



## ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO TECIDO ÓSSEO EM ANIMAIS TREINADOS EM ESTEIRA MOTORIZADA

*Morphological changes in bone tissue in animals trained on motorized mat*

Andreson Charles de Freitas Silva<sup>1</sup>

Priscilla de Oliveira Mendonça Freitas<sup>2</sup>

### RESUMO

De acordo com a *World Health Organization*, o *Diabetes Mellitus* é uma síndrome de etiologia múltipla, ocasionada pela falta de insulina ou por uma incapacidade da insulina de exercer de forma eficaz sua função. O exercício físico é definido como toda atividade física planejada e repetitiva que tem por objetivo a melhoria das funções do organismo. A prática de pelo menos 150 minutos semanais de atividade com intensidade moderada é recomendada para pacientes com diabetes *mellitus*. O objetivo deste estudo foi investigar a influência do exercício físico no tecido ósseo de ratos diabéticos submetidos ao treinamento em esteira motorizada. Foram utilizados 12 animais, divididos em dois grupos: Diabético Sedentário (DS), que não praticava nenhum exercício e, Diabético treinado (DT) submetidos ao exercício físico em esteira durante 10 semanas duas vezes por dia, com 6h de repouso entre uma sessão e outra, cinco dias por semana. O diabetes foi induzido através de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60mg/Kg, S.C; Sigma ChemicalCo.) dissolvida em tampão de citrato, pH 4.5. Realizamos, neste estudo, a mensuração das tíbias de ratos diabéticos para verificar a possível participação do exercício físico no desenvolvimento ósseo desses animais. Como resultado, verificou-se que o exercício foi capaz de promover de forma significativa o aumento nos diâmetros da diáfise e epífise distal, bem como aumento no comprimento e peso das tíbias do grupo (DT) vs (DS) com  $p < 0,05$ .

**Palavras-chave:** Exercício Físico. Diabetes. Tecido ósseo.

### ABSTRACT

According to the World Health Organization, Diabetes mellitus is a syndrome of multiple etiology, caused by lack of insulin or an inability of insulin to exert its function effectively. Exercise is defined as any physical activity planned and repetitive that aims at to improve the functions of the organism. The practice of at least 150 minutes per week activity with moderate intensity is recommended for patients with diabetes mellitus. The objective of this study was to investigate the influence of exercise on bone tissue of diabetic rats submitted to training motorized mat. Were used 12 animals divided into two groups: Sedentary Diabetic (DS) who did not practice any exercise and trained diabetic (DT) submitted to physical exercise on a treadmill for 10 weeks twice a day, with 6 hours of rest between one session and another five days a week. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60mg / kg, SC; ChemicalCo Sigma) dissolved in citrate buffer, pH 4.5. We performed this study to measure the tibia of diabetic rats to verify the possible role of exercise in bone development of these animals. As a result, it was found that the exercise is able to enhance significantly the increase in diameter of the diaphysis and distal epiphysis as well as increase in length and weight of the tibia group (DT) vs (DS) with  $p < 0.05$ .

**Keywords:** Physical Exercise. Diabetes. Bone tissue.

<sup>1</sup> Doutorando em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ce, Brasil.

E-mail: andresonde@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4050-0531>

<sup>2</sup> Coordenadora do curso de Radiologia da Faculdade Pitágoras, Fortaleza, Ceará, Brasil.

E-mail: priscilinha.ce@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0724-5508>





## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, que pode ocorrer pela ausência de insulina ou por insensibilidade dos órgãos alvos desse hormônio, o que também é chamado de perda da sensibilidade à insulina (WHO, 1999). Acredita-se que aproximadamente 240 milhões de pessoas sejam portadores do DM no mundo, mesmo que não tenha conhecimento da doença, e estima-se que esse número possa chegar a 380 milhões até o ano de 2025 (BRITO, 2007).

Os dois tipos mais encontrados dessa patologia são o Diabetes *Mellitus* do tipo I (DM1) e o Diabetes *Mellitus* do tipo II (DM2), segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2014). Diversas alterações cardiovasculares são relatadas em indivíduos portadores do DM1, como diminuição da flexibilidade das artérias, disfunção do ventrículo esquerdo e lesão endotelial (BOUDINA; ABEL, 2007; LARSEN *et al.*, 2005; WITTE *et al.*, 2005). Há também relatos de diversas complicações a nível microvascular, que podem gerar complicações como neuropatias, retinopatias e nefropatias diabéticas (LIBBY *et al.*, 2005), além de estarem ligadas de forma íntima a várias desordens relacionadas aos ossos, como quadros de osteoporose (GALI, 2001; LERARIO, 2004).

O diabetes apresenta uma alta taxa de mortalidade mundial, o que o torna um problema de saúde pública que requer uma atenção especial afim de promover a diminuição desse quadro de mortalidade, bem como melhorar a qualidade de vida dos portadores da patologia, na qual a nutrição e a adesão à prática de atividades físicas emergem como uma ferramenta não farmacológica à promoção de saúde desse público (WILD *et al.*, 2004; KOKUBUM *et al.*, 2007). A prática de atividade física está intimamente relacionada com a melhoria da qualidade de vida das pessoas. Diversos estudos demonstram essa relação independente de gênero e idade, sendo que esses praticantes apresentam melhorias de forma significativa em diversos aspectos em suas vidas, quando comparados a indivíduos sedentários (MACEDO *et al.*, 2012).

O osso é uma estrutura ativa, que está diuturnamente se modificando e possui funções diversas como a proteção de órgãos, apoio de músculos, hematopoese e armazenam diversos minerais, sendo o principal desses o cálcio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As células que participam do metabolismo ósseo são denominadas de osteoblastos e osteoclastos, das quais a segunda é uma célula multinucleada, responsável pela reabsorção óssea e que são geradas a partir da fusão de outras células mononucleadas hematopoéticas que já foram diferenciadas (DATTA *et al.*, 2008).

O exercício físico já é bastante conhecido por promover melhoras à massa óssea, combatendo situações como a osteopenia decorrente da idade avançada dos indivíduos e também por conta da diminuição hormonal que acompanha a idade. Estudos anteriores já mostraram que o exercício físico promove ganho ósseo entre 7 a 8% em indivíduos adultos, e também minimiza de forma significativa os riscos de lesões ósseas em idade mais avançada (DERMAN *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2008).



Segundo Kokubum *et al.* (2007), a realização periódica de atividade física também está associada à melhora nos níveis de aptidão física, desempenho funcional, no metabolismo de lipídeos e glicose, além de promover uma melhor qualidade de vida aos seus praticantes.

Em um trabalho de Mo *et al.* (2002), foi relatado uma relação diretamente proporcional positiva entre exercício físico e melhora de densidade óssea, o que tornou o mesmo um meio amplamente utilizado no combate à redução do tecido ósseo ou mesmo sua manutenção, mantendo sua integridade esquelética.

Pessoas portadoras de patologias como hipertensão arterial e diabetes são beneficiadas com a prática do exercício físico tanto a curto quanto a longo prazo, o que pode promover, no caso do diabetes, um aumento da sensibilidade à insulina, promovendo uma melhor captação de glicose pelas células (ARSA *et al.*, 2009). O treino resistido já é relatado na literatura como um agente provedor de osteogênese, independente de quem o pratica, sendo beneficiados ambos os sexos e diferentes faixas etárias (RYAN *et al.*, 2004).

O exercício promove, de forma indireta, efeito sobre o esqueleto através de estímulo na liberação de citocinas e fatores de crescimento pelas células ósseas, proporcionando, assim, uma maior atividade das células (HENDERSON; WHITE; EISMAN, 1998). Existem alguns eixos descritos na literatura nos quais o exercício atua estimulando respostas fisiológicas que modulam a atividade das células ósseas, os eixos hipotálamo-hipófise-gonadal e hipotálamo-hipófise-adrenal (WARREN; PERLROTH, 2001).

Dessa forma, o estudo se justifica, pois é de fundamental relevância uma pesquisa que vise verificar as possíveis interações entre o DM e exercício físico, a fim de contribuir para um melhor entendimento dessa patologia e se o exercício pode de alguma maneira influenciar positivamente nesse quadro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Delineamento Experimental

#### 2.1.1 Material

O projeto passou pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e foi aprovado sob o nº 11223232-9/49. Foram utilizados animais machos da linhagem Wistar com 60 dias de vida ( $n=12$ ) e pesando em média  $220 \pm 10$ g. Os espécimes foram adquiridos no biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISBC) da UECE. Os mesmos ficaram em ciclo de 12h claro/escuro e a temperatura local era mantida estável, em média de 23 °C, com ração e água *ad libitum*.

Primeiramente, esses animais eram apresentados ao ambiente de treino na esteira rolante (FERRAZ, 2007), por um período de duas semanas antes do treinamento propriamente dito, no qual os mesmos realizavam uma caminhada na esteira durante um período de dez minutos e a velocidade utilizada foi de 0,4 km/h. Essa adaptação ocorreu durante cinco dias/uma semana.



O intuito da realização dessa etapa do experimento foi a de adaptar ao máximo os animais ao ambiente de treino e diminuir o possível estresse que poderia ocorrer durante o exercício. Essa metodologia ainda serviu para possíveis exclusões de animais não adaptados ao ambiente.

### 2.1.2 Grupos Experimentais

Os doze animais foram separados em dois grupos (n=6) como descrito a seguir:

- ✓ Diabético Sedentário (n=6) DS.
- ✓ Diabético Treinado (n=6) DT.

### 2.1.3 Indução ao diabetes

Os animais foram induzidos por meio de uma aplicação única de estreptozotocina (60mg/Kg, S.C; Sigma ChemicalCo), que foi dissolvida em um tampão de citrato, pH 4.5. Os animais ficaram durante 12 horas antes da injeção em jejum noturno. Três dias após ser realizada a aplicação da substância indutora do diabetes, verificou-se a confirmação da mesma por meio de aferição da glicose utilizando um aparelho digital (glicosímetro ACCUCHECK Active, Ireland). Foram considerados animais diabéticos aqueles que apresentaram um valor equivalente de 300 mg/dL de glicose, sendo estes utilizados para realização do estudo.

Após uma semana da indução dos referidos animais ao diabetes, estes iniciaram o treinamento na esteira rolante (adaptado de Heidarianpour, 2010). O treinamento consistia em realizar as caminhadas duas vezes diárias, tendo um repouso de seis horas entre cada treinamento, que durou dez semanas, sendo a frequência semanal de cinco vezes.

### 2.1.4 Monitoramento e sacrifício

A monitorização dos animais ocorreu semanalmente, tendo esses avaliados o peso e a glicemia. Para a realização das avaliações de peso dos animais, foi utilizada uma balança que apresentava uma precisão em miligramas (KERN 882), e para a dosagem glicêmica foi utilizado um glicosímetro. Quando passadas 36 horas do final do treinamento, os animais foram anestesiados com Xilasina (8mg/Kg) e Ketamina (60mg/Kg) e depois eutanasiados através de decapitação, respeitando a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV/ CRMVs - Nº 714, 20/06/2002.

Os ossos da fíbula e da tíbia de ambas as patas foram retiradas e acondicionadas a fim de realizar as análises posteriores de comprimento ósseo e diâmetro proximal, médio e distal. Após a retirada dos tecidos necessários, os animais foram acondicionados em local específico, congelados e depois coletados por empresa específica responsável pelo descarte da Universidade.



### 2.1.5 Mensuração óssea

As medidas de comprimento e diâmetro ósseo (epífise proximal, epífise distal e também diáfise) foram realizadas por um único pesquisador utilizando um paquímetro digital da marca Starrett (série 799); e para o peso das tíbias dos animais, foi utilizado uma balança Bel Mark M 214A.

### 2.1.6 Laboratório

Os experimentos envolvendo os animais e análises foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica (LABIEX), nas dependências do ISCB ([www.uece.br/cmacf](http://www.uece.br/cmacf)), pertencentes à UECE.

### 2.1.7 Análise estatística

Para a análise dos resultados foram utilizadas as médias dos experimentos e os seus respectivos erros padrões. Foi considerado como significativamente diferente os resultados que apresentaram o valor menor que 5% ( $p < 0,05\%$ ). Para a confecção dos gráficos do estudo foi utilizado o programa Graphpad Prisma 5.0. O teste T não pareado foi utilizado para a comparação entre os dois grupos, treinado e não treinado, respeitando as hipóteses de normalidade na distribuição das amostras.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Dados Antropométricos

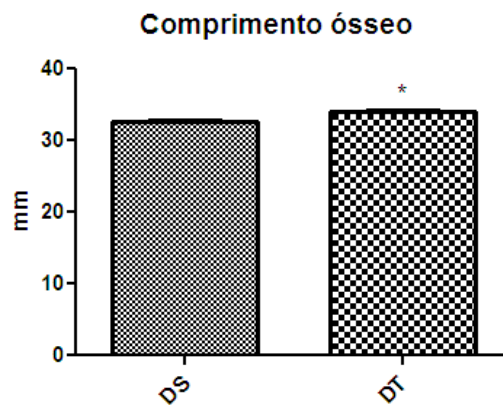
O aumento na incidência de DM nas últimas décadas tem chamado a atenção médica para a necessidade de readaptações nos hábitos de vida da população, com o objetivo de reduzir os fatores de risco para DM, como alimentação inadequada, obesidade e inatividade física e, conseqüentemente, reduzir a ocorrência de complicações relacionada a essa doença. O DM se apresenta como um grande problema de saúde pública a nível mundial. De acordo com Ministério da Saúde, no Brasil, até o ano de 2030 haverá uma população diabética em torno de 12 milhões.

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA), o DM pode ser subdividido em quatro classes, sendo elas: Diabetes tipo 1 (DM1), Diabetes tipo 2 (DM2), Diabetes Gestacional (DG) e outros tipos específicos (ADA, 2013). Os dois tipos mais estudados de DM são o 1 e o 2, sendo o primeiro responsável por 5 a 10% dos casos e o segundo, pela maior quantidade, entre 90 a 95%. No primeiro caso, o que ocorre é a destruição das células produtoras de insulina, impedindo sua produção; já no segundo é caracterizado um defeito nessa produção dos receptores das células alvo. Diante disso, indivíduos com valores de glicemia de jejum  $> 126$  mg/dL são considerados diabéticos (SBD, 2014).



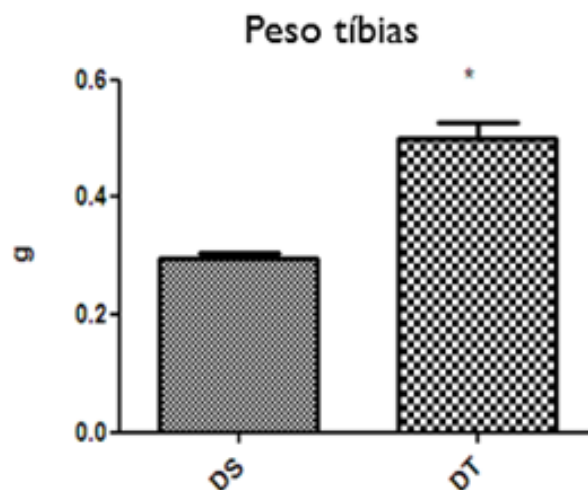
O comprimento das tíbias dos animais diabéticos treinados em esteira teve um aumento de 4,29 % quando comparado aos não treinados (Figura 1), mostrando diferença estatística entre os dois grupos (DT) x (DS).

Figura 1 - Comprimento das tíbias com  $p < 0,05$ .



No peso, foi encontrado um aumento de 72,4% no grupo DT vs DS, o que nos leva a postular que o treinamento físico possui uma influência positiva para a promoção do aumento da massa óssea desses animais (Figura 2).

Figura 2 - Gráfico expressando diferença estatisticamente significativa entre grupos com  $p < 0,05$ .



Os resultados também mostraram uma diferença estatisticamente significativa nos diâmetros da epífise distal 4,22 % (Figura 3) e diáfise 20,43 % (Figura 4) dos segmentos analisados com  $p < 0,05$ .



Figura 3 - Valores de diâmetro com treinamento (DT) e na ausência de treinamento (DS)  $p < 0,05$

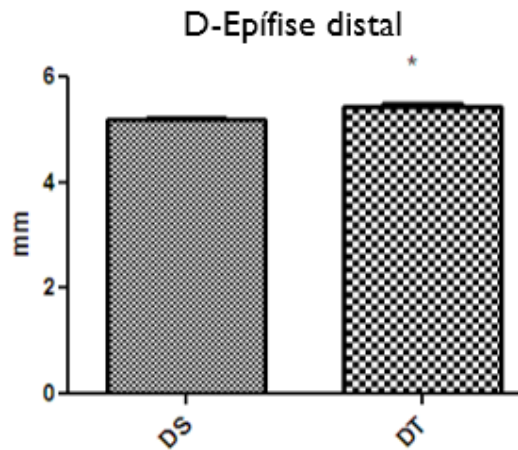
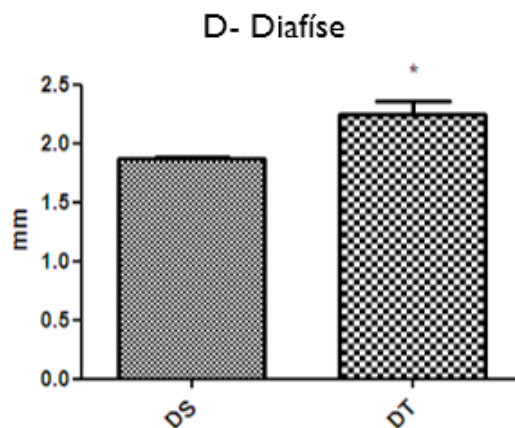


Figura 4 - Valores de diâmetro de diáfise com treinamento (DT) e na ausência de treinamento (DS)  $p < 0,05$



De acordo com os dados obtidos, o treinamento físico regular mostrou-se importante também para a formação óssea, sendo eficaz na promoção do aumento longitudinal nos ossos, bem como no diâmetro dos mesmos, mesmo diante de um quadro patológico como o DM.

Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação óssea são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro que pode resultar em aumento ou diminuição de massa óssea. Os marcadores podem ser divididos em marcadores de formação, que refletem a atividade dos osteoblastos, e os de reabsorção, que refletem a atividade dos osteoclastos (GABRIELA; MARISE, 2002).

Os tecidos do nosso organismo respondem a uma situação de estresse mecânico modificando suas propriedades. O mesmo pode ser aplicado na falta ou baixa de movimento, que pode ser considerada um estresse, e também produz readaptações nessas estruturas, inclusive na própria estrutura óssea (LECOQ *et al.*, 2006).



Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre grupos relacionado ao diâmetro da epífise proximal, porém pode-se dizer que houve uma tendência de elevação nesse quesito no grupo treinado (tabela 1), em conjunto com as outras variáveis.

Tabela 1 - Apresentação de todas as variáveis encontradas com inclusão dos valores de diâmetro da EP.

Grupos	DT	DS	P value
Peso da tíbia	0,50 ± 0,0256*	0,29 ± 0,0073	< 0,0001
Comprimento	34,0 ± 0,1891*	32,6 ± 0,2258	0,0001
Diâmetro epífise proximal	6,68 ± 0,0405	6,45 ± 0,1203	0,0901
Diâmetro diáfise	2,24 ± 0,1196*	1,86 ± 0,01930	0,0045
Diâmetro epífise distal	5,43 ± 0,06667*	5,21 ± 0,02599	0,0047

O impacto causado ao osso por meio do exercício físico é benéfico por estimular a formação óssea, bem como retardar sua perda. Segundo Rikli e McMans (1990), a atividade física é considerada positiva e de fundamental importância para os indivíduos que desejam o ganho ou manutenção de massa óssea.

Verificamos um aumento significativo na maioria as variáveis estudadas, com exceção apenas na epífise proximal, que não apresentou diferença estatística, o que nos leva a postular que a mecânica do movimento empregada no presente trabalho foi eficaz na modificação estrutural do tecido ósseo.

#### 4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, é plausível postular que o exercício físico seja um excelente aliado no desenvolvimento e/ou manutenção da massa óssea em animais acometidos pelo diabetes mellitus, podendo ser utilizado como tratamento não farmacológico nessa situação.

#### REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2012. **Diabetes Care**, v.36, n.4, p. 1033-1046, 2013.

ARSA, G. *et al.* Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.** Florianópolis, v. 11, n. 1, p. 103-111, 2009.

BOUDINA; S.; ABEL, E.D. Diabetic cardiomyopathy revisited. **Circulation**, v.115, n.25, p.3213-3223, 2007.

BRITO, C.P. Prevenção da Diabetes Tipo 2: Consenso da “Internacional Diabetes Federation”. **Revista portuguesa de diabetes** n.1, p.34-37, 2007.





DATTA, H.K.; NG, W.F.; WALKER, J.A.; TUCK, S.P.; VARANASI, S.S. The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.** v.61, n. p.577-587, 2008.

DERMAN, O.; CINEMRE, A.; KANBUR, N.; DOGAN, M.; KILIÇ, M.; KARADUMAN, E. Effect of swimming on bone metabolism in adolescents. **Turk. J. Pediatr.** v. 50, n. 2, p.149-154, 2008.

FERRAZ, A.S.M. **Estudo proteômico e fisiológico da resposta músculoesquelética ao exercício físico em ratos.** Dissertação, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

GALI, J.C. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.9, n.2, p.53-62, 2001.

GABRIELA, L.S; MARISE, L.C. marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Meta.** v.46, n.1, p.72-78, 2002.

HEIDARIANPOUR, A. Does detraining restore influence of exercise training on microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats? **Microvascular Research**, v.80, n.3, p.422-426, 2010.

HENDERSON, N.K.; WHITE, C.P.; EISMAN, J.A. The roles of exercise and fall risk reduction in the prevention of osteoporosis. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.** v. 27, n. 2, p.369-387, 1998.

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 Res.** v. 26, n. 4, p. 350-357, 2008.

JUNQUEIRA, J.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12ed. Guanabara Koogan, 2013. p. 135-148.

KOKUBUM, E. *et al.* Programa de atividade física em unidades básicas de saúde: relato de experiência no município de Rio Claro- SP. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde.** Londrina, v. 12, n.1, p. 45-50, 2007.

LARSEN, J.R.; BREKKE, M.; BERGENGEN, L.; SANDVIK, L.; ARNESEN, H.; DAHL-JORGENSEN, K. Mean HbA1c over 18 years predicts carotid intima media thickness in women with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v.48, n.4, p.776-779, 2005.

LECOQ, B.; POTREL-BURGOT, C.; GRANIER, P.; SABATIER, J.P.; MARCELLI, C. Comparison of bone loss induced in female rats by hindlimb unloading, ovariectomy, or both. **Joint Bone Spine.** v. 73, p. 189 – 195, 2006.

LERARIO, A.C. Diabetes mellitus tipo 2. **Diabetes News**, v. 1, n. 1, p. 20-25, 2004.

LIBBY, P.; NATHAN, D.M.; ABRAHAM, K., *et al.* Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. **Circulation**, v.111, p.3489-3493, 2005.



MACEDO, C.S.G.; GARAVELLO, J.J.; OKU, E.C. *et al.* Benefícios do exercício físico para a qualidade de vida. **Revista Brasileira de Atividade Física; Saúde**. Londrina, v. 8, n. 2, p. 19-27, 2012.

MO, A., YAO, W., LI, C. *et al.* Bipedal stance exercise and prostaglandin E2 (PGE2) and its synergistic effect in increased bone mass and in lowering the PGE2 dose required to prevent ovariectomized-induced cancellous bone loss in aged rats. **Bone**, v.31, n.3, p.402-406, 2002.

RIKLI, R.E.; MCMANIS, B.G. Effects of exercise on bone mineral content in postmenopausal women. **Res Q Exerc Sport**. v.61, n.3, p.243-249, 1990.

Submetido em 19/12/2019  
Aceito em 27/03/2020  
Publicado em 07/2020