Juciléia Barbosa Bezerra

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ULTRA-SOM DE BAIXA INTENSIDADE E DO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS EM
RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades
Bioengenharia – Escola de
Engenharia de São Carlos / Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto /
Instituto de Química de São Carlos da
Universidade São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Romariz Duarte

São Carlos

2005

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **José Bezerra** e **Clemides Ribeiro**, por serem minha base e firme alicerce em todos os momentos. Pelo grande amor dedicado a mim, pelo constante apoio e por possibilitarem a realização desse sonho. Ao meu querido pai pelo constante carinho e preocupação com meu bem estar. À minha querida mãe, também por fazer parte de todos os processos, por sua presença física em São Carlos nos momentos que eu mais precisava. Por abdicar de si mesma para estar aqui comigo, inúmeras vezes.

Aos meus irmãos **Júlio César** e **Luciane Moreira** pelo apoio e incentivo e sobrinhos: **Maria Eduarda**, **Alexandre**, **Caio César** e **Maria Vitória** pela linda presença em minha vida.

A todos, meu constante amor e agradecimento. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu abrigo, consolo, escudo, força e refúgio sempre!

Ao meu orientador professor Dr. **Luiz Duarte**, por me aceitar, confiar em mim e pelo inesquecível apoio e força em todos os momentos, sobretudo, nos mais difíceis. Obrigada também por permitir que eu fizesse parte de sua linda e admirável carreira acadêmica!

À minha co-orientadora e grande amiga, professora Dr^a. **Ana Claudia Duarte**, por tudo! Não seria possível descrever tudo que aprendi com essa convivência. Obrigada por sua forma toda especial de trabalhar, ensinar e viver. Por tornar esses anos em São Carlos mais agradáveis. Pela fundamental e constante presença no laboratório, congressos e palestras. Pelos ensinamentos, a qualquer momento e horário e pelos grandes momentos de descontração.

Aos amigos Salete Alves, pela amizade incondicional, dedicação, presença, apoio, ajuda, descontração e companheirismo sempre!

Marla Manzoni, pelos ensinamentos científicos, amizade verdadeira, conselhos, companhia, cuidado e agradáveis momentos.

Rafael Guerreiro pela amizade, companheirismo e fundamental ajuda.

Aos amigos e irmãos da 1^o Igreja Presbiteriana de São Carlos.

A todos os colegas dos laboratórios da UFSCar e Bioengenharia pelos momentos de aprendizado, ajuda, trocas científicas e amizade.

Benigno Gómez, pela grande atenção e dedicação ao me ajudar em Física.

Aos técnicos Nelson Júnior (USP), José Alves (UFSCar), Sérgio (UFSCar) pelo fundamental ajuda e apoio.

Aos professores doutores Ana Damaso, pelo acesso irrestrito ao seu laboratório, onde a maior parte da pesquisa foi realizada.

Keico Nonaka, por permitir livre acesso ao seu laboratório possibilitando realizar parte da pesquisa e adquirir imprescindíveis conhecimentos científicos no seu ambiente.

Cliquet Junior, grande ser humano e mestre, que confiou em mim, apoiou e incentivou sempre!

José Carlos Pereira, pela atenção e disponibilidade.

Homero pelo acesso ao seu laboratório e permissão para digitalizar as imagens de ultrassom e a seus prestativos alunos: Marcelo e Maurício pela grande ajuda e gentileza.

Nilvaldo Parizoto e seu aluno Charles, pelas avaliações histológicas e grande apoio.

Oscar Peitl e seu aluno Murilo pelo acesso ao laboratório LAMAV (materiais Vítreos da UFSCar) e utilização de microscópio de luz polarizada.

João Rollo e seu técnico Pedro pelo livre acesso ao seu laboratório e utilização de equipamentos.

Afonso Ferreira pelo laudo das imagens histológicas, apoio e receptividade.

Ao Cefete e seu funcionário Umberto, por melhorar a qualidade das imagens de raio-x.

Às secretárias Janete, Melaine e Cristina por sua ajuda.

Ao Programa de pós-graduação Interunidades em Bioengenharia da Universidade de São Paulo

A CAPES pelo apoio financeiro em parte da pesquisa.

A todos meu, MUITO OBRIGADA!!!

...os que esperam no Senhor
renovarão as suas forças e subirão
com asas como águias; correrão e
não se cansarão; caminharão e não
se fatigarão.

(Isaías 40:31)

RESUMO

BEZERRA, J.B. (2005). **Estudo dos efeitos do ultra-som de baixa intensidade e do exercício físico sobre a consolidação de fraturas em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005.

O Diabetes Mellitus é uma doença na qual o organismo perde a habilidade de regular adequadamente o metabolismo dos carboidratos e é caracterizada entre outros sintomas, por hiperglicemia permanente. Especificamente, o Diabetes Tipo I, está associado com a diminuição da integridade do tecido ósseo e, por isso, mais propenso à fraturas. Esta pesquisa refere-se ao estudo aplicação do ultra-som e do exercício físico (natação) como formas de consolidação de fraturas em fíbula de ratos diabéticos e apresenta resultados das avaliações glicêmicas, radiológicas, histológica e de microscopia de luz polarizada. A avaliação do grau de birrefringência nos permitiu observar que os animais Diabéticos, tanto os exercitados quanto os tratados apresentaram melhores resultados que os controles. O tratamento com ultra-som de baixa intensidade e o exercício físico foram eficazes na consolidação de osteotomias experimentais.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, exercício físico, fratura óssea, ultra-som.

ABSTRACT

BEZERRA, J.B. (2005). **Estudo dos efeitos do ultra-som de baixa intensidade e do exercício físico sobre a consolidação de fraturas em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005.

Diabetes Mellitus is a disease characterized by lost of ability in the regulating the carbohydrate metabolism and it is represented by constant hiperglycaemia and others sintoms. Among the types of Diabetes, the type I, is associated with the decrease of the bone tissue integrity and therefore more susceptible to fractures. This research is related to the aplication of ultrasound and physical exercise (swimming) to help healing of osteotomized fibulae in diabetics rats. The results were evaluated by glycaemics, radiological, hystological and polarized light microscopy analysis. Birefringence analysis showed that diabetic animals, exercited and treated with ultrasound presented better results as compared to the controls. The treatment with low intensity ultrasound and physical exercise demonstrated efficacy in experimental healing fractures.

Key-word: Diabetes Mellitus, physical exercise, healing bone, ultrasound.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Células ósseas	19
Figura 2 – Piezoeletricidade no osso	25
Figura 3 – Animal mantido em gaiola individual	29
Figura 4 – Animal sendo pesado	29
Figura 5 – Detalhamento do processo de pesagem dos animais	30
Figura 6 – Indução do Diabetes Mellitus através de injeção de Streptozotocin na veia caudal do animal	30
Figura 7 – Animal realizando treinamento em tanque individual	31
Figura 8 – Processo para coleta de sangue	33
Figura 9 – Coleta de sangue através da cauda do animal	34
Figura 10 – Fíbula e tíbia do animal	35
Figura 11 – Média glicemia dos grupos Controle e Diabético	42
Figura 12 – Consolidação óssea dos grupos Controle e Diabético	43
Figura 13 – Consolidação óssea dos grupos controle e diabético exercitado e Sedentário	43
Figura 14 - Consolidação óssea dos grupos controle e diabético exercitado e sedentário e/ou tratado (US)	44
Figura 15 - Consolidação óssea dos grupos controle e diabético sedentário e/ou tratado (US)	44
Figura 16 - Consolidação óssea dos grupos controle e diabético com tratamento sham	45
Figura 17 - fibrocartilagem (pseudoartrose) (CS)	45
Figura 18 – formando osso primário (CE)	45
Figura 19 – osso primário evoluído – fileira de osteoblastos (CST)	46
Figura 20 – osteócito (osso primário tendendo a organizar (CET)	46
Figura 21 – uma parte mais evoluída que outra (DS)	46
Figura 22 – osso primário e uma área de atraso (DE)	46
Figura 23 – osso primário na periferia avançando para o centro cartilaginoso (DST)	47
Figura 24 – osso primário completo (DET)	47
Figura 25 – osso primário na periferia não no centro (CSh)	47

Figura 26 – osso primário em quase todo o tecido. Pequenas partes não formadas (DSH)	47
Figura 27 - grau de birrefringência (CS-CE-DS-DE-B90D)	49
Figura 28 - grau de birrefringência (CS-CST-DS-DST-B90D)	49
Figura 29 - grau de birrefringência (CE-CET-DE-DET-B90D)	50
Figura 30 – grau de birrefringência (CST-CET-DST-DET-B90D)	50
Figura 31 – grau de birrefringência (CSh-DSh-B90D)	51
Figura 32 – luz e extinção das fibras de colágeno dos grupos estudados	51

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO.....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 Diabetes.....	13
3.2.Tecido Ósseo.....	17
3.3 microscopia de polarização e orientação das fibras colágenas	21
3.4 Ultra-som.....	23
3.5 Diabetes e Tecido Ósseo.....	25
3.6 Formas Tratamento de Fraturas no Diabetes Mellitus.....	26
3.6.1 Exercício Físico.....	26
3.6.2 Ultra-som.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Descrição Geral do Protocolo Experimental.....	29
4.2 Grupos Experimentais.....	31
4.3 Indução do Diabetes.....	33
4.4 Protocolo de Treinamento Moderado.....	35
4.5 Procedimento Cirúrgico para Produção da fratura.....	35
4.6 Protocolo de Tratamento com Ultra-som.....	36
4.7 Coleta do Material.....	37
4.8 Técnicas de Avaliação.....	37
4.8.1 Avaliação Glicêmica	37
4.8.2 Avaliação Radiológica.....	38
4.8.3 Avaliação Histológica	39
4.8.4 Medidas de Birrefringência	40
4.9 Análise Estatística.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Avaliações Glicêmica e Radiológica.....	42
5.2 Avaliação Histológica.....	45
5.3 Avaliação do Grau de Birrefringência	48
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO.....	60
8. SUGESTÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

1.INTRODUÇÃO

A elevada e ascendente prevalência do Diabetes Mellitus (DM) e o conseqüente aumento da morbidade e mortalidade, devido às suas complicações crônicas, passou a ser um sério problema de saúde pública (BRAGA, 2002). Na última estimativa da World Health Organization (WHO), 2003 constatou-se que, pelo menos, 177 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de diabetes, dos quais 5 milhões estão no Brasil. Este quadro pode atingir mais que o dobro em 2030. Os motivos para essa grande incidência do Diabetes está relacionado com crescimento populacional, idade, dietas não balanceadas, obesidade e estilo de vida sedentário dos países em desenvolvimento e com a grande incidência do diabetes tipo 2, o qual compreende de 80% a 90% dos casos. O Diabetes tipo 1 compreende de 10% a 20% dos casos (WHO, 2003; TEIXEIRA e MACHADO, 1999). Embora os homens tenham maior pré-disposição para desenvolver Diabetes, existem mais mulheres diabéticas (WILD et al, 2004). No Brasil, por exemplo, 30,79% dos homens são diabéticos, enquanto que as mulheres apresentam 69,2% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004)..

O Diabetes Mellitus é uma doença multifatorial, resultando de uma interação de fatores genéticos e ambientais. Compreende um grupo de distúrbios metabólicos, de múltipla etiologia, que se caracterizam, bioquimicamente, por hiperglicemia crônica e, clinicamente pelo desenvolvimento, a longo prazo, de complicações microvasculares (microangiopatia diabética) (MACHADO e OLIVEIRA JUNIOR, 2002). Todo ano, morrem aproximadamente, quatro milhões de pessoas devido às complicações causadas pelo DM. Os países mais atingidos são: Índia, China, EUA, Indonésia, Rússia, Japão, Paquistão, Brasil e Itália. (WHO, 2003).

A classificação etiológica do Diabetes e suas complicações, incluem: tipo 1; tipo 2; diabetes gestacional (KUZUYA et al, 2002) e, o diabetes experimental (CAMPOS, entre 1991 e 1992). Esta classificação refere-se a presença ou ausência do hormônio insulina, cuja principal função, neste caso, é controlar os níveis de glicose sanguínea. (SILVA e DIB, 2002).

O DM é diagnosticado quando os valores de glicemia ultrapassam 250mg/dl, no entanto atualmente já tem sido aceito valores acima 100mg/dl como padrão para diagnóstico desta doença. Os sintomas típicos da doença são: glicosúria, poliúria, perda de peso, polidipsia (KUZUYA et al, 2002) e, especificamente, no Diabetes tipo 1,

estudos têm demonstrado consideráveis perdas de massa óssea. Encontra-se na literatura muitos relatos sobre a menor densidade óssea em indivíduos diabéticos insulino dependentes, o que os torna mais propícios a fraturas ósseas (BEAM; PARSONS e LIN, 2002). Há um consenso geral de que a deficiência de insulina do Diabetes Mellitus coincide com osteopenia tanto em homens como em animais experimentais (MISHIMA et al, 2002).

Sabe-se que a atividade física tem um papel fundamental, não simplesmente na melhoria da qualidade de vida, mas sobretudo nos benefícios que esta pode causar a longo prazo. Ressalta-se, por exemplo, seu efeito benéfico sobre o controle do peso corporal, fortalecimento muscular e ósseo. Desta forma, tem sido evidenciado, que o exercício físico apresenta resultados positivos no que diz respeito à melhoria da qualidade óssea de indivíduos diabéticos tipo I, bem como na consolidação de fraturas (REDDY et al, 2001).

O tecido ósseo, por sua vez, possui uma característica piezoelétrica que permite ao osso receber deformações mecânicas e traduzi-las em potenciais elétricos, possibilitando a movimentação de células formadoras de osso. Portanto, o mecanismo piezoelétrico possui grande importância devido sua participação no processo de cicatrização óssea.

A ação do ultra-som no osso tem sido bastante estudada. Sua energia de baixa intensidade vem apresentando rápidos efeitos na consolidação de fraturas e isto tem sido reconhecido através de experimentos realizados em animais e em estudos clínicos (SATO; MATSUSHITA e NAKAMURA, 1999). Em vista desses mecanismos facilitadores da consolidação de fraturas ósseas, despertou-se o interesse em verificar os efeitos da aplicação tanto do exercício físico (natação) como do ultra-som em sítios lesados de ratos diabéticos.

2. OBJETIVO

Verificar os efeitos da aplicação do ultra-som e do exercício físico sobre a consolidação óssea de fraturas de fíbulas de ratos Diabéticos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Diabetes

O Diabetes Mellitus é uma doença no qual o organismo perde a habilidade de regular adequadamente a glicemia e o metabolismo dos carboidratos. Isto ocorre devido a não produção, ou produção deficiente do hormônio pancreático insulina e/ou de uma resposta ineficiente dos tecidos sensíveis a esse hormônio. É caracterizado por níveis elevados de açúcar no sangue (hiperglicemia), pela presença de açúcar na urina (glicosúria), tendência ao desenvolvimento de aterosclerose, microangiopatia, nefropatia e neuropatia. Pode ser provocado pela lesão das células beta do pâncreas, induzido por vírus, fatores genéticos e/ou imunológicos (WILMORE e COSTILL, 2001). É considerado uma síndrome crônica com hiperglicemia permanente, com ou sem glicosúria.

O DM é classificado em 4 classes: Diabetes tipo I ou Diabetes insulino-dependente, Diabetes tipo II ou Diabetes não insulino-dependente, Diabetes Gravítico e Diabetes Experimental (CAMPOS, entre 1991 e 1992).

O Diabetes Tipo I ou insulino-dependente é uma doença auto-imune que causa destruição das células β do pâncreas e leva à inabilidade do corpo em produzir insulina. A destruição pode ser causada pelo sistema imune do organismo, pelo aumento da susceptibilidade das células beta a vírus e pela degeneração das células beta. Apresenta, em geral, um início súbito durante a infância ou o início da vida adulta. Corresponde, portanto, de 5 a 10% dos casos de Diabetes, acometendo crianças e adolescentes (WILMORE e COSTILL, 2001; JOHN; TED e DONAVAN, 1999). É caracterizado pelo rápido e acentuado surgimento de sintomas e instalação da doença, e requer administração crônica de insulina (WILMORE e COSTILL, 2001).

O Diabetes tipo II, ou não-insulino dependente, é uma desordem metabólica que resulta na inabilidade do corpo em responder apropriadamente à insulina, referida como resistência insulínica. Corresponde a 90-95% dos casos, com maior prevalência em indivíduos mais velhos. Apresenta progressão lenta e está associado ao aumento do peso corpóreo e ao sedentarismo (JOHN; TED e DONAVAN, 1999).

No entanto, durante as últimas décadas o diabetes tipo II tem sido diagnosticado com freqüente aumento em adolescentes e até mesmo em crianças (JONES, 2000; BANERJI, 2002). Isto é atribuído a obesidade, resistência insulínica e a deficiência da função das células beta (BANERJI, 2002). Vários estudos têm relatado que as dislipidemias, Diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, e a obesidade, apresentam alterações metabólicas inter-relacionadas, descritas como Síndrome Plurimetabólica (Síndrome X) (HARDMAN, 1999; HANSEN; SAYE e WENNOGLE, 1999; HONG et al., 1998, LERARIO et al., 2002; VIANA et al, 2001; PIETROBELLI et al, 1999; BETTERIDGE e VINCE, 1997). As principais características desta síndrome são a resistência à captação da glicose estimulada pela insulina, elevada concentração plasmática de triglicerídeos, baixa concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL), hipertensão entre outras (HARDMAN, 1999). A resistência à insulina tem se mostrado muito mais severa na obesidade de gordura visceral quando comparada à obesidade de gordura subcutânea, e embora seu mecanismo não tenha sido elucidado, a hipótese mais comum é de que o aumento da adiposidade visceral possa estimular um aumento dos ácidos graxos livres na circulação portal, provocando a produção de triglicerídeos (dislipidemias), aumentando a concentração da insulina e diminuindo o desempenho de sua função (hiperinsulinemia e resistência à insulina, respectivamente) e estimulando a gliconeogênese (hiperglicemia) (ARNER, 1999; LERARIO et al, 2002).

O Diabetes Gravídico apresenta as mesmas características do Diabetes Tipo II. Afeta cerca de 3% das gestantes e está sempre associado a riscos de morbidade perinatal, aumento da incidência de macrosomia, traumas ao nascer e hipoglicemia neonatal. Além disso, estas mulheres em 60% dos casos desenvolverão o Diabetes Mellitus Tipo II num prazo de 10 a 20 anos após o parto (CAMPOS, entre 1991 e 1992).

O Diabetes Experimental refere-se ao estudo e pesquisa da doença através da reprodução da mesma em animais. A patologia é produzida por agentes químicos que exercem um efeito imediato e específico sobre as células beta das Ilhotas de Langerhans, produzindo Diabetes do Tipo I, com o objetivo de se estudar as características crônicas do estado diabético. As drogas mais conhecidas e utilizadas são a Aloxana e o Streptozotocin. A descoberta da Aloxana em 1943 introduziu o termo “diabetes químico” (DUARTE, 2001). O streptozotocin tem sido amplamente usado para induzir o Diabetes experimental em muitos animais de laboratório. Esta droga foi

originalmente isolada de culturas do *Streptomyces Achromogenes* em 1960. O transportador de glicose – GLUT 2, é expresso nas células β do pâncreas, nos rins e no fígado de roedores. O GLUT 2 transporta a glicose para as células β e recentemente tem sido sugerido como mediador do conteúdo celular do streptozotocin. Isto pode explicar porque as células β são especialmente afetadas por essa droga. O streptozotocin causa fragmentação no DNA das células β do pâncreas através de radicais livres alcalinizados que proporcionam redução dos níveis celulares de nucleotídeos e compostos relacionados, em particular o NAD^+ . Isso causa uma rápida necrose das células β ..(THULESEN et al, 1997). Portanto, este tipo de DM apresenta uma característica específica que é a insuficiência ou completa falta de insulina, uma vez que suas células produtoras são destruídas.

O pâncreas, além de suas funções digestiva, secreta hormônios importantes fundamentais na regulação normal do organismo. É composto por dois tipos principais de tecidos: os ácinos, os quais secretam sucos digestivos no duodeno e as ilhotas de Langerhans que secretam insulina e glucagon. As ilhotas foram identificadas por Langerhans em 1869, elas representam de 1% a 2% da massa pancreática, sendo constituídas por 4 tipos de células: a beta (β ou B), que secreta principalmente a insulina, a alfa (α ou A), secreta o glucagon, a delta (Δ ou D), a somastatina e a F o polipeptídeo pancreático (PP). A principal função da insulina é reduzir a quantidade de glicose que circula no sangue, por sua vez, o glucagon tem efeitos opostos aos da insulina, ou seja, promove o aumento da degradação do glicogênio hepático em glicose (glicogenólise) e aumenta a gliconeogênese. Ambos os processos aumentam as concentrações plasmáticas de glicose. (MACHADO e OLIVEIRA JÚNIOR, 2002; GUYTON, 2002; WILMORE e COSTILL, 2001).

A secreção de insulina é controlada pela ingestão de alimentos, hormônios gastrointestinais e outros estímulos neuroendócrinos..Essa secreção é estimulada por glicose, aminoácidos, ácidos graxos e corpos cetônicos, o que está de acordo com suas ações de promover a captação e/ou o armazenamento dessas substâncias. Desta forma, o principal estímulo à secreção de insulina é a glicose, a única que também induz sua síntese. Isto é de grande importância uma vez que todos os secretagogos são glicossensíveis, ou seja, necessitam da presença da glicose para serem efetivos. O limiar para glicestimulação da secreção de insulina é de 80 a 100mg/dl (MACHADO e OLIVEIRA JÚNIOR, 2002).

A insulina é o principal fator de controle e metabolismo dos substratos energéticos ingeridos. Possui efeitos anabólicos e anticabólicos integrados entre si, facilitando a captação, utilização e armazenamento desses substratos. No fígado, aumenta as sínteses do glicogênio e ácidos graxos e a glicólise e reduz a glicogenólise, a gliconeogênese e a cetogênese. No tecido adiposo, estimula a captação, síntese e esterificação de ácidos graxos e reduz a lipólise. Nos músculos, aumenta a captação de aminoácidos, a síntese protéica e a síntese de glicogênio e reduz a proteólise e o débito de aminoácidos (MACHADO e OLIVEIRA JÚNIOR, 2002).

O evento inicial do metabolismo da glicose é a sua entrada nas células, como esta é hidrofílica, não atravessa facilmente a membrana plasmática, necessitando de mecanismos facilitadores do seu transporte através da membrana. A insulina aumenta a captação de glicose ao estimular o recrutamento dos seus transportadores para a membrana plasmática. Foram identificados cinco transportadores: GLUT 1, nos eritrócitos e cérebro; GLUT 2, no fígado, rins, intestinos e células β pancreáticas; GLUT 4, nos músculos e tecido adiposo; GLUT 3 no cérebro e GLUT 5, no jejuno, fígado e espermatozóides (MACHADO e OLIVEIRA JÚNIOR, 2002).

Em se tratando de aumento dos transportadores de glicose, têm-se observado o aumento do GLUT 4 através de vários tipos e de diferentes intensidades de exercício físico (KAWANAKA et al, 1997). O primeiro dado de que o exercício pode aumentar a habilidade da insulina de estimular a utilização de glicose foi, provavelmente, promovido por Per Bjorntorp e colaboradores em Gothenberg, na Suécia, no início de 1970. Em 1972, eles afirmaram que a tolerância à glicose foi melhor e os níveis plasmáticos de insulina menores em homens suecos de meia idade, que participavam regularmente de competições esportivas quando comparados com homens de idade e peso semelhantes, mas que não praticavam atividades físicas. Igualmente, estes dados sugerem que a prática regular de exercícios físicos pode aumentar a sensibilidade insulínica em todo o corpo e, provavelmente, no músculo. Isto foi posteriormente confirmado, em estudos com ratos, por Carl Mondon, Constantine Dolkas e Gerald Reaven em Stanford. (TOMAS; ZORZANO e BUDERMAN, 2002).

3.2 Tecido Ósseo

O tecido ósseo e seus elementos esqueléticos são muito mais do que apenas uma rede de fixação de músculos possuindo grande variedade de funções vitais. Somado ao suporte do peso corporal, ossos e músculos mantêm a posição corporal para produzir movimentos precisos e controlados. Sem o esqueleto para resistir, a contração das fibras musculares seria incapaz de, por si só, fazer-nos andar, sentar ou correr. Sem algo para tracioná-los, os músculos simplesmente iriam ser curtos e redondos (MARTINI, 1998).

O osso tem como funções primárias:

- a) suporte – o esqueleto fornece suporte estrutural para todo o corpo. Ossos individualmente ou em grupos dão estrutura e proteção para tecidos moles e órgãos;
- b) depósito de minerais e lipídeos – o tecido ósseo tem a função de estocar minerais e íons inorgânicos que contribuem para a osmolaridade dos fluidos corporais. Estes íons e minerais participam de vários processos fisiológicos, inclusive como cofatores enzimáticos. Os sais de cálcio do osso representam uma valiosa reserva mineral que mantém as concentrações normais dos íons cálcio e fosfato nos fluidos corporais (o cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano). O esqueleto estoca energia ao armazenar lipídeos nas áreas da medula óssea amarela.
- c) produção de células sangüíneas – as células vermelhas e brancas do sangue, bem como outros elementos sangüíneos são produzidos na medula óssea vermelha que preenche a cavidade interna de muitos ossos.
- d) proteção – muitos órgãos e tecidos delicados são cercados por elementos esqueléticos. O tórax protege o coração e os pulmões, o crânio engloba o cérebro, as vértebras protegem o cordão espinhal e a pélvis embala delicadamente os órgãos dos sistemas reprodutivo e digestivo.
- e) sistema de alavancas – muitos ossos funcionam como alavancas que podem alterar a magnitude e direção das forças geradas pelos músculos esqueléticos. O sistema de alavancas multiplica a força gerada durante as contrações musculares, transformando-as em movimentos corporais. Os movimentos variam da delicadeza motora da flexão de um dedo a movimentos vigorosos nas alterações do corpo como um todo (MARTINI, 1998).

A matriz orgânica contribui com 30% do peso do osso e tem como principal componente a molécula de colágeno tipo I (95%), da qual se origina a molécula de tropocolágeno. Este, por sua vez, consiste de três cadeias polipeptídicas que se enrolam

em hélice e estão unidas entre si por meio de pontes de hidrogênio (DUARTE, 1977; MARCUS et al, 1996). As moléculas de tropocolágeno agregam-se entre si e formam as fibrilas (suas secções transversais exibem várias moléculas de tropocolágeno unidas como se fosse a de um cabo de aço). As fibrilas apresentam propriedades elásticas e se localizam nas direções dos esforços predominantes dos ossos. Dessa forma, de modo a resistir a esforços, é importante que elas permaneçam ligadas entre si. Esta estabilidade é dada por moléculas de mucoproteínas e complexos proteína-mucopolissacarídeos.

As características ósseas de resistência, dureza e elasticidade são dadas pela associação dos cristais de hidroxiapatita (componente mineral mais importante do osso – 65% do peso do osso) com as fibras colágenas. O osso é forte, um pouco flexível e muito resistente a fraturas. As fibrilas estabilizadas dispõem-se em planos chamados lamelas sendo que, as fibrilas de uma lamela, quando orientadas, formam um ângulo de 90° com a orientação de outras fibrilas da lamela consecutiva (DOBLARÉ; GARCIA e GÓMEZ, 2004; DUARTE, 1977).

As células ósseas podem ser classificadas em:

Osteoblastos – os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz;

Osteócitos – estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando assim a difusão de nutrientes possível graças à comunicação entre os osteócitos. Os osteócitos têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea;

Osteoclastos -participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sangüíneos (figura 1).

Figura 1 - Células ósseas

Fonte – Sacco, 2001

As células ósseas são constantemente renováveis, o osso é continuamente depositado pelos osteoblastos e é constantemente absorvido nos locais em que os osteoclastos estão ativos. Os osteoblastos são encontrados nas superfícies externas dos ossos, bem como em suas cavidades. Verifica-se um pequeno grau de atividade contínua osteoblástica em todos os ossos vivos (cerca de 4% de todas as superfícies, num dado momento), de modo que ocorre formação constante de pelo menos uma certa quantidade de osso novo. O balanço entre as atividades das células é muito importante, porque se a atividade osteoclástica predomina, o osso fica mais frágil, por outro lado, se a atividade osteoblástica predomina, o osso torna-se muito forte e denso (MARTINI, 1998; GUYTON, 2002).

Normalmente, exceto nos ossos em crescimento, a velocidade de deposição e a velocidade de absorção óssea são iguais, de modo que a massa total permanece constante. Em geral, os osteoclastos existem em massas pequenas, porém concentradas; quando a massa de osteoclastos começa a se desenvolver, ela costuma corroer o osso durante cerca de 3 semanas, perfurando um túnel que pode atingir 1 mm de diâmetro e vários milímetros de extensão. Ao fim desse tempo, os osteoclastos desaparecem, e o túnel é invadido por osteoblastos: a seguir começa a surgir novo osso. A deposição óssea prossegue, então, durante vários meses, sendo o novo osso depositado em camadas sucessivas de círculos concêntricos (lamelas) nas superfícies internas da cavidade, até preencher o túnel. A depleção de novo osso cessa quando o osso começa a

invadir os vasos sangüíneos que irrigam essa área. O canal através do qual ocorrem esses vasos, denominado *canal de Havers*, é, por conseguinte, tudo o que resta da cavidade original. Cada nova área de osso assim depositada é denominada *ósteon*.

A deposição e a absorção ósseas contínuas desempenham algumas funções fisiológicas importantes. Em primeiro lugar, o osso adapta habitualmente sua força ao grau do estresse ósseo. Por conseguinte, os ossos sofrem espessamento quando submetidos a cargas pesadas. Em segundo lugar, mesmo a forma do osso pode ser reorganizada para a sustentação adequada das forças mecânicas, pela deposição e absorção ósseas, de acordo com o tipo do estresse. Em terceiro lugar, como o osso velho torna-se relativamente fraco e quebradiço, é necessária a formação de nova matriz orgânica à medida que a matriz antiga sofre degeneração. Dessa maneira, é mantida a rigidez normal do osso. Com efeito, os ossos de crianças, em que a velocidade de deposição e de absorção é rápida, são pouco quebradiços em comparação com os ossos do indivíduo idoso, quando a velocidade de deposição e absorção fica lenta.

O osso é depositado em proporção à carga de compressão que ele deve suportar. Por exemplo, os ossos dos atletas ficam consideravelmente mais pesados que os das outras pessoas. Além disso, se a pessoa tiver uma das pernas engessada, mas continuar a andar com a perna oposta, o osso da perna engessada fica fino e sofre descalcificação de até 30% dentro de algumas semanas, enquanto o osso oposto permanece espesso e normalmente calcificado. Por conseguinte, o estresse físico contínuo estimula a calcificação e a deposição osteoblástica de osso.

Apesar da sua resistência e de sua dureza, o tecido ósseo é muito elástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações das forças a que está submetido normalmente. O comportamento mecânico, como resultado da aplicação de uma força, é influenciado pelo fato de que o osso é um material visco-elástico. Conseqüentemente, quando uma força é aplicada, o osso tende a resistir “imóvel” ou deformar-se. Quando a força não ultrapassa o limite elástico do osso, toda deformação elástica é recuperada no menor tempo possível após a retirada da carga ou força. As forças ou cargas superiores ao limite elástico ósseo e pouco tempo de recuperação podem levar a deformações plásticas permanentes ou fraturas (GUYTON, 2002).

