p. 31–41, 2001.

KUBOTA, Y. et al. Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. **Journal of dental research**, v. 81, n. 1, p. 23–7, 2002.

KURRA, S.; FINK, D. A.; SIRIS, E. S. Osteoporosis-associated fracture and diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 233–243, 2014.

LEE, S.; FARRAR, R. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. **J Exercise Physiol Online**, p. 80–87, 2003.

LEWANDOWSKI, K. C. et al. Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: Effects of short-term and chronic hyperglycaemia. **Archives of Medical Science**, v. 7, n. 2, p. 294–303, 2011.

MAÏMOUN, L.; SULTAN, C. Effects of physical activity on bone remodeling. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 60, n. 3, p. 373–388, 2010.

MARQUETI, R. D. C. et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **International Journal of Sports Medicine**, v. 29, n. 7, p. 559–563, 2008.

MARTIN, R. B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 10, p. 1021–1029, 1990.

MARWICK, T. H. et al. Exercise training for type 2 diabetes mellitus: Impact on cardiovascular risk: A scientific statement from the american heart association. **Circulation**, v. 119, n. 25, p. 3244–3262, 2009.

MERLOTTI, D. et al. Mechanisms of impaired bone strength in type 1 and 2 diabetes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 9, p. 683–690, 2010.

MOHAMMAD, S.; AHMAD, J. Management of obesity in patients with type 2 diabetes mellitus. **Current diabetes reviews**, v. 3, n. 2, p. 95–101, 2007.

MOSIG, R. A. et al. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 9, p. 1113–1123, 2007.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 290–308, 2009.

NORDSLETTEN, L. et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: A mechanical and densitometric study. **Calcified Tissue International**, v. 55, n. 6, p. 436–442, 1994.

NOTOMI, T. ET AL; A comparison of resistance and aerobic training for mass , strength and turnover of bone in growing rats. **European Journal Applied Physiology**, V. 83, n.6, p. 469–474, 2000.

NYMAN, J. S. et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 1252–1260, 2011.

RAKIETEN N, RAKIETEN ML, N. M. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep.**, v. 29, p. 91–98, 1963.

REDDY, G. K. et al. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 2001.

RENNO, A. C. M. et al. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. **Experimental Gerontology** q , qq. v. 42, p. 517–522, 2007.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. BIOMECHANICAL AND MOLECULAR REGULATION OF BONE REMODELING\_annurev.bioeng.8.061505.pdf. 2006.

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **The Journal of physiology**, v. 577, n. Pt 3, p. 997–1007, 2006.

ROSEN, C. J. Bone Remodeling, Energy Metabolism, and the Molecular Clock. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 7–10, 2008.

SAITO, M.; MARUMO, K. **Bone quality in diabetes** **Frontiers in Endocrinology**, 2013.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 22, n. 5, p. 607–617, 2012.

SIGAL, R. J. et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: A randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 147, n. 6, p. 357–369, 2007.

SINITSKAYA, N. et al. Short day-length increases sucrose consumption and adiposity in rats fed a high-fat diet. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 9, p. 1269–1278, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015/Sociedade Brasileira de Diabetes – São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 4, p. 313–320, 2005.

STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. **Advances in physiology education**, v. 38, n. 4, p. 308–14, 2014.

STEPHENS, N. A.; SPARKS, L. M. Resistance to the beneficial effects of exercise in type 2 diabetes: are some individuals programmed to fail? **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 1, p. 43–52, 2015.

SUOMINEN, H. Muscle training for bone strength. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 18, n. 2, p. 85–93, 2006.

THOMAS, C. C.; PHILIPSON, L. H. Update on Diabetes Classification. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 1, p. 1–16, 2015.

THRAILKILL, K. M. et al. Bone Formation Is Impaired in a Model of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2875–2881, 2005a.

THRAILKILL, K. M. et al. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 289, n. 5, p. E735–E745, 2005b.

TUREK, S. L. **Ortopedia: princípios e sua aplicação**. Editora Manole, São Paulo: 1991.

TURNER, C. H. et al. Mechanobiology of the skeleton. **Science signaling**, v. 2, n. 68, p.3, 2009.

VARGHESE, S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: an overview of regulation and functions. **Front Biosci**, v. Sep 1;11, p. 2949–66, 2006.

VERHAEGHE, J. et al. Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. **Bone**, v. 27, n. 2, p. 249–256, 2000.

VICENTE-RODRÍGUEZ, G. et al. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 416–424, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. p. 6, 2016.

YOKOTA, H.; LEONG, D. J.; SUN, H. B. Mechanical loading: Bone remodeling and cartilage maintenance. **Current Osteoporosis Reports**, v. 9, n. 4, p. 237–242, 2011.

YUAN, Y. et al. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2015.

ZHANG, L. et al. Bone biomechanical and histomorphometrical investment in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Acta Diabetologica**, v. 46, n. 2, p. 119–126, 2009.

ZHANG, M. et al. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. **Experimental Diabetes Research**, v. 2008, p. 1–9, 2008.

## ANEXO I - PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**n° 071/2012**

Protocolo n°. 067/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *"Papel dos treinamentos: Aeróbico, resistido e combinado sobre as propriedades físicas e biomecânicas de ossos de ratos obesos com diabetes mellitus 2"*, submetido pela pesquisadora *Karina Ana da Silva*.

São Carlos, 22 de outubro de 2012.

**Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias**

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais