

ALINE PEDRO DE MELO YAMAMOTO

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA DENSIDADE
ÓSSEA E NO CONTEÚDO DE GLUT4 EM RATOS DIABÉTICOS
(TIPO 2) OSTEOPÊNICOS**

**Araçatuba-SP
2013**

ALINE PEDRO DE MELO YAMAMOTO

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA
DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E NO CONTEÚDO DE
GLUT4 EM RATOS DIABÉTICOS (TIPO 2)
OSTEOPÊNICOS**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba -
Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" -
UNESP, para obtenção do título
de "Mestre em Ciências
Fisiológicas".
Orientadora: Profa. Adj. Doris
Hissako Sumida.

**Araçatuba-SP
2013**

Dados Curriculares

Nascimento: 01.03.1988, Penápolis - SP.

Filiação: Ilza Pedro de Melo
Mauro Vicente Tadayoshi Yamamoto

2004/2009: Curso de Graduação em Fisioterapia – Faculdade de Saúde São Paulo/FASSP.

2011/2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho

À minha mãe, **ILZA PEDRO DE MELO**, meu porto seguro que em momentos quando o caminho mais cômodo era desistir, me incentivou a continuar, mostrando que para atingir meus objetivos, devo lutar. Obrigada pelo exemplo que é, pelo amor e apoio que me dá. Você atua de forma providencial em toda as minhas conquistas.

Agradecimentos Especiais

A uma energia maior que posso chamá-la de **Deus**, por me proporcionar força naqueles momentos em que ela me faltava.

À minha orientadora Professora **Doris Hissako Sumida**, por sua paciência, orientação e ensinamentos transmitidos.

Ao Professor **Mário Jefferson Quirino Louzada** e minha amiga **Nandressa Mendes Riso**, pelo incentivo e confiança em mim depositada.

Ao **Max Sander de Oliveira da Mota** pela atenção e ajuda prestada neste momento tão importante da minha vida.

A meu amigo **Rafael Dias Astolphi**, pela amizade, apoio e colaboração constante durante todas as fases deste trabalho.

E por fim, a todas as **amizades** que construí ao longo do tempo em que vivi no Departamento de Ciências Básicas, na Faculdade de Medicina Veterinária/FMVA e no Instituto de Ciências Biomédicas/ICB. Saibam que todos vocês, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradecimentos

Bem sei que agradecer é difícil, pois toda lista eventualmente peca pela ausência de uma ou de outra pessoa que teve seu papel, ainda que pequeno, para a conclusão de um estudo como este. Mesmo assim, arrisco-me a citar os nomes de algumas pessoas que participaram dessa jornada comigo, que me forneceram meios para a travessia. E dizer a elas e a todos que contribuíram para realização desse trabalho que os agradecimentos aqui escritos são bem mais que um simples obrigada.

À minha incansável mãe Ilza, pela formação que me permitiu ter, com os sacrifícios que só ela sabe quais foram, e aos meus irmãos Angélica Pedro de Melo Yamamoto e Vincent Pedro Yamamoto, que me acompanham a todo momento, fornecendo-me amor e carinho. “Obrigada pela compreensão e por me apoiarem”.

Agradeço também aos demais familiares, meu pai Mauro Vicente Tasayoshi Yamamoto, minha vó Astolfina de Melo Pedro, minha Tia Ivone Pedro de Melo Vales e aos meus primos Tiago Pedro Vales e Gustavo Pedro Vales, pela paciência e incentivo.

Agradeço novamente ao Prof. Dr. Adj. Mario Jefferson Quirino Louzada, que mesmo não me conhecendo, abdicou de suas tarefas para me ouvir e acreditou em mim. “Sua contribuição foi fundamental para esta pesquisa”.

Ao Professor Ubiratan Fabres Machado que abriu as portas de seu laboratório para me receber, e à Dr^a Maristela Makamoto pela grande colaboração neste trabalho.

A todos os professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais/FMVA, por todos os ensinamentos transmitidos e empréstimo de laboratório.

Ao professor Edilson Ervolino pela paciência e pela grande contribuição para a realização desse trabalho.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação, da Biblioteca e do Setor de Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo excelente trabalho e atenção em atender-me.

Em particular ao Técnico de laboratório e meu amigo Pedro Florindo, sempre disposto a ajudar-me.

Aos amigos pós-graduandos do laboratório Daisy Jaqueline Shirakashi, Fernando Yamamoto Chiba, Natália Helena Colombo e Rafael Dias Astolphi e aos alunos de iniciação científica, Alana Carvalho, Jéssica Bonilha, Maria Sara Coutinho, Mariane Curbete, Natália Magalhães, Nayara Rodrigues, Patricia Juvencio e Viviane Clicie.

A todas as amizades especiais construídas aqui, resultados importantíssimos que obtive durante esses anos de convivência e que levarei para o resto da vida.

À UNESP – Universidade Estadual Paulista e a sua Diretoria, pela oportunidade de realizar este curso.

E finalmente, à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa de estudos; à FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pesquisa (PROPe) e de pós-graduação (PROPG) da UNESP que proporcionaram os recursos necessários para a realização das pesquisas.

*“Pensamos demasiadamente,
Sentimos muito pouco.
Necessitamos mais de humildade
Que de máquinas.
Mais de bondade e ternura
Que de inteligência.
Sem isso,
A vida se tornará violenta e
Tudo se perderá”.*

Charles Chaplin

YAMAMOTO, A.P.M. **EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E NO CONTEÚDO DE GLUT4 EM RATOS DIABÉTICOS (TIPO 2) OSTEOPÊNICOS**. 2013. 142f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

RESUMO

O diabetes *melittus* (DM) é considerado um importante problema na saúde pública em vários países do mundo, pois além de estar em ascendente prevalência, compromete tanto a produtividade quanto a qualidade de vida e sobrevida dos seus portadores. Sua principal característica é a presença de hiperglicemia crônica decorrente de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A literatura tem mostrado uma associação de DM com redução da massa óssea. Contudo, os mecanismos de mudanças da densidade mineral óssea (DMO) nesses pacientes diabéticos ainda não estão claros. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do treinamento resistido (TR) sobre a DMO, as propriedades biomecânicas do osso, glicemia, calcemia, fosfatemia, a sensibilidade à insulina e a expressão de GLUT4 em ratos osteopênicos com diabetes tipo 2 (DM2). Para tanto, foram utilizados 64 ratos machos (5 dias de idade) divididos em dois grandes grupos: grupo controle (CN), que recebeu injeção de veículo (tampão citrato 10 mmol/L, pH 4.5 i.p.) e grupo diabético (DM), que recebeu injeção de estreptozotocina (150 mg/kg i.p.). Após 55 dias, foi mensurada a glicose de cada animal utilizando o monitor (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) para verificar se os animais do grupo DM estavam diabéticos. Apenas os ratos do grupo DM com glicose acima de 200mg/dl foram utilizados no experimento. Logo em seguida, todos os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (80 mg/kg de peso corporal, i.m) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal, i.m) para realizar a primeira análise densitométrica (AD) (pré-suspensão) da tíbia direita por emissões de absorciometria de raios-X (DXA), do aparelho DPX (Lunar DPX Alpha, WI, USA). Em seguida, esses grupos foram subdivididos em quatro grupos: CN, controle osteopênicos (CO), DM e diabéticos osteopênicos (DO). Os animais dos grupos CO e DO foram suspensos pela cauda por um período de 21 dias para promover osteopenia nos membros traseiros. Ao final deste período, a segunda AD (pós-suspensão) foi realizada. Após esta análise, estes grupos osteopênicos foram retirados da suspensão e ficaram em movimento livre em suas gaiolas. Antes de iniciar o treinamento resistido, foi necessário esperar duas semanas para que o grupo osteopênico recuperasse a marcha. Então, os ratos foram subdivididos novamente em 8 grupos: 1) Controle sedentário (CS), 2) CO sedentário (COS), 3) Controle exercitado (CE), 4) CO exercitado (COE); 5) diabético sedentário (DS), 6) DO sedentário (DOS), 7) Diabético exercitado (DE), 8) DO exercitado (DOE). Os grupos exercitados foram submetidos ao TR (os ratos foram treinados para subir uma escada vertical de 1.1m inclinada a 80 graus com pesos acoplados em suas caudas), durante 12 semanas. Ao final deste período, os ratos foram anestesiados, conforme descrito acima, para a realização de: 1) terceira AD (pós-TR) para avaliar a DMO; 2) remoção de: a) amostra de sangue (para a aferição de: glicemia, insulinemia, calcemia e fosfatemia); b) músculo gastrocnêmio (para

quantificação da proteína GLUT4); c) tíbias direitas (para realização do teste biomecânico de flexão em três pontos com o intuito de avaliar rigidez, força máxima (Fmax) e tenacidade dos ossos) e tíbias esquerdas (para análise histológica). Após o TR, constatou-se que a glicemia, a expressão de GLUT4, o peso corporal, a DMO e as propriedades biomecânicas do osso melhoraram em animais diabéticos osteopênicos e não osteopênicos. No entanto, os grupos controle exercitados e sedentários não mostraram diferenças em qualquer uma dessas variáveis. Em relação à fosfatemia, todos os grupos apresentaram valores semelhantes; por outro lado, apenas o grupo DS apresentou níveis mais elevados de calcemia em relação ao grupo COE. Os resultados obtidos sugerem que o TR em animais diabéticos osteopênicos e não osteopênicos promoveu: 1) diminuição da glicemia; 2) incremento na expressão de GLUT4; 3) aumento de peso corporal; 4) aumento da DMO; 5) melhoria nas propriedades biomecânicas.

Palavras-chave: Densidade óssea. Diabetes mellitus. Doença óssea metabólica. Exercício. Fraturas óssea. Sensibilidade à insulina. GLUT4.

YAMAMOTO, A.P.M. EFFECT OF RESISTANCE TRAINING ON BONE MINERAL DENSITY AND GLUT4 CONTENT IN OSTEOPENIC RATS WITH TYPE 2 DIABETES. 2013. 142f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is considered an important public health problem in many countries of the world, because, besides being in ascending prevalence, it commits the productivity, the quality of life and survival of their bearers. Its main characteristic is the presence of chronic hyperglycemia due to defects in secretion and/or insulin action. The literature has shown an association between DM and reduced bone mass. However, the mechanisms of change in bone mineral density (BMD) in these diabetic patients are still unclear. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of resistance training (RT) on BMD, bone biomechanical properties, glycemia, calcemia and phosphatemia, insulin sensitivity and GLUT4 expression in osteopenic rats with type 2 diabetes (DM2). Thus, we used 64 male rats (5 days old) divided into two groups: control (CN), which received an injection of vehicle (citrate buffer 10 mmol/L, pH 4.5 i.p.) and diabetic (DM), which received an injection of streptozotocin (150 mg/kg i.p). After 55 days, glucose was measured in each animal using the monitor (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) to verify if animals of DM group were diabetic. Only diabetic group rats with glucose above 200mg/dl were used in the experiment. After that all animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg body weight, i.m) and xylazine (10 mg/kg bodyweight i.m) so that the first densitometric analysis (DA) (pre-suspension) of the right tibia by dual X-ray absorptiometry emissions (DXA), from apparatus DPX (Lunar DPX Alpha, WI, USA) was performed. Then, these groups were subdivided into four groups: CN, osteopenic control (OC), DM and osteopenic diabetic (OD). Animals in groups OC and OD were suspended by their tails for a period of 21 days to promote osteopenia in hindlimb. Thereafter, the second DA (post-suspension) was performed. After this analysis, these osteopenic groups were removed from suspension and stayed with free movement in their cages. A period of two weeks was required to start the resistance training to recover the march of the animals that were in hypokinesia. Then, the rats were subdivided again into 8 groups: 1) sedentary control (SC), 2) sedentary OC (SOC), 3) exercised control (EC), 4) exercised OC (EOC), 5) sedentary diabetic (SD), 6) sedentary OD (SOD), 7) exercised diabetic (ED) and 8) exercised OD (EOD). The exercised groups were submitted to RT (the rats were trained to climb a vertical ladder of 1.1m inclined at 80 degrees with weights secured to their tails), during 12 weeks. At the end of this period, rats were anesthetized, as described above, to perform: 1) the third DA (post-TR) to evaluate BMD, 2) the removal of: a) blood sample (for evaluation of: glycemia, insulinemia, calcemia and phosphatemia) b) gastrocnemius muscle (for quantification of GLUT4 protein), c) right tibias (for biomechanical testing of three-point flexion in order to assess stiffness, maximum strength (Fmax) and toughness of bone) and left tibias (for

histological analysis). After RT, glycemia, body weight, expression of GLUT4, BMD and biomechanical properties of bone in osteopenic and non-osteopenic diabetic animals were improved. However, the exercised and sedentary control groups showed no differences in any of these parameters. Regarding to phosphatemia, all groups showed similar values, but only the DS group showed higher calcium levels in relation to group COE. The results suggest that the RT in osteopenic and non-osteopenic diabetic animals promoted: 1) decrease in glycemia; 2) increase in GLUT4 expression; 3) augmentation in body weight; 4) increase in BMD; 5) improvement in biomechanical properties.

Keywords: Bone Density. Diabetes mellitus, Metabolic bone disease. Exercise. Bone fracture. Insulin sensitivity. GLUT4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da divisão dos grupos durante o período experimental.	39
Figura 2	Modelo de suspensão pela cauda.	41
Figura 3	Densitômetro DPX-ALPHA utilizado para mensuração da DMO da tíbia dos ratos	44
Figura 4	Foto ilustrativa da imagem da tela do computador evidenciando o programa operacional para a análise de dados de área, CMO e DMO.	44
Figura 5	Ensaio mecânico de flexão em três pontos, em tíbia de rato, corpo de prova.	46
Figura 6	Em A : Glicemia inicial (aos 60 dias de vida) dos grupos controle (CN) e diabético (DM), resultados são média±SEM, n=32. Em B : Glicemia plasmática (mg/dL); em C : Insulinemia (mg/dL); em D : HOMA-IR, após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e grupos diabético: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos.	54
Figura 7	Avaliação da concentração plasmática de fósforo (A) e cálcio (B), após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. * $p < 0,05$ DS vs. COE.	55

- Figura 8** Conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática (PM) e no microssoma (M), após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. A significância foi considerada quando $p<0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos. 57
- Figura 9** Densidade mineral óssea analisada por DXA, antes do período de suspensão pela cauda, dos grupos controle (CN) e diabético (DM). Em **A**: o conteúdo mineral ósseo (g), em **B**: área total (cm²) e em **C**: densidade mineral óssea (g/cm²). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=32, * $p<0,05$. 59
- Figura 10** Densidade mineral óssea analisada por DXA, após o período de suspensão pela cauda, dos grupos controle (CN), controle osteopênico (CO), diabético (DM) e diabético osteopênico (DO). Em **A**: o conteúdo mineral ósseo (g), em **B**: área total (cm²) e em **C**: densidade mineral óssea (g/cm²). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=16. A significância foi considerada quando $p<0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos. 60
- Figura 11** Densidade mineral óssea analisada por DXA, após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Em **A**: o conteúdo mineral ósseo (CMO - g), em **B**: área total (cm²) e em **C**: densidade mineral óssea (DMO - g/cm²). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. A significância foi considerada quando $p<0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos. 62

Figura 12 Propriedades biomecânicas das tíbias de ratos avaliadas pelo teste de flexão em 3 pontos, após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Em A: rigidez extrínseca ($\times 10^3 \text{N/m}$), em B: Fmax (N) - força máxima e em C: tenacidade (mJ). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, n=8. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos. 63

Figura 13 Aspecto histológico da epífise, metáfise e parte da diáfise nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando o tecido ósseo esponjoso e o tecido ósseo compacto nos grupos CS (A), COS (B), CE (C), COE (D), DS (E), DOS (F), DE (G), DOE (H). Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE). Barras de escala: 1500 μm ; aumento original 2x. Figura 13 - Aspecto histológico da epífise, metáfise e parte da diáfise nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando o tecido ósseo esponjoso e o tecido ósseo compacto nos grupos: em A: controle sedentário (CS); em B: controle osteopênico sedentário (COS); em C controle exercitado (CE); em D: controle osteopênico exercitado (COE); em E: diabético sedentário (DS); em F: diabético osteopênico sedentário (DOS); em G: diabético exercitado (DE); em H: diabético osteopênico exercitado (DOE). Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE). Barras de escala: 1500 μm ; aumento original 2x. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso corporal dos animais durante o período experimental.	58
-----------------	---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGE's – produtos finais de glicação avançada
- AMPK - proteína quinase ativada por AMP
- CMO – conteúdo mineral ósseo
- CN – grupo controle
- CS – grupo controle sedentário
- COS - grupo controle osteopênico sedentário
- CE – grupo controle exercitado
- COE – grupo controle osteopênico exercitado
- cm² - centímetro quadrado
- DM - diabetes mellitus
- DM1- diabetes mellitus tipo 1
- DM2- diabetes mellitus tipo 2
- DS - grupo diabético sedentário
- DOS - grupo diabético osteopênico sedentário
- DE - grupo diabético exercitado
- DOE - grupo diabético osteopênico exercitado
- DMO - densidade mineral óssea
- DXA - dual Energy X-Ray Absorptiometry
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM - erro padrão da média
- Fmáx - força máxima
- g - grama
- g/cm² - grama por centímetro quadrado

- GLUT4 - proteína transportadora de glicose-4
- GH - hormônio do crescimento
- HDL - lipoproteína de alta densidade
- IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- i.m - intramuscular
- IMC - Índice de massa corporal
- i.p – intraperitonal
- IR - resistência insulínica
- IRS-1/IRS-2 – substrato do receptor de insulina-1 e 2
- ITT - Teste endovenoso de tolerância à insulina
- mJ - miliJoule
- Kg – quilogramas
- kDa - kiloDalton
- Kitt - velocidade de decaimento da glicose
- L - litro
- m - metro
- mg - miligrama
- mg/dL - miligrama por decilitro
- mg/kg - miligramas por quilo
- mL - mililitro
- mM - milimolar
- μm - micrômetro
- M - molar
- Mmol - milimol
- MSC - células tronco mesenquimais da medula óssea
- N - Newton
- N/m - Newton por metro

- OC - osteocalcina
- OMS - organização mundial de saúde
- PI3K - fosfatidilinositol-3 quinase
- PKB ou Akt - proteína quinase-B
- RI - receptor insulínico
- RIE – radioimunoensaio
- rpm – rotações por minuto
- STZ – estreptozotocina
- TR – treinamento resistido
- μL – microlitro
- $\mu\text{IU/mL}$ – microunidades internacionais por mililitro
- μm – micrômetro
- vs – versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVO	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Animais	37
3.2	Sistema de suspensão	39
3.2.1	Técnica de suspensão	40
3.3	Programa orientado de treinamento resistido	42
3.4	Coleta das amostras	43
3.5	Análises das estruturas ósseas	43
3.5.1	Densitometria óssea	43
3.5.2	Ensaio biomecânico – flexão em três pontos	45
3.5.3	Análise histológica	46
3.6	Outras análises	47
3.6.1	Glicemia	47
3.6.2	Insulinemia	48
3.6.3	Resistência à insulina	48
3.6.4	Cálcio	49
3.6.5	Fósforo	49
3.7	Metodologia de quantificação de GLUT4	49
3.7.1	Preparação das Amostras para o Western Blotting	49
3.7.2	Quantificação do conteúdo de proteína GLUT4	50
3.8	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Glicemia	52
4.2	Insulinemia	52
4.3	HOMA-IR	53
4.4	Fósforo	54
4.5	Cálcio	55
4.6	Expressão de GLUT4	56
4.7	Peso corpóreo	57
4.8	Densitometria óssea	59
4.8.1	Fase pré-suspensão	59
4.8.2	Fase pós-suspensão	59
4.8.3	Fase pós- treinamento resistido	60
4.9	Propriedades mecânicas da tíbia, após exercício	62
5	Análise histológica qualitativa	63
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	104

1 INTRODUÇÃO

A idade pediátrica é um período crítico para a aquisição do conteúdo mineral esquelético, pois durante a infância e a adolescência adquire-se 80% da massa óssea (DEL RIO *et al.*, 1994; GLASTRE *et al.*, 1990). O aumento progressivo da massa óssea durante esta faixa etária decorre de um estado de anabolismo ósseo, resultado de um padrão metabólico ósseo e mineral característico desta idade. Entretanto, certas doenças, especialmente doenças crônicas, podem alterar este padrão provocando redução da massa óssea na faixa etária pediátrica. Várias doenças crônicas têm sido relacionadas a esta situação, como, por exemplo, o diabetes *melittus* (DM) (AUDÍ, *et al.*, 2002; VAN DER SLUIS; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, 2001). A redução da massa óssea foi descrita tanto em portadores de diabetes *melittus* tipo 1 (DM1), quanto em portadores de diabetes *melittus* tipo 2 (DM2) (GUNCZLER *et al.*, 1998; TUOMINEN *et al.*, 1999).

O DM é uma doença metabólica crônica, caracterizada por hiperglicemia, distúrbios no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas decorrentes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A ação deficiente da insulina resulta de secreção inadequada e/ou respostas dos tecidos a este hormônio que pode estar diminuída em um ou mais pontos nas vias complexas da ação insulínica. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a danos em longo prazo, como disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Com a progressão da doença,

o indivíduo desenvolve complicações sistêmicas, como, por exemplo, alteração no metabolismo de proteínas, baixas concentrações plasmáticas de colesterol HDL, altas concentrações de triglicérides, doenças cardiovasculares (BORGGREVE *et al.*, 2003), microangiopatia (GUERCI *et al.*, 2001a), disfunção endotelial (GUERCI *et al.*, 2001b; HUANG *et al.*, 2012), retinopatia, neuropatia, nefropatia (JENSEN; DECKERT, 1992), aumento do tempo de cicatrização de feridas (PEPPA; RAPTIS, 2011) e risco de infecção (LÖE, 1993; PATTERSON; ANDRIOLE, 1997). Já os mecanismos fisiopatológicos relacionados à perda óssea no DM incluem a redução da atividade osteoblástica, alteração do metabolismo fósforo/cálcio, diminuição da síntese colágena ou produção reduzida de IGF-I e insulina (GLAJCHEN *et al.*, 1988; MCNAIR *et al.*, 1979).

Existe uma ascendente prevalência do DM e isso o torna um importante problema na saúde pública em vários países do mundo, levando ao comprometimento tanto da produtividade, quanto da qualidade de vida e sobrevida dos portadores da doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002). A projeção é que em 2030 a população mundial de diabéticos seja de 552 milhões e no Brasil alcançará 19 milhões, ou seja, cerca de 10% da população adulta (WHITING *et al.*, 2011). Este aumento do DM é impulsionado fundamentalmente pela crescente ascendência do DM2 que acontece tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (SMYTH; HERON, 2006). Desta maneira, o DM é considerado um problema de saúde pública prevalente, em crescimento e oneroso do ponto de vista econômico e social (GEORG *et al.*, 2005), sendo que, o adequado controle metabólico e tratamento de suas complicações

acarretam altos custos, refletindo em um grande problema médico-econômico-social (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002).

Há diferentes classes clínicas de diabetes, porém os dois principais tipos são classificados em: DM tipo1 (DM1) e DM tipo 2 (DM2). O tipo menos comum é o DM1, associado à absoluta deficiência de insulina pancreática e representa de 5 a 10% das pessoas com esta doença. Indivíduos com risco aumentado de desenvolver este tipo de diabetes geralmente podem ser identificados pela evidência sorológica de um processo patológico autoimune ocorrendo nas ilhotas pancreáticas e por marcadores genéticos. Já o DM2, considerado o tipo mais prevalente, representa cerca de 90 a 95% dos casos diagnosticados como DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). O DM pode estar relacionado a distúrbios envolvendo a ação e a secreção da insulina, afetando principalmente indivíduos obesos, uma vez que a obesidade confere resistência à ação periférica da insulina (GROSS *et al.*, 2002). A hiperglicemia no DM2 geralmente se desenvolve gradualmente, não sendo suficiente nos estágios iniciais para provocar o aparecimento dos sintomas clássicos. A causa desse desenvolvimento gradual é a evolução da doença que se inicia com leve resistência à ação da insulina, podendo culminar com a deficiência na produção desse hormônio (OLIVEIRA; MILECH, 2004).

Muitos modelos experimentais em animais têm contribuído para a elucidação de síndromes diabéticas e fatores genéticos associados (SINZATO *et al.*, 2009). O DM experimental induzido por estreptozotocina (STZ), tem sido amplamente utilizado para estudar a fisiopatologia do diabetes. Sabe-se que em ratos diabéticos induzidos por injeção de STZ no período neonatal, o

desenvolvimento da hiperglicemia, da intolerância a glicose e de leve hipoinsulinemia é um processo insidioso, quase assintomático no início e se manifesta na idade adulta, características que podem assemelhar-se ao curso natural do diabetes em seres humanos (KODAMA *et al.*, 1993; PORTHA *et al.*, 1989).

Provavelmente, a STZ induz diabetes pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que leva à destruição das células β da ilhota pancreática em animais experimentais. Modelos de ratos com diabetes severa (glicemia de jejum nível superior a 200/360 mg/dL), que reproduzem o DM1 descontrolado em humanos, estão bem estabelecidos por meio da administração de altas doses de STZ durante a vida adulta do animal. Já o tipo de Diabetes moderado (injeção de STZ no período neonatal), na qual o modelo experimental apresenta glicemia de jejum entre 120 a 360 mg/dL, caracteriza o estado clínico do DM2. Alguns autores administram STZ em uma única dose no dia de nascimento ou 2 dias após o nascimento ou após cinco dias de vida ou em duas doses no 2º e 9º dia de vida. Estes estudos mostram que, após 8 semanas de vida, os animais apresentam piora na tolerância à glicose e uma diminuição de 50% no conteúdo de insulina pancreática com hipoinsulinemia leve. Essa alteração na capacidade secretória das células beta pode ser decorrente de: 1) um reduzido conteúdo de GLUT2 nestas células, limitando assim a entrada da glicose e seu metabolismo; 2) da diminuição da afinidade da glicoquinase pela glicose (SINZATO *et al.*, 2009).

O modelo experimental de diabetes (injeção de STZ neonatal - no 5º dia) adotado pelo presente estudo é baseado no estudo de Takada *et al.* (2007).

Este modelo apresenta uma resistência à insulina sustentada e marcante na vida adulta que está fortemente relacionado com a perda de massa adiposa.

Beam e colaboradores (2002) relataram que indivíduos diabéticos apresentam menor densidade mineral óssea (DMO), o que os tornam mais propícios a fraturas, sendo que a perda de massa e o retardo na cicatrização do tecido ósseo (MOTYL; MCCABE, 2009) presentes em pacientes com DM é denominado como “doença óssea do diabético” ou “osteopatia diabética” (RETZEPI; DONOS, 2010).

O osso é um tecido conjuntivo rígido e flexível, onde a matriz extracelular é impregnada por sais de cálcio e fosfato amorfos, por um processo chamado de mineralização. Ele é altamente vascularizado, metabolicamente ativo e recoberto por células osteogênicas (KIERSZENBAUM, 2008). Os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos são células ósseas responsáveis pela função de regulação da distribuição e do conteúdo do componente inorgânico, por meio da manutenção dos níveis circulantes de cálcio (homeostase mineral) e pela contínua reabsorção e formação (modelação e remodelação) da matriz óssea, fazendo com que o sistema esquelético responda às forças mecânicas, geradas pela sustentação de pesos e atividade física (homeostase esquelética) (AIRES, 2008).

Portanto, a DMO trata-se do equilíbrio dos processos de formação e reabsorção, denominada de remodelação óssea. A formação está diretamente ligada à reconstrução e ao fortalecimento do tecido ósseo, enquanto a reabsorção se responsabiliza pela deterioração desse mesmo tecido (CADORE *et al.*, 2005). Tanto o CMO quanto a DMO são determinados principalmente por

fatores genéticos; cerca de 70% da variação na densidade óssea são determinadas pela hereditariedade, mas os outros 30% restantes dependem do estilo de vida em que a atividade física e, ou, a nutrição podem induzir respostas fisiológicas que permitam níveis mais elevados de obtenção de massa óssea (VICENTE-RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

Com o avanço significativo do conhecimento sobre a fisiologia do metabolismo ósseo nas últimas três décadas (COOPER; WOOLF, 2006; FERRON *et al.*, 2010), o tecido ósseo passou a ser observado como um órgão endócrino responsável por diversas circunstâncias metabólicas diretamente relacionadas com o balanço energético, por meio da interação de diferentes sinais (MOHAMED-ALI *et al.*, 1998) sujeito à regulação, tanto periférica como central (FUKUMOTO; MARTIN, 2009).

A regulação do metabolismo ósseo por meio da insulina sugere que o osso pode ser regulado pela homeostase energética. Ao mesmo tempo, a regulação do metabolismo energético por meio da osteocalcina, proteína secretada pelas células osteoblásticas, sugere que a homeostase energética pode ser regulada pela dinâmica do metabolismo ósseo (KARSENTY; OURY, 2010; NG, 2011).

Há um consenso geral de que a deficiência na produção de insulina observado no DM coincide com a osteopenia tanto em homens como em animais experimentais (MISHIMA *et al.*, 2002). A insulina é um agente anabólico que promove a proliferação de osteoblasto, síntese de colágeno e a produção de fosfatase alcalina (DUARTE *et al.*, 2005). Ademais, este hormônio é capaz de induzir respostas anabólicas no fígado, tecido muscular e tecido

adiposo, sendo importante para a homeostase de lipídeos, proteínas e carboidratos. A insulina também regula vários processos fisiológicos em diferentes tipos celulares como o fluxo de íons, captação de aminoácidos, expressão gênica, proliferação celular, apoptose, rearranjo do citoesqueleto e regulação de enzimas celulares (MAASSEN; OUWENS, 1997; MYERS; WHITE, 1996).

O DM provoca inúmeras consequências deletérias para a saúde esquelética, como menor crescimento da estatura durante a puberdade, menor DMO na idade adulta, aumento no risco de fratura e osteoporose, má cicatrização óssea e embriopatia esquelética (INZERILLO; EPSTEIN, 2004).

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento da osteopenia, que pode progredir para a osteoporose entre a população diabética (THRAILKILL *et al.*, 2005). Entre eles estão a insuficiente mineralização óssea durante os períodos críticos de acúmulo de massa óssea; o aumento da excreção de cálcio na urina, juntamente com menor absorção de cálcio intestinal, levando a uma deficiência crônica do mesmo; o efeito da hiperglicemia crônica sobre a função dos osteoblastos; a insulinopenia, por desregulação do eixo GH-IGF (THRAILKILL *et al.*, 2005). Além disso, os indivíduos com DM sofrem mais com fraturas ósseas (SCHWARTZ, 2003), devido à redução da força dos ossos causada pelo aumento na concentração dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no colágeno, por causa da hiperglicemia crônica (PAUL; BAILEY, 1996).

O metabolismo da glicose inicia-se com sua entrada nas células, necessitando de mecanismos facilitadores para seu transporte através da

membrana. A insulina aumenta a captação de glicose ao estimular o recrutamento dos seus transportadores para a membrana plasmática. Um dos transportadores identificados nesse processo é o transportador de glicose GLUT4, presente nos músculos esqueléticos e tecido adiposo (MACHADO *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos têm relatado aumento do GLUT4 em vários tipos de exercícios (KAWANAKA *et al.*, 1997).

O GLUT4 é a isoforma sujeita à ação da insulina, sofrendo translocação do intracelular (fração microssomal) para a membrana plasmática (fração membrana plasmática) quando há estimulação insulínica. Este é o principal mecanismo pelo qual a insulina agudamente estimula a captação de glicose pelas células sensíveis à insulina. O GLUT4 é encontrado principalmente em adipócitos e células musculares esquelética e cardíaca (FUKUMOTO *et al.*, 1989), possuindo um Km ao redor de 5 mM para a glicose. Marcus *et al.* (1994) verificaram que o GLUT4 se encontra distribuído também em células glomerulares renais e células musculares lisas da arteríola aferente do glomérulo renal de ratos. Em condições basais, a maior concentração de GLUT4 encontra-se dentro das células (aproximadamente 80%), em pequenos elementos túbulo-vesiculares, associados ao retículo trans-Golgi. A insulina causa uma rápida e pronunciada redistribuição de GLUT4, resultando em um aumento de 30 a 40 vezes nas quantidades presentes na superfície da membrana plasmática das células desses tecidos, possibilitando acentuados aumentos na capacidade de tecidos sensíveis à insulina captarem glicose (SLOT *et al.*, 1991).

A literatura tem apontado, nas últimas décadas, a associação entre a prática de exercício físico e longevidade com melhores condições de saúde (LEE; PAFFENBARGER, 2000; PAFFENBARGER JUNIOR *et al.*, 2001). A atividade física regular trabalha grande quantidade de grupos musculares, trazendo várias adaptações ao organismo, capazes de diminuir as taxas de morbidade e mortalidade e melhorar a saúde dos praticantes. Há evidências de que esses efeitos do exercício físico se estendem também a pacientes com DM (JACOBS-VAN DER BRUGGEN *et al.*, 2007; MYERS *et al.*, 2003; THOMPSON, 2003, 2005). Além disso, sabe-se que hábitos saudáveis de vida, plano alimentar adequado, atividade física e, se necessário, utilização de medicamentos, podem constituir tratamentos efetivos para o controle do DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

O exercício físico tem papel fundamental, não só na melhoria da qualidade de vida, como também nos benefícios que pode causar em longo prazo. Por exemplo, os efeitos benéficos sobre o controle do peso corporal, fortalecimento muscular e ósseo e quando praticado constantemente promove aumento na captação e metabolização da glicose pelo músculo, independente do aumento da insulina e isso é também associado ao aumento da síntese de GLUT4 (RICHTER *et al.*, 2001). Sendo assim, o exercício físico apresenta resultados positivos na melhoria da qualidade óssea em pacientes com diabetes, assim como, na consolidação das fraturas (REDDY *et al.*, 2001).

Durante o exercício físico, a contração muscular aumenta a translocação de GLUT4, independentemente da presença de insulina. Schimmack *et al.* (2006) demonstraram que este aumento de GLUT4 na membrana plasmática

durante o exercício é decorrente da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). E esta ativação promove a captação de glicose e a oxidação de ácidos graxos. Ademais, Musi e Goodyear (2003) observaram que a ativação da AMPK associada ao aumento da captação de glicose é influenciada por fatores como conteúdo de glicose, tipo de fibra muscular e treinamento físico. Entretanto, o mecanismo de transporte de glicose por meio da via de sinalização da AMPK não parece ser o único mecanismo responsável por esse processo metabólico. De maneira semelhante, existem inúmeras outras moléculas envolvidas nesse mecanismo de sinalização durante o exercício. O aumento na concentração do íon cálcio no interior da célula, a atividade do óxido nítrico sintase (NOS), o aumento na concentração de bradicinina ou até mesmo a hipóxia podem estimular a captação de glicose por meio do aumento da translocação do GLUT4 para a membrana durante a contração muscular (PAULI *et al.*, 2009).

Evidências científicas mostram que o exercício físico pode, além dos efeitos positivos sobre a via de sinalização dependente de insulina (receptor de insulina (IR), substratos do receptor de insulina-1 e 2 -IRS-1/IRS-2-, fosfatidilinositol-3 quinase -PI3K- e proteína quinase-B -PKB ou Akt-) e/ou independente de insulina (via AMPK e/ou outras biomoléculas), também beneficiar o indivíduo obeso com resistência à insulina por diminuir a expressão e/ou atividade de proteínas inflamatórias de efeito negativo à ação da insulina (PAULI *et al.*, 2009).

Homens de meia idade que participam de competições esportivas apresentam uma melhoria na tolerância à glicose e diminuição dos níveis

plasmáticos de insulina em relação aos homens de idade e peso semelhantes, mas que não praticam de atividade física. Estes dados sugerem que a prática regular de exercício físico pode aumentar a sensibilidade insulínica em todo o corpo e, provavelmente, no músculo. Posteriormente, isso foi confirmado em estudos com ratos (TOMAS *et al.*, 2002).

O treinamento físico realizado regularmente proporciona maior captação e metabolização da glicose pelo músculo, independentemente da ocorrência de aumento da insulina, sendo associado também ao aumento da síntese de GLUT4 (RICHTER *et al.*, 2001). A literatura mostra que ocorre 66% de aumento no conteúdo de GLUT4 em indivíduos treinados comparados com indivíduos sedentários (YONEMITSU *et al.*, 2001).

O exercício com peso ou TR é caracterizado por ter menor tempo de duração e intensidade mais elevada e, devido a isto, ocorre um aumento do recrutamento da via ATP-CP e da via glicolítica (ROMAN *et al.*, 2002). Este tipo de protocolo de atividade física é caracterizado por ativar mais a via glicolítica, sendo que após algumas semanas, o exercício resistido ou com pesos, faz com que o indivíduo tenha uma hipertrofia, ou seja, um aumento da secção transversa do músculo que, por sua vez, levará a um aumento da área de captação de glicose, da taxa metabólica de repouso (aumentando a beta oxidação de ácidos graxos livres -AGL- durante o repouso) e do consumo de energia após o exercício (EPOC) (MEIRELLES; GOMES, 2004).

O TR também desempenha importante influência anabólica sobre os ossos devido às forças mecânicas impostas (SOUZA; LUCIANO, 2005),

também exerce efeitos osteogênicos sobre o sistema esquelético (CADORE *et al.*, 2005 ; WARNER *et al.*, 2006).

Por sua vez, o tecido ósseo tem características piezoelétrica que permite ao osso receber deformações mecânicas e transformá-las em potenciais elétricos, estimulando a movimentação das células formadoras de osso. Essas forças de tensão, compressão, cisalhamento e deformação mecânica repetida pelas contrações musculares resultam em um aumento das correntes elétricas pulsáteis no osso, devido aos fenômenos piezoelétrico e de fluxo (SOUZA; LUCIANO, 2005).

Reddy *et al.* (2001), no intuito de examinar as consequências biomecânicas do diabetes, estudaram a integridade estrutural do fêmur e da tíbia em ratos com diabetes induzido por STZ, sendo que os resultados deste estudo garantiu que o DM está associado com a deterioração mecânica do osso, resultando em ossos com integridade biomecânica menor.

Pesquisas nas quais os animais são mantidos em suspensão ou hipocinesia têm sido executadas para simular as condições que acontecem em voos espaciais, em pessoas acamadas e imobilizadas. Embora o método produza condições diferentes (os animais podem realizar contrações dinâmicas, porém com carga mínima), as alterações podem ser observadas nos músculos e nos ossos de acordo com o tempo de exposição a essas situações (FITTS *et al.*, 1986; MATSUMOTO *et al.*, 1998).

Contudo, a exposição a ambientes de microgravidade afeta diretamente o sistema músculo-esquelético, alterando seu metabolismo. Esse ambiente gera uma baixa tensão sobre os ossos e por consequência, menor massa

óssea será necessária para manter a integridade estrutural do esqueleto (JOHNSON, 1998). Portanto, uma vez que os ossos são sensíveis a tensões mecânicas, a estrutura óssea pode ser modificada com alterações de gravidade ou ausência de contato com o solo (COWIN, 1998).

Sabe-se que a pratica regular de exercício físico, por exemplo, possui grande importância na manutenção da estrutura óssea, bem como na prevenção de fraturas (MARTINI, 1998).

Estudos epidemiológicos têm proporcionado evidências de que a regularidade de atividade física está associada com a incidência de DM2, mostrando que um programa de exercício regular pode reduzir o risco de desenvolvimento deste tipo de diabetes (BORGHOUTS *et al.*, 2000).

Trabalhos de intervenção e epidemiológico têm demonstrado que mudanças no estilo de vida, adotando-se novos hábitos alimentares e prática regular de atividade física, diminuem a incidência de diabetes do tipo 2 em indivíduos com intolerância à glicose. Geralmente tem sido recomendada a realização de exercícios aeróbios para indivíduos com diabetes do tipo 2. No entanto, recentes estudos têm demonstrado que o exercício resistido também é benéfico no controle glicêmico de diabéticos do tipo 2 (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004).

O exercício físico que desencadeia contrações musculares contra alguma forma de resistência externa, geralmente pesos, recebe as denominações de: treinamento com pesos, de força, contra resistência e resistido. O TR, quando praticado com regularidade, pode aumentar a força muscular com positivas repercussões na proteção contra as quedas, além do

eficiente estímulo para o aumento da massa óssea, influenciando fatores de risco relacionados com osteoporose (JOVINE *et al.*, 2006). Salientamos que os TRs são utilizados principalmente para aumentar a força muscular e este incremento de força está associado à maior densidade mineral (RYAN *et al.*, 2004).

A remodelação óssea é determinada pela solicitação a que os ossos são impostos (MARTIN, 2007). A prática da atividade física regular é uma importante estratégia não farmacológica para prevenção da osteoporose, manutenção e incremento da massa óssea (DELANEY, 2006).

O exercício físico também é importante para o controle e tratamento do DM, uma vez que o treinamento físico aumenta a capacidade do músculo em captar e oxidar ácidos graxos livres durante a atividade muscular, bem como aumenta a atividade da enzima lípase lipoproteica, que caracteriza um aumento de sensibilidade à insulina (RICHTER *et al.*, 2001).

A duração do programa de exercício é uma variável que deve ser sempre considerada para o entendimento do processo de adaptação do tecido ósseo. Vários autores têm realizado estudos de exercitação em períodos que variam de 3 a 20 semanas, tais como: 6 semanas (HOSHI *et al.*, 1998), 8 semanas (HUANG *et al.*, 2003), 12 semanas (HORNBERGER JUNIOR; FARRAR, 2004) entre outros.

Vários estudos demonstram a importância do exercício físico, relatando seus efeitos na melhora da força muscular e flexibilidade (POIRIER; DESPRÉS, 2001) e mudança na microarquitetura óssea (PRIOR *et al.*, 1996).

Muitos trabalhos da literatura que estudam o tecido ósseo em animais diabéticos utilizam modelos experimentais que mais se aproximam do DM1 (BEDI, *et al.*, 2010; ERDAL *et al.*, 2011).

Conforme descrito anteriormente, há disponíveis na literatura diversos artigos científicos que relatam uma associação entre diabetes e osteopenia, nos quais se observa que o DM leva diminuição da DMO. No entanto, ainda não há estudos utilizando modelos experimentais de diabetes neonatal (que tem como característica a presença de DM2 na vida adulta do rato) e de osteopenia (induzida via suspensão pela cauda, ocasionando ausência de carga nos membros posteriores, que simula situações de pacientes acamados ou imobilizados), e que foram submetidos ao TR no intuito de promover uma melhoria na qualidade do tecido ósseo e aumento do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4. O presente projeto propõe-se a realizar os estudos acima com base em experimentos específicos.

2 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do treinamento resistido (TR) sobre a DMO, as propriedades biomecânicas do osso, glicemia, calcemia, fosfatemia, a sensibilidade à insulina e o conteúdo do transportador de glicose GLUT4 em músculo esquelético gastrocnêmio à insulina em ratos osteopênicos com diabetes tipo 2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (64 animais) com 5 dias de vida, após nascimento, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Campus de Araçatuba - SP. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (Protocolo número 0470-11).

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Básicas, em temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, seguindo o ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, com disponibilidade plena de água e ração.

A massa corporal dos animais foi verificada semanalmente, sendo a primeira determinação realizada no início do experimento, quando foram estabelecidos de forma aleatória os grupos e a última medição, na data do sacrifício dos animais.

Os animais foram distribuídos em dois grandes grupos: 1) controle (CN), no qual se injetou o veículo (tampão citrato - 10 mmol/L, pH 4.5 – via i.p.) no quinto dia de vida; 2) diabéticos (DM), que recebeu injeção de streptozotocina (150mg/kg de p.c, via i.p) no quinto dia de vida. Após 55 dias, foi mensurada a glicose de cada animal utilizando-se o monitor (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) para verificar se os animais do grupo DM estavam diabéticos. Deste grupo, apenas os ratos com glicemia acima de 200mg/dL foram utilizados no experimento. Logo em seguida, todos os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (80 mg/kg de peso corporal,

i.m) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal, i.m) para realizar a primeira análise densitométrica (AD) (pré-suspensão) da tíbia direita por emissões de absorciometria de raios-X, do aparelho DXA (Lunar DPX Alpha, WI, USA). Em seguida, esses grupos foram subdivididos em quatro grupos: 1) CN; 2) controle osteopênicos (CO); 3) DM; 4) diabéticos osteopênicos (DO). Os animais dos grupos CO e DO foram suspensos pela cauda por um período de 21 dias para promover osteopenia nos membros posteriores. Após este período, a segunda AD (pós-suspensão) foi realizada. Após esta análise, estes grupos osteopênicos foram retirados da suspensão e ficaram livres em suas gaiolas. Esperaram-se duas semanas para iniciar o treinamento resistido com a finalidade de recuperar a marcha dos animais que ficaram em hipocinesia. Então, os ratos foram subdivididos novamente em 8 grupos: 1) Controle sedentário (CS), 2) CO sedentário (COS), 3) Controle exercitado (CE), 4) CO exercitado (COE); 5) diabético sedentário (DS), 6) DO sedentário (DOS), 7) Diabético exercitado (DE), 8) DO exercitado (DOE). A Figura 1 mostra o esquema da divisão dos grupos experimentais do presente estudo.

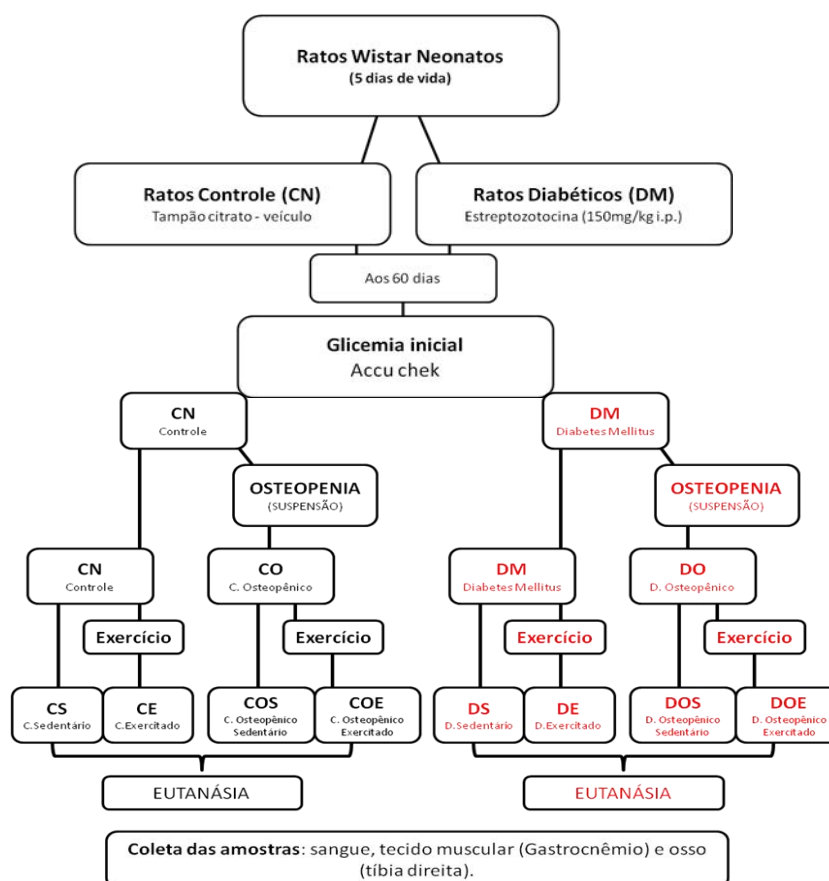


FIGURA 1 - Esquema da divisão dos grupos durante o período experimental.

3.2 SISTEMA DE SUSPENSÃO

O sistema de suspensão utilizado foi o elaborado por KASPER *et al.*, (1993), constituído por uma gaiola comum, única, onde foi instalado o sistema de fixação e suspensão do animal. A estrutura da gaiola permitiu aos animais livre movimentação com os membros dianteiros, e os membros pélvicos suspensos sem apoio no piso da gaiola ou nas paredes laterais, mantendo o animal, visualmente inclinado aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho.

O sistema de fixação foi composto por:

- uma presilha que serviu de encaixe da alça que faz parte do sistema de acoplamento do animal;

- haste rosqueada de aço retilínea com 40 cm de comprimento e 4,5mm de diâmetro;

- arruelas presas por duas porcas próximas à presilha que delimitou o espaço de movimentação do animal no interior da gaiola, sendo que o limite de curso para movimentação era de 5 cm;

- porcas sextavadas;

- porcas borboleta e arruelas para fixação da haste na grade da gaiola.

Esta haste foi colocada transversalmente na região superior da gaiola, a alça da cauda do animal foi presa na presilha do sistema de suspensão e, logo após, regulada a altura do animal para que seus membros pélvicos ficassem totalmente suspensos. Após esta verificação, a haste foi então fixada na grade pelas porcas borboletas.

No assoalho da gaiola foram colocadas ração e maravalha esterilizada. A higienização foi realizada todos os dias, com a substituição da maravalha. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração balanceada, podendo se movimentar.

3.2.1 TÉCNICA DE SUSPENSÃO

O processo de instalação da suspensão foi o mesmo utilizado por Silva e Volpon (2004). Inicialmente, os animais foram anestesiados com injeção via intramuscular de quetamina (10%, 80mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal) e xilazina (2%, 10 mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal). A cauda do animal foi lavada com água e sabonete líquido antisséptico e, após estar seca, foi aplicada tintura de Benjoim em toda a pele. Em seguida, a cauda foi envolvida

por uma espuma adesiva desde sua origem até os dois terços proximais, com o objetivo de proteger a pele e evitar lesões cutâneas.

Sobre a espuma adesiva foi aplicada uma tira elástica adesiva que foi tensionada homogeneamente de modo a envolver toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocada uma fita elástica estreita, fixada por enfaixamentos da tira elástica adesiva e enfaixamentos adicionais de esparadrapo e barbante, de modo a formar uma alça que serviu para conectar o animal ao sistema de suspensão. Em seguida, com o animal ainda anestesiado, a extremidade distal da sua cauda que não estava enfaixada foi amputada com auxílio de uma cisalha, com objetivo de evitar necrose no local durante o período de 21 dias em que os animais permaneceriam suspensos.



Figura 2 - Modelo de suspensão pela cauda.

3.3 PROGRAMA ORIENTADO DE TREINAMENTO RESISTIDO

Os animais realizaram o treinamento proposto por meio de uma escada, com as seguintes dimensões: (1.13 x 0.18 m, 2 cm grade), com 80° de inclinação; no topo da escada havia um local (casa), com diâmetro de 20 x 20 x 20 cm, onde ocorria o descanso durante as subidas (HORNBERGER JUNIOR; FARRAR, 2004). Após os 21 dias de suspensão, os animais dos grupos Diabéticos Osteopênicos Exercitados (DOE) e Controle Osteopênicos Exercitados (COE) foram colocados na gaiola e deixados com movimentação livre para que os mesmos recuperassem os movimentos normais da marcha. Após 2 semanas, quando esses animais voltaram à normalidade da movimentação, começou-se a prática orientada de TR.

Os animais dos grupos Diabéticos Osteopênicos Exercitados (DOE), Diabéticos Exercitados (DE), Controle Osteopênicos Exercitados (COE) e Controle Exercitados (CE) realizaram um período de adaptação ao TR, quando os mesmos fizeram, durante a primeira semana de treinamento, 8 repetições (subidas), com 30 segundos de descanso entre as séries, 3 vezes por semana, sem acréscimo de carga. Na segunda semana os animais fizeram 12 repetições, com 30 segundos de descanso entre as mesmas, 3 vezes por semana. Após 2 semanas de treinamento foi realizado o teste de uma repetição máxima (1-RM), com o intuito de quantificar a força máxima de cada animal e a partir do teste, estipulou-se a porcentagem de trabalho para os grupos.

Ao término do período de adaptação e do teste de 1-RM, os grupos CE, COE, DE e DOE foram submetidos ao programa orientado de TR em modo de

circuito, 3 dias por semana, divididos em 5 séries de 8 repetições. Na primeira semana não houve acréscimo de carga, na segunda semana ocorreu um acréscimo de sobrecarga aparato acoplado à cauda (esferas de aço) referente a 60% do valor obtido através do teste de 1-RM. A partir da terceira semana, houve um acréscimo sucessivo de 5% de sobrecarga semanalmente, em relação ao valor obtido por meio do teste de 1-RM, durante 12 semanas.

3.4 COLETAS DAS AMOSTRAS

Após 12 semanas de tratamento, os animais, em jejum de 12 horas, foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.) e, sob anestesia, foi realizada a laparotomia mediana, coletando-se o sangue pela veia cava inferior, e as amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados (4000 rpm, 4°C, 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -20°C até o dia da avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, insulinemia, cálcio e fósforo. Destes animais também foi realizada a remoção do músculo esquelético gastrocnêmio para quantificação de GLUT4 e das tíbias direitas e esquerdas para análises ósseas. Em seguida, os animais foram eutanasiados por dose excessiva anestésica.

3.5 ANÁLISES DAS ESTRUTURAS ÓSSEAS

3.5. 1 DENSITOMETRIA ÓSSEA

A densitometria óssea foi realizada em três fases ao longo do experimento: primeira análise densitométrica (pré-suspensão), antes da

aplicação da técnica de suspensão pela cauda; segunda análise densitométrica pós-suspensão, ou seja, ao final do período de suspensão pela cauda, e terceira e última análise densitométrica (pós-TR), ao final das 12 semanas de TR.

A CMO(g), a área total (cm^2) e a DMO (g/cm^2) foram medidas em todas as tíbias direitas dos animais, utilizando-se densitômetro modelo DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais, pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP.



Figura 3 - Densitômetro DPX-ALPHA utilizado para mensuração da DMO da tíbia dos ratos.



Figura 4 - Foto ilustrativa da imagem da tela do computador evidenciando o programa operacional para a análise de dados de área, CMO e DMO.

3.5.2 ENSAIO BIOMECÂNICO – FLEXÃO EM TRÊS PONTOS

Após análise densitométrica, todas as tíbias direitas foram submetidas a ensaios mecânicos em máquina universal de ensaio EMIC[®], modelo DL 3000*, do Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Unesp, Araçatuba, SP, com carga aplicada a uma velocidade de 5mm/min. O registro de força e deslocamento foi realizado pelo sistema computacional pertencente à máquina. Sendo assim, foi possível controlar todos os parâmetros dos ensaios e obter o valor da força referente a cada deslocamento. A aquisição destes pontos foi realizada em intervalos não padronizados de tempos definidos pelo programa, e permitiu definir a força necessária para ruptura da amostra.

Foram utilizados ensaios de flexão simples em três pontos que permitiram testar o corpo de prova. O ensaio consistiu em apoiar o corpo de prova sob dois suportes distanciados entre si a uma distância L , sendo a carga de dobramento ou flexão aplicada no centro do corpo de prova (a uma distância $L/2$ de cada apoio, Figura 4). A distância de vão de apoio foi de 20 mm e a célula de carga utilizada foi de 2000N. A cada incremento de carga aplicada ao material, foi anotada a deflexão correspondente, para depois ser construído o gráfico carga x deflexão, a partir do qual pôde-se obter: força máxima, rigidez e tenacidade, sendo - força máxima: $F_{máx}$, o maior valor de força observada no ensaio mecânico; rigidez: definida pela deformação observada no corpo, em resposta à força aplicada. Quanto maior a rigidez,

menor a deformação resultante da aplicação de uma tensão. Foi obtida por meio da inclinação da curva força versus deformação na fase elástica da curva.



Figura 5 - Ensaio mecânico de flexão em três pontos, em tíbia de rato, corpo de prova.

O programa de computador da máquina emitiu um arquivo de extensão.txt para cada ensaio. Este arquivo continha todos os pontos adquiridos durante os ensaios [tempo (s) x deslocamento (mm) x força (N)]. Com estes pontos e o programa de computador Excel[®] foi possível construir os gráficos e calcular as propriedades mecânicas.

3.5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica, dois animais de cada grupo (CS, COS, CE, COE, DS, DOS, DE e DOE) foram selecionados aleatoriamente. A tíbia esquerda dos ratos foi recolhida imediatamente após o período de TR e, em seguida, foram imersas em formaldeído a 4% durante 24 horas. A

descalcificação foi realizada em 10% de EDTA (pH 7,4) durante 2 meses. Secções seriadas de parafina de 5 mm de espessura foram feitas sobre os aspectos méso-distais da tibia esquerda e coradas com hematoxilina e eosina.

3.6 OUTRAS ANÁLISES

3.6.1 GLICEMIA

A glicemia foi determinada pelo método da glicose-oxidase que é um método enzimático específico para quantificação de glicose (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, Brasil), pelo qual ela é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada. A H_2O_2 , em presença de peroxidase, produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina, dando origem a um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 505nm de comprimento de onda. Para a dosagem de glicemia foram utilizados 10 μ L da amostra de plasma ou de padrão (100 mg/dl) e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 505 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

Glicose (mg/dl) = (Absorbância do teste $\div$ Absorbância do padrão) x 100

Glicose (mmol/L) = mg/dl x 0,0556

3.6.2 INSULINEMIA

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico – RIE (Coat-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Trata-se de uma reação de competição entre antígenos (insulina fria e insulina marcada) para ligação a um anticorpo específico. Essa reação obedece à lei da ação de massas. Portanto, quanto mais insulina fria estiver presente, haverá maior formação do complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

Para a dosagem da insulinemia foram pipetados 200µL de amostras de plasma ou dos padrões (0, 5, 15, 50, 100, 200 e 350 µIU/mL) nos tubos do “kit” que contém anticorpo frio de insulina. Adicionou-se 1,0 mL de insulina 125I a todos os tubos. Esta solução foi bem homogeneizada, e incubada por 18 horas em temperatura ambiente para que ocorra a reação de ligação competitiva de insulina fria e da marcada pelo anticorpo. Terminada a incubação, todo o líquido foi descartado, restando no fundo do tubo o complexo hormônio-anticorpo, e deste, foi quantificada a emissão de radiação gama da curva padrão e das amostras de plasma. As insulinemias de ratos foram aferidas nesta curva padrão.

3.6.3 RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina foi avaliada por dois índices: a) HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue: $HOMA - IR = \frac{\text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum (}\mu\text{IU/mL)}}{22,5}$ (LIMA; MACHADO *et al.*, 1998); b) velocidade de desaparecimento de glicose (Kitt) calculada pela fórmula $\ln 2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da

glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose, ou seja, $t_{1/2} = \ln 2 / \text{coeficiente de } x$ (BONORA *et al.*, 2000).

3.6.4 CÁLCIO

As determinações de cálcio foram realizadas pelo método espectrofotométrico (“kit” comercial - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil. ref. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm.

3.6.5 FÓSFORO

As determinações de fósforo foram realizadas por meio do método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972), utilizando-se “kit” comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil. ref.12). O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de complexo fosfomolibdato não reduzido, que foi determinado em 340 nm.

3.7 METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DO GLUT4

A quantificação da proteína GLUT4 das amostras foi feita por meio da técnica de “western blotting”.

3.7.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O “WESTERN BLOTTING”

Para “western blotting” foi feito o processo de fracionamento de membranas celulares em membrana plasmática (PM) e microssomal (M), para tecido muscular esquelético gastrocnêmio. Para isso, os tecidos musculares

foram homogeneizados em tampão TRIS HCl 10mM; EDTA 1mM, sacarose 250mM, pH 7,4, usando-se POLYTRON PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) e centrifugados a 1700 rpm durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado ressuspenso no mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (1700 rpm) por 10 minutos a 4°C. Os dois sobrenadantes juntos foram submetidos a uma centrifugação a 16000 rpm durante 60 minutos, a 4°C. O sedimento correspondendo à fração plasmática (PM) foi ressuspenso em 500µL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até a utilização. O sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação (47000 rpm) durante 60 minutos, a 4°C. O sedimento correspondente à fração microssomal (M) foi ressuspenso em 300µL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até a utilização.

A concentração de proteína total das diferentes frações de membranas celulares foi avaliada através do método de Lowry's method (LOWRY *et al.*, 1951).

3.7.2 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA GLUT4

A detecção das quantidades de proteínas GLUT4 no músculo gastrocnêmio foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, com a utilização de kit de quimioluminescência (ECL) para detecção das bandas. Quantidades iguais de proteínas foram solubilizadas em tampão de Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (10%) e então transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). Após bloqueio com leite desnatado em pó durante 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-GLUT4 (Chemicon) (diluição

1: 3000 em PBS/BSA 8%), durante 3 horas a 37°C. Posteriormente foi feita uma incubação com os anticorpos secundários anti-IgG, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1: 10000, em solução bloqueadora BSA 1% durante 1 hora. As membranas foram lavadas vigorosamente com tampão PBS + Triton e colocadas em contato com 4ml da combinação da solução A e solução B (Solução A: 8,856 mL de água destilada, 100µL de Luminol 2,5 mM e 44µL de Ácido Cumárico 400mM e 1 mL de Tris 1M pH 8,5; Solução B: 8,9939 água destilada, 6,1µL de Peróxido de Hidrogênio e 1mL de Tris 1M pH 8,5) por 1 minuto e expostas a Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) por períodos de 1 hora a -70°C para detecção das bandas resultantes. As imagens obtidas após revelação foram analisadas por densitometria óptica, utilizando-se um “software” (IMAGE MASTER ID–AMERSHAM Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

O anticorpo anti-GLUT4 utilizado consistiu em antisoro comercial de coelho (Chemicon International, Temecula, Califórnia).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores foram apresentados como média±EPM. A análise estatística foi feita pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 GLICEMIA

Aos 60 dias de vida, as glicemias dos capilares dos grupos controle (CN) e diabetes mellitus (DM) foram aferidas. O grupo DM mostrou um aumento ($p<0,05$) da glicose no sangue em comparação com CN (Fig. 6A). A Figura 6B mostra as glicemias dos grupos controle (CS, COS, CE e COE) e dos ratos diabéticos (DS, DOS, DE, e DOE) após TR. Esta figura mostra que as glicemias de todos os grupos controle foram semelhantes (CS, COS, CE e COE). Não há diferenças entre as glicemias dos ratos diabéticos exercitados (DE e DOE). Entretanto, estes grupos exercitados apresentaram glicemia reduzida ($p<0,05$) em relação aos grupos diabéticos sedentários (DS e DOS), que por sua vez, não mostraram diferenças entre eles. Avaliando os grupos controle e diabéticos, observa-se que ambos os grupos, DS e DOS, apresentaram glicemias mais altas ($p<0,05$) em relação a todos os grupos controle (CS, COS, CE e COE). O grupo DOE mostrou valores mais elevados ($p<0,05$) em comparação com os grupos controle (CE e COE exercitados). Por outro lado, o grupo DE apresentou valores maiores ($p<0,05$) apenas em relação ao grupo CE.

4.2 INSULINEMIA

A Figura 6C mostra os resultados da insulinemia após TR. A indução de osteopenia promoveu aumento dos valores de insulinemia ($p<0,05$) nos grupos COS e COE em relação ao grupo CS. Não houve diferenças entre os grupos controle COS e COE, bem como entre os grupos CS e CE, e entre este

último grupo e COE. Por outro lado, o CE apresentou valores menores de insulinemia em relação aos grupos COS. Todos os grupos diabéticos apresentaram valores semelhantes. Os animais do grupo CS apresentaram valores similares em comparação com os grupos diabéticos (DS, DOS e DOE), exceto em relação ao grupo DE. Não houve diferença entre o grupo CE somente em comparação com o grupo de diabético DOE. No entanto, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os grupos diabéticos (DS, DOS, DE, e DOE) em relação aos grupos controle COS e COE. A insulinemia de grupo CE foi diferente em comparação aos grupos DS e DOS, e do grupo DE.

4.3 HOMA-IR

O HOMA-IR (Figura 6D) foi calculado a partir dos valores de glicemia e insulinemia para verificar a presença de resistência à insulina (RI). Ao comparar apenas os grupos controle, observou-se que o grupo COS apresentou maior valor ($p < 0,05$) deste índice em comparação com os outros grupos controle (CS, CE e COE). Não houve diferenças entre os grupos diabéticos. Na análise dos resultados entre os animais dos grupos controle e diabéticos, observou-se que não houve diferenças entre os grupos diabéticos (DS, DOS, DE, e DOE) em comparação com os grupos controle CS e CE. Também não foram encontradas diferenças entre os grupos DS e DOE em relação aos grupos CS, CE e COE. Além disso, o HOMA-IR no grupo controle COS foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com todos os grupos diabéticos. O grupo COE apresentou valores significativamente superiores ($p < 0,05$) em relação aos grupos diabéticos DOS e DE.

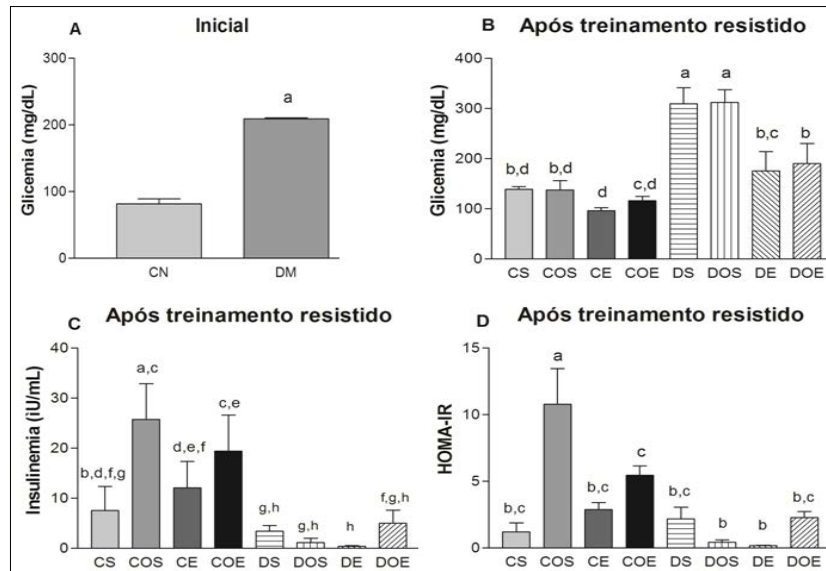


Figura 6 - Em **A**: Glicemia inicial (aos 60 dias de vida) dos grupos controle (CN) e diabético (DM), resultados são média $\pm$ SEM, $n=32$. Em **B**: Glicemia plasmática (mg/dL); em **C**: Insulinemia (mg/dL); em **D**: HOMA-IR, após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e grupos diabético: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, $n=8$. A significância foi considerada quando $p<0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos.

4.4 FÓSFORO

A Figura 7A, mostra as concentrações plasmáticas de fósforo de todos os grupos controle e diabéticos ao final do experimento. Observa-se que não houve diferenças significativas neste parâmetro entre os grupos estudados.

4.5 CÁLCIO

Na avaliação da concentração plasmática de cálcio (Figura 7B) de todos os grupos controle e diabéticos constatou-se apenas uma diferença entre o grupo controle COE e diabético DS.

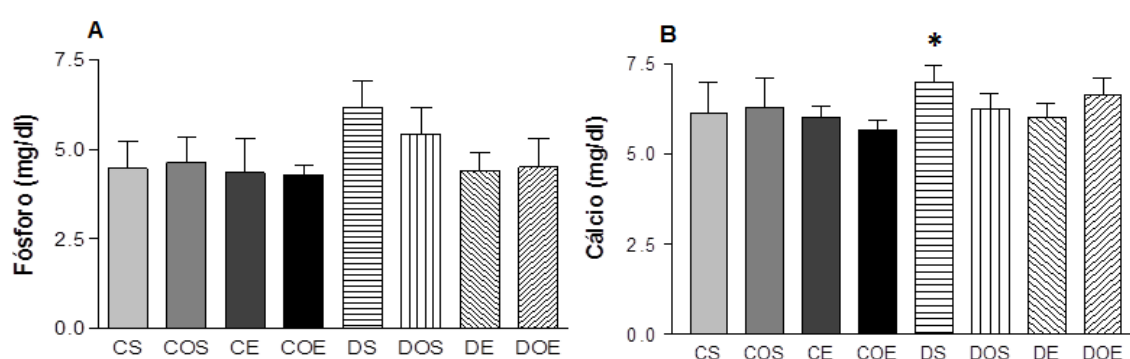


Figura 7 - Avaliação da concentração plasmática de fósforo (**A**) e cálcio (**B**), após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. *p<0,05 DS vs. COE.

4.6 EXPRESSÃO DE GLUT4

A Figura 8A e 8B mostram os resultados da expressão de GLUT4 na membrana plasmática (PM) e no microssoma (M) após a TR. Na avaliação desses dois parâmetros, todos os grupos controle (CS, COS, CE e COE) apresentaram valores semelhantes. Analisando-se os grupos diabéticos, tanto

em PM como em M, não há diferenças entre os grupos diabéticos exercitados (DE e DOE). Não houve diferenças entre os grupos DS e DOS em PM; no entanto, em M, o DOS apresentou um menor valor em relação ao DS. Os animais destes grupos (DS e DOS) tiveram valores menores de GLUT4 ($p < 0,05$) em comparação com os grupos DE e DOE, tanto em PM como M. Comparando-se os grupos controle e diabéticos, observou-se que, em relação aos valores de PM, todos os grupos controle apresentaram valores maiores ($p < 0,05$) em comparação com os grupos DS e DOS. Por outro lado, não foram observadas diferenças nos valores de PM entre todos os grupos controle e grupo diabético DE. Entretanto, o grupo DOE apresentou valor menor ($p < 0,05$) quando comparado com os grupos COS, CE e COE. Quando se compararam os resultados de M dos grupos controle e diabéticos, verificou-se que todos os grupos controle mostraram resultados semelhantes em relação aos grupos diabéticos exercitados (DE e DOE), mas o grupo DS teve valor mais baixo ($p < 0,05$) em comparação com os grupos controle CS, COS e COE. Observou-se que o grupo DOS mostrou resultados menores ($p < 0,05$) em relação a todos os grupos controle.

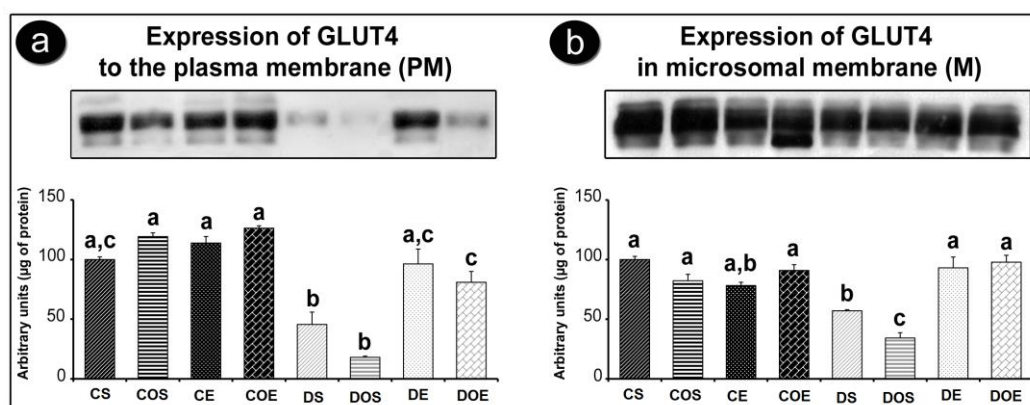


Figura 8 - Conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática (PM) e no microssoma (M), após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos.

4.7 PESO CORPÓREO

Na análise do peso corpóreo dos grupos controle e diabéticos, no início do experimento, observou-se que os pesos iniciais de todos os grupos estudados foram semelhantes. Na avaliação entre peso inicial e final constatou-se que todos os grupos apresentaram incremento significativo ao final do experimento (Tabela 1).

Todos os pesos finais dos grupos controle foram semelhantes. Entretanto, os grupos diabéticos sedentários (DS e DOS) apresentaram um menor peso corpóreo final em relação aos grupos exercitados (DE e DOE). Salientamos que não houve diferenças tanto entre os grupos DS e DOS, como entre DE e DOE.

Na comparação entre os grupos controle e diabéticos, no final do experimento, os grupos CS, CE e COE apresentaram maiores ($p < 0,05$) pesos

corporais, em relação aos grupos diabéticos sedentários (DS e DOS), mas não em relação aos grupos diabéticos exercitados (DE e DOE). Ao passo que o grupo COS apresentou um aumento significativo no peso final tanto em relação aos grupos diabéticos sedentários (DS e DOS) como em comparação com os diabéticos exercitados (DE e DOE).

Tabela 1. Peso corporal dos animais durante o período experimental.

Grupos	Peso Inicial (g)	Grupos	Peso Final (g)
CS (i)	330,5±11,8 ^a	CS (f)	508,6±16,1 ^{b,c}
COS(i)	290,4±19,7 ^a	COS(f)	535,9±12,4 ^b
CE(i)	282,8±11,4 ^a	CE(f)	437,9±18,3 ^{b,c}
COE(i)	312,0±7,4 ^a	COE(f)	495,9±23,1 ^{b,c}
DS(i)	255,3±18,3 ^a	DS(f)	352,1±12,5 ^d
DOS(i)	255,0±7,3 ^a	DOS(f)	348,0±15,4 ^d
DE(i)	263,4±11,1 ^a	DE(f)	451,1±28,91 ^c
DOE(i)	257,4±16,1 ^a	DOE(f)	441,4±21,2 ^c

Peso corporal dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos.

4.8 DENSITOMETRIA ÓSSEA

4.8.1 FASE PRÉ-SUSPENSÃO

Na densitometria realizada antes da aplicação da técnica de suspensão, verificou-se que o grupo CN apresentou valores de CMO, área e DMO das tíbias significativamente maiores ($p < 0,05$) em comparação com o grupo DM (Figura 9A-C).

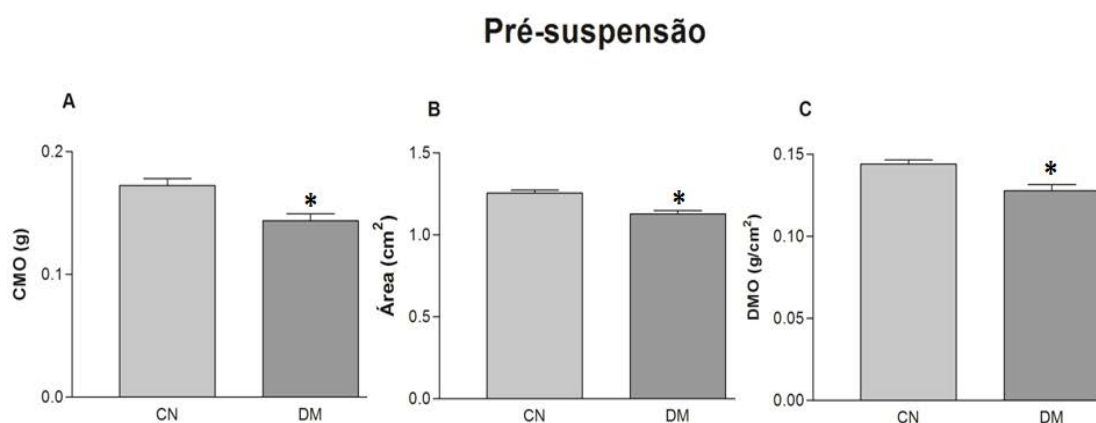


Figura 9 - Densidade mineral óssea analisada por DXA, antes do período de suspensão pela cauda, dos grupos controle (CN) e diabético (DM). Em A: o conteúdo mineral ósseo (g), em B: área total (cm²) e em C: densidade mineral óssea (g/cm²). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=32, * $p < 0,05$.

4.8.2 FASE PÓS-SUSPENSÃO

Na avaliação densitométrica realizada no final da aplicação da técnica de suspensão (fase pós-suspensão), observou-se uma diminuição do CMO e da DMO nos grupos CO e DO em relação aos grupos CN e DM, respectivamente. Comparando os grupos controle e diabéticos, observou-se que o CMO e a DMO do grupo CN e CO foram superiores em comparação com os dos grupos diabéticos DM e DO, respectivamente. Nesta mesma fase,

avaliou-se a área da tíbia dos grupos acima referidos. Neste parâmetro, observou-se que apenas os animais que passaram por suspensão dos membros posteriores, CO e DO, tiveram uma área menor em comparação com o grupo CN e DM, respectivamente. Não houve nenhuma diferença da área total de osso entre CN e CO em relação a DM e DO, respectivamente. E não houve diferença entre CO em comparação com DM e DO (Fig. 10A-C).

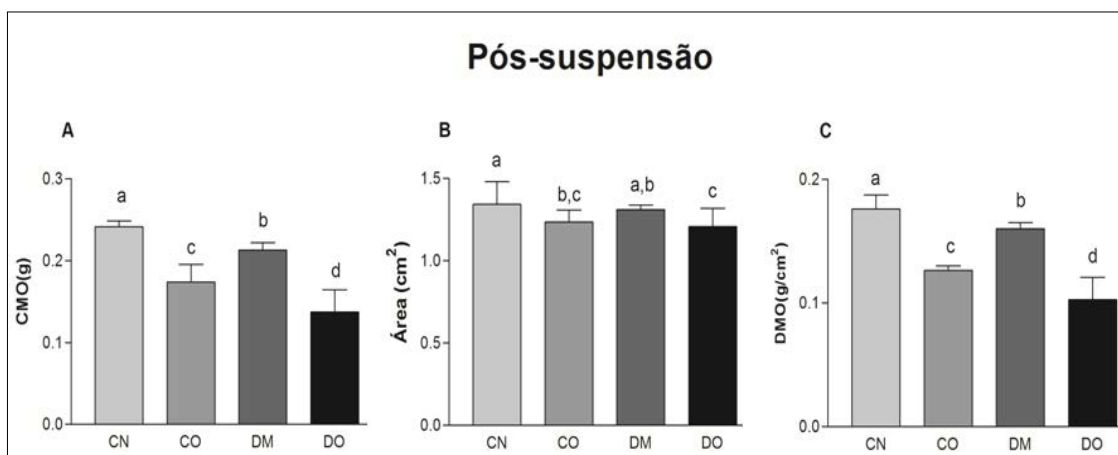


FIGURA 10 - Densidade mineral óssea analisada por DXA, após o período de suspensão pela cauda, dos grupos controle (CN), controle osteopênico (CO), diabético (DM) e diabético osteopênico (DO). Em A: o conteúdo mineral ósseo (g), em B: área total (cm²) e em C: densidade mineral óssea (g/cm²). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=16. A significância foi considerada quando p<0,05. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos.

4.8.3 FASE PÓS – TREINAMENTO RESISTIDO

Analisando-se os grupos controle, constatou-se que não houve diferença no CMO entre os quatro grupos estudados (CS, COS, CE e COE).

Comparando-se os grupos diabéticos, observou-se que o grupo DS apresentou menor CMO ($p < 0,05$) em comparação apenas com grupo DE (Fig. 11A). Ao mesmo tempo, o grupo DOS exibiu um valor mais baixo de CMO em comparação com os grupos diabéticos exercitados (DE e DOE). Comparando os grupos controle e diabéticos, notou-se que os grupos controle (CS, CE e COE) tiveram um CMO mais elevado em comparação com os grupos diabéticos sedentários (DS e DOS). O grupo COS mostrou um CMO superior apenas em relação ao grupo de DOS. Os resultados da DMO (Fig. 11C) não mostraram diferenças entre os grupos controle (CS, COS, CE e COE). No entanto, nos grupos diabéticos sedentários (DS e DOS) os valores de DMO foram menores em relação aos grupos diabéticos exercitados (DE e DOE). A Fig. 11B mostra que não houve diferenças nos valores das áreas de tíbia, entre os grupos controle (CS, COS, CE e COE). Quanto aos grupos diabéticos foram observadas diferenças apenas entre os grupos DE e DOS. Considerando os grupos controle e diabéticos, os grupos CS e CE apresentaram maior valor nas áreas de tíbia em relação ao grupo diabético DOS. O grupo COE teve valores mais elevados desta área, em comparação com os grupos diabéticos sedentários (DS e DOS).

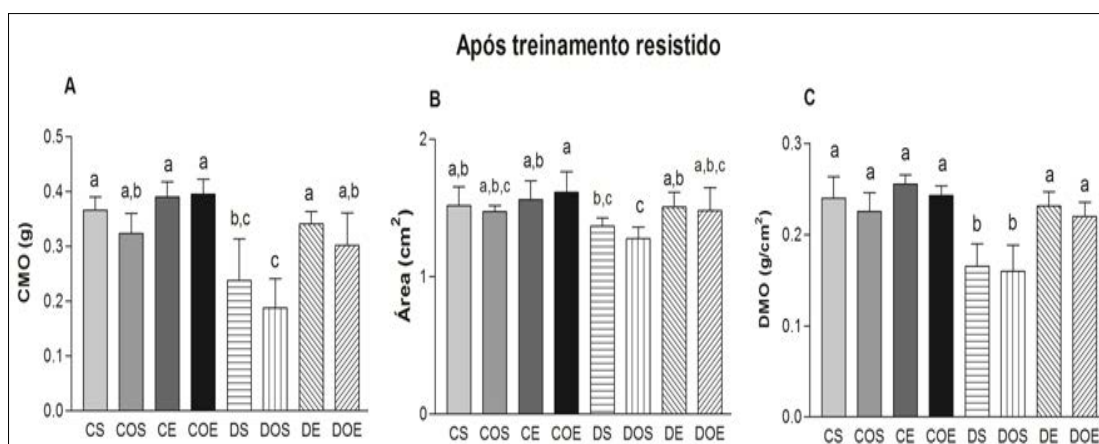


Figura 11 - Densidade mineral óssea analisada por DXA, após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Em A: o conteúdo mineral ósseo (CMO - g), em B: área total (cm²) e em C: densidade mineral óssea (DMO - g/cm²). Os resultados foram apresentados como média±EPM, n=8. A significância foi considerada quando p<0,05. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos.

4.9 PROPRIEDADES MECÂNICAS DA TÍBIA, APÓS EXERCÍCIO

A Figura 12 mostra os valores de rigidez (12A), força máxima (12B) e tenacidade (12C), obtida por ensaio biomecânico realizado nas tíbias dos animais estudados. Considerando rigidez, força máxima e tenacidade foram observados valores semelhantes entre os grupos controle (CS, COS, CE e COE). No que diz respeito aos animais diabéticos foram encontrados, nos grupos sedentários (DS e DOS) valores mais baixos (p<0,05) de rigidez e tenacidade apenas em relação ao grupo DE, mas não foi observada nenhuma diferença em relação ao grupo DOE. Analisando-se estes dois parâmetros

(rigidez e tenacidade), não foram observadas diferenças entre o DS e DOS, bem como entre DE e DOE. A força máxima nos grupos diabéticos sedentários (DS e DOS) foi inferior ($p < 0,05$) à dos grupos DE e DOE. A avaliação entre os grupos controle e diabéticos mostrou que todos os grupos controle (CS, COS, CE e COE) apresentaram valores de rigidez e força máxima maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo diabéticos sedentários (DS e DOS). O resultado de força máxima em DOE foi menor do que no grupo COE. Não houve diferenças na rigidez e tenacidade entre todos os grupos controle em relação aos grupos diabéticos exercitados (DE e DOE). Observou-se também que nos grupos controle sedentários (CS e COS) aumentaram os valores de tenacidade apenas em relação ao DOS. E este parâmetro foi maior nos grupos de controle exercitados (CE e COE) em relação ao grupos DS e DOS.

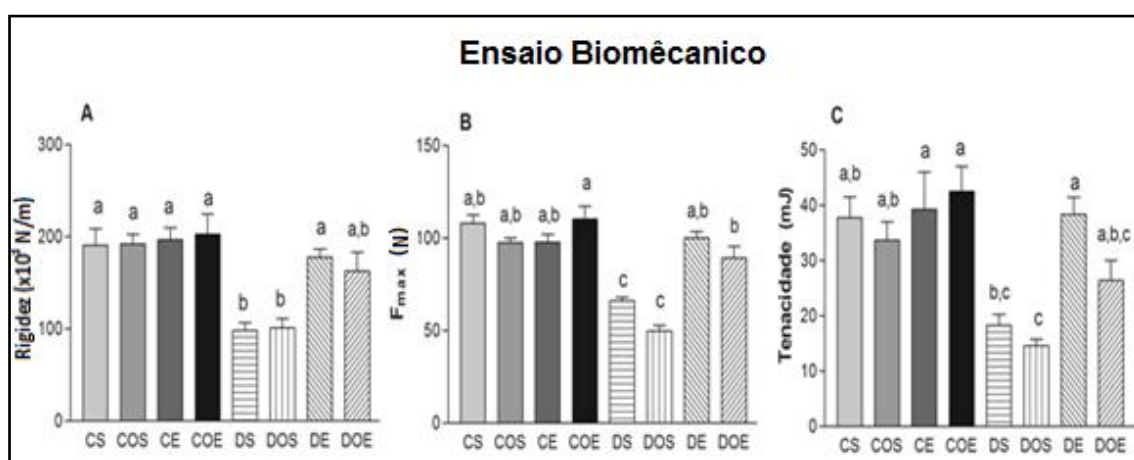


Figura 12 - Propriedades biomecânicas das tíbias de ratos avaliadas pelo teste de flexão em 3 pontos, após treinamento resistido, dos grupos controle: controle sedentário (CS); controle osteopênico sedentário (COS); controle exercitado (CE); controle osteopênico exercitado (COE) e dos grupos diabéticos: diabético sedentário (DS); diabético osteopênico sedentário (DOS); diabético exercitado (DE); diabético osteopênico exercitado (DOE). Em **A**: rigidez extrínseca ($\times 10^3$ N/m), em **B**: F_{max} (N) - força máxima e em **C**: tenacidade (mJ). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, n=8. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. Letras iguais demonstram que não há diferenças entre os grupos.

5 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

Os grupos COS e DOS apresentaram tíbias com características histológicas condizentes com osteopenia, confirmando a efetividade do modelo de osteopenia via suspensão pela cauda. Quando comparados com seus respectivos controles (CS e DS), os grupos COS e DOS apresentaram trabéculas ósseas bem mais delgadas e em uma quantidade muito menor, tanto na epífise quanto na metáfise. Nestes grupos a espessura do disco epifisário mostrou-se inalterada; no entanto, as trabéculas ósseas recém-formadas por osteogênese endocondral também se mostraram bem mais delgadas e em uma menor quantidade. A diáfise apresentou uma redução na espessura do tecido ósseo compacto e uma grande redução na quantidade de tecido ósseo esponjoso. Uma grande quantidade de osteoclastos em processo de reabsorção óssea foi observada especialmente na porção externa da diáfise em contato com o perióstio. Ainda observamos nestes grupos um perióstio mais espesso e bastante celularizado, especialmente em sua porção mais interna, principalmente em decorrência da grande quantidade de osteoclastos. Os grupos DS e DOS, quando comparados, respectivamente, com os grupos CS e COS apresentam ossos menores e com trabéculas ósseas ainda mais delgadas. As características histológicas apresentadas pelo tecido ósseo compacto e pelo tecido ósseo esponjoso no grupo CE foram similares às aquelas observadas no grupo CS. Nos grupos COE e DOE o tecido ósseo esponjoso da epífise e da metáfise mostrou-se constituído por trabéculas ósseas delgadas, mas em uma quantidade muito maior do que aquela apresenta pelos grupos COS e DOS, respectivamente. A espessura do disco epifisário se mostrou

inalterada nos grupos COS, COE, DOS e DOE, no entanto, as trabéculas ósseas recém-formadas na zona de osteogênese endocondral mostraram-se em maior número nos grupos COE e DOE. Na diáfise, a espessura do tecido ósseo compacto mostrou-se similar nestes grupos (COS, COE, DOS e DOE); contudo, a quantidade de trabéculas ósseas em sua parte interna mostrou-se maior nos grupos COE e DOE. O grupo DE apresentou características histológicas similares àquelas apresentadas pelo grupo DOE. A espessura e as características histológicas da cartilagem articular não apresentaram alteração em nenhum dos grupos experimentais (Fig. 13).

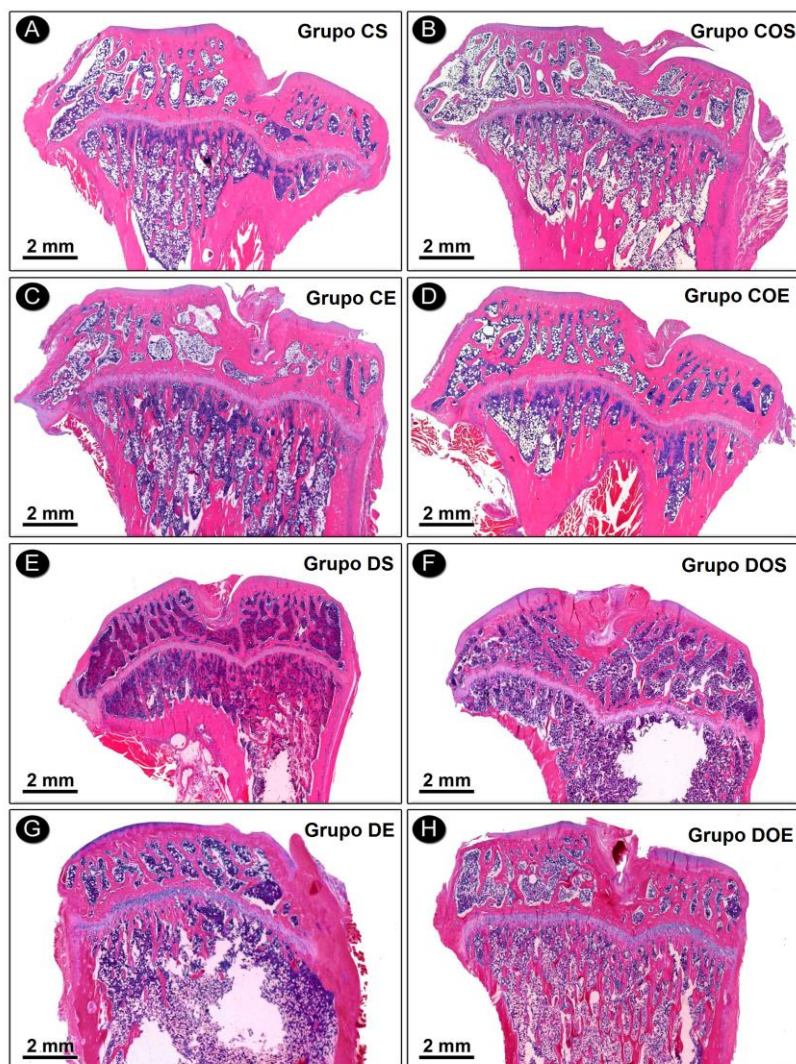


Figura 13 - Aspecto histológico da epífise, metáfise e parte da diáfise nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando o tecido ósseo esponjoso e o tecido ósseo compacto nos grupos: em **A**: controle sedentário (CS); em **B**: controle osteopênico sedentário (COS); em **C** controle exercitado (CE); em **D**: controle osteopênico exercitado (COE); em **E**: diabético sedentário (DS); em **F**: diabético osteopênico sedentário (DOS); em **G**: diabético exercitado (DE); em **H**: diabético osteopênico exercitado (DOE). Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE). Barras de escala: 1500 μ m; aumento original 2x.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que, após o TR, os grupos diabéticos apresentaram melhor controle glicêmico, aumento no conteúdo de GLUT4 e incremento na DMO e nas propriedades biomecânicas da tíbia.

Houve um avanço significativo no conhecimento sobre a fisiologia do metabolismo ósseo nas últimas três décadas, principalmente em relação à remodelação óssea. Essa remodelação propicia que este tecido ósseo desempenhe as principais funções: mecânica (sustentação do corpo e proteção de órgãos) e metabólica (tanto na manutenção da estabilidade de íons principalmente, o cálcio, como metabolismo de carboidratos) (COOPER; WOOLF, 2006; FERRON *et al.*, 2010).

A remodelação óssea permite que pequenas porções do tecido antigo sejam renovadas por outras recém-formadas e isto é primordial para a manutenção da resistência óssea. A atividade da remodelação é dividida em quatro fases: ativação, reabsorção, reversão e formação. As principais células responsáveis pela reabsorção e formação são os osteoclastos e osteoblastos respectivamente (CREIGHTON *et al.*, 2001; PIVONKA *et al.*, 2008).

As células tronco mesenquimais da medula óssea (MSC) podem potencialmente originar várias células, como por exemplo, osteoblastos, adipócitos, condrócitos, fibroblastos e células musculares (SUDA *et al.*, 1999). Vários fatores podem influenciar essa diferenciação celular. A MSC sob

influência de fatores como osterix, β -catenina e Runx2 diferencia-se em osteoblastos; entretanto, sob atuação de outros fatores como o PPRy2 e C/EBP α e β diferencia-se em adipócitos (BUCAY *et al.*, 1998; KANAMARU *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007). Estudos demonstram que a imobilização e inatividade física ocasionam aumento de infiltração gordurosa na medula óssea. Delahunty *et al.* (2006) sugerem que o aumento da adiposidade na medula óssea deve estar envolvido na etiopatogenia da osteoporose. Estudos relacionam o metabolismo ósseo com o metabolismo energético, como por exemplo, os trabalhos de Ducky *et al.* (2000) e Elefteriou *et al.* (2005) nos quais constataram que a leptina produzida no adipócito modula tanto o armazenamento de energia como a atividade de remodelação óssea. Kanazawa *et al.* (2011) demonstraram que a osteocalcina, peptídeo expresso em osteoblasto, possivelmente está associada com a sensibilidade à insulina e a secreção deste hormônio (FERRON *et al.*, 2010; GARNERO *et al.*, 1992).

Umas das patologias que apresenta diminuição na sensibilidade à insulina é o diabetes. Conforme foi descrito anteriormente os principais tipos dessa patologia são diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2. Nessa patologia podemos encontrar alterações tanto no metabolismo de carboidrato como no metabolismo ósseo (JESSEN; GOODYEAR, 2005). Em decorrência disso, na literatura há vários trabalhos que correlacionam diabetes e metabolismo ósseo.

Sabe-se que o exercício atua positivamente na formação óssea. O treinamento resistido por envolver levantamento de peso promove não só o aumento da massa muscular como também a óssea. Como não existem dados na literatura sobre a associação dos efeitos do treinamento resistido na

densidade óssea de ratos diabéticos neonatais (DM2), submetidos a um ambiente de ausência de carga (como pacientes imobilizados e acamados que podem desenvolver a osteopenia por desuso), o presente estudo objetivou investigar esta proposição.

Para este estudo foram utilizados ratos tratados com streptozotocina (STZ) em períodos neonatais, pois desenvolvem hiperglicemia e leve hipoinsulinemia na idade adulta. O processo de instalação do diabetes neste modelo animal é insidioso, tornando-se quase assintomático no início, manifestando-se na fase adulta, conforme relato anterior. Estas características assemelham-se ao curso natural da doença em seres humanos (KODAMA *et al.*, 1993; PORTHA *et al.*, 1989).

O resultado da glicemia verificado na fase inicial do experimento, ou seja, antes da suspensão e TR, mostrou que os animais do grupo diabetes mellitus (DM), apresentaram hiperglicemia, configurando-se a instalação da doença.

Ao final do experimento, todos os grupos controle (CS, COS, CE e COE) apresentaram glicemias semelhantes. No entanto, os grupos diabéticos exercitados (DE e DOE) exibiram valores mais baixos de glicemia, em comparação com os grupos DS e DOS. O DM aumenta a glicose no sangue devido a insuficiente secreção de insulina e alterações da sensibilidade do receptor deste hormônio (GOODMAN; GILMAN, 2012). O TR proporcionou uma relevante redução na glicemia do grupo DE e, como consequência, esta glicemia foi semelhante aos grupos CS, COS e COE. Sabe-se que o exercício físico promove uma série de efeitos benéficos no músculo esquelético,

incluindo melhorias na homeostase da glicose (JESSEN; GOODYEAR, 2005), no metabolismo lipídico (BONEN *et al.*, 2006) e na sensibilidade insulínica (GOODYEAR; KAHN, 1998). O exercício aumenta o transporte de glicose no músculo, por promover a translocação de GLUT4 para a superfície celular por uma via que difere da ativada por insulina (KRAMER; GOODYEAR, 2007). Roux e Blenis (2004) descreveram o aumento da atividade da AMPK induzido pelo exercício, e seus efeitos nas alterações adaptativas no metabolismo glicídico e lipídico. Apesar de constatar nenhuma diferença entre as glicemias de DE e DOE, este último grupo não apresentou as mesmas respostas do grupo DE, pois o grupo DOE apresentou glicemia maior em comparação com os controle exercitados (CE e COE), enquanto o DE exibiu uma glicemia mais elevada somente em relação ao CE. Isto pode ser em decorrência do efeito residual da diminuição da DMO após a suspensão neste grupo DOE (Figura 10). Há trabalhos que demonstram que quando há um incremento na DMO, a concentração plasmática de osteocalcina também aumenta (STEIN; LIAN, 1993), e esta proteína está relacionada positivamente com sensibilidade à insulina (KANAZAWA *et al.*, 2011). Baseado nestes trabalhos, pode-se aventar que como a DMO foi menor no grupo DOE (apenas logo após a suspensão – Figura 10), a concentração plasmática de osteocalcina neste grupo também pode ter diminuído neste período, e isto pode ter gerado alteração na sensibilidade à insulina, que persistiu mesmo após o período de exercício. Baseado nisto, pode-se sugerir que se o tempo e/ou intensidade do exercício fossem maiores, a diferença nas respostas entre DE e DOE não seria evidenciada.

As insulinemias dos grupos controle osteopênicos (COS e COE) foram superiores em relação ao grupo controle CS. Novamente, comparando somente os grupos controle, observou-se que o grupo controle exercitado (CE) mostrou valores menores apenas em comparação com COS, porém com resultados semelhantes aos grupos controle CS e COE. Embora não fosse detectada diferença estatística entre COS e COE, este grupo exercitado apresentou uma resposta melhor em relação a este grupo osteopênico, pois os valores de insulinemia do grupo CE foram semelhantes em relação ao grupo COE e diferentes em relação ao grupo COS, evidenciando assim o efeito positivo do RT. Como já citado anteriormente, possivelmente a alteração da DMO nos grupos osteopênicos, após período de suspensão, alterou o metabolismo glicídico desses animais e perdurou até o final do experimento. Está bem elucidada na literatura a associação positiva entre resistência insulínica e hiperinsulinemia (HOTAMISLIGIL; SPIEGELMAN, 1994; WEYER *et al.*, 2001). Muitos estudos têm mostrado os efeitos benéficos da atividade física na melhora da sensibilidade à insulina (GOODYEAR; KAHN, 1998; LEE *et al.*, 2011). Com relação aos grupos diabéticos, não foi observada diferenças entre eles. Salienta-se que devido à indução de diabetes por STZ, os grupos diabéticos DOS, DE e DOE apresentaram valores de insulinemia inferiores em relação aos seus respectivos controles, COS, CE e COE. Desta forma, não podemos inferir que os diabéticos apresentaram uma melhor resposta metabólica. Por outro lado, não houve diferença entre DS e CS.

A partir dos valores da glicemia e insulinemia calculou-se o HOMA-IR (Figura 6D). O grupo COS apresentou valores de elevados em comparação

com demais grupos controle, demonstrando que o grupo COS apresenta menor sensibilidade à insulina. Como já citado anteriormente, estudos mostram que o aumento na DMO está associado ao aumento da concentração sérica de osteocalcina (STEIN; LIAN, 1993), sendo que esta proteína está relacionada à sensibilidade insulínica (KANAZAWA *et al.*, 2011). Logo, podemos aventar que diminuição na DMO no grupo COS (após a suspensão) proporcionou uma diminuição na sensibilidade à insulina. Embora alguns estudos indiquem que o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina (GOODYEAR; KAHN, 1998; LEE *et al.*, 2011), no presente estudo, não foram encontradas diferenças nos valores de HOMA-IR entre CS e CE. Porém o exercício melhorou a sensibilidade à insulina em ratos osteopênicos. Em relação aos grupos diabéticos não se observou alteração desse índice entre estes grupos. Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de HOMA-IR entre os diabéticos e seus respectivos controles, exceto o grupo DOS que apresentou valores inferiores em relação ao seu controle COS. Segerström *et al.* (2010) verificaram uma melhora na sensibilidade à insulina em mulheres diabéticas somente após seis meses de treinamento, utilizando uma intensidade de exercício superior ao presente estudo.

Segundo Seraphim *et al.* (2001) em modelos de obesidade, a resistência à insulina está associada à redução da expressão do transportador de glicose GLUT4 e/ou prejuízo na via de sinalização da insulina em músculo esquelético e tecido adiposo. O GLUT4 tem como função propiciar a captação de glicose mediada pela insulina em músculo cardíaco, esquelético e tecido adiposo (LEHNEN *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2006). Ratos transgênicos que não

expressam ou superexpressam o GLUT4, respectivamente, diminuem ou aumentam a sensibilidade à insulina (BERGLUN *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2005; KATZ *et al.*, 1996) assim sendo, este transportador é de fundamental importância para a manutenção da homeostase da glicose (CARVALHO *et al.*, 2005; LEGUISAMO *et al.*, 2012). Citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo, tais como TNF- α e IL-6 têm sido relacionadas com a redução da expressão de GLUT4, promovendo redução na captação de glicose pelo músculo. Xie e colaboradores (2010), por meio da técnica de citometria de fluxo, avaliaram a ação do TNF- α , IL1-beta e IL-6 em células 3T3-L (pré-adipócitos) e verificaram que cada uma destas citocinas reduziram significativamente a quantidade de GLUT4. Ou seja, estas citocinas inflamatórias têm um papel importante na regulação do metabolismo da glicose e na ativação exacerbada das vias inflamatórias, e isto pode representar uma etapa fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

Conforme já citado, durante a contração muscular ocorre um aumento da translocação de GLUT4, independentemente da presença de insulina (SCHIMMACK *et al.*, 2006). Como pode-se observar no presente estudo, os valores de expressão de GLUT4 (Figura 8), tanto na membrana plasmática (PM) quanto no microssoma (M), foram semelhantes entre todos grupos controle. Na análise dos grupos diabéticos, observou-se que não houve diferenças entre os grupos diabéticos sedentários DS e DOS, como também entre os exercitados DE e DOE. E os grupos exercitados diabéticos apresentaram maior expressão de GLUT4 em relação aos animais diabéticos

sedentários (DS e DOS). Na comparação entre grupos controle e diabético, observou-se que os grupos sedentários diabéticos (DS e DOS) exibiram menor conteúdo de GLUT4 (em PM) em relação aos demais grupos diabéticos e controle. Em M, respostas similares foram encontradas, exceto em DS que apresentou resultados similares ao CE. Novamente, como visto em parâmetros anteriores, em PM, apesar de não ter sido detectada diferença entre DE e DOE, pôde-se se aventar que o grupo DE apresentou respostas mais expressivas em relação ao DOE, visto que o valor de GLUT4 (PM) em DE foi semelhante a todos os grupos controle, enquanto o valor de GLUT4 (PM) em DOE foi semelhante somente em relação ao CS.

O DM diminui o conteúdo de proteína GLUT4 (MUÑOZ *et al.*, 1996). Além disso, a literatura tem mostrado que os ratos submetidos a TR apresentam uma melhoria na expressão GLUT4 no músculo-esquelético (FRIEDMAN *et al.*, 1990). Schimmack e colaboradores (2006) relatam que durante o exercício ocorre ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), que promove a captação de glicose. A expressão de GLUT4 (em PM) diminuída no grupo diabético DOE, em comparação com grupos controle COS, CE e COE, pode ter sido devido às alterações na densidade óssea em decorrência da suspensão pela cauda, que conseqüentemente, pode ter alterado o nível de osteocalcina, e este, por sua vez, pode alterar a sensibilidade à insulina (KANAZAWA *et al.*, 2011).

A osteocalcina (OC) é uma proteína composta por 49 amino ácidos, sendo três (posições 17, 21 e 24) constituídos por ácido gama-carboxiglutâmico (Gla), no qual o cálcio liga-se (VIEIRA, 1999). Esta proteína é

secretada pelos osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos, e é primariamente depositada na matriz óssea recém-formada, mas uma pequena fração entra em circulação, caracterizando esta proteína como marcador da atividade osteoblástica. Apesar de ser depositada em quantidades significativas na matriz óssea, sendo uma das proteínas não-colágenas mais abundantes, não é um marcador de reabsorção óssea, pois é totalmente destruída na reabsorção promovida pelos osteoclastos. Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado, em mulheres com idade avançada que apresentam perdas de cálcio (menopausa), podem apresentar aumento de marcadores de formação como a osteocalcina (LUUKINEN *et al.*, 2000; VERGNAUD *et al.*, 1997). Embora a função da OC não esteja totalmente elucidada, há evidências que sua estrutura interage com cálcio e com cristais de hidroxiapatita. Ademais, estudos demonstram que aumento de produção da OC coincide com o início do processo de mineralização (SOKOLL *et al.*, 1995). Outros estudos, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a osteocalcina tem importante papel no recrutamento e diferenciação dos osteoclastos (GARNERO *et al.*, 1992).

Lee e colaboradores (2007), realizando estudos com camundongos geneticamente modificados, demonstraram que a OC aumenta tanto a expressão de insulina nas células β pancreáticas como de adiponectinas. E os achados de Kanazawa *et al.* (2011) indicam que a concentração plasmática de OC está associada positivamente com sensibilidade à insulina e sua secreção em pacientes com diabetes do tipo 2, conforme já descrito anteriormente.

Várias evidências indicam que o metabolismo ósseo e o metabolismo energético estão associados (KANAZAWA *et al.*, 2011). A insulina atua no metabolismo ósseo promovendo diferenciação das células osteoblásticas (THOMAS *et al.*, 1997), e a ativação do substrato do receptor de insulina também promove a osteoblastogênese (AKUNE *et al.*, 2002; OGATA *et al.*, 2000). Vários pesquisadores demonstraram que a adiponectina, uma das adipocinas que promove aumento da sensibilidade à insulina, está envolvida no metabolismo ósseo (KANAZAWA *et al.*, 2009; 2011; RICHARDS *et al.*, 2007). Richards *et al.* (2007) demonstraram que os osteoblastos possuem receptores de adiponectina e esta estimula a proliferação e diferenciação destas células.

Na análise do peso corporal, observou-se que os animais dos grupos diabéticos sedentários (DS e DOS) apresentaram menor peso em relação aos demais grupos controle e diabéticos exercitados ao final do experimento. As diminuições de peso nesses grupos podem estar relacionadas às alterações no metabolismo lipídico e protéico presentes no diabetes mellitus. Em situações nas quais a ação da insulina está comprometida, ocorre um aumento da lipólise e proteólise (YANARDAG *et al.*, 2005).

O maior de peso nos diabéticos exercitados (DE e DOE) em relação aos diabéticos sedentários pode ser decorrente do aumento da massa magra. Este aumento tecidual também pode ter promovido redução da glicemia desses animais (conforme descrito acima), visto que a maior parte do peso corpóreo e da captação de glicose está relacionada ao músculo esquelético. Vários autores demonstraram que o TR, por desencadear contrações musculares contra alguma forma de resistência externa, causa hipertrofia muscular o que

leva a um aumento da massa magra, podendo ainda contribuir para a redução da massa gorda (BROWN *et al.*, 1990; FIATARONE *et al.*, 1990; MAZZEO; TANAKA, 2001).

Embora esteja descrito na literatura que alguns tipos de exercício físico promovem redução do peso em ratos, os grupos controle exercitados não apresentaram tal resultado (Tabela 1). A razão desta não alteração pode ser decorrente do tipo de exercício, o treinamento resistido, que promove maior ganho de peso e força muscular (VASQUES *et al.*, 2012) em relação aos outros tipos de exercícios que envolvem apenas condicionamento aeróbico (RAMADAN; BARAC-NIETO, 2001). Os grupos diabéticos sedentários (DS e DOS) apresentaram menor peso corpóreo em relação aos grupos controle (CS, COS, CE e COE). Este resultado corrobora o estudo de Takada *et al.* (2007) que utilizou o mesmo modelo de diabetes e evidenciou uma diminuição no peso corporal de ratos diabéticos. Takada *et al.* (2007) demonstrou que neste modelo de diabetes o rato apresenta resistência à insulina (RI) e leve hipoinsulinemia. Sabe-se que a insulina é um hormônio anabólico e a associação de RI e hipoinsulinemia pode ter ocasionado essa redução no peso corpóreo dos ratos DS e DOS.

Alguns trabalhos demonstram que a progressão do DM tipo 2 pode causar alterações na massa óssea. A hiperglicemia promove um aumento na concentração dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no colágeno, que pode levar a um quadro de redução da força dos ossos (PAUL; BAILEY, 1996). Outros mecanismos que podem induzir a uma perda da massa óssea incluem a hipercalciúria, a insuficiência renal (YENDT *et al.*, 1993), baixos

níveis de insulina que ocorrem durante a progressão do diabetes (STOLK *et al.*, 1996) entre outros.

Os estudos citados logo acima, estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, no qual a densitometria óssea realizada aos 60 dias de vida no grupo DM, mostrou uma diminuição do CMO, da área e da DMO. A deficiência na concentração e ação da insulina pode ocasionar um comprometimento da neoformação óssea, levando à alteração, tanto no CMO quanto na DMO (MIAZGOWSKI *et al.*, 2007).

Na análise do efeito da ausência de carga, o decréscimo da massa óssea ocorrido durante esse período nos animais dos grupos osteopênicos (CO e DO) em relação aos seus controles (CN e DM) mostrou que 21 dias de suspensão foi suficiente para provocar diminuição da densidade óssea e conteúdo ósseo e área da tíbia (Figura 10 A-C). As análises histológicas mostram que mesmo depois de 14 semanas de movimento livre na gaiola, os grupos COS e DOS ainda apresentaram características de um osso osteopênico (Figura 13B e 13F). Estes resultados corroboram os estudos de Silva e Volpon (2004). E a associação do diabetes com a ausência de carga promoveu uma piora no conteúdo mineral ósseo e na densidade óssea (Figura 10A e 10C). Cornwal, 1984 observou que durante a fase de suspensão ocorre diminuição da formação óssea. Essa alteração também é observada em pessoas que permanecem por tempo prolongado no leito.

A Figura 11A-C, mostra que os grupos controle exercitados não apresentaram diferenças nos valores dos parâmetros ósseos analisados (CMO,

área e DMO) em relação aos grupos controle sedentários. Por outro lado, a ação deletéria do diabetes no tecido ósseo, vista acima, foi revertida pelo RT, promovendo um aumento na DMO dos grupos diabéticos exercitados (DE e DOE) em relação os diabéticos sedentários (Figura 11C).

Na análise entre os grupos controle e diabéticos, de uma maneira geral, os grupos DS e DOS apresentaram valores de DMO inferiores em relação aos grupos controles (CS, COS, CE e COE); entretanto, os grupos diabéticos exercitados não apresentaram diferenças em relação a todos estes grupos controle. Estudos com humanos (BERGSTROM *et al.*, 2008; CHIEN *et al.*, 2000) e com animais (HONDA *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2008) têm mostrado que o exercício aumenta a densidade, a massa e a força óssea (HART *et al.*, 2001). Acredita-se que o estresse mecânico gerado pelo exercício desempenha papel relevante na resposta osteogênica, ou seja, a tensão mecânica proporcionada pelo exercício constitui um estímulo importante para a formação do osso e desempenha papel importante para minimizar a perda óssea (BARENGOLTS *et al.*, 1993). Como visto acima, o grupo diabético exercitado apresentou um maior peso em relação aos sedentários e este incremento pode ter também propiciado um aumento nos valores de DMO. El Hage *et al.* (2010) realizaram estudos com indivíduos sedentários obesos e sobrepesos e puderam concluir que a DMO foram ajustadas de acordo com a massa desses indivíduos, ou seja, o peso corporal pode melhorar a mineralização óssea devido ao aumento da descarga mecânica causada por estas condições. Vários estudos também ligaram a obesidade com o aumento

da densidade e conteúdo mineral ósseo e a redução do risco de fratura (EDELSTEIN; BARRETT-CONNOR, 1993; JOHNELL et al., 2005).

Todos os grupos osteopênicos reverteram o quadro de perda óssea causada pela suspensão em relação aos seus controles sedentários, ao final do experimento. Esta reversão pode ser decorrente da atividade livre na caixa durante 14 semanas após a suspensão. Estes resultados corroboram os resultados de Frateschi (2002) que demonstrou que ratos imobilizados por 21 dias seguidos de movimentação livre por 4 semanas recuperaram os valores das propriedades mecânicas do osso.

Quando analisados os resultados de rigidez, força máxima e tenacidade, todos os grupos controle apresentaram resultados semelhantes entre si e em relação aos grupos diabéticos exercitados DE e DOE, sendo que apenas na força máxima o grupo controle COE teve valores maiores que DOE. Por outro lado, os ratos diabéticos sedentários (DS e DOS) apresentaram valores de força máxima da tibia menor em relação aos grupos diabéticos exercitados DE e DOE; e uma rigidez e tenacidade menores apenas em relação ao grupo DE, mas não DOE. Na comparação entre os grupos controle e diabéticos observou-se uma diminuição nesses três parâmetros avaliados nos ratos diabéticos sedentários (DS e DOS) em relação aos ratos controle, exceto na tenacidade do grupo DS que apresentou valores similares em comparação com os ratos controle sedentários (CS e COS).

A partir dos resultados dos parâmetros biomecânicos pode-se aventar que a estrutura óssea no organismo diabético sedentário esteja mais fragilizada

(referente à rigidez, força máxima e tenacidade) quando comparado com os animais controle (CS, COS, CE e COE), exceto na tenacidade, pois o grupo DS apresentou valores semelhantes aos dos grupos CS e COS. Esses grupos diabéticos sedentários também apresentaram valores inferiores em relação aos grupos diabéticos exercitados, exceto nos valores de rigidez e de tenacidade do grupo DOE que foram similares em relação aos diabéticos sedentários. Sabe-se que a rigidez, força máxima e a tenacidade óssea são importantes propriedades que expressam o enfraquecimento do osso e o maior risco de fraturas. Com bases nestes dados pode-se inferir que o exercício conseguiu reverter esse quadro no diabético exercitado (DE). O fato do grupo DOE não ter tido a mesma resposta pode ser decorrente, conforme já citado acima, da diminuição da DMO após suspensão; isto pode ter levado a uma diminuição da concentração plasmática de osteocalcina e a falta da mesma pode ter propiciado as alterações ósseas detectadas especialmente neste grupo diabético submetido à suspensão.

A rigidez diminuída nos animais diabéticos revela mudanças nas propriedades ósseas, devido às alterações na ação da insulina (UMPIERREZ *et al.*, 1989) sendo uma possível causa de síntese desorganizada do colágeno, consequentemente interferindo na mineralização, diminuindo o CMO, a DMO e a força máxima (LIU *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 2001). O colágeno é uma proteína que atribui ao osso sua flexibilidade contribuindo para sua resistência à tração. A integridade do osso é importante para que não ocorra fratura; sendo assim, menor rigidez, força e tenacidade óssea aumentam a probabilidade desse risco de fratura (LIRANI-GALVÃO; CASTRO, 2010).

O treinamento resistido (TR), quando praticado com regularidade, pode aumentar a força muscular com positivas repercussões na proteção contra as quedas, além do eficiente estímulo para o aumento da massa óssea, influenciando fatores de risco relacionados com osteoporose (JOVINE *et al.*, 2006). A estimulação mecânica causada pelo exercício, afeta a rede de colágeno e altera sua produção e as propriedades mecânicas do osso (ISAKSSON *et al.*, 2009).

Em nossos resultados encontramos um aumento da concentração plasmática de cálcio no grupo DS em relação ao COE, no entanto, não houve diferença nos valores de fósforo. Alterações na concentração de insulina, mesmo que discretas, foram relacionadas com prejudicada reabsorção de cálcio (HOLL; ALLEN, 1987), sendo que a presença de hipercálcúria pode induzir um quadro de perda óssea (GREGORIO *et al.*, 1994; RASKIN *et al.*, 1978). Possivelmente, o aumento dos níveis plasmáticos de cálcio dos animais diabéticos sedentários (DS) presente neste trabalho, justifica as alterações encontradas nos parâmetros ósseos desse grupo.

Os resultados encontrados pelo presente estudo evidenciam a importância do exercício para a saúde óssea, controle glicêmico e expressão de GLUT4 de animais diabéticos. Muitas das respostas evidenciadas demonstram que a suspensão em ratos diabéticos promove alterações no metabolismo ósseo que perduram após 14 semanas de exercício, pois não foram encontrados em DOE todos os incrementos no metabolismo ósseo e glicídico vistos em DE.

Portanto, a insulina pode atuar como hormônio do crescimento, estimulando a síntese de colágeno e a multiplicação dos osteoblastos, sendo que os mesmos contêm receptores para este hormônio (CANALIS *et al.*, 1980). O exercício físico promove melhora no estado geral dos animais diabéticos, principalmente no metabolismo de substratos energéticos e as secreções hormonais (JEAN *et al.*, 1992; ROUSSEAU-MIGNERON *et al.*, 1988; TAN *et al.*, 1982; TANCREDE *et al.*, 1982). E isto acarreta mudanças favoráveis como a diminuição da glicose sanguínea e aumento da expressão de GLUT4 (SCHIMMACK *et al.*, 2006). A suspensão parece promover mais alterações deletérias no metabolismo ósseo de ratos diabéticos. Em vista disto, os cuidados devem ser redobrados em pacientes diabéticos que foram submetidos a situações de ausência de carga, como no caso de indivíduos acamados, sendo que o exercício é uma importante ferramenta que pode restabelecer grande parte das alterações decorrentes do modelo de osteopenia e diabetes.

7 CONCLUSÃO

O treinamento resistido em animais diabéticos osteopênicos e não osteopênicos promoveu: 1) diminuição da glicemia; 2) aumento de peso corporal; 3) incremento na expressão de GLUT4; 3) melhoria nas propriedades biomecânicas; 4) aumento da DMO. Por outro lado, os grupos controle exercitados e sedentários não mostraram diferenças em qualquer uma dessas variáveis. Com relação à fosfatemia, todos os grupos apresentaram valores similares; entretanto, apenas o grupo DS apresentou calcemia mais elevada em relação ao grupo COE.

De acordo com os resultados obtidos, podemos enfatizar a importância da intervenção do tratamento com TR em indivíduos com DM2, melhorando assim a qualidade do tecido ósseo e o perfil glicêmico. E deve-se dar maior atenção aos pacientes diabéticos osteopênicos, visto que tempo e a intensidade de exercício utilizados pelo presente estudo não proporcionaram as mesmas resposta entre diabéticos não osteopênicos e diabéticos osteopênicos.

REFERÊNCIAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232 p.

AKUNE, T.; OGATA, N.; HOSHI, K.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; TOBE, K.; TAKAGI, H.; AZUMA, Y.; KADOWAKI, T.; NAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, H. Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. **J. Cell. Biol.**, v. 159, n. 1, p. 147–156, Oct. 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, suppl. 1, p. S15-S35, Jan. 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 36, suppl 1, p. S67-S74, Jan. 2013.

AUDÍ, L.; VARGAS, D.M.; GUSSINYÉ, M.; YESTE, D.; MARTÍ, G.; CARRASCOSA, A. Clinical and biochemical determinants of bone metabolism and bone mass in adolescent female patients with anorexia nervosa. **Pediatr. Res.**, v. 51, n. 4, p. 497-504, Apr. 2002.

BARENGOLTS, E.I.; CURRY, D.J.; BAPNA, M.S.; KUKREJA, S.C. Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 8, n. 8, p. 937-942, Aug. 1993.

BEAM, H. A.; PARSONS, J.R.; LIN, S. S. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. **J. Orthop. Res.**, v. 20, n. 6, p. 1210 – 1216, Nov. 2002.

BEDI, A.; FOX, A.J.; HARRIS, P.E.; DENG, X.H.; YING, L.; WARREN, R.F.; RODEO, S.A. Diabetes mellitus impairs tendon-bone healing after rotator cuff repair. **J Shoulder Elbow Surg.**, v. 19, n. 7, p. 978-988, Oct. 2010.

BERGLUND, E.D.; LI, C.Y.; AYALA, J.E.; MCGUINNESS, O.P.; WASSERMAN, D.H. Regulation of endogenous glucose production in glucose transporter 4 over-expressing mice. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52355, 2012.

BERGSTRÖM, I.; LANDGREN, B.; BRINCK, J.; FREYSCHUSS, B. Physical training preserves bone mineral density in postmenopausal women with forearm fractures and low bone mineral density. **Osteoporos. Int.**, v. 19, n. 2, p. 177-183, Feb. 2008.

BONEN, A.; DOHM, G.L.; VAN LOON, L.J. Lipid metabolism, exercise and insulin action. **Essays Biochem.**, v. 42, p. 47-59, 2006.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R.C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M.B.; MONAUNI, T.; MUGGIO, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucosetolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, Jan. 2000.

BORGGREVE, S.E.; DE VRIES R.; DULLAART, R.P. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 33, n. 12, p. 1051-1069, Dec. 2003.

BORGHOUTS, L.B.; SCHAART, G.; HESSELINK, M.K.; KEIZER, H.A. GLUT-4 expression is not consistently higher in type-1 than in type-2 fibres of rat and human vastus lateralis muscles; an immunohistochemical study. **Pflugers Arch.**, v. 441, n. 2-3, p. 351-358, Dec. 2000.

BROWN, A.B.; MCCARTNEY, N.; SALE, D.G. Positive adaptations to weight-lifting training in the elderly. **J. Appl. Physiol.**, v. 69, n. 5, p. 1725-1733, Nov. 1990.

BUWAY, N.; SAROSI, I.; DUNSTAN, C.R.; MORONY, S.; TARPLEY, J.; CAPPARELLI, C.; SCULLY, S.; TAN, H.L.; XU, W.; LACEY, D.L.; BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev.**, v. 12, n. 9, p. 1260-1268, May 1998.

CADORE, E. L.; BRETANO, M. A.; KRUEL, L. F. M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. **Ver. Bras. Med. Esporte**, v.11, n. 1, p. 373-379, Nov./Dec. 2005.

CANALIS, E.; PECK, W. A.; RAISZ, L. G. Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria. **Science**, v. 210, n. 4473, p. 1021-1023, Nov. 1980.

CARVALHO, E.; KOTANI, K.; PERONI, O.D.; KAHN, B.B. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, n. 4, p. E551–E561, May 2005.

CHIEN, M.Y.; WU, Y.T.; HSU, A.T.; YANG, R.S.; LAI, J.S. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. **Calcif. Tissue Int.**, v. 67, n. 6, p. 443-448, Dec. 2000.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, n. 4, p. 319-324, Jul./Aug. 2004

COOPER, C.; WOOLF, A. D. **Osteoporosis: best practice & research compendium**. New York: Elsevier, 2006. 198 p.

CORNWAL, M.W. Biomechanics of noncontractile tissue. A review. **Phys. Ter.**, v. 64, n. 12, p. 1869-1873, Dec. 1984.

COWIN, S.C. On mechanosensation in bone under microgravity. **Bone**, v. 22, n. 5, p. 119S-125S, May 1998.

CREIGHTON, D.L; MORGAN, A.L.; BOARDLEY, D.; BROLINSON, P.G. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, n. 2, p. 565–570, Feb. 2001.

DALY, J. A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". **Clin Chem**. v. 18, n. 3, p. 263-265, Mar. 1972.

DEL RIO, L.; CARRASCOSA, A.; PONS, F.; GUSINYÉ, M.; YESTE, D.; DOMENECH, F.M. Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. **Pediatr. Res.**, v. 35, n. 3, p. 362-366, Mar. 1994.

DELAHUNTY, K.M.; SHULTZ, K.L.; GRONOWICZ, G.A.; KOCZON-JAREMKO, B.; ADAMO, M.L.; HORTON, L.G.; LORENZO, J.; DONAHUE, L.R.; ACKERT-BICKNELL, C.; KREAM, B.E.; BEAMER, W.G.; ROSEN, C.J. Congenic mice provide in vivo evidence for a genetic locus that modulates serum insulin-like growth factor-I and bone acquisition. **Endocrinology**, v. 147, n. 8, p. 3915-3923, Aug. 2006.

DELANEY, M.F. Strategies for the prevention and treatment of osteoporosis during early postmenopause. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 194, Suppl 2, p. S12-S23, Feb. 2006.

DUARTE, V.M.; RAMOS, A.M.; REZENDE, L.A.; MACEDO, U.B.; BRANDÃO-NETO, J.; ALMEIDA, M.G.; REZENDE, A.A. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 23, n. 1, p. 58-68, 2005.

DUCY, P.; AMLING, M.; TAKEDA, S.; PRIEMEL, M.; SCHILLING, A.F.; BEIL, F.T.; SHEN, J.; VINSON, C.; RUEGER, J.M.; KARSENTY, G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. **Cell**, v. 100, n. 2, p. 197-207, Jan. 2000.

EDELSTEIN, S. L.; BARRETT-CONNOR, E. Relation between body size and bone mineral density in elderly men and women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 138, n. 3, p. 160–169, Aug. 1993.

ELEFTERIOU, F.; AHN, J.D.; TAKEDA, S.; STARBUCK, M.; YANG, X.; LIU, X.; KONDO, H.; RICHARDS, W.G.; BANNON, T.W.; NODA, M.; CLEMENT, K.; VAISSE, C.; KARSENTY, G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. **Nature**, v. 434, n. 7032, p. 514-520, Mar. 2005.

EL HAGE, R.; MOUSSA, E.; JACOB, C. Bone mineral content and density in obese, overweight, and normal-weighted sedentary adolescent girls. **J. Adolesc. Health**, v. 47, n. 6, p. 591–595, Dec. 2010.

ERDAL, N.; GÜRGÜL, S.; KAVAK, S.; YILDIZ, A.; EMRE, M. Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetes mellitus in rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 140, n. 3, p. 342-353, Jun. 2010.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIKAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R.A.; TETI, A.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 296-308, Jul. 2010

FIATARONE, M.A., MARKS, E.C., RYAN, N.D., MEREDITH, C.N., LIPSITZ, L.A., EVANS, W.J. High intensity strength training in nonagenarians. Effects on skeletal muscle. **JAMA**, v. 263, n. 22, p. 3029-3034, Jun. 1990.

FITTS, R.H., METZGER, J.M., RILEY, D.A., UNSWORTH, B.R. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. . **J. Appl. Physiol.**, v. 60, n. 6, p. 1946 – 1953, Jun. 1986.

FRATESCHI, M. E. B. J. M. **Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso**. 56f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

FRIEDMAN, J.E., SHERMAN, W.M., REED, M.J., ELTON, C.W., DOHM, G.L. Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. **FEBS Lett.**, v. 268, n. 1, p. 13-16, Jul 1990.

FUKUMOTO, H., KAYANO, T., BUSE, J.B., EDWARDS, Y., PILCH, P.F., BELL, G.I., SEINO, S. Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. **J.Biol.Chem.**, v. 264, p. 7776-79, 1989.

FUKUMOTO, S.; MARTIN, T. J. Bone as an endocrine organ. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 5, p. 230-236, Jul. 2009.

GARNERO, R.; GRIMAU, M.; DEMIAUX, B.; PREAUDAT, C.; SEQUIN, P.; DELMAS, P.D. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immuno-radiometric assay. **J. Bone Miner. Res.**, v. 7, N. 12, p. 1389-1398, Dec. 1992.

GEORG, A.E.; DUNCAN, B.B.; TOSCANO, C.M.; SCHMIDT, M.I.; MENGUE, S.; DUARTE, C.; POLANCZYK, C.A. Economic analysis of a screening program for diabetes mellitus in Brazil **Rev. Saude Publica**, v. 39, n. 3, p. 452-460, Jun. 2005.

GLAJCHEN, N.; EPSTEIN, S.; ISMAIL, F.; THOMAS, S.; FALLON, M.; CHAKRABARTI, S. Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: osteocalcin as a measure of bone remodeling. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 290-295, Jul. 1988.

GLASTRE, C.; BRAILLON, P.; DAVID, L.; COCHAT, P.; MEUNIER, P.J.; DELMAS, P.D. Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 70, n. 5, p. 1330-1333, May 1990.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 235-261, 1998.

GREGORIO, F.; CRISTALLINI, S.; SANTEUSANIO, F.; FILIPPONI, P.; FUMELLI, P. Osteopenia associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus: what are the causes? **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 23, n. 1, p. 43-54, Feb. 1994.

GROSS, J.L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J.L.; REICHELT, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação de controle glicêmico. **Arq. Bras. Endocrino. Metabo.**, v. 46, n. 1, p. 16-26, Feb. 2002.

GUERCI, B.; BÖHME, P.; KEARNEY-SCHWARTZ, A.; ZANNAD, F.; DROUIN, P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 2: altered endothelial function and the effects of treatments in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metab.**, v. 27, n. 4, Pt 1, p. 436-447, Set. 2001a.

GUERCI, B.; KEARNEY-SCHWARTZ, A.; BÖHME, P.; ZANNAD, F.; DROUIN, P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. **Diabetes Metab.**, v. 27, n. 4, Pt 1, p. 425-434, Set. 2001b.

GUNCZLER, P.; LANES, R.; PAZ-MARTINEZ, V.; MARTINS, R.; ESAA, S.; COLMENARES, V.; WEISINGER, J.R. Decreased lumbar spine bone mass and low bone turnover in children and adolescents with insulin dependent diabetes mellitus followed longitudinally. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 3, p. 413-419, 1998.

HART, K.J.; SHAW, J.M.; VAJDA, E.; HEGSTED, M.; MILLER, S.C. Swimtrained rats have greater bone mass, density, strength and dynamics. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n.4, p. 1663-1668, Oct. 2001.

HOLL, M. G.; ALLEN, L. H. Sucrose ingestion, insulin response and mineral metabolism in humans. **J. Nutr.**, v. 117, n. 7, p. 1229-1233, Jul. 1987.

HONDA, A.; SOGO, N.; NAGASAWA, S.; SHIMIZU, T.; UMEMURA, Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, n. 3, p. 1032-1037, Set. 2003.

HORNBERGER JUNIOR, T.A.; FARRAR, R.P.P. Hysiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physio.**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb. 2004.

HOSHI, A.; WATANABE, H.; CHIBA, M.; INABA, Y. Bone density and mechanical properties in femoral bone of swim loaded aged mice. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 11, n. 3, p. 243-250, Set. 1998.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SPIEGELMAN, B.M. Tumor-necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes.**, v. 43, n. 11, p. 1271-1278, Nov. 1994.

HUANG, A.; YANG, Y.M.; FEHER, A.; BAGI, Z.; KALEY, G.; SUN, D. Exacerbation of endothelial dysfunction during the progression of diabetes: role of oxidative stress. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 302, n. 6, p. R674-R681, Mar. 2012.

HUANG, T.H.; CHANG, F.L.; LIN, S.C.; LIU, S.H.; HSIEH, S.S.; YANG, R.S. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, n. 4, p. 350-357, Nov./Dec. 2008.

HUANG, T.H.; LIN, S.C.; CHANG, F.L.; HSIEH, S.S.; LIU, S.H.; YANG, R.S. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, n. 1, p. 300-307, Jul. 2003.

INZERILLO, A. M.; EPSTEIN, S. Osteoporosis and diabetes mellitus. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 5, n. 3, p. 261-268, Aug. 2004.

ISAKSSON, H.; TOLVANEN, V.; FINNILÄ, M.A.; IIVARINEN, J.; TUUKKANEN, J.; SEPPÄNEN, K.; AROKOSKI, J.P.; BRAMA, P.A.; JURVELIN, J.S.; HELMINEN, H.J. Physical exercise improves properties of bone and its collagen network in growing and maturing mice. **Calcif. Tissue Int.**, v. 85, n. 3, p. 247-256, Sep. 2009.

JACOBS-VAN DER BRUGGEN, M.A.; BOS, G.; BEMELMANS, W.J.; HOOGENVEEN, R.T.; VIJGEN, S.M.; BAAN, C.A. Lifestyle interventions are cost-effective in people with different levels of diabetes risk: results from a modeling study. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 128-134, n. 3, Jan. 2007.

JEAN, C.; TANCREDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Adrenodemedullation does not impair the beneficial effect of psysical trainingin treptozotocin- diabetic rats. **Metabolism**, v. 41, n. 4, p. 370-376, Apr. 1992.

JENSEN, T.; DECKERT, T. Diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy. Generalized vascular damage in insulin-dependent diabetic patients. **Horm. Metab. Res. Suppl.**, v. 26, p. 68-70, 1992.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 99, n. 1, p. 330-337, Jul. 2005.

JOHNELL, O.; KANIS, J.A.; ODEN, A.; JOHANSSON, H.; DE LAET, C.; DELMAS, P.; EISMAN, J.A.; FUJIWARA, S.; KROGER, H.; MELLSTROM, D.; MEUNIER, P.J.; MELTON, L.J. 3RD; O'NEILL, T., POLS, H., REEVE, J.; SILMAN, A.; TENENHOUSE, A. Predictive value of BMD for hip and other fractures. **J. Bone Miner. Res.**, v. 20, n. 7, p. 1185-1194, Jul. 2005.

JOHNSON, R. B. The bearable lightness of being: bones, muscle, and spaceflight. **Anat. Rec.**, v. 253, n. 1, p. 24-27, Feb. 1998.

JOVINE, M. S.; BUCHALLA, C.M.; SANTARÉM, E. M.; SANTARÉM, M. J.; ALDRIGHI, J.M. Effects of resistance training on postmenopausal osteoporosis: study update. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 9, n. 4, p. 493-505, Jul. 2006.

KANAMARU, F.; IWAI, H.; IKEDA, T.; NAKAJIMA, A.; ISHIKAWA, I.; AZUMA, M. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human T cells. **Immunol. Lett.**, v. 94, n. 3, p. 239-246, Jul. 2004.

KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; TADA, Y.; YAMAUCHI, M.; YANO, S.; SUGIMOTO, T. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin

sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. **Bone**, v. 48, n. 4, p. 720-725, Abr. 2011.

KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; YAMAMOTO, M.; KURIOKA, S.; YANO, S.; SUGIMOTO, T. Adiponectin is associated with changes in bone markers during glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, n. 8, p. 3031–3037, Aug. 2009.

KARSENTY, G.; OURY, F. The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 11, p. 4795–4801, Nov. 2010.

KASPER, C.E.; MCNULTY, A.L.; OTTO, A.J.; THOMAS, D.P. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: an empirical model. **Res. Nurs. Health**, v. 16, n. 4, p. 265-273, Aug. 1993.

KATZ, E.B.; BURCELIN, R.; TSAO, T.S.; STENBIT, A.E.; CHARRON, M.J. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. **J. Mol. Med.**, v. 74, n. 11, p. 639–652, Nov. 1996.

KAWANAKA, K.; TABATA, L.; KATSUTA, S.; HIGUCHI, M. Changes in insulin-stimulated glucose transport and GLUT 4 protein in rat skeletal muscle after training. **J. Appl. Physiol.** v. 83, n. 6, p. 2043-2047, Dec. 1997.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 677 p.

KODAMA, T.; IWASE, M.; NUNOI, K.; MAKI, Y.; YOSHINARI, M.; FUJISHIMA, M. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 20, n. 3, p. 183-189, Jun. 1993.

KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 103, n. 1, p. 388-395, Jul 2007.

LEE, I.M.; PAFFENBARGER, R.S.J. Association of light moderate and vigorous intensity physical activity with longevity. **Am. J. Epidemiol.**, v. 151, n. 3, p. 293-299, Feb. 2000.

LEE, N.K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J.D.; CONFAVREUX, C.; DACQUIN, R.; MEE, P.J.; MCKEE, M.D.; JUNG, D.Y.; ZHANG, Z.; KIM, J.K.;

MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, n. 7, p. 456–469, Aug. 2007.

LEE, S.; PARK, Y.; ZHANG, C. Exercise training prevents coronary endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. **Am. J. Biomed. Sci.**, v. 3; n. 4, p. 241–252, Oct. 2011.

LEGUISAMO, N.M.; LEHNEN, A.M.; MACHADO, U.F.; OKAMOTO, M.M.; MARKOSKI, M.M.; PINTO, G.H.; SCHAAN, B.D. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 11, p. 100, Aug. 2012.

LEHNEN, A.M.; LEGUISAMO, N.M.; PINTO, G.H.; MARKOSKI, M.M.; DE ANGELIS, K.; MACHADO, U.F.; SCHAAN, B. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 9, p. 67, Oct. 2010.

LI, X.; LIU, H.; QIN, L.; TAMASI, J.; BERGENSTOCK, M.; SHAPSES, S.; FEYEN, J.H.; NOTTERMAN, D.A.; PARTRIDGE, N.C. Determination of dual effects of parathyroid hormone on skeletal gene expression in vivo by microarray and network analysis. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 45, p. 33086–33097, Nov. 2007.

LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H.; MORAES, S.M.; HELL, N.S.; OKAMOTO, M.M.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 6, p. E934–E941, Dec. 1998.

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

LIU, E.Y.; WACTAWSKI-WENDE, J.; DONAHUE, R.P.; DMOCHOWSKI, J.; HOVEY, K.M.; QUATTRIN, T. Does low bone mineral density start in postteenage years in women with type 1 diabetes? **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2365–2369, aug. 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265–275, Nov. 1951.

LUUKINEN, H.; KÄKÖNEN, S.M.; PETTERSSON, K.; KOSKI, K.; LAIPPALA, P.; LÖVGREN, T.; KIVELÄ, S.L.; VÄÄNÄNEN, H.K. Strong prediction of fractures among older adults by the ratio of carboxylated to total serum osteocalcin. **J. Bone Miner. Res.**, v. 15, n. 12, p. 2473-2478, Dec. 2000.

LÖE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 329-334, Jan. 1993.

MAASSEN, J. A.; OUWENS, D. M. Mechanism of insulin action. **Front. Horm. Ver.**, v. 22, p. 201-221, 1997.

MACHADO, L. J. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. R.; BRAGA, W. R. V. Insulina **Diabetes Mellitus**, v. 11, n. 1, mai. 2002.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 177-189, Abr. 2006.

MARCUS, R. G.; ENGLAND, R.; NGUYEN, K.; CHARON, M. J.; BRIGGS, J. P.; BROSIUS, F. C. 3rd. Altered renal expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in experimental diabetes mellitus. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 5, p. F816-F824, Nov. 1994.

MARTIN, R. B. Targeted bone remodeling involves BMU steering as well as activation. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1574-1580, Jun. 2007.

MARTINI, F. H. **Fundamentals of anatomy and physiology**. 9. ed. Ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 1123 p.

MATSUMOTO, T.; NAKAYAMA, K.; KODAMA, Y.; FUSE, H.; NAKAMURA, T.; FUKUMOTO, S. Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. **Bone**, v. 22, n. 5, p. 895-935, May. 1998.

MAZZEO, R. S.; TANAKA, H. Exercise prescription for the elderly: current recommendations. **Sports Med.**, v. 31, n. 11, p. 809-818, 2001.

MCNAIR, P.; MADSBAD, S.; CHRISTENSEN, M. S.; CHRISTIANSEN, C.; FABER, O. K.; BLINDER, C.; TRANSBØL, I. Bone mineral loss in insulin-treated

diabetes mellitus: studies on pathogenesis. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v. 90, n. 3, p. 463-472, Mar. 1979.

MEIRELLES, C. M.; GOMES, P. S. Efeitos agudos da atividade de contra-resistência sobre o gasto energético: revisitando o impacto das principais variáveis. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, n. 2, p. 122-138, Mar./Abr. 2004.

MAZGOWSKI, T.; PYNKA, S.; NOWORYTA-ZIETARA, M.; KRZYŻANOWSKA-SWINIARSKA, B.; PIKUL, R. Bone mineral density and hip structural analysis in type 1 diabetic men. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 156, v. 1, p. 123–127, Jan. 2007.

MISHIMA, N.; SAHARA, N.; SHIRAKAWA, M.; OZAWA, H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. **Arch. Oral Biol.**, v. 47, n. 12, p. 843-849, Dez. 2002.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H.; COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ International. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 22, n. 12, p. 1145 -1158, Dec. 1998.

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

MUSI, N.; GOODYEAR, L. J. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. **Acta Physiol. Scand.**, v. 178, n. 4, p. 337-345, Aug. 2003.

MUÑOZ, P.; CHILLARÓN, J.; CAMPS, M.; CASTELLÓ, A.; FURRIOLS, M.; TESTAR, X.; PELACÍN, M.; ZORZANO, A. Evidence for posttranscriptional regulation of GLUT4 expression in muscle and adipose tissue from streptozotocin-induced diabetic and benfluorex-treated rats. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, n. 11, p. 1665-1673, Dec. 1996.

MYERS, J.; ATWOOD, E.; FROELICHER, V. Active lifestyle and diabetes. **Circulation**, v. 107, n. 19, p. 2392-2394, May 2003.

MYERS JUNIOR, M. G.; WHITE, M. F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 615 – 658, 1996.

NG, K. W. Regulation of glucose metabolism and the skeleton. **Clin. Endocrinol.**, v. 75, n. 2, p. 147-155, Aug. 2011.

OGATA, N.; CHIKAZU, D.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; TOBE, K.; AZUMA, Y.; OHTA, T.; KADOWAKI, T.; NAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, K. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 7, p. 935–943, Apr. 2000.

OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. Diabetes: passado, presente e futuro. In: OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento interdisciplinar. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, p. 1-6.

PAFFENBARGER JUNIOR, R. S.; BLAIR, S. N.; LEE, I. M. A history of physical activity, cardiovascular health and longevity: the scientific contributions of Jeremy N Morris, DSc, DPH, FRCP. **Int. J. Epidemiol.**, v. 30, n. 5, p. 1184-1192, Oct. 2001.

PATTERSON, J. E.; ANDRIOLE, V. T. Bacterial urinary tract infections in diabetes. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 11, n. 3, p. 735-750, Sep. 1997.

PAUL, R. G.; BAILEY, A. J. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 28, n. 12, p. 1297–1310, Dec. 1996.

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; ROPELLE, E. R. New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 4, p. 399-408, Jun. 2009.

PEPPA, M.; RAPTIS, S. A. Glycoxidation and wound healing in diabetes: an interesting relationship. **Curr. Diabetes. Rev.**, v. 7, n. 6, p. 416-425, Nov. 2011.

PIVONKA, P.; ZIMAK, J.; SMITH, D. W.; GARDINER, B. S.; DUNSTAN, C. R.; SIMS, N. A.; MARTIN, T. J.; MUNDY, G. R. Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study. **Bone**, v. 43, n. 2, p. 249-263, Aug. 2008.

POIRIER, P.; DESPRÉS, J. P. Exercise in weight management of obesity. **Cardiol. Clin.**, v. 19, n. 3, p. 459-470, Aug. 2001.

PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P.; MCEVOY, R.; GIROIX, M. H.; KERGOAT, M.; BAILBE, D. The rat models of non-insulin dependent diabetes

induced by neonatal streptozotocin. **Diabete Metab.**, v. 15, n. 2, p. 61-75, Mar./Apr. 1989.

PRIOR, J. C.; BARR, S. I.; CHOW, R.; FAULKNER, R. A. Prevention and management of osteoporosis consensus statements from the scientific advisory board of the osteoporosis society of Canada. Physical activity as therapy for osteoporosis. **CMAJ**, v. 155, n. 7, p. 940-944, Oct. 1996.

RAMADAN, J.; BARAC-NIETO, M. Low-frequency physical activity insufficient for aerobic conditioning is associated with lower body fat than sedentary conditions. **Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 225-229, Mar. 2001.

RASKIN, P.; STEVENSON, M. R.; BARILLA, D. E.; PAK, C. Y. The hypercalciuria of diabetes mellitus: its amelioration with insulin. **Clin. Endocrinol.**, v. 9, n. 4, p. 329-335, Oct. 1978.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; HAMADE, S.; ENWEMEKA, C. S. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 54, n. 1, p. 1-8, Oct 2001.

RETZEPI, M.; DONOS, N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 21, n. 7, p. 673-681, Jul 2010.

RICHARDS, J. B.; VALDES, A. M.; BURLING, K.; PERKS, U. C.; SPECTOR, T. D. Serum adiponectin and bone mineral density in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 92, n. 4, p. 1517-1523, Apr. 2007.

RICHTER, E. A.; DERAIVE, W.; WOJTASZEWSKI, J. F. Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. **J. Physiol.**, v. 535, pt. 2, p. 313 – 322, Sep. 2001.

ROMAN, B.B.; MEYER, R.A.; WISEMAN, R.W. Phosphocreatine kinetics at the onset of contractions in skeletal muscle of MM creatine kinase knock-out mice. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 283, n. 6, p. C1776-C1783, Dec. 2002.

ROUSSEAU-MIGNERON, S.; TURCOTTE, L.; TANCRÈDE, G.; NADEAU, A. Transient increase in basal insulin levels in severely diabetic rats submitted to physical training. **Diabetes Res.**, v. 9, n. 2, p. 97-100, Oct. 1988.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 2, p. 320-344, Jun 2004.

RYAN, A. S.; IVEY, F. M.; HURLBUT, D. E.; MARTEL, G. F.; LEMMER, J. T.; SORKIN, J. D.; METTER, E. J.; FLEG, J. L.; HURLEY, B. F. Regional bone mineral density after resistive training in young and older men and women. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 14, n. 1, p. 16-23, Feb. 2004.

SCHIMMACK, G.; DEFRONZO, R. A.; MUSI, N. AMP – activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 8, n. 6, p. 591-602, Nov. 2006.

SCHWARTZ, A. V. Diabetes mellitus: does it affect bone? **Calcif. Tissue Int.**, v. 73, n. 6, p. 515–519, Dec. 2003.

SEGERSTRÖM, A. B.; GLANS, F.; ERIKSSON, K. F.; HOLMBÄCK, A. M.; GROOP, L.; THORSSON, O.; WOLLMER, P. Impact of exercise intensity and duration on insulin sensitivity in women with T2D. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 21, n. 5, p. 404-408, Oct. 2010.

SERAPHIM, P. M.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 10, p. 1353-1362, Oct. 2001.

SILVA, A. V.; VOLPON, J. B. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortop. Bras.**, v. 12, n. 1, p. 22- 31, Jan./Mar 2004.

SINZATO, Y. K.; LIMA, P. H.; CAMPOS, K. E.; KISS, A. C.; RUDGE, M. V.; DAMASCENO, D. C. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 55, n. 4, p. 384-388, Jul./Aug. 2009.

SLOT, J. W.; GEUZE, H. J.; GIGENGACK, S.; LIENHARD, G. E.; JAMES, D. E. Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. **J. Cell Biol.**, v. 113, n. 1, p. 123-135, Apr. 1991.

SMYTH, S.; HERON, A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. **Nat. Med.**, v. 12, n. 1, p. 75-80, Jan. 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso brasileiro sobre diabetes 2002**: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Rio de Janeiro: Ed. Diagraphic, 2003. 72 p.

SOUZA, M. Z.; LUCIANO, E. Influências do treinamento físico sobre o crescimento ósseo de ratos diabéticos. **Saúde Rev.**, v. 7, n. 16, p. 27-35, 2005.

STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. **Endocr. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 424-442, Aug. 1993.

STOLK, R. P.; VAN DAELE, P. L.; POLS, H. A.; BURGER, H.; HOFMAN, A.; BIRKENHÄGER, J. C.; LAMBERTS, S. W.; GROBBEE, D. E. Hyperinsulinemia and bone mineral density in an elderly population: The Rotterdam Study. **Bone**, v. 18, n. 6, p. 545-549, Jun. 1996.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; JIMI, E.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocr. Rev.**, v. 20, n. 3, p. 345-357, Jun. 1999.

TAKADA, J.; MACHADO, M. A.; PERES, S. B.; BRITO, L. C.; BORGES-SILVA, C. N.; COSTA, C. E.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F. B. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism**, v. 56, n. 7, p. 977-984, Jul. 2007.

TAN, M. H.; BONEN, A.; GARNER, J. B.; BELCASTRO, A. N. Physical training in diabetic rats: effect on glucosetolerance and serumlipids. **J. Appl. Physiol.**, v. 52, n. 6, p. 1514-1518, Jun. 1982.

TANCRÈDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 31, n. 5, p. 406-409, May. 1982.

THOMAS, D.M.; HARDS, D.K.; ROGERS, S.D.; NG, K.W.; BEST, J.D. Insulin and bone, clinical and scientific view. **Endocrinol. Metab. North Am.**, v. 4, p. 5–17, 1997.

THOMPSON, P. D. E. A. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Arteriocler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 8, p. 1319-1321, Aug. 2003.

THOMPSON, P. D. Exercise prescription and prescription with coronary artery disease. **Circulation**, v. 112, n. 15, p. 2354-2363, Oct. 2005.

THRAILKILL, K. M.; LUMPKIN, C. K. Jr; BUNN, R. C.; KEMP, S. F.; FOWLKES, J. L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, n. 5, p. E735-E745, Nov. 2005.

TOMAS, E.; ZORZANO, A.; RUDERMAN, N. B. Exercise effects on muscle insulin signaling and action exercise and insulin signaling: a historical perspective . **J. Appl. Physiol.**, v. 93, p. 765-772, Aug. 2002.

TUOMINEN, J. T.; IMPIVAARA, O.; PUUKA, P; RÖNNEMAA, T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 7, p. 1196-1200, Jul. 1999.

UMPIERREZ, G. E.; ZLATEV, T.; SPANHEIMER, R. G. Correction of altered collagen metabolism in diabetic animals with insulin therapy. **Matrix**, v. 9, n. 4, p. 336-342, Aug. 1989.

VAN DER SLUIS, I. M.; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M. Osteoporosis in childhood: bone density of children in health and disease. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 14, n. 7, p. 817-32, 2001 Jul./Aug. 2001.

VASQUES, M. O.; ANDREATO, L. V.; ALMEIDA, F. N.; ESTEVES, J. V. D. C.; SOUZA, F. R.; MORAES, S. M. F. Strenght training improves plasma parameters, body composition and liver morphology in ovariectomized rats. **Sci. Sports**, v. 27, n. 2, p. 94-100, Apr. 2012.

VERGNAUD, P.; GARNERO, P.; MEUNIER, P. J.; BRÉART, G.; KAMIHAGI, K.; DELMAS, P. D. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 3, p. 719–724, Mar. 1997.

VIEIRA, J. G. H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.43, n.6, P.415-422, 1999.

VICENTE-RODRIGUEZ, G.; EZQUERRA, J.; MESANA, M. L.; FERNÁNDEZ-ALVIRA, J. M.; REY-LÓPEZ, J. P.; CASAJUS, J. A.; MORENO, L. A. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, n. 5, p. 416-424, Aug. 2008.

WARNER, S. E.; SHEA, J. E.; MILLER, S. C.; SHAW, J. M. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. **Calcif. Tissue Int.**, v. 79, n. 6, p. 395-403, Dec. 2006.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J. Clin. Invest.** v. 115, n. 5, p. 1111-1119, May 2005.

WEYER, C.; FUNAHASHI, C.; TANAKA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R. E.; TATARANNI, T. A. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, May. 2001.

WHITING, D. R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 94, n. 3, p. 311-321, Dec 2011.

XIE, L.; ORTEGA, M. T.; MORA, S.; CHAPES, S. K. Interactive changes between macrophages and adipocytes. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 651–659, Apr. 2010.

YANARDAG, R.; OZSOY-SACAN, O.; BOLKENT, S.; ORAK, H.; KARABULUT-BULAN, O. Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 24, n. 3, p. 129–135, Mar. 2005.

YENDT, E. R.; COHANIM, M.; JARZYLO, S.; JONES, J.; ROSENBERG, G. Reduced creatinine clearance in primary osteoporosis in women. **J. Bone Miner. Res.**, v. 8, n. 9, p. 1045–1052, Set. 1993.

YONEMITSU, S.; NISHIMURA, H.; SHINTANI, M.; INOUE, R.; YAMAMOTO, Y.; MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; HOSODA, K.; INOUE, G.; HAYASHI, T.; HAYASHI, T.; NAKAO, K. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 Troglitazone induces myotubes. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 1093-1101, May 2001.

ANEXO A

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética
na Experimentação Animal da Faculdade de
Odontologia do *Campus* de Araçatuba -
UNESP

ANEXO B

Artigo submetido à Revista Internacional
Osteoporosis International para publicação

**Effect of resistance training on bones of
osteopenic rats with type 2 diabetes:
Analysis of GLUT4 expression and
densitometric, biomechanical, biochemical,
and histological evaluation**

Effect of resistance training on bones of osteopenic rats with type 2 diabetes: Analysis of GLUT4 expression and densitometric, biomechanical, biochemical, and histological evaluation

Yamamoto APM^a, Astolphi RD^a, Chiba FY^d, Mota MSO^a, Garbin CAS^d, Louzada MJQ^b, Ervolino E^a, Okamoto MM^c, Machado UF^c, Sumida DH^a

^aYamamoto; Astolphi; Mota; Ervolino; Sumida

Department of Basic Sciences

Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rua José Bonifácio 1193. CEP 16015-050

^bLouzada

Department of Support, Animal Production and Health

Araçatuba School of Veterinary Medicine, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, 793.

CEP: 16050-680

^cOkamoto; Machado

Department of Physiology and Biophysics

Institute of Biomedical Sciences, USP - University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415. CEP:

05508-900

^dChiba; Garbin

Department of Odontology Infant and Social Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista,

Rua José Bonifácio 1193. CEP 16015-050

*Corresponding author:

Doris Hissako Sumida, DDS, PhD:

Department of Basic Sciences

Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista

Rua José Bonifácio 1193. CEP 16015-050

Tel.: (55) 18-3636-2819

E-mail: dorishs@foa.unesp.br

Mini Abstract

Resistance training (RT) in diabetic rats improves the biomechanical properties and the quality of bone, promotes blood glucose control, and increases GLUT4 expression.

Abstract

Purpose: To investigate the effect of resistance training (RT) on plasma glucose levels, insulin sensitivity, expression of the glucose transporter GLUT4, BMD, and biomechanical properties of bone in osteopenic rats with type 2 diabetes. **Methods:** Sixty-four 5-day-old male rats were divided into two groups: control and diabetic, which were injected with vehicle or streptozotocin (150 mg/kg i.p.), respectively. After 55 days, densitometric analysis (DA) of the tibia was performed by dual X-ray absorptiometry. Then, these groups were subdivided into 4 subgroups: non-osteopenic control, osteopenic control (OC), non-osteopenic diabetic, and osteopenic diabetic (OD). The OC and OD groups were suspended by their tails for 21 days to promote osteopenia in the hindlimb, after which a second DA was performed. Then, the rats were subdivided into eight subgroups: sedentary control, sedentary-OC, exercised control, exercised-OC, sedentary diabetic, sedentary-OD, exercised diabetic, and exercised-OD. The RT consisted of climbing a ladder with weights secured to their tails for 12 weeks. After the RT period, a third DA was performed, and blood samples, gastrocnemius muscles, and tibias were collected to measure glycemia, insulinemia, GLUT4 content, bone maximum strength, fracture energy, extrinsic stiffness, and BMD. **Results:** After RT, glycemia, expression of GLUT4, BMD, and bone biomechanical properties were improved in osteopenic and non-osteopenic diabetic rats. However, RT had no effect on these parameters in the exercised and sedentary control groups. **Conclusion:** These results suggest that RT improves GLUT4 expression, BMD, and biomechanical properties of bone in osteopenic and non-osteopenic diabetic rats, in addition to controlling glucose levels.

Keywords: bone mineral density, diabetes mellitus, osteopenia, resistance training, insulin sensitivity, GLUT4

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, action [1], or both [2]. Based on recent estimates from the World Health Organization, more than 300 million people worldwide have T2DM, and diabetes deaths will double between 2005 and 2030 [3]. It is known that T2DM leads to a variety of complications, including those in the skeletal system, such as low bone turnover and increased incidence of fractures [4]. However, it is not clear which bone properties are influenced by T2DM. Furthermore, fractures in diabetic patients can promote prolonged hospitalization periods and decreased mobility, reducing biomechanical stress. The lack of biomechanical stress (i.e. absence of load situation) leads to bone disuse, and, in turn, reduces bone mass, resulting in low bone mineral density (BMD) and negative effects on other properties of bone, such as bone resistance [5].

Van Loon et al. [6] showed that 4 days of absence of load inhibits mineralization of bone due to stimulation of osteoclastic resorption. Furthermore, human osteoblastic cells exposed to an absence of load for 9 days showed reduced expression of osteocalcin and collagen [6]. Studies have shown that osteocalcin stimulates insulin secretion and sensitivity and that it plays an important role in bone metabolism, stimulating the differentiation of osteoblastic cells [7]. It is clear that increased insulin secretion and sensitivity can decrease serum glycemia. In T2DM, the osteocalcin levels are also reduced, and it is also known that glycemic levels are controlled when osteocalcin levels are normalized, demonstrating the important link between osteocalcin and glycemia [8]. On the other hand, the changes in collagen due to diabetes affect not only the process of mineralization, but also the mechanical properties of bone [9]. Hyperglycemia and hyperinsulinemia have been identified as causes of skeletal changes in diabetic patients [10]. Hyperglycemia suppresses the proliferation and differentiation of osteoblasts and affects the expression of collagen; insulin also has an important function in osteoblasts, chondrocytes, and collagen synthesis [10-12].

Physical exercise has positive effects on virtually all organ systems, particularly in the skeletal and muscular systems. The resistance training (RT) program has shown short-term benefits on bone health, improving bone formation, resistance, and remodeling [13], increasing BMD, and consequently reducing the risk of fractures by improving bone strength [14]. It is well established that continuous physical exercise is one of the most valuable forms of non-pharmacological therapy for T2DM. RT promotes several beneficial effects on skeletal muscles, including improvements in glucose homeostasis [15], lipid metabolism [16], insulin sensitivity [17], along with an increase in glucose transport in muscle, due to RT-stimulated translocation of the glucose transporter GLUT4 to the cell surface [18]. It is known that insulin resistant (IR) states, such as T2DM, can alter the expression of GLUT4 in insulin-sensitive tissues [19-21]. On the other hand, increased GLUT4 expression has been shown to improve glycemic control in diabetic animals [22,23]. However, there are no reports addressing the effect of RT on the properties of bone in diabetic rats with osteopenia.

Osteopenia, in association with T2DM-induced stresses, can decrease BMD and bone strength; on the other hand, the RT program can reverse this condition. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of RT on plasma glucose and insulin levels, insulin sensitivity, expression of GLUT4, BMD, and biomechanical properties of bone in adult osteopenic rats (that were exposed to a condition where the hindlimb is unloaded) with T2DM that was induced in neonatal life.

Methods

Animals and treatment

All procedures were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee (Protocol number 0470-11). Sixty-four Wistar male rats (5 days old) were fasted (separated from their mothers) for 8 h, and randomly divided into two groups: control (CN) and diabetic (DM). In the DM group, streptozotocin (STZ; 150 mg/kg, ip) diluted in citrate buffer (10 mmol/L sodium citrate, pH 4.5) was injected. The CN group received an equivalent volume of

the vehicle solution [24]. Rats were weaned at 21 days, and were then kept in groups of 5 in collective cages under a controlled environment (temperature $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) with a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) with free access to a regular laboratory rat diet (LABINA Indústria de rações do Brasil LTDA, Paulínia, Brasil) and water. Fifty-five days after injection of STZ, blood samples (about 50 μL) were collected from nicked tails and, immediately, glucose was measured using a glucose monitor (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Only DM rats with blood glucose levels over 200 mg/dL were used for experiments. The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/kg bw, i.m.) and xylazine (10 mg/kg bw, i.m.) to facilitate the first evaluation of the BMD of the right tibia by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). After this evaluation, the animals were subdivided into 4 subgroups: non-osteopenic control (CN); osteopenic control (OC); non-osteopenic diabetic (DM); and osteopenic diabetic (OD). The OC and OD groups were suspended by their tails for 21 days to promote osteopenia in the hindlimb. At the end of this period, the groups were anesthetized as described above and a second DA of the right tibia was performed. Then, the non-osteopenic and osteopenic control rats (CN and OC) were divided into these groups: sedentary control - not suspended or exercised (SC, $n = 8$); sedentary osteopenic control suspended by the tail, but not exercised (SOC, $n = 8$); exercised control not suspended but exercised (EC, $n = 8$); and exercised osteopenic control suspended by the tail and then exercised for 12 weeks (EOC, $n = 8$). Likewise, the non-osteopenic and osteopenic diabetic rats (DM and OD) were divided into the following groups: sedentary diabetic (SD, $n = 8$); sedentary osteopenic diabetic (SOD, $n = 8$); exercised diabetic (ED, $n = 8$); and exercised osteopenic diabetic (EOD, $n = 8$). After gait recovery (2 weeks) of the osteopenic groups, the animals in the exercise groups were subjected to a physical exercise-guided practice or the RT program (rats were trained to climb a 1.1-m vertical 80° -incline ladder with weights secured to their tails) for 12 weeks [25]. After the RT period, a third DA of the right tibia was carried out in all groups and the next day, after 12 h of fasting, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (Thiopentax $\text{\textcircled{R}}$ - Cristália

Chemicals Pharmaceuticals Ltd., Itapira, Brazil, 3%, 50 mg/kg of body weight, i.p.) and blood, gastrocnemius muscle, and bone samples were collected.

Evaluation of BMD and biomechanical parameters

The total area (cm²), bone mineral content (BMC; g), and bone mineral density (BMD) (g/cm³) were measured in whole tibia DXA (lunar DPX alpha, WI, USA). The biomechanical properties of tibiae of rats were evaluated by 3-point bending using a universal testing machine (DL 3000, EMIC®, SP, Brazil). Each tibia was loaded centrally in the diaphysis medium, with a support distance range of 2/3 of the bone length, and a 2000-N load cell was applied at a rate of 5 mm/min until the bone fractured. The load and displacement of the cross bar of the machine was monitored and recorded using a software. From these data, the load-displacement curves were obtained. The tensile strength of the bone (N) is the breakdown strength that represents the force at which the bone was broken. In fact, it is a more precise parameter for directly evaluating the resistance to bone fracture. The slope of the elastic region of the load-displacement curve is the extrinsic stiffness (N/mm) of the structure, and the area under the load-displacement curve (i.e., the area of the elastic strain region plus the area of the plastic strain region) is a measure of the amount of energy required to cause a bone fracture [26].

The hindlimb unloading model (Osteopenia)

The rat tails were washed with water and detergent and after drying, a tincture of benzoin was applied to the entire skin. After that, the tail was enfolded with an adhesive spume (Reston®) from its origin until the two proximal thirds, approximately, aiming to protect the skin and avoid cutaneous injuries. An adhesive elastic strip was applied on the adhesive spume. The strip was tensioned homogeneously enfolding all the spume. A narrow elastic ribbon was placed on the elastic strip and fixed by bandages of the adhesive elastic strip and additional bandages of court plaster and twined in order to form a handle used to connect the animal to the suspension system [27].

RT protocol

The physical RT was applied according to the protocol already described by Hornberger and Farrar [25], with gradual load increase during the 12-week period of training. Prior to the RT itself, the rats were subjected to a 2-week adaptation program. After this adaptation period, training was performed 3 days a week on an alternate day basis, with the rats executing climbing procedures 8 times a day with 2-min intervals between each repetition.

Analysis methods

Samples from plasma were used for determination of glycemia by the oxidase glucose method (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) [28] and insulinemia by the radioimmunological assay (RIA) method (Coat-A-Count, DPC, Diagnostic products, Los Angeles, CA, USA). Insulin resistance was evaluated by index of homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), calculated using the formula: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting glycemia (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia (}\mu\text{UI/mL)} / 22.5$ [28].

GLUT4 protein analysis

Levels of GLUT4 protein in the total cellular membrane fraction was assessed as previously described [21, 29]. Two subcellular membrane fractions of gastrocnemius muscle (GM) were prepared as previously described [21]. Briefly, tissues were homogenized using a Polytron (Brinkmann Instruments, Westbury, NY) in a buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 250 mmol/L sucrose buffer, at pH 7.4, and centrifuged at $3000\times g$ for 15 min. The fat cake was discarded, and the supernatant was subjected to a second centrifugation at $12,000\times g$ for 15 min. The pellet was resuspended 1 mL of the same buffer to obtain the plasma membrane-rich fraction (PM). The supernatant was centrifuged at $28,000\times g$ for 15 min, and, subsequently, centrifuged at $146,000\times g$ for 75 min. The final pellet was resuspended in 1 mL of the buffer to obtain the microsomal fraction (M). The GM fraction was homogenized in the

same buffer, and centrifuged at $1000\times g$ for 10 min. The supernatant was retained and the pellet was resuspended in 1/3 of the initial volume of the buffer, and centrifuged again at $1000\times g$ for 10 min. Both supernatants were mixed and subjected to a $150,000\times g$ -centrifugation for 75 min. The final pellet was resuspended in 1 mL of buffer to obtain the total membrane fraction. All procedures were performed at 4°C. Total protein concentration of the membrane samples was evaluated by Lowry's method [30]. Immunoblotting was carried out as previously described by Zanquetta et al. [31]. Equal amounts of membrane protein were solubilized in Laemmli's sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5; 9% SDS; 15% glycerol; 0.05% bromophenol blue; and 6% 2-mercaptoethanol), heated in a boiling bath, and resolved by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels. Proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane (HYBOND-C Super, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by pre-incubating the membrane for 2 h at room temperature in blocking buffer (phosphate-buffered saline [PBS], 6% bovine serum albumin [BSA], pH 7.2). The nitrocellulose membrane was then incubated with an anti-GLUT4 antiserum for 3 h at 37°C, washed, and incubated with 1.5 Ci/50 mL of PBS buffer pH 7.2 [125 I]protein-A (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) for 2 h at room temperature. After that, the membrane was washed five times in 1% Triton X-100 in PBS for 5 min, and exposed to an X-ray film for 2 days. The blots were quantified by densitometry (Image Master 1D®, Pharmacia Biotech, Upsalla, SW), and the results were expressed as arbitrary units (AU).

Histological Analysis

For histologic analysis, two animals of each group (SC, SOC, EC, EOC, SD, SOD, ED, and EOD) were randomly selected. The right tibia was collected from rats immediately after the strength training period and then soaked in 4% formaldehyde for 24 h. Decalcification was performed in 10% EDTA (pH 7.4) for 2 months. Serial paraffin sections of 5- μ m thickness were obtained on the mesio-distal aspects of the whole right tibia and stained with hematoxylin and eosin.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM, and statistical analysis was performed using the Graph Pad Prism (version 5.0) software program. Intergroup comparisons were performed by one-way ANOVA with the Tukey-Kramer post-hoc test, considering $p < 0.05$ as statistically significant.

Results

Qualitative Histological Analysis

The SOC and SOD groups had tibiae with histological features consistent with osteopenia, confirming the effectiveness of the model for osteopenia via hindlimb suspension. When compared with the corresponding controls, the SOC and SOD groups showed fewer bone trabeculae that were much thinner, as much as in epiphysis and metaphysis (Fig. 1). In these groups, the epiphysial disc thickness was unchanged; however, the newly formed bone trabeculae by endochondral osteogenesis were also much thinner and of a lesser amount. The diaphysis showed a reduction in the thickness of compact bone tissue and a great reduction in the amount of cancellous bone. A large number of osteoclasts were observed in the process of bone resorption, especially in the outer portion of the diaphysis in contact with the periosteum. In these groups, a thicker periosteum that was highly cellularized, especially in its inner portion, mainly due to the large amount of osteoclasts, was observed. The groups SD and SOD, when compared with the SC and SOC groups, respectively, had smaller bones and bone trabeculae were even thinner. Histological characteristics presented by compact bone tissue and the cancellous bone tissue in the EC group were similar to those observed in the SC group. In the EOC and EOD groups, the cancellous bone of the epiphysis and metaphysis showed thin trabecular bones, but these were much larger than that seen in the SOC and SOD groups, respectively (Fig. 1). The thickness of the epiphysial disc was unchanged in the SOC, EOC, SOD, and EOD groups; however, the newly formed bone trabeculae in the zone of endochondral osteogenesis were in greater numbers in the EOC and EOD groups. In the

diaphysis, the thickness of the compact bone tissue showed similarities among the SOC, EOC, EOD, and SOD groups; however, the amount of trabecular bone in the inside was greater in the EOC and EOD groups. The ED group showed histologic features similar to those of the EOD group. The thickness and histological characteristics of articular cartilage showed no changes in any of the experimental groups (Fig. 1).

Measurement of glucose levels

At sixty days, the capillary glycemia of the CN and DM were measured. The DM group showed an increase ($p < 0.05$) in blood glucose compared to the CN group (Fig. 2A). The glycemia of control groups (SC, SOC, EC, and EOC) were similar (Fig. 2B). In addition, there was no difference in the glycemia between the exercised diabetic rats (ED and EOD). However, these exercised groups showed reduced blood glucose ($p < 0.05$) compared to sedentary diabetic groups (SD and SOD), while there were no differences between the sedentary groups. The SD and SOD groups had higher glycemia ($p < 0.05$) compared to all the control groups (SC, SOC, EC, and EOC). The EOD group showed higher values ($p < 0.05$) compared to both control groups (EC and EOC). However, the ED group had higher values ($p < 0.05$), only compared to the EC group.

Insulinemia

The results of the insulinemia analysis after RT show that the induction of osteopenia increased insulinemia ($p < 0.05$) in the SOC and EOC groups, compared to that in the SC group (Fig. 2C). There was no difference between the EOC and SOC control, the SC and EC, or the EC and EOC groups. On the other hand, EC had lower insulinemia values compared to SOC. All the T2DM groups had similar insulinemia profiles. The animals in the SC group had insulinemia values comparable to that of the diabetic groups, except for the ED group. There was no difference between the EC and the EOD diabetic groups. However, significant differences were

observed ($p < 0.05$) among all diabetic groups compared to the SOC and EOC control groups. The insulinemia of group EC was different from that of the SD, SOD, and ED groups (Fig. 2C).

HOMA-IR

The HOMA-IR index was calculated to verify the presence of insulin resistance. When only the control groups were compared, the SOC group had a higher HOMA-IR index ($p < 0.05$) compared to the other control groups. There were no differences between the diabetic groups. In the analysis of the control and diabetic groups, no differences were noted among the diabetic groups, when compared to the SC and EC control groups. In addition, no differences were found among the SD and EOD groups, when compared to the SC, EC, and EOC groups. Moreover, the HOMA-IR index of the SOC control group was significantly higher ($p < 0.05$), compared to all the diabetic groups. The EOC group had a significantly higher HOMA-IR index ($p < 0.05$), compared to the SOD and ED diabetic groups (Fig. 2D).

GLUT4 expression

The results of the GLUT4 expression analysis in the plasma membrane (PM) and in the microsomal membrane (M) after RT are shown in Fig. 3A-B. The data show that GLUT4 expression levels were similar in all the control groups. Among the diabetic groups, there were no differences in GLUT4 expression between the ED and EOD groups. There was no difference between the SD and SOD groups in PM; however, there was a difference in GLUT4 expression in the M. On the other hand, the animals of the SD and SOD groups expressed lower levels of GLUT4 ($p < 0.05$) compared to the ED and EOD groups, both in PM and M. All control groups expressed higher amounts of GLUT4 in PM ($p < 0.05$) compared to the SD and SOD groups. There was no difference in GLUT4 levels in the ED and EOD diabetic groups, compared to the SC control group. However, the EOD group expressed less GLUT4 ($p < 0.05$) than the SOC, EC, and EOC groups. There were no differences in GLUT4 expression levels between the ED group and all the control groups. When comparing the results of GLUT4 expression in M in

control and diabetic groups, all the control groups expressed comparable amounts of GLUT4, compared to the exercised diabetic groups; however, the SD group expressed lower amounts of GLUT4 ($p < 0.05$) compared to SC, SOC, and EOC control groups. It was observed that the SOD group expressed less GLUT4 ($p < 0.05$) compared to all the control groups.

Bone mineral density

Before hindlimb unloading, the CN group had significantly higher values of BMC, BMD, and area of tibiae ($p < 0.05$) than the DM group (Fig. 4A-C). After hindlimb unloading, there was a decrease in BMC and BMD in the OC and OD groups, compared to that in the CN and DM groups, respectively. When the control and diabetic groups were compared, the CN and OC groups had higher BMC and BMD compared to the diabetic DM and OD groups, respectively. In this same phase, we evaluated the area of the tibia of the aforementioned groups. In this parameter, it was observed that only those animals with hindlimb suspension (OC and OD) had a lower bone area compared to the CN group and DM, respectively. There was no difference of bone total area between the CN and OC groups, when compared to the DM and OD groups, respectively. In addition, there were no differences between the OC groups, compared to the DM and OD groups (Fig. 5A-C).

Effect of RT

There were no differences in BMC after RT among the four control groups studied (SC, SOC, EC, and EOC). However, among the diabetic groups, the SD group had a lower BMC ($p < 0.05$) than only the ED group (Fig. 6A). At the same time, the SOD group exhibited a lower BMC value compared to the exercised diabetic groups. Moreover, the control groups had a higher BMC compared to the sedentary diabetic groups. The SOC group had a higher BMC only in relation to the SOD group. The results of the BMD analysis showed no differences between any of the control groups (Fig. 6C). However, in sedentary diabetic groups, the values of BMD were lower than those in the exercised diabetic groups. Our data also showed that there were no differences in the values in the areas of tibiae among the control groups (Fig. 6B). The only

difference in the diabetic groups was observed between the ED and SOD groups. Considering the control and diabetic groups, SC and EC showed higher values in the areas of tibia compared to the SOD group. The EOC group showed higher values in this area, compared to the sedentary diabetic groups (Fig. 6B).

Biomechanical parameters

The stiffness (Fig. 7A), maximum strength (Fig. 7B), and toughness (Fig. 7C) were analyzed in tibias of the rats as described in Materials and Methods. Similar values for stiffness, maximum strength, and toughness were observed in the control groups. In diabetic animals, the sedentary groups had lower values ($p < 0.05$) of stiffness and toughness, when compared to the ED, but not the OED group. There were no differences between the SD and SOD, as well as between ED and EOD groups in these parameters. The maximum strengths in the sedentary groups were lower ($p < 0.05$) than those in the ED and EOD groups. The comparison of the control and diabetic groups showed that all control groups had greater values of stiffness and maximum strength ($p < 0.05$) compared to sedentary diabetic groups (SD and SOD). And the maximum strength result of EOD group was lower compared to EOC group. There were no differences in stiffness and toughness among all control groups in relation to exercised diabetic groups (ED and EOD). It was also observed that the control groups (SC and SOC) had increased values of toughness only in relation to SOD. And this parameter was higher in exercised control groups (EC and EOC) in relation to the SD and SOD groups.

Discussion

This study showed that RT improved BMD, biophysical properties on bone, glucose levels, and GLUT4 expression values of osteopenic, as well as non-osteopenic, diabetic rats. The present data showed that sedentary control groups (SC and SOC) do not differ in their BMD values compared to the exercised (EC and EOC) groups. The sedentary diabetic groups had lower BMD values in relation to the control group. These results are in accordance with studies of

Hamann [32] that demonstrated that the insulin-resistant rat models exhibit low bone mass and delayed bone regeneration. On the other hand, the exercise program promoted an increase in BMD in diabetic rats compared to the non-exercised diabetic rats, and the BMD values of these exercised diabetic rats were similar to the values of all the control groups. Physical exercise has been used as an important tool in the recovery of bone mass [33]. RT induces changes in BMD and improvement in the muscle strength, and these alterations are strongly related to the risk of falling [34] and the present study confirms that this would apply to osteopenic diabetic patients as well.

The rats used in this study were treated with STZ during the neonatal period to induce diabetes. This diabetic model resembles the natural course of disease in humans, since it is almost asymptomatic at an early age, manifesting mainly in adulthood [35, 36]. The result of blood glucose analysis in the initial phase of the experiment, before the suspension and RT, showed that the animals belonging to the DM group had hyperglycemia, confirming the onset of this disease.

Even though the blood glucose levels in the control groups were similar, the insulinemia of the SOC group was higher than that of the SC and EC groups. These data demonstrate that the SOC group is more resistant to insulin, compared to these control groups, as well as in comparison to the EOC group. This hypothesis was confirmed by the results of the HOMA-IR analysis. The association between insulin resistance and hyperinsulinemia has been described extensively in published reports [37, 38]. Based on these results, we can deduce that, in relation to control groups, the induction of osteopenia can promote IR states, and that exercise can reverse it. Previous studies have shown that when there is an increase in BMD, serum osteocalcin concentration also increases [39], and osteocalcin protein levels are positively correlated to insulin sensitivity [40]. Although some studies indicate that exercise improves insulin sensitivity [41, 17], this conclusion is not supported by our data, especially in the comparison between the SC and EC groups and the sedentary and exercised diabetic groups. However, as described above, RT improves insulin sensitivity in control osteopenic rats.

Segerström et al. [42] verified an improvement in insulin sensitivity in diabetic individuals only after six months of training, using an exercise of high intensity. Therefore, it is possible that for osteopenic diabetic animals, we have to increase the intensity of exercise to promote the improvement of insulin sensitivity.

After RT, both groups of exercised diabetic rats had lower glycemia values in comparison to SD and SOD groups, and similar values as the sedentary control groups. No differences in this parameter were found between the ED and EOD groups, as well as between the SD and SOD groups. Furthermore, in the analysis of these exercised diabetic rats, only the ED group had similar glycemia values as the EOC group; however, this result was not seen in the EOD group, which showed higher values of glycemia compared to the EOC group. It seems that the ED group exhibits better glycemic control than the EOD. It is known that DM increases blood glucose because of insufficient secretion and insensitivity to the insulin receptor, and exercise is an important tool used for glycemic control in diabetic patients [43]. Moreover, physical exercise promotes several beneficial effects on the skeletal muscle, including improvements in glucose homeostasis [44], lipid metabolism [45], and insulin sensitivity [41]. As described above, the EOD group showed elevated blood glucose levels compared to the EC and EOC groups. However, the same response was not observed in the ED group, which showed higher glycemia compared to only the EC group. These data can be explained on the basis of the results in prior reports, which showed that when BMD is increased, there is a concomitant increase in serum osteocalcin [39], and that osteocalcin levels are correlated with the improvement of insulin sensitivity [40]. Our results demonstrated that the BMD was lower in the OD group than the DM group, soon after hindlimb suspension. Moreover, it is likely that osteocalcin plasma concentrations were still decreased after RT in EOD, altering the insulin sensitivity, a change that seems to have persisted even after the exercise period.

During muscle contraction, there is an increase in GLUT4 translocation, independent of the presence of insulin [15]. The results of the present study showed that the GLUT4 content in both PM and M were similar among all the control groups, among the exercised diabetic groups,

and among the sedentary diabetic groups. The exception was the GLUT4 levels in M, which was lower in the SOD group than in the SD group. In the comparison between control and diabetic groups, it was observed that the sedentary diabetic groups (SD and SOD) expressed lower amounts of GLUT4 (in PM) compared to other diabetic groups and all control animals. In M, similar responses were found, except that SD and EC expressed similar amounts of GLUT4. Although there are no differences in the GLUT4 content in PM between the ED and EOD groups, the ED group expressed amounts of GLUT4 (PM) that was similar to that in all the control groups, whereas the GLUT4 (PM) amount of EOD was similar only to that in the SC control group. These results may reflect changes in the bone density in EOD after the tail suspension, which consequently may have changed the level of osteocalcin, and this, in turn, may have altered the sensitivity to insulin [40], as described previously.

The exercised diabetic groups also showed higher expression of GLUT4 than the sedentary diabetic animals. A study by Mufioz et al. [16] showed that T2DM decreases GLUT4 protein content. Moreover, other studies showed that rats that were on a RT program exhibited an improvement in GLUT4 expression in the skeletal muscle during exercise [18], due to the activation of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) [15]. In experimental obesity models, insulin resistance was associated with reduced GLUT4 expression and/or impaired insulin signaling in skeletal muscle and adipose tissue [46]. GLUT4 facilitates insulin-mediated glucose uptake in cardiac muscle, and skeletal and adipose tissues [47, 48]. Transgenic mice that do not express or overexpress GLUT4 exhibit decreased or increased sensitivity to insulin, respectively [49-51], and this transporter is of fundamental importance for the maintenance of glucose homeostasis [50, 52].

Some studies have shown that the progression of type 2 diabetes can cause changes in bone mass. This occurs because hyperglycemia leads to an increase in the concentration of advanced glycation end products (AGEs) on collagen, which may lead to a reduction in bone strength [53]. Other mechanisms that may induce a loss of bone mass include hypercalciuria,

renal insufficiency [54], and low insulin levels, which occur during the progression of diabetes [55]. The lower concentration and deficient functioning of insulin may impair bone formation, leading to changes in both BMC and BMD [56]. Our data are in accordance with those of this study, because bone densitometry performed in 60-day-old rats that belonged to the diabetic group (DM) showed a decrease in BMC and BMD. These results are also in agreement with those reported by Arikan [57], who found a decline in the bone condition in diabetic patients. The authors verified that insulin resistance may have a negative effect on BMD in type 2 diabetics, while the presence of hyperinsulinemia may be associated with low BMD. Cornwall [58] observed that during hindlimb suspension, bone formation is impaired, which is also observed in people who stay in bed for long periods.

After 21 days of hindlimb suspension, bone mass was decreased in animals that belonged to the osteopenic groups (OC and OD) compared to their corresponding controls (CN and DM). These data showed that the technique and period of suspension were sufficient to cause BMC and BMD reductions in the tibia. Therefore, these data indicate that the model of suspension used in the present study was effective enough to cause significant weakness in the bones, thereby simulating the skeletal changes that may occur in a microgravity environment [27]. However, there was reversal of bone loss caused by the hindlimb suspension in the osteopenic control groups at the end of the experiment, compared to their corresponding sedentary control groups. This reversal effect may be due to the free activity of the rats in the box for 14 weeks after discontinuation of suspension, following which few histological characteristics of osteopenia remained in the SOC and SOD groups.

Although some studies [59, 60] suggest that mechanical stresses placed on bone during muscle contractions have the potential to improve bone health; as mentioned before, the results of this study showed no differences in the values of BMC, area, and BMD of the sedentary control groups compared to other exercised control groups. The results obtained in the present study may be due to the exercise intensity applied and the duration of the training. Similarly, the study of Bemben [61], performed in estrogen-deficient postmenopausal women who were on an

RT program, did not verify improvement in bone metabolism, either. Considering the analysis of the control and diabetic groups, the SD and SOD groups had BMD values lower than all the control groups, as well the exercised diabetic groups. Furthermore, these exercised diabetic groups showed no differences in comparison to all the control groups. These data demonstrate that exercise can improve BMD in diabetic rats. These findings are in accordance with the studies performed in humans [62, 63] and animals [64, 65] that show that exercise increases the density, mass, and strength of bones [66]. It is thought that mechanical stress generated by the exercise plays an important role in the osteogenic response; in other words, the mechanical tension provided by the exercise is an important stimulus for bone formation and plays an important role in minimizing bone loss [67]. Moreover, the deleterious effects of diabetes on bone, as observed above, were reversed by RT, which promoted an increase in the BMD of the exercised diabetic groups, compared to the sedentary diabetic groups.

Similar to the data for BMC, area, and BMD of the tibia, the control groups showed no differences in the stiffness, maximum strength, and toughness values in the bone. On the other hand, sedentary diabetic rats showed maximum strength impairment of the tibia compared to exercised diabetic groups, and smaller stiffness and toughness compared only to the ED, but not the EOD group. In comparison to control and diabetic groups, these three parameters decreased only in sedentary diabetic rats, but not in exercised diabetic rats compared to all the control groups. Considering stiffness and toughness (energy required to fracture the bone) values, our data support the conclusion that the bone structure is more fragile in sedentary diabetic animals when compared to the control animals and the exercised diabetic, but not the EOD groups. At the same time, it is known that the bone stiffness, maximum strength, and toughness are important properties that reflect the integrity of the bone.

From the above data, we conclude that exercise reversed bone fragility in the exercised diabetic group. Furthermore, the EOD group did not have the same response. This difference in the response may be due to the decrease in the osteocalcin plasma levels in the EOD group, which likely interferes with the improvements in BMD and the mechanical properties of bone.

The decrease in the stiffness in diabetic animals reflects the changes in the bone properties due to changes in insulin action [68], thereby interfering with mineralization, BMC, BMD, and maximum strength of bone [69, 70]. Bone health is important for avoiding fractures [71]. RT, when practiced regularly, can increase muscle strength, which eventually protects against falls [72], contributing to glucose homeostasis and an increase in the GLUT4 content. The lack of load in diabetic patients may promote deleterious changes in bone metabolism. Therefore, particular attention needs to be paid to diabetic patients who have undergone no-load situations, as in the case of bedridden individuals, to ensure that exercise programs such as RT are applied to improve bone health. Moreover, exercise can be an important therapy that can restore many changes resulting from osteopenia and diabetes.

Conclusion

In conclusion, we can emphasize the importance of RT therapy in individuals with type 2 diabetes. Our data show that RT improves the quality of the bone tissue and glycemic control, as well as increases the GLUT4 content. Furthermore, we recommend that osteopenic diabetic patients receive particular attention, given that the period and intensity of the RT program applied in this study did not provide the same responses between osteopenic and not non-osteopenic diabetic animals.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the Foundation for Research Support of São Paulo State – FAPESP, Pro-rector for research, and graduate of UNESP - Univ Estadual Paulista.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- [1] Nolan CJ, Damm P, Prentki M (2011) Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378: 169-181
- [2] American Diabetes Association (2012) Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. *-Diabetes Care* 35: 64-71
- [3] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ (2010) Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87: 4-14
- [4] Retzepi M, Donos N (2010) The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res* 21: 673-681
- [5] Burger EH, Klein-Nulend J (1998) Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Bone* 22: 127S-130S
- [6] Van Loon JJ, Bervoets DJ, Burger EH, Dieudonné SC, Hagen JW, Semeins CM, Doulabi BZ, Veldhuijzen JP (1995) Decreased mineralization and increased calcium release in isolated fetal mouse long bones under near weightlessness. *J Bone Miner Res* 10: 550-557
- [7] Thomas DM, Hards DK, Rogers SD, Ng KW, Best JD (1997) Insulin and bone, clinical and scientific view. *Endocrinol Metab North Am* 4: 5–17
- [8] Yasuda S, Wada S. (2001) Bone metabolic markers and osteoporosis associated with diabetes mellitus. *Clin Calcium* 11: 879-883
- [9] Saito M, Marumo K (2010) Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 21: 195-214
- [10] Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM (2001) Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone* 28: 21-28
- [11] Zayzafoon M, Stell C, Irwin R, McCabe LR (2000) Extracellular glucose influences osteoblast differentiation and c-Jun expression. *J Cell Biochem* 79: 301-310

- [12] Bouillon R, Bex M, Van Herck E, Laureys J, Doms L, Lesaffre E, Ravussin E (1995) Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1194–1202
- [13] Lester ME, Urso ML, Evans RK, Pierce JR, Spiering BA, Maresh CM, Hatfield DL, Kraemer WJ, Nindl BC (2009) Influence of exercise mode and osteogenic index on bone biomarker responses during short-term physical training. *Bone* 45: 768–776
- [14] Deng SL (2012) Muscle strength training helps to reduce bone loss in early postmenopausal women. *Sci sports*. doi: 10.1016/j.scispo.2012.05.003
- [15] Schimmack G, Ralph A, DeFronzo, Musi- N- (2006) AMP –Activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metad.* 6:591-602
- [16] Thompson D, Karpe F, Lafontan M, Frayn K (2012) Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol Rev* 92: 157-191
- [17] Lee S, Park Y, Zhang C (2011) Exercise training prevents coronary endothelial dysfunction- in type 2 diabetic mice. *Am J Biomed Sci* 3:241-252
- [18] Friedman JE, Sherman WM, Reed MJ, Elton CW, Dohm GL (1990) Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS Lett.* 268:13-16
- [19] Pedersen O, Bak JF, Andersen PH, Lund S, Moller DE, Flier JS, Kahn B (1990) Evidence against altered expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity and IDDM. *Diabetes* 7: 865–870
- [20] Garvey WT, Maianu L, Hueckstead TP, Birnbaum MJ, Molina JM, Cairaldi T (1991) Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest* 87: 1072–1081
- [21] Machado UF, Shimizu Y, Saito M (1993) Decreased glucose transporter (Glut4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. *Horm Metab Res* 25: 462–465

- [22] Gibbs EM, Stock JL, McCoid SC, Stukenbrok HA, Pessin JE, Stevensons RW, Milici AJ, McNeish JD (1995) Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4). *J Clin Invest* 95: 1512–1518
- [23] Tozzo E, Gnudi L, Kahn BB (1997) Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter. *Endocrinology* 138: 1604–1611
- [24] Takada J, Machado MA, Peres SB, Brito LC, Borges-Silva CN, Costa CE, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Lima FB (2006) Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* 56: 977–984
- [25] Hornberger TAJr, Farrar RP (2004) Hysiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 29: 16-31
- [26] Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical-measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14: 595-608
- [27] Silva AV, Volpon JB (2004) Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. *Acta Ortop Bras* 12: 22- 31
- [28] Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, Gomes WDS, Moimaz SAS, Garbin CAS, Silva CA (2010) Insulin signal decrease in muscle but not in the liver of castrated male rats from chronic exposure to fluoride. *Fluoride* 43: 25–30
- [29] De Carvalho Papa P, Vargas AM, da Silva JLT, Nunes MT, Machado UF (2002) GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. *Life Sci* 71: 1917–1928
- [30] Lowry OH, Rosembrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- [31] Zanquetta MM, Nascimento ME, Mori RC, D’Agord SB, Young- ME, Machado UF (2006) Participation of beta-adrenergic activity in modulation of GLUT4 expression during fasting and -refeeding in rats. *Metabolism* 55:1538-1545

- [32] Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J, Henkenjohann V, Rauner M, Hempel U, Bernhardt R, Fratzl-Zelman N, Roschger P, Rammelt S, Günther KP, Hofbauer LC (2011) Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: 220-228
- [33] Winters-Stone KM, Dobek J, Nail LM, Bennett JA, Leo MC, Torgirson-Ojerio B, Luoh S-W, Schwartz A (2013) Impact + resistance training improves bone health and body composition in prematurely menopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *Osteoporos Int* 24: 1637–1646
- [34] Marques EA, Wanderley F, Machado L, Sousa F, Viana JL, Moreira-Gonçalves D, Moreira P, Mota J, Carvalho J (2011) Effects of resistance and aerobic exercise on physical function, bone mineral density, OPG and RANKL in older women. *Exp Gerontol* 46: 524-532
- [35] Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, Bailbe D (1989) The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes Metab* 15: 61-75.
- [36] Kodama T, Iwase M, Nunoi K, Maki Y, Yoshinari M, Fujishima M (1993) A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 20: 183-189.
- [37] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley R, Tataranni AP (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *JCEM* 86: 1930-1935
- [38] Hotamisligil GS, Spiegelman BM (1994) Tumor-necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271–1278
- [39] Jagtap VR, Ganu JV, Nagani NS (2011) BMD and serum intact osteocalcin in postmenopausal osteoporosis women. *Ind J Clin Biochem* 26: 70-73
- [40] Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T (2011) Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. *Bone* 48: 720-725

- [41] Goodyear LJ, Kahn BB (1998) Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 1998;49: 235–261
- [42] Segerström AB, Glans F, Eriksson KF, Holmbäck AM, Groop L, Thorsson O, Wollmer P (2010) Impact of exercise intensity and duration on insulin sensitivity in women with T2D. *Eur J Intern Med* 1:404-8
- [43] Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells G, Sigal RJ (2001) Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials *JAMA* 286:1218-27
- [44] Jessen N, Goodyear LJ (2005) Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99:330-7
- [45] Bonen A, Dohm GL, van Loon LJ (2006) Lipid metabolism, exercise and insulin action. *Essays Biochem* 42:47-59
- [46] Seraphim PM, Nunes MT, Machado UF (2001) GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34:1353-1362
- [47] Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM (2006) Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50:177-189
- [48] Lehnen AM, Leguisamo NM, Pinto GH, Markoski MM, Angelis K, Machado UF, Schaan B (2010) The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. *Cardiovasc Diabetol*. 9:1
- [49] Katz EB, Burcelin R, Tsao TS, Stenbit AE, Charron MJ (1996) The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. *J Mol Med* 74:639-652
- [50] Carvalho E, Kotani K, Peroni OD, Kahn BB (2005) Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:551-561

- [51] Berglund ED, Li CY, Ayala JE, McGuinness OP, Wasserman DH (2012) Regulation of endogenous glucose production in glucose transporter 4 over-expressing mice. *PLoS One* 7:e52355
- [52] Leguisamo NM, Lehnen AM, Machado UF, Okamoto MM, Markoski MM, Pinto GH, Schaan BD (2012) GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* 11:100
- [53] Paul RG, Bailey AJ (1996) Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 28:1297-1310
- [54] Yendt ER, Cohanin M, Jarzylo S, Jones G, Rosenberg G (1993) Reduced creatinine clearance in primary osteoporosis in women. *J Bone Miner Res* 8:1045-1052
- [55] Stolk RP, van Daele PL, Pols HA, Burger H, Hofman A, Birkenhager JC, Lamberts SW, Grobbee DE (1996) Hyperinsulinemia and bone mineral density in an elderly population: The Rotterdam Study. *Bone* 18:545-549
- [56] Miazgowski T, Pynka S, Noworyta-Zietara MM, Krzyzanowska-Swiniarska B, Pikul R (2007) Bone mineral density and hip structural analysis in type 1 diabetic men. *Eur J Endocrinol* 156: 123–127
- [57] Arikan S, Tuzcu A, Bahceci M, Ozmen S, Gokalp D (2012) Insulin resistance in type 2 diabetes mellitus may be related to bone mineral density. *J Clin Densitom* 15:186-190
- [58] Cornwal MW (1984) Biomechanics of noncontractile tissue. A review. *Phys Ter* 63: 1869-1873
- [59] Frost HM (1997) On our age-related bone loss: insights from a new paradigm. *J Bone Miner Res* 12: 1539–1546
- [60] Burr DB (1997) Commentary: Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *J Bone Miner* 12: 1547–1551–
- [61] Bemben DA, Palmer IJ, Bemben MG, Allen W, Knehans AW (2010) Effects of combined whole-body vibration and resistance training on muscular strength and bone metabolism in postmenopausal women. *Bone* 47: 650-656

- [62] Chien MY, Wu YT, Hsu AT, Yang RS, Lai JS (2000) Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 67: 443-448
- [63] Bergstrom I, Landgren B, Brinck J, Freyschuss B (2008) Physical training preserves bone mineral density in postmenopausal women with forearm fractures and low bone mineral density. *Osteoporos Int* 19: 177-183
- [64] Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y (2003) High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *J Appl Physiol* 95: 1032-1037
- [65] Hiang TH, Chang FL, Lin SC, Liu SH, Hsieh SS, Yang R (2008) Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. *J Bone Miner Metab* 26: 350-357
- [66] Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC (2001) Swimtrained rats have greater bone mass, density, strength and dynamics. *J Appl Physiol* 91: 1663-1668
- [67] Barengolts EI, Curry DJ, Bapna MS, Kukreja SC (1993) Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 8: 937-942
- [68] Umpierrez GE, Zlatev T, Spanheimer RG (1989) Correction of altered collagen metabolism in diabetic animals with insulin therapy. *Matrix* 9: 336-342
- [69] Liu EY, Wactawski-Wende J, Donahue RP, Dmochowski J, Hovey KM, Quattrin T (2003) Does low bone mineral density start in postteenage years in women with type 1 diabetes? *Diabetes Care* 26: 2365–2369
- [70] Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka CS (2001) The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 54: 1-8
- [71] Lirani-Galvão AP, Castro ML (2010) Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metab* 54: 171- 178

- [72] Jovine MS, Buchalla CM Santarém EMM, Santarém JM, Aldrighi JM (2006) Effects of resistance training on postmenopausal osteoporosis: study update. *Rev Bras Epidemiol* 9: 493-505

Figure Legends

Fig. 1. Histological analysis of the tibia. The tibias of the following groups were evaluated by histological examination: (a) sedentary control (SC), (b) sedentary osteopenic control (SOC), (c) exercised control (EC), (d) exercised osteopenic control (EOC), (e) sedentary diabetic (SD), (f) sedentary osteopenic diabetic (SOD), (g) exercised diabetic (ED), and (h) exercised osteopenic diabetic (EOD).

Fig. 2. Evaluation of glycemia and insulin. (a) Initial (in 60-day-old rats) glycemia (mg/dL) of control (CN) and diabetic (DM) groups are shown. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM, $n = 32$. (b) The plasma glycemia (mg/dL), (c) insulin (mg/dL), and (d) HOMA-IR after RT of the following groups: sedentary control (SC), sedentary osteopenic control (SOC), exercised control (EC), exercised osteopenic control (EOC), sedentary diabetic (SD), sedentary osteopenic diabetic (SOD), exercised diabetic (ED), and exercised osteopenic diabetic (EOD). The results are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 8$. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant; values not sharing a common character are significantly different.

Fig. 3. GLUT4 content in (a) plasma membrane (PM) and (b) microsome (M) after RT of the following groups: sedentary control (SC), sedentary osteopenic control (SOC), exercised control (EC), exercised osteopenic control (EOC), sedentary diabetic (SD), sedentary osteopenic diabetic (SOD), exercised diabetic (ED), and exercised osteopenic diabetic (EOD). The results are presented as mean $\pm$ SEM, $n = 8$. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant; values not sharing a common character are significantly different.

Fig. 4. Bone mineral density analyzed by dual X-ray absorptiometry emissions (DXA) before the period of tail suspension in the control (CN) and diabetic (DM) groups. (a) Bone mineral content (g), (b) total area (cm^2), and (c) bone mineral density (g/cm^2) are shown. The results were presented as the mean $\pm$ SEM, $n = 32$, $^a p < 0.05$, DM vs. CN.

Fig. 5. Bone mineral density analyzed by DXA after the period of tail suspension in the following groups: control group (CN), osteopenic control (OC), diabetic (DM), and osteopenic diabetic (OD). Bone mineral content (g) (A), total area (cm^2) (B), and bone mineral density (g/cm^2) (C) are shown. The results are

presented as the mean $\pm$ SEM, $n = 16$. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant; values not sharing a common character are significantly different.

Fig. 6. Bone mineral density analyzed by DXA after RT in the following groups: sedentary control (SC), sedentary osteopenic control (SOC), exercised control (EC), exercised osteopenic control (EOC), sedentary diabetic (SD), sedentary osteopenic diabetic (SOD), exercised diabetic (ED), and exercised osteopenic diabetic (EOD). (a) Bone mineral content (g), (b) total area (cm^2), and (c) bone mineral density (g/cm^2) are shown. The results are presented as the mean $\pm$ SEM, $n = 8$. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant; values not sharing a common character are significantly different.

Fig. 7. Biomechanical properties of the rat tibia evaluated by flexion test 3 points after RT in the following groups: sedentary control (SC), sedentary osteopenic control (SOC), exercised control (EC), exercised osteopenic control (EOC), sedentary diabetic (SD), sedentary osteopenic diabetic (SOD), exercised diabetic (ED), and exercised osteopenic diabetic (EOD). (a) Extrinsic stiffness ($\times 10^3 \text{ N/m}$), (b) Fmax (N) - maximum strength, and (c) energy to fracture (mJ) are shown. The results are presented as the mean $\pm$ SEM, $n = 8$. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant; values not sharing a common character are significantly different.

Fig. 1

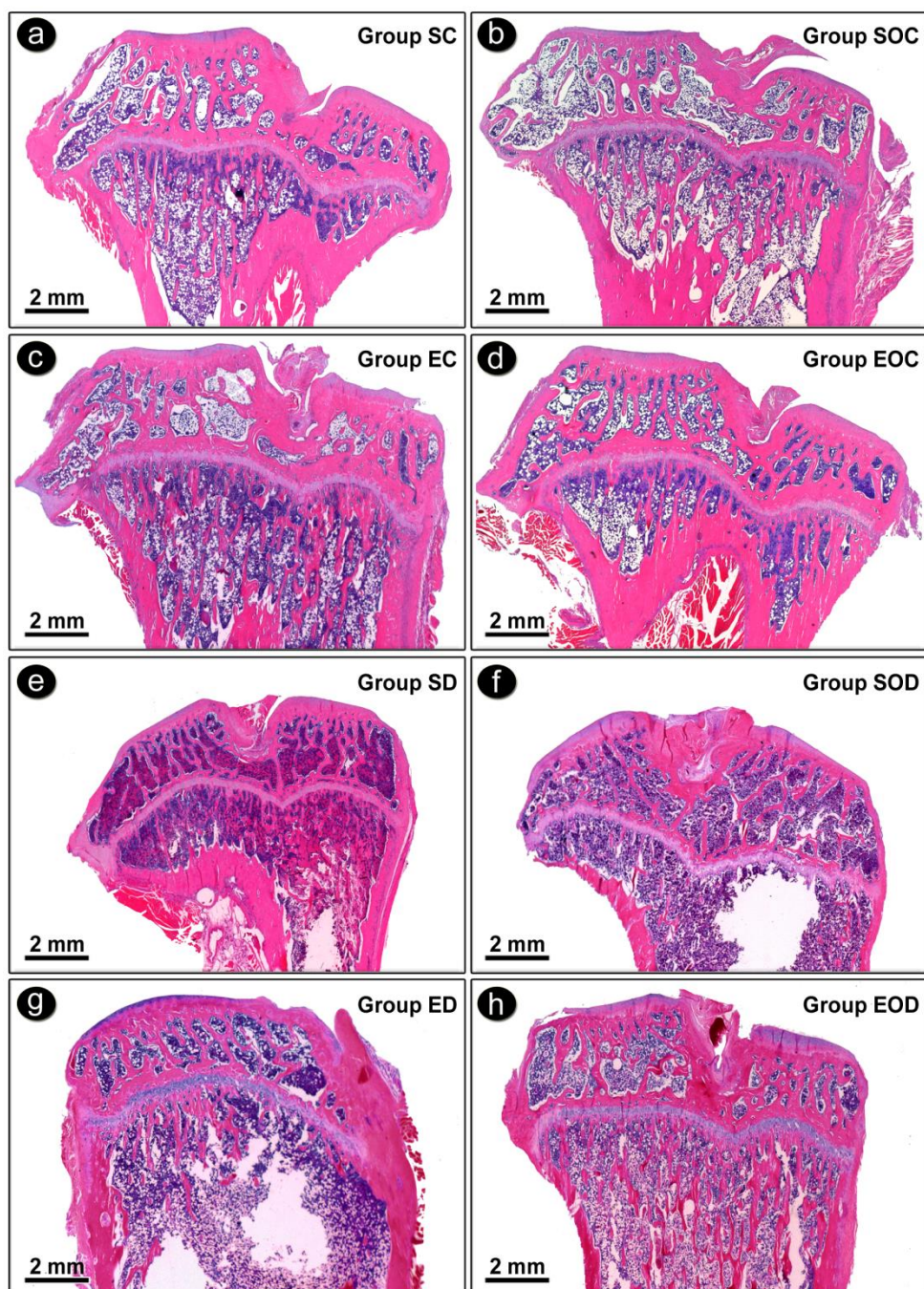


Fig.2

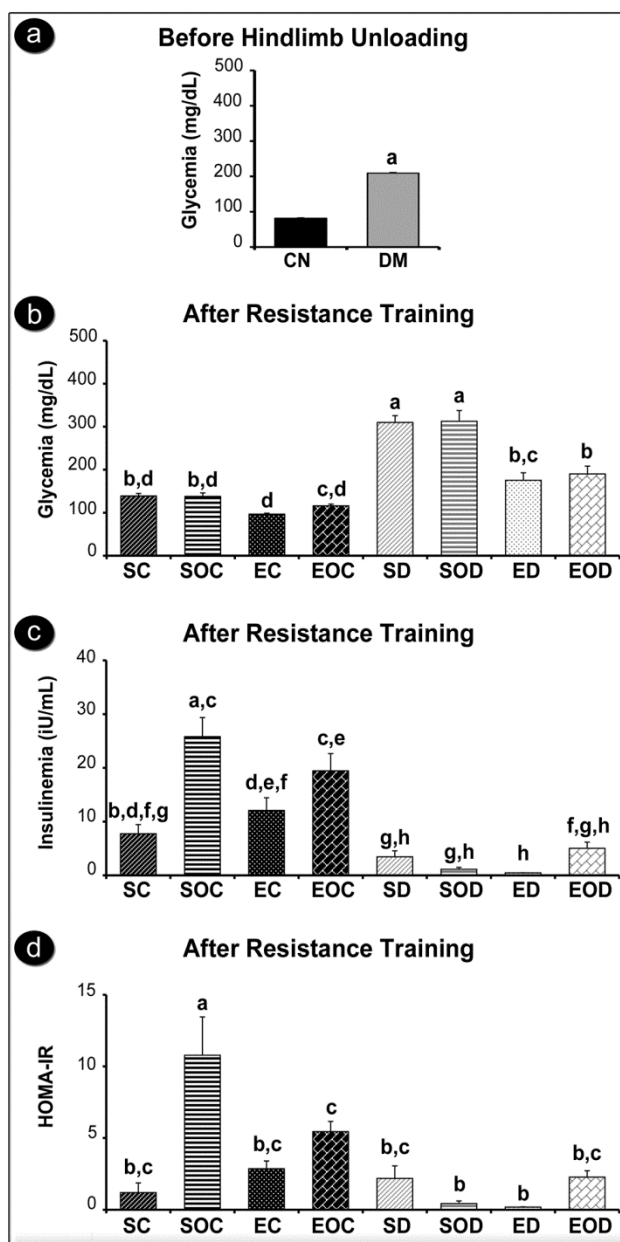


Fig. 3

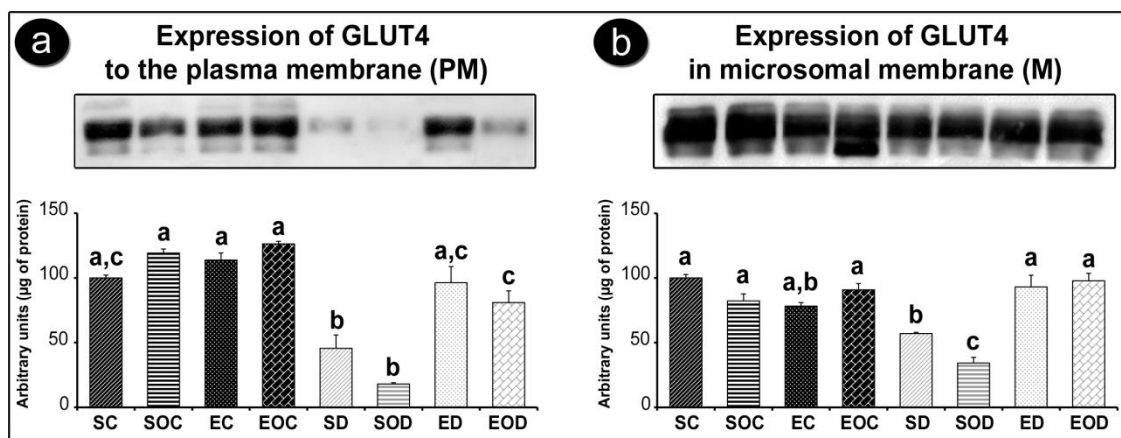


Fig. 4

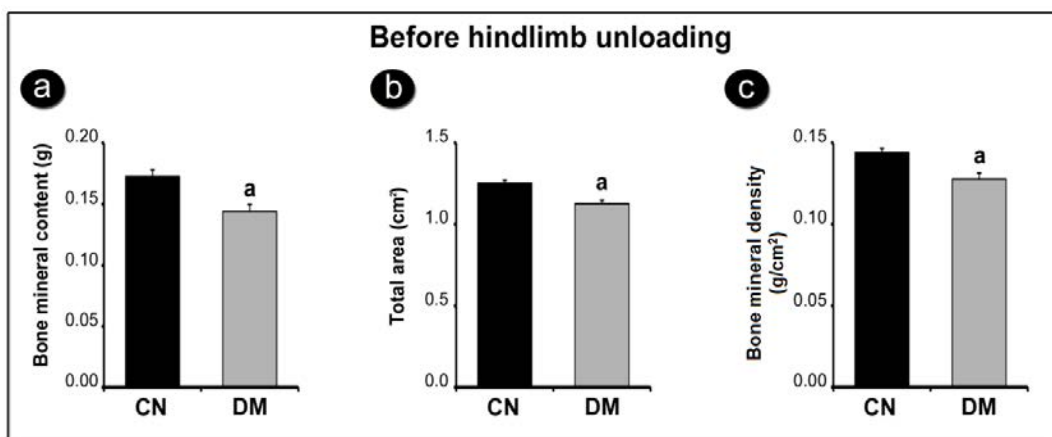


Fig. 5

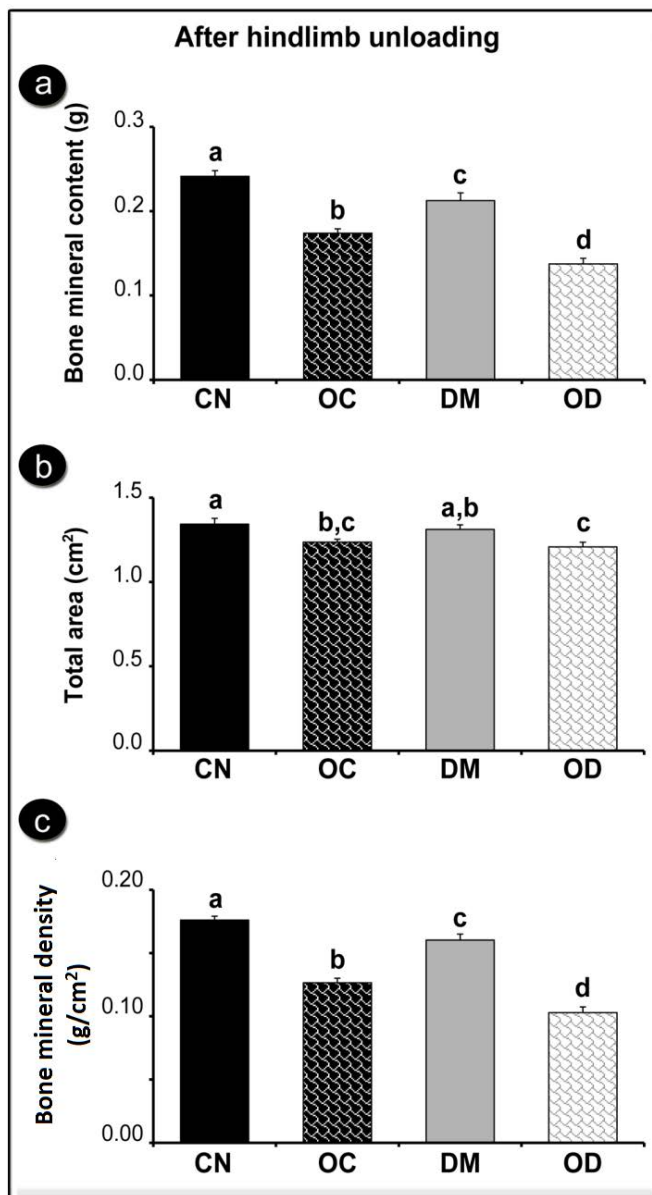


Fig. 6

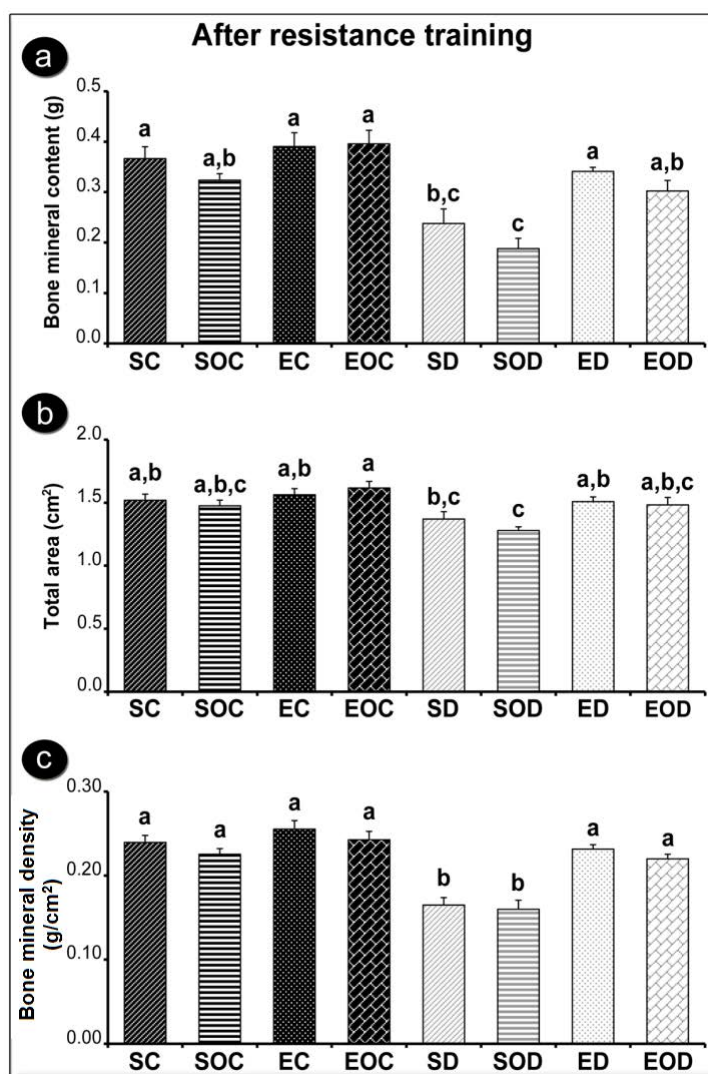


Fig. 7