Nas fraturas sempre há hemorragia local pela lesão dos vasos sangüíneos do osso e do periósteo. Há também destruição da matriz e morte de células ósseas junto ao local fraturado (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974). A fratura de um osso, de certa maneira, ativa ao máximo todos os osteoblastos periosteos e intra-ósseos envolvidos na fratura.

Além disso, forma-se grande número de novos osteoblastos, quase imediatamente, a partir das *células osteoprogenitoras*, que são células-tronco ósseas. Por conseguinte, em pouco tempo surge, entre as duas extremidades fraturadas do osso, uma grande elevação de tecido osteoblástico e nova matriz óssea orgânica, seguida rapidamente pela deposição de sais de cálcio. Trata-se do denominado *calo*.

No entanto, com o avanço da idade, os ossos tornam-se finos e relativamente quebradiços. Osteopenia é o processo de ossificação inadequada que ocorre com os seres humanos, tendo início entre 30 e 40 anos. Mulheres perdem em média 8% de sua massa óssea por década enquanto os homens perdem 3%. Quando a redução da massa óssea é suficiente para comprometer a função normal, chamamos o processo de osteoporose, alteração que provoca uma grande perda, tanto de osso esponjoso quanto de osso compacto. Os hormônios sexuais são importantes para a manutenção das taxas normais de deposição óssea (MARTINI, 1998).

3.3 Microscopia de polarização e orientação das fibras colágenas

A eficaz biomecânica do tecido ósseo é largamente determinada pela orientação e distribuição das fibras de colágeno (bem como a orientação dos cristais minerais).

Esta hipótese de que as fibras de colágeno têm um significado biomecânico de preferência de orientação e distribuição, foi primeiramente estabelecido por Gebhardt em 1905 e, mais tarde, testado por Ascenzi e Bonucci nos anos de 1964, 1967 e 1968. Estes autores provaram que as fibras de colágeno e os cristais minerais em uma orientação, predominantemente transversal, perpendicularmente ao longo do eixo do osso, resiste melhor a forças de compressão, enquanto que, fibras e cristais longitudinais, orientados mais paralelos ao longo do eixo do osso, resistem melhor às forças de tensão. Fibras colágenas orientadas a 45° entre uma lamela longitudinal e uma transversal provaram ser mais resistentes às fraturas (ASCENZI e BENVENUTI, 1996).

Fibras colágenas de diferentes orientações podem ser visualizadas em luz polarizada, onde as fibras colágenas orientadas transversalmente aparecem com brilho (luz) e aquelas orientadas longitudinalmente aparecem escuras e, fibras com orientação intermediária aparecem em diferentes níveis de verde (BROMAGE et al, 2003).

O microscópio de luz polarizada permite uma informação única sobre a estrutura e composição de uma variedade de materiais orgânicos e inorgânicos que não é disponível através de outras técnicas. O feixe de luz da microscopia de polarização

ocorre num polarizador ideal Pol, onde será transmitido somente seu componente com campo paralelo ao seu eixo de transmissão. Neste tipo de microscopia há também outro analisador, idêntico ao primeiro, o analisador An, com eixo de transmissão orientado verticalmente. Segundo a Lei de Malus, a irradiância é máxima quando os eixos de transmissão entre Pol e An é nulo e mínima ou ausente quando essa angulação é de 90° (BROMAGE et al, 2003; FALK et al, 1986).

O microscópio de luz polarizada é basicamente constituído por dois filtros polarizadores, o polarizador (Pol) e o analisador (An), os quais são formados por placas de plástico laminado e corado por iodo em solução ou por seu derivado de quinina, que se deposita na mesma direção das moléculas do polímero. Estas moléculas de polímero são estiradas e orientadas na mesma direção da força de laminação. Estas características permitem que a placa polarizadora tenha todos os vetores elétricos da radiação visíveis e absorvidos de forma seletiva, transmitindo apenas a energia radiante em uma direção, ou seja, a energia que corresponde ao seu plano de polarização. Desta forma, toda a radiação polarizada, perpendicular ao plano de polarização do analisador, será absorvida e a intensidade de passagem de luz será máxima quando o Pol e o An forem paralelos entre si (VIDAL, 1987b).

O tecido ósseo é um material anisotrópico e birrefringente, pois exhibe anisotropia óptica quando visto através de luz polarizada. Esta anisotropia é expressa como uma variação no brilho determinado pelas diferenças na refração de luz do material, ou seja, uma substância anisotrópica é aquela onde suas propriedades ópticas não são as mesmas em todas as direções de uma mesma amostra. O colágeno, por sua vez, caracteriza-se como um material anisotrópico, pois quando as fibras de colágeno são alinhadas transversalmente à direção de propagação da luz, há uma mudança na direção da refração da luz, resultando em um brilho máximo. Por outro lado, quando as fibras de colágeno são alinhadas ao longo do eixo de propagação da luz, não ocorre nenhuma refração e a amostra aparece escura ou extinta. Fibras colágenas orientadas em outras direções resultam em valores de brilho intermediário. Em resumo, birrefringência é a anisotropia óptica devido à propagação desigual da luz em se tratando de velocidade, através de um objeto, o qual tem diferentes índices de refração em determinadas direções, as quais são perpendiculares uma a outra em um material birrefringente (BROMAGE et al, 2003; VIDAL, 1987b).

A luz polarizada se propaga em dois caminhos ópticos distintos quando incide em um material birrefringente, um na direção do raio ordinário (η_o) e outro na direção do

raio extraordinário (η_e). Essa diferença de caminho óptico ou retardo óptico (OR), o material apresenta brilho característico, onde a intensidade é máxima quando seus eixos de propagação, correspondentes aos índices de refração são colocados a 45° dos dois filtros polarizadores do microscópio. Este brilho será igual à espessura do objeto e a diferença de fase entre as frentes de luz emergentes do objeto. Se os eixos de propagação da luz estiverem paralelos ao Pol e ao An, desaparecem as imagens birrefringentes, tornando o objeto escuro, é o chamado ponto de extinção (VIDAL, 1987b).

A birrefringência é expressa em termos de retardo óptico através das unidades nanômetros. Dessa forma, temos que: $B = (\eta_o - \eta_e)$ e o retardo óptico é expresso por $OR = (\eta_o - \eta_e) \times t$, onde t é a espessura do objeto. Tem-se então: $OR = B \times t$.

3.4 Ultra-Som

O ultra-som é uma energia mecânica de baixa intensidade e alta frequência (acima de 20 khz e superior aos limites da audição humana) que se propaga como uma onda de pressão causando agitação nas moléculas do meio em que estão se propagando, fazendo-as oscilarem. É transmitido através de ondas de compressão ou modo longitudinal e de cisalhamento ou modo transversal. No primeiro caso, a oscilação de partículas ocorre paralelamente à direção de propagação da onda, constituindo zonas de compressão e rarefação. No segundo, as ondas de cisalhamento (somente para sólidos), permitem que as partículas oscilem em direção perpendicular à direção de propagação das ondas (NOLASCO, 1993).

Os efeitos da ação do ultra-som envolvem muitos fatores físicos e biológicos, como intensidade, tempo de exposição, estrutura espacial e temporal do campo magnético e estado fisiológico do objeto. A existência de muitas variáveis dificulta a compreensão exata do mecanismo de ação do ultra-som na interação com os tecidos biológicos (SARVAZYAN, 1983). Seu principal objetivo é estabelecer limiares para a intensidade ultra-sônica abaixo dos quais não ocorram efeitos lesivos, independente do tipo de mecanismo de interação que está agindo no tecido biológico, visto que experimentos com o ultra-som demonstraram que a interação deste com os tecidos biológicos provoca alterações fisiológicas, benéficas ou não (FERRARI, 1987).

Os mecanismos físicos envolvidos na terapêutica do ultra-som que induzem respostas clinicamente significativas sobre as células, tecidos, órgãos e organismos são

geralmente classificados em mecanismos térmicos e não-térmicos (DYSON, 1987). O primeiro refere-se ao aumento de temperatura que ocorre em um tecido biológico quando há passagem de uma onda ultra-sônica, causando aumento temporário da extensibilidade das estruturas altamente colagenosas como tendões, ligamentos e cápsulas articulares, redução da dor e espasmos musculares além de uma reação inflamatória branda. O mecanismo não-térmico envolve a utilização de intensidades acústicas mais baixas na estimulação ultra-sônica, indicando que outros mecanismos, que não os térmicos, estão envolvidos na interação do ultra-som com o tecido biológico, como exemplo: mecanismo cavitacional, microfluxo acústico e mecanismo piezoelétrico (DYSON, 1987). Vale ressaltar, portanto, o mecanismo piezoelétrico devido à sua grande participação no processo de cicatrização óssea. A piezoeletricidade foi descoberta em 1880 pelos irmãos Curie (MASON, 1981) e é definida como a propriedade física segundo a qual alguns materiais quando deformados por uma tensão mecânica, desenvolvem cargas elétricas superficiais e vice-versa e, ao se colocar um material piezoelétrico sob campo elétrico, as cargas elétricas interagem com o mesmo e apresentam deformações mecânicas.

Fukada e Yasuda (1957), foram os primeiros a descreverem a piezoeletricidade em um tecido biológico – o osso. Eles observaram os efeitos piezoelétricos direto e inverso no osso e mostraram que ao sofrer deformações mecânicas, cargas elétricas são formadas na face oposta do osso, sendo este efeito devido à molécula de colágeno. (DUARTE, 1977; SILVA et al, 2001).

A remodelagem óssea é controlada pela polaridade originada pelas cargas compressivas, onde as cargas positivas favorecem a ação dos osteoclastos e as negativas a ação dos osteoblastos (figura 2).

Figura 2 - Piezoelectricidade no osso

Fonte – Sacco, 2001.

Desse modo, a piezoelectricidade continuou despertando interesse no meio científico. DUARTE (1983), atribuiu a aceleração do processo de consolidação de fraturas ósseas por ultra-som de baixa intensidade ao mecanismo de piezoelectricidade. Xavier e Duarte (1983), consideraram que o processo de reparação óssea se estabelece quando uma corrente elétrica estimula a “alocação” de cargas elétricas no sítio lesado, que induzem a proliferação de células ósseas.

3.5 Diabetes e Tecido Ósseo

O Diabetes tipo I está associado à redução da densidade mineral do osso. A alta associação de fraturas com o Diabetes Mellitus desperta ainda mais o interesse no estudo dessa patologia e suas características. No entanto, a origem da doença diabética no osso, não é completamente conhecida. Patologias como as microangiopatias e pobre

controle glicêmico, podem estar envolvidos (RIX; ANDREASSEN e ESKILDSEN, 1999).

Pacientes com Diabetes Mellitus estão sujeitos a altos riscos de fraturas comparados com indivíduos normais. Isto indica que a integridade estrutural do sistema esquelético pode estar comprometida. Para examinar as consequências biomecânicas do Diabetes, foi estudada a integridade estrutural do fêmur e da tíbia em ratos diabéticos induzido pela streptozotocin. Os resultados deste estudo garantem que o estado diabético está associado com a mecânica de deteriorização do osso, resultando em ossos com integridade biomecânica menor (REDDY et al, 2001).

3.6 Formas de Tratamento de Fraturas no Diabetes Mellitus

3.6.1 Exercício Físico

Adaptações, ou mudanças no estilo de vida são especialmente importantes no sentido de promover melhor desenvolvimento e/ou manutenção da estrutura músculo esquelética. Estudos indicam que o exercício físico regular, por exemplo, possui grande importância na manutenção da estrutura óssea normal, bem como na prevenção de fraturas. Ossos de halterofilistas são densos, com saliências grossas e proeminentes onde os músculos se inserem. Em não atletas, a atividade física moderada e a postura corporal são essenciais para garantir a manutenção do estímulo ao osso e da força óssea adequada. Alterações degenerativas podem ocorrer após um período breve de inatividade, como em períodos de reparação de fraturas, em que os ossos submetidos à imobilização perdem, normalmente, um terço de sua massa óssea (MARTINI, 1998).

Vale ressaltar a importância do exercício físico no controle e tratamento do DM, uma vez que o treinamento físico aumenta a habilidade do músculo em captar e oxidar ácidos graxos livres durante o exercício bem como aumenta a atividade da enzima lipase, que caracteriza um aumento de sensibilidade à insulina (RICHTER et al, 1992). No que diz respeito à prevenção do DM, intervenções devem ser feitas nas causas de origem comportamentais e ambientais como o estresse, obesidade, sedentarismo, dieta e fármacos (MARTINS, 2000). A atividade física tem sido indicada como terapia no tratamento da doença, favorecendo o equilíbrio metabólico. Esta, portanto, deve ser

realizada conjuntamente com o controle da dieta e insulina exógena, quando necessário (SANTOS, 2000).

O treinamento físico realizado regularmente providencia maior captação e metabolização da glicose pelo músculo, independente da ocorrência de aumento de insulina, e tem sido associado ao aumento da síntese de GLUT – 4. Tal aumento apresenta relação com o aumento da captação de glicose pela ação da insulina.

O exercício físico induz um rápido aumento da taxa de glicose no músculo esquelético em contração. A capacidade de intensificar o transporte de glicose é causado pelo recrutamento dos transportadores de glicose (GLUT 4) para o sarcolema e para os Túbulos T (RICHTER; DERAIVE e WOJTASZEWSKI, 2001). Da mesma forma, outro estudo demonstrou que, em humanos, atletas possuem mais GLUT 4 do que os não treinados e, tanto nos indivíduos saudáveis como nos indivíduos que possuem resistência à captação da glicose estimulada pela insulina, o exercício físico tem apresentado constante aumento do conteúdo de GLUT 4. Além disso, o decréscimo do nível de atividade física diminuiu o conteúdo de GLUT 4. Mudanças da atividade física e do teor de GLUT 4 estão associadas com as mudanças da resistência à captação da glicose estimulada pela insulina (DAUGAARD et al, 2000).

Além de promover melhora no quadro dislipidêmico, a atividade física pode prevenir ou adiar o desenvolvimento do diabetes tipo 2 nas pessoas com alto risco para esta doença, bem como auxiliar na atenuação do quadro de hipertensão, contribuindo assim, para redução do risco de doenças coronarianas (WING et al., 2001).

3.6.2 Ultra-som

O reparo de fraturas ósseas tem sido amplamente estudado. Apesar de inúmeros estudos comprovarem os benefícios do exercício físico na melhoria da condição óssea, bem como na prevenção de fraturas, a terapia com o ultra-som é um dos tratamentos mais comumente usados em tecidos lesionados, nos quais constituem a maioria das reclamações reumáticas. Duarte (1977), em seu trabalho pioneiro, demonstrou a eficácia da utilização do ultra-som na consolidação de fraturas.

O ultra-som vem apresentando rápidos efeitos na consolidação de fraturas e isto tem sido reconhecido através de experimentos realizados em animais e em estudos clínicos. Em particular, múltiplos efeitos da baixa intensidade da energia do ultra-som

têm sido demonstrados, recentemente, através de experimentos como aumentos da força de flexão em calos ósseos, modulação da síntese do fator de transformação do crescimento (TGF), aumento de cálcio etc (SATO; MATSUSHITA e NAKAMURA, 1999).

Experiências mostraram a eficácia da energia de baixa intensidade do ultra-som como um sinal de estimulação da aceleração da consolidação de fraturas com uma diminuição bastante significativa do tempo de cicatrização (SATO; MATSUSHITA e NAKAMURA, 1999).

Estudos científicos tiveram como objetivo investigar os efeitos do tratamento com ultra-som e o exercício físico sobre a velocidade de consolidação óssea e resistência de deformação em ratos da raça Wistar. A atividade física consistia em 1 hora de natação por dia com aumento de 5% da carga em relação ao peso corporal, durante 30 dias. A terapia com intensidade média do ultra-som foi aplicada diariamente na área afetada. Os resultados foram: no teste de resistência mecânica, a terapia com o ultra-som, associada à atividade física demonstrou diferenças significativas da resistência e rigidez óssea após os 30 dias de tratamento. Estes fatos sugerem que o ultra-som ou a atividade física ou a combinação de ambos, pode acelerar o processo de reparação do tecido ósseo (GUERINO et al, 1999).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Descrição Geral do Protocolo Experimental

O projeto foi desenvolvido no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da EESC/USP e no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Ambos laboratórios apresentam infra-estrutura necessária para a realização da presente pesquisa.

Foram utilizados 60 ratos machos da Linhagem “Wistar” a partir de 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFSCar. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, acondicionados em sala sob condições controladas de temperatura (22°-23° C), ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), com livre acesso à água e alimento (Figura 3).

Figura 3 – Animal mantido em gaiola individual.

O peso corporal dos ratos, (Figuras 4 e 5) e as amostras de sangue para determinação da glicemia foram coletadas durante todo o experimento.

Figura 4 – Animal sendo pesado.

Figura 5 – Detalhamento do processo de pesagem dos animais.

No 45º dia, os animais dos grupos denominados diabéticos, foram submetidos a uma injeção da droga Streptozotocin (Figura 6).

Figura 6 – Indução do Diabetes Mellitus através de injeção de Streptozotocin na veia caudal do animal.

Após 48 horas, os animais com glicemia superior à 250mg/dl, foram considerados e os com glicemia abaixo, descartados.

No 90º dia de vida, todos os animais, de todos os grupos, foram submetidos à fratura cirúrgica da fíbula direita. Os animais denominados tratados com ultra-som, foram submetidos a sessões diárias de 20 minutos, conforme protocolo. Os animais dos grupos denominados exercitados foram submetidos a exercícios diários de natação por 1 hora no 45º dia de vida (Figura 7).

Figura 7 – Animal realizando treinamento em tanque individual.

Os animais dos grupos sedentários permaneceram sem tratamento e atividade física. Ao final de 9 semanas de exercício ou tratamento ou repouso, todos os animais foram sacrificados e suas fíbula direitas retiradas e congeladas para análise posterior.

4.2 Grupos Experimentais

Para a realização deste estudo os ratos foram divididos em 2 grandes grupos: diabéticos e controles, que por sua vez, se subdividiram em: sedentários, tratados com ultra-som, exercitados e submetidos aos dois protocolos. Além dos grupos: Basal 45 e 90 dias e o grupo Sham.

- a) Grupo Controle Sedentário (CS): os animais deste grupo foram submetidos apenas à fratura da fíbula D.
- b) Grupo Controle Sedentário e Tratado (CST): os animais deste grupo foram submetidos à fratura da fíbula D e após isso foram tratados pelo ultra-som de baixa intensidade.
- c) Grupo Controle Exercitado (CE): os animais deste grupo foram submetidos à fratura da fíbula D e após isso foram exercitados.
- d) Grupo Controle Exercitado e Tratado (CET): os animais deste grupo foram submetidos ao processo de fratura e foram exercitados e tratados com o Ultra-som.
- e) Grupo Diabético Sedentário (DS): neste grupo os animais foram submetidos à indução do Diabetes e à fratura.

- f) Grupo Diabético Sedentário Tratado (DST): os animais deste grupo foram submetidos à indução do Diabetes e à fratura e após isto foram tratados pelo ultra-som de baixa intensidade.
- g) Grupo Diabético Exercitado (DE): os animais deste grupo foram submetidos à indução do Diabetes e à fratura e após isto foram exercitados.
- h) Grupo Diabético Exercitado e Tratado (DET): neste grupo os animais foram submetidos à indução do Diabetes, após isto foram exercitados e tratados com o ultra-som de baixa intensidade.
- i) Grupo Basal 45 dias (B 45): este grupo foi apenas sacrificado aos 45 dias de vida, sem nenhuma manipulação para posterior análise do comportamento ósseo nessa faixa etária.
- j) Grupo Basal 90 dias (B 90): este grupo foi sacrificado aos 90 dias de vida, sem qualquer tipo de manipulação, para posterior análise do comportamento ósseo nessa faixa etária.
- k) Grupo Sham Controle (CSh): neste grupo os animais foram submetidos à fratura e submetidos a uma simulação do ultra-som, no qual realizou-se o mesmo procedimento do tratamento e com o mesmo nível de estresse causado pelo tratamento com o ultra-som.
- l) Grupo Sham Diabético (DSh): neste grupo os animais foram submetidos à indução do diabetes, tendo suas fíbulaas direitas fraturadas aos 90 dias de vida. Após isso, foram tratados com uma simulação do ultra-som, no qual realizou-se o mesmo procedimento do tratamento e com o mesmo nível de estresse causado pelo tratamento com o ultra-som.

4.3 Indução do Diabetes

A indução do Diabetes foi realizada através de uma injeção venosa (veia caudal) de Streptozotocin (Sigma Chemical Co., St. Luis, Mo, USA) em estado pós prandial. Foi utilizada 50mg/kg de peso corporal, dissolvida em citrato 0,01M, pH 4,5.

Para constatação do quadro de Diabetes Mellitus, a glicemia foi monitorada através do método enzimático da glicose oxidase utilizando-se o Kit Wiener.

A constatação da glicemia foi realizada seguindo o padrão de monitoramento glicêmico:

- verificação da glicemia antes da indução do Diabetes;
- 48 horas após a injeção da droga Streptozotocin (constatação do Diabetes);
- a cada 7 dia após a instalação do quadro Diabético (verificação da manutenção do quadro até o sacrifício);
- no sacrifício;
- o monitoramento da glicemia foi feito retirando-se sangue da cauda (Figura 8 e 9) utilizando o método enzimático-colorimétrico (GOD-POD).

Figura 8 – Processo para coleta de sangue.

Figura 9 – Coleta de sangue através da cauda do animal.

- Esta metodologia baseia-se no fato de uma glicose-oxidase (GOD) hidrolisar a glicose produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, na presença de 4-Aminofenazona (4-AF) e fenol, em uma reação catalisada por Peroxidase (POD), dão lugar à formação de 4-p-benzoquinona-monoiminofenona, com um máximo de absorção em 505 nanômetros, de acordo com o seguinte esquema de reação:

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra e estável por 60 minutos. Em condições normais, a reação de cor é linear até 450mg/dL, desenvolvendo-se completamente em 10 minutos de incubação a 37°C. A determinação é realizada com plasma heparinizado ou com 50µl de fluoreto de sódio. A concentração de glicose plasmática é determinada a partir da fórmula:

$\text{Concentração de Glicose} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância Padrão}} \times 100$

4.4 Protocolo de Treinamento Moderado

Os animais dos grupos Exercitados foram submetidos a treinamento aeróbio crônico moderado de 1 hora de natação (UENO, 1997). (com 3 a 5% de peso adicional atado à cauda), numa frequência de 5 vezes por semana, durante 9 semanas, em tanques individuais (50 cm de altura x 30 cm de diâmetro). A temperatura da água foi mantida entre 28 - 32°C e trocada diariamente.

Anteriormente ao treinamento, houve um período de adaptação: 30 minutos no primeiro e segundo dias sem adição de carga, 45 minutos no terceiro dia com adição de carga e 1 hora nos dias subsequentes com sobrecarga adicional do peso corpóreo (3 a 5%) atada à cauda para que o animal não flutuasse, mantendo-se em atividade durante todo o período do treinamento.

4.5 Procedimento Cirúrgico para a Produção da Fratura

O osso escolhido para realização da osteotomia foi a fíbula visando minimizar os problemas de locomoção pós-cirúrgico do animal, uma vez que a fíbula do rato é agrupada à sua Tíbia (Figura 10).

Figura 10 – Fíbula e tíbia do animal.

A osteotomia constou de corte transversal com a lâmina de bisturi. As práticas cirúrgicas foram realizadas sob anestesia geral.

O procedimento cirúrgico seguiu a seguinte sequência:

- Administração de anestésico intra-muscular (cloridrato de trilocaína) próximo ao local a ser osteomizado – CITOCAÍNA 3% (Lab. Cristália);
- Tricotomia lateral do membro inferior direito do animal (parte externa, região a ser osteotomizada);
- Lavagem e limpeza de todo o membro;
- Assepsia da área com solução de iodo;
- Acesso cirúrgico mediante incisão da pele, executada com bisturi montado com lâmina nº 15, na extensão de aproximadamente 1,5 cm, no sentido longitudinal e afastamento de tecido subcutâneo e músculos até se atingir o osso;
- Exposição do osso e subsequente afastamento de todos os planos com afastador mantenedor;
- Corte transversal na fíbula com bisturi;
- Confirmada a osteotomia, realizar a redução do foco de fratura;
- Sutura da pele com agulha odontológica e fio de seda trançada;
- Desinfecção posterior da área com agente bactericida.

Radiografias foram tiradas após o procedimento cirúrgico para avaliações posteriores (DUARTE, 1996).

4.6 Protocolo de Tratamento com Ultra-som

O tratamento com ultra-som teve início 24 horas após a cirurgia, com aplicações diárias de 20 minutos, durante 21 dias consecutivos por ultra-som pulsado no sítio da osteotomia, por via transcutânea, com o transdutor estacionado (DUARTE, 1985). Para tal procedimento, o animal era colocado em um tubo de contenção, para que este não tivesse muita locomoção e assim facilitar o tratamento com o US. O transdutor foi posicionado sobre a pele com auxílio de um gel hidrossolúvel (GEL CONTACT) como meio acoplante do transdutor.

O ultra-som utilizado possui as seguintes características:

- Frequência de 1,5MHZ;

- 200 μ s de largura do pulso;
- Intensidade de 30mW/cm².

Somente as fíbula diretas dos grupos denominados tratados foram estimuladas.

4.7 Coleta do Material

No dia do sacrifício, foram realizadas radiografias das áreas onde foram feitas osteotomias, estabelecendo assim, um padrão de comparação radiológica do sítio de fratura.

No dia seguinte ao término do tratamento (22º dia após a osteotomia) os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina e, imediatamente novas radiografias foram realizadas.

Após o sacrifício as fíbula osteomizadas foram separadas de suas partes moles, e com o auxílio de um bisturi foram retiradas e acondicionadas de acordo com a técnica descrita, para posterior análise histológica.

4.8 Técnicas de Avaliação

4.8.1 Avaliação Glicêmica

Para constatação do quadro de Diabetes Mellitus, a glicemia foi monitorada através do método enzimático da glicose oxidase utilizando-se o Kit Wiener (descrito anteriormente). As análises foram realizadas a cada 7 dias e no dia do sacrifício dos animais.

4.8.2 Avaliação Radiológica

Todos os animais foram radiografados ao final das cirurgias para avaliarmos o aspecto das osteotomias realizadas. Após o tratamento e sacrifício dos animais, novas radiografias foram feitas para verificar se houve ou não a formação de calo ósseo.

As radiografias foram feitas com um aparelho de raio-x odontológico, com as seguintes especificações:

- Voltagem – 115 volts – 60 Hz
- Voltagem no tubo – 50Kvp
- Filtro – 2mm (al)
- Foco de emissão – 0,8x0,8 mm

O filme de raio-x utilizado foi o KODAK DENTAL FILM Size 4 EO – 41 oclusal.

4.8.3 Avaliação Histológica

A análise histológica do material experimental foi obtida seguindo as seguintes etapas:

- 1) Fixação das fíbula retiradas em solução de Bouin por 30 horas;
- 2) descalcificação da peça histológica usando solução de ácido tricloracético (TCA-0,3 molar). O processo foi otimizado submetendo as peças em banho de TCA sob uma corrente AC de 50mA, durante 7 dias;
- 3) neutralização das peças com solução de sulfato de sódio a 5%, por 24 horas;
- 4) pré-diafanização ou desidratação do material através de baterias crescentes de álcoois;
- 5) diafanização ou substituição do álcool presente na peça histológica pelo xilol;
- 6) inclusão em parafina;
- 7) realização de microtomia através de cortes longitudinais de 0,7 micra nas peças histológicas fixadas em suportes, na forma de blocos lapidados;
- 8) montagem dos cortes em lâminas;
- 9) desparafinação e rehidratação dos cortes das peças;
- 10) coloração com o uso dos corantes hematoxilina e eosina;
- 11) desidratação para montagem final das lâminas;
- 12) montagem definitiva para o acoplamento de lâmina e lamínula;
- 13) etiquetagem e arquivamento.

4.8.4 Medidas de Birrefringência

As lâminas histológicas foram medidas randomicamente. As medidas das fibras de colágeno foram realizadas utilizando a birrefringência através da microscopia de polarização.

As lâminas foram imersas em água destilada por um curto período de tempo, apenas para hidratação das mesmas. Vale ressaltar que, tais lâminas não foram coradas, passaram por todos os processos de preparação das lâminas para histologia convencional, exceto a coração.

Após o período de imersão, as lâminas foram cobertas com lamínulas contendo água destilada nas interfaces.

As medidas de OR foram obtidas pela microscopia de luz polarizada no microscópio Zeiss com uma objetiva 10x/0,22, condensador 0,0 compensador Sérnamont's $\lambda/4$, luz monocromática $\lambda = 546$ nm, obtida por meio de um filtro de interferência Zeiss, no Laboratório de Materiais Vítrios (LAMAV) da Universidade Federal de São Carlos, sob a orientação dos professores Dr Oscar Pleitl e Dr. Nivaldo Parizoto.

Para realização das medidas o eixo longo do osso (fibula) foi posicionado a 45° em relação aos polarizadores do microscópio, pois nessa posição as fibras de colágeno apresentam maior brilho e, conseqüentemente um valor OR maior.

Foram realizadas 253 medidas dos 12 grupos, na região onde foi realizada a osteotomia, em diferentes cortes de uma mesma lâmina.

4.9 Análise Estatística

Os dados obtidos em cada grupo (MÉDIA $\pm$ EPM), para cada parâmetro analisado, foram comparados entre si através da aplicação do método ANOVA para análise de variância e aplicação do Teste paramétrico de Tukey-Kramer - Multiple Comparisons, conforme adequação ao software INSTAT, utilizando um coeficiente de variação $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliações glicêmica e radiológica

Os resultados da figura 11 apresentam valores médios das avaliações glicêmicas dos grupos Controle e Diabético.

Figura 11 - média glicêmica dos grupos Controle e Diabético

A figura 12 apresenta valores referentes às análises radiológicas de todos os grupos permitindo observar, quantitativamente, o percentual de consolidação óssea.

Figura 12 - consolidação óssea dos grupos Controle e Diabético

Na figura 13, compara-se o percentual de consolidação óssea dos grupos Controle e Diabético sedentários.

Figura 13 - consolidação óssea dos grupos controle e diabético exercitado e sedentário

A figura 14 apresenta os resultados radiológicos dos grupos Controle e Diabético exercitado bem como os grupos Controle e Diabético exercitados e tratados com ultra-

Figura 14 - consolidação óssea entre controles e diabéticos exercitados e/ou tratados (US)

som.

Os valores percentuais da consolidação óssea dos grupos Controle e Diabético sedentários assim como controle e diabético sedentário e tratado com ultra-som são visualizados na figura 15.

Figura 15 - consolidação óssea entre os grupos controle e diabético sedentário e/ou tratado (US)

Na figura 16, observa-se as diferenças percentuais dos grupos Controle e Diabético sham.

Figura 16 - Consolidação óssea dos grupos controle e diabético com tratamento sham

5.2 Avaliação Histológica

Os grupos Controles apresentaram os resultados: todos os subgrupos apresentam reparo ósseo em curso, no entanto, o grupo CS demonstra ainda um osso imaturo (figura 17) quando comparado ao CE (Figura 18).

Figura 17 - fibrocartilagem (pseudoartrose) (CS)

Figura 18 - formando osso primário (CE)

O CST evidencia um osso primário com fileiras de osteoblastos (figura 19) enquanto o CET apresenta um osso um pouco mais organizado já com presença de osteócitos (figura 20).

Figura 19 - osso primário evoluído - fileira de osteoblastos (CST)

Figura 20 - osteócito (osso primário tendendo a organizar) –(CET)

Entre os grupos Diabéticos, os resultados apresentaram as seguintes características: o grupo DS apresenta calo ósseo primário (figura 21). O perfil do grupo DE apresenta formação de tecido ósseo novo, porém de forma irregular e alguns ainda em fase de reparo (figura 22);

Figura 21 - uma parte mais evoluída que outra (DS)

Figura 22 - osso primário e uma área de atraso (DE)

O grupo DST apresenta osso primário na periferia tendendo a ossificar (figura 23), enquanto o grupo DET apresenta osso primário em quase toda a região injuriada (figura 24).

Figura 23 - osso primário na periferia avançando para o centro cartilaginoso (DST)

Figura 24 - osso primário quase completo (DET)

Os grupos Sham tiveram os seguintes resultados: Todo o grupo CSh apresenta osso primário na periferia, porém, não organizado (figura 25), o grupo DSh apresenta osso primário em todos os animais e em maior quantidade que o grupo CSh (figura 26).

Figura 25 - osso primário na periferia, não no centro (CSh)

Figura 26 - osso primário em quase todo o tecido. Pequenas partes não formadas (DSh)

5.3 Avaliação do Grau de Birrefringência

Quanto à organização das fibras de colágeno, podemos observar, através do grau de birrefringência as seguintes diferenças estatísticas entre os grupos estudados (tabela 1).

Quanto maior for o valor, maior é, portanto a organização das fibras. Isso nos permite ter uma visão geral dos efeitos dos tratamentos aplicados no sítio da osteotomia. É importante notar que, neste caso, temos como grupo controle (padrão) o grupo Basal 90 dias, já que, neste grupo não foi realizada a osteotomia, exatamente para nos permitir comparar o grau de alinhamento das fibras de colágeno em um osso saudável com os demais grupos da mesma idade, porém osteotomizados.

Tabela I

Grupos	B 90 D	CS	CE	CST	CET	CSh	DS	DE	DST	DET	DSh
Média	30.4 ^{eh}	26.05 ^{abc}	14.7 ^{ade}	20.3 ^b	13.7 ^{fgh}	20.8 ^f	33.5 ^{cij}	24.8 ^{dil}	26.7 ^m	36.6 ^{gl mn}	25.8 ^{jn}
Erro Padrão da Média	1.6	1.4	0.5	0.6	0.6	1.02	2.8	2,04	2.3	1.6	2.02

Tabela 1 - Valores expressos como média e erro padrão da média. Letras iguais representam valores significativamente diferentes. $P < 0.05$ (Tukey-Kramer Multiple Comparisons).

Quando cruzamos os grupos visualizamos melhor os resultados. Nos Controles e Diabéticos sedentários e exercitados, comparando-os com o padrão Basal 90 dias (CS, CE, DS DE vs B90D), nesta comparação, o único que não atingiu o realinhamento das fibras de colágeno quando comparados com o basal foi o Controle exercitado. Por outro lado, o CS apresentou um dos maiores graus de birrefringência. Da mesma forma, o grupo Diabético exercitado e o sedentário, embora diferentes entre si, não apresentaram diferenças significativas comparados ao padrão (figura 27).

Figura 27 – grau de birrefringência (CS-CE-DS-DE-B90D). Letras iguais apresentam valores significativamente diferentes.. $P < 0.05$ (teste de Comparação Múltipla - Tukey-Kramer).

Ao cruzar os grupos Controles e Diabéticos sedentários e sedentários tratados com US e compará-los com o padrão Basal 90 dias observamos que o tratamento com ultra-som no grupo diabético sedentário, proporcionou melhor alinhamento das fibras de colágeno, o que não ocorreu no controle sedentário (figura 28).

Figura 28 – grau de birrefringência (CS-CST-DS-DST-B90D). Letras iguais apresentam valores significativamente diferentes.. $P < 0.05$ (teste de Comparação Múltipla - Tukey-Kramer).

Os grupos Controles e Diabéticos exercitados e tratados com US comparados com o padrão mostram que, ao contrário do grupo controle, os diabéticos, tanto o exercitado como o tratado com US atingiram os valores padrão, ainda que, significativamente diferentes entre si. No entanto, o grupo DET apresenta valores superiores aos

considerados como padrão, identificando, neste caso, o efeito potencial do tratamento com ultra-som em animais diabéticos (figura 29).

Figura 29 – grau de birrefringência (CE-CET-DE-DET-B90D). Letras iguais apresentam valores significativamente diferentes.. $P < 0.05$ (teste de Comparação Múltipla - Tukey-Kramer).

Entre os sedentários e exercitados tratados com US, Controles e Diabéticos, comparados com o padrão, os resultados mostram que o tratamento com US foi positivo, tanto nos diabéticos sedentários quanto nos exercitados, o que não aconteceu com os controles com o mesmo tipo de tratamento (figura 30).

Figura 30 – grau de birrefringência (CST-CET-DST-DET-B90D). Letras iguais apresentam valores significativamente diferentes.. $P < 0.05$ (teste de Comparação Múltipla - Tukey-Kramer).

Os Sham Controle e Diabético, comparados com o padrão Basal 90 dias, mostram que apenas o grupo Sham diabético apresentou uma reorganização das fibras de colágeno (figura 31).

Figura 31 – grau de birrefringência (CSh-DSh-B90D). Letras iguais apresentam valores significativamente diferentes. $P < 0.05$ (teste de Comparação Múltipla - Tukey-Kramer).

De forma a visualizar esses resultados, imagens foram obtidas através de microscopia de luz polarizada de alguns dos grupos estudados. Através destas, é possível perceber a orientação, a deposição de fibras no sítio da osteotomia e seu brilho característico (luz) (figura 32).

Figura 32 – luz e extinção das fibras de colágeno dos grupos estudados.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, realizamos quatro tipos diferentes de avaliações na intenção de observar os resultados através de diversos ângulos e que os tornassem mais fidedignos.

A glicemia apresentou seus valores padrão tanto para os controles como para os diabéticos, exceto o grupo Sham Diabético que, apesar de apresentar glicemia superior aos limites de normalidade, em se tratando de diabéticos (211,5 mg/dl), não atingiu o padrão estabelecido nesta pesquisa. Este grupo foi refeito duas vezes e mesmo assim o problema se manteve. Por esse motivo, consideramos os valores da glicemia do mesmo por se encontrarem em estado hiperglicêmico já que, esta situação caracteriza alguns comportamentos fisiológicos o que pode justificar alguns resultados encontrados.

Em se tratando dos animais sedentários, o grupo DSh apresenta glicemia média, estatisticamente diferente do grupo DST, o que pode explicar a maior consolidação óssea do grupo sham, já que a severidade da doença é diagnosticada, principalmente por altos níveis de glicemia, os quais indicam um maior comprometimento da estrutura óssea. Embora o DSh também se encontre no estado hiperglicêmico, sua glicemia média é muito inferior ao grupo DST, indicando que, quanto maior a glicemia, maior será o comprometimento do tecido ósseo causado pela relação com o estado diabético.

Através da avaliação glicêmica pudemos analisar mais criteriosamente os resultados das demais avaliações, visto que esta, tem um papel fundamental na caracterização do quadro diabético ou não e assim, estar diretamente ligadas com às respostas encontradas.

A avaliação radiológica permitiu observar quantitativamente a formação ou não do calo ósseo. Portanto, observa-se que, em média, o grupo controle obteve maior percentual de consolidação óssea comparado ao grupo diabético. No entanto, quando cruzamos os grupos, evidenciamos as diferenças de consolidação óssea, especialmente nos grupos diabéticos exercitados.

O exercício físico e os esportes aumentam a massa muscular e o processo de remodelagem dos ossos. Este aumento depende do tipo e da qualidade do esporte (FELSENBERG e GOWIN, 1998). Embora as atividades físicas que envolvam cargas sejam consideradas efetivas na manutenção do metabolismo ósseo, o tipo de atividade que, de fato, apresenta benefícios para o tecido ósseo ainda é controverso (BEMBEN, 1999).

Especificamente nos animais dos grupos diabéticos, as radiografias apresentaram maior percentual de consolidação quando comparados aos controles. Nestes, o exercício não exerceu efeitos quantitativamente positivos na consolidação óssea. Como citado, este dado pode estar de encontro com estudos que afirmam que exercícios com cargas ou de impactos sejam melhores quando se trata de aumento de massa óssea.

Como descrito, o DM tipo I está associado com baixo nível de consolidação de fraturas ósseas (GEBAUER, 2002). No entanto, avaliando especificamente os dados radiológicos, pode-se dizer que o percentual de consolidação foi maior nos animais diabéticos exercitados e nos exercitados e tratados com ultra-som comparados aos controles. Apesar dos resultados, estes ainda não são suficientes para afirmar se os tratamentos utilizados foram ou não eficientes na melhoria da qualidade óssea de animais diabéticos. Por outro lado, observando o comportamento dos grupos controle (CE e CET), verifica-se que o ultra-som também foi efetivo em aumentar o percentual de consolidação óssea. Embora os resultados dos grupos DE e DET, tenham sido os mesmos, o que se pode afirmar é que, o tratamento com o exercício físico e com o ultra-som obteve, no mínimo, os mesmos efeitos. Portanto, neste caso, tanto a atividade física quanto o US, aumentaram a capacidade de consolidação óssea em ratos diabéticos.

Entre os grupos sedentários, a consolidação foi mais efetiva no grupo Controle, o que não ocorreu nos Diabéticos, demonstrando o comprometimento do Diabetes no tecido ósseo. Beam et al (2002), analisando a consolidação de fraturas em pacientes com DM, demonstrou significante atraso da consolidação de fraturas, bem como não consolidação e pseudoartrose.

Visto que, o ultra-som pulsado de baixa intensidade produz efeitos multifuncionais que são muito relevantes para a formação e reabsorção óssea, e que esta estimulação ultra-sônica vem mostrando acelerar a cicatrização de ossos fraturados bem como a regeneração de osso trabecular (SUN, 2001), percebe-se que no grupo CST, o US foi eficaz em aumentar o percentual de consolidação, mas não nos DST.

Os animais dos grupos sham controle também apresentaram maior percentual de consolidação óssea que os diabéticos, uma vez que, o Diabetes possui a capacidade de mudar as propriedades do tecido ósseo e de dificultar a consolidação de uma fratura (FUNK et al, 1997).

A avaliação radiológica nos permitiu apenas quantificar o percentual de consolidação óssea. Embora importantes esses dados não são suficientes para que se pudesse afirmar a qualidade desse calo ósseo neoformado. Por esse motivo, a avaliação

histológica se faz necessária. Apesar desta avaliação ser qualitativa, é perfeitamente possível verificar, a formação ou não de calo ósseo.

Histologicamente, o comportamento do tecido ósseo apresenta resultados qualitativos que nos permite observar a característica do calo ósseo formado, ou seja, em que fase ou momento está o processo de remodelação. Isto porque, como vimos, a remodelação óssea passa por algumas importantes fases, nas quais, a presença de células específicas, nos permite determinar a qualidade desse osso neoformado. Os vasos sangüíneos são a chave para o processo de osteogênese. A inadequada ou imprópria vascularização do osso está relacionada com a diminuição da formação óssea e com a perda de massa óssea (RICHARD et al, 2003). Através desses conhecimentos foi possível diagnosticar o estágio que o reparo ósseo se encontrava

É importante ressaltar que, as lâminas em geral, apresentam um aspecto esboroadado que apenas foi percebido após sua confecção, no entanto, embora o aspecto estético não seja o esperado, isto não comprometeu a avaliação dos resultados.

Os achados histológicos mostram que, em termos gerais, tanto os Controles quanto os Diabéticos, revelam presença de cartilagem, concordando com os resultados de Funk et al (1997). A presença de osso primário ou imaturo, em diferentes níveis e quantidades, é notável em todos os grupos, ressaltando com isso, as adaptações do tecido ósseo frente ao tratamento recebido.

Entre os Controles, o exercitado demonstrou maior quantidade de osso primário que o sedentário, o qual apresenta maior número de condroblastos e, portanto, um osso mais imaturo, ou seja, percebe-se que ainda é uma fibrocartilagem. Estes resultados parecem ser bastante fidedignos por se tratar de animais sedentários. A inibição da osteogênese durante o processo de reparo de fraturas em animais resulta em formação de um tecido fibroso (RICHARD et al, 2003). Esta avaliação diferencia-se da radiológica uma vez que, nesta o maior percentual de consolidação foi do grupo CS, no entanto, a histologia provou que, a qualidade do osso exercitado é superior ao sedentário. Como é sabido, a atividade física e esportes em geral são benéficos para a saúde. Particularmente, o exercício físico é benéfico para o tecido ósseo. Os efeitos positivos no osso são primariamente baseados em dois aspectos: 1) a inatividade, imobilização e diminuição do peso levam a uma grande perda de massa muscular bem como da força e, conseqüentemente perda de massa óssea; 2) estudos mostram que uma população fisicamente ativa, assim como os atletas, tem mais massa óssea do que a população comum, que não é fisicamente ativa..(FELSENBERG e GOWIN, 1998).

Os Controles exercitados e tratados apresentam um tecido ósseo mais organizado devido à presença de osteócitos. Estas são células de revestimento interno ósseo, resultaram de diferenciação dos osteoblastos. A partir desses resultados podemos observar as diferenças entre as avaliações histológica e radiológica, onde esta última apresenta os grupos CE e CET com o mesmo percentual de consolidação, no entanto, quando avaliamos histologicamente, percebemos que o grupo CET apresenta um osso mais maduro e organizado, o que pode ser explicado pelo tratamento com o US, já que esta técnica vem apresentando resultados bastante satisfatórios quando se trata de remodelamento ósseo. O ultra-som pulsado de baixa intensidade é uma técnica de cicatrização de fraturas bastante utilizada para esse fim (DUARTE, 1983 e KWOK-SUI, 2004).

Mesmo um pouco menos desorganizado que o grupo CET, o CST apresenta um tecido mais maduro, com visível presença de fileira de osteoblastos - células responsáveis pela deposição óssea – o que significa que o osso já está voltando a sua forma normal ou madura. Comparando as avaliações histológicas e radiológicas, observa-se sua compatibilidade de informações, ou seja, realmente, o tratamento de animais sedentários foi efetivo quando estes foram tratados com US. Estes dados concordam com o estudo Warden et al (2001), onde, mesmo com aplicação de 6 semanas de US, este foi suficiente para que o osso respondesse ao estímulo.

Em se tratando dos animais diabéticos, o exercitado apresenta formação óssea irregular, com áreas mais evoluídas que outras. O sedentário tem um perfil semelhante ao anterior, no entanto, nas áreas mais evoluídas, este apresenta mais osso primário que o exercitado. Neste caso, o tratamento com exercício parece não ter tido grande influência na melhoria da qualidade óssea. De acordo com Richard et al (2003), entre os fatores de risco que debilitam a consolidação óssea, estão: pobre suprimento de vasos sangüíneos, interposição de tecidos moles ou necrose óssea entre os fragmentos ósseos, imobilização inadequada, infecção, idade avançada, doenças sistêmicas como o Diabetes entre outros. Estes dados apresentam incompatibilidade quando comparados com os radiológicos, já que nestes, o percentual de consolidação foi maior nos exercitados, mostrando que apenas uma avaliação não é suficiente para se chegar a uma conclusão definitiva.

Da mesma forma que os controles, os diabéticos sedentários e exercitados e tratados com US, as imagens histológicas mostram que, diferente do DST, o grupo DET apresenta osso mais maduro, com maior formação de osso primário. Estes dados

também concordam com os radiológicos. Se individualmente, o exercício e o US mostraram seus benefícios histológicos no tratamento de osteotomias experimentais como no caso do CE e do CST, quando juntas, essas formas de tratamento, são ainda mais efetivas na consolidação óssea e na melhoria da qualidade desse osso. Assim como a atividade física apresenta seus benefícios para o tecido ósseo, seja na manutenção ou no processo de remodelação (JUNQUEIRA et al, 2001), o tratamento com US também tem mostrado inúmeros estudos onde sua atuação, especialmente no reparo de fraturas ósseas, vem obtendo resultados positivos nesse sentido. Estes resultados também foram encontrados por Valério et al (2004) onde o tratamento com US parece ser uma ferramenta de proteção para os distúrbios ósseos em crianças e adolescentes com DM tipo I.

Em se tratando dos grupos Sham, o diabético mostrou histologicamente, um osso mais maduro que o controle.

Finalmente, as análises ao microscópio de luz polarizada, nos permitiu observar o grau de alinhamento das fibras de colágeno do calo ósseo formado. A eficácia biomecânica do osso como um tecido, é largamente determinada pelas fibras de colágeno com preferência de organização e distribuição (BROMAGE et al, 2003). O colágeno tipo I é a proteína mais abundante do osso, correspondendo a 85% da matrix orgânica óssea. Em adição à sua estrutura, evidências indicam que o colágeno é de grande importância na interação da matrix celular do osso e que pode ser muito importante na regulação do crescimento e diferenciação das células osteoblásticas (KATAYAMA et al, 1997). Há portanto, ampla evidência de que apenas mudanças nas moléculas de colágeno podem alterar o risco de fraturas (BURR, 2002).

Neste caso temos como grupo padrão, o grupo Basal 90 dias pelo fato de ter a mesma idade dos demais grupos osteotomizados e não sofrer nenhum tipo de intervenção óssea.

Nossos resultados nos mostram que, o CE não apresentou um grau de alinhamento satisfatório quando comparamos ao Basal, diferentes dos demais que tiveram valores muito próximos ao padrão. Apesar do DS apresentar maior grau de alinhamento das fibras do que o DE, observa-se que, o exercício foi mais eficiente na reorientação das fibras de colágeno nos animais diabéticos do que no controle também exercitado, sugerindo mais uma vez, sua eficiência não apenas no tratamento como, inclusive na melhoria da qualidade desse osso nesta patologia. Estes resultados confirmam os da literatura a qual indica que a natação não é o melhor estímulo para remodelamento

ósseo. A natação tem sido prescrita mais com objetivo de melhoria da amplitude articular do que para estimular o metabolismo ósseo (PAPLER e MEIRELLES, 1999).

Comparando os grupos Sedentários, tanto Controles como Diabéticos, observamos que, entre os controles, o tratamento com US não melhorou o grau de birrefringência. O efeito do US de baixa intensidade em acelerar a consolidação de fraturas tem sido reconhecida através de experimentos com animais bem como em estudos clínicos (DUARTE, 1983 e SATO et al., 1999). Dessa forma, percebemos que, radiológica e histologicamente este grupo apresentou resultados bastante satisfatórios não apenas no percentual de consolidação como na qualidade desse osso. Apesar disso, nossos resultados não nos mostra que esta consolidação tenha seguido um grau de realinhamento adequado das fibras de colágeno. Nesse sentido, vale salientar que, talvez, um dos motivos que tenha contribuído para isso, seja a posição e o local que o animal ficava ao ser aplicado o aparelho de US. Neste ambiente, especialmente o animal sedentário, se movimentava bastante o que dificultava, algumas vezes, a aplicação do US.

Entre os Diabéticos também sedentários e tratados, os resultados foram bastante satisfatórios. Considerando as explicações sobre o local em que o animal era mantido para tratamento ultrassônico, podemos afirmar que, o DS não teve esse problema por não ser tratado e que o DST apresentava muito mais letargia – característica do Diabetes – facilitando a aplicação do tratamento.

Entre os exercitados, os resultados foram positivos apenas nos animais diabéticos, tanto exercitado quanto tratados com US. Os controles não demonstraram efeitos benéficos no grau de birrefringência. Neste caso, ressalta-se o grupo DET, que obteve grau de birrefringência maior que o considerado como padrão. Um estudo histomorfométrico experimental de Swissa-Sivan, (1989), com ratos, mostrou aumento do osso trabecular subepifisal do fêmur com protocolo de natação. E Sato et al (1999) mostraram a eficácia do US de baixa intensidade em acelerar a consolidação de fraturas ósseas com uma diminuição significativa do tempo de consolidação. Isso indica os efeitos potencializadores tanto do exercício físico quanto do US.

Se compararmos os tratamentos, perceberemos que, nos Controles o grupo CST apresentou melhores resultados que o CET, embora ambos não tenham atingido os níveis padrão de birrefringência. Isto pode indicar que o exercício não parece ser um bom estímulo para reorganização das fibras colágenas. Entre os Diabéticos também

houve diferenças, no entanto, ambos atingiram o grau de birrefringência esperado e superado pelo grupo DET.

O grupo Sham Diabético indica uma boa organização das fibras colágenas através do grau de birrefringência, ao contrário do Controle.

Comparando então o CSh com o CST, nota-se que não houve diferenças entre eles e que ambos apresentaram diferenças significativas quando comparados ao basal. Neste caso, o tratamento com US e Sham tiveram os mesmos efeitos. Entre os Diabéticos, o DSh e o DST não apresentaram diferenças entre si da mesma forma que não foram diferentes do grupo padrão, indicando que, mesmo o US não tendo superado os valores do sham, pelo menos apresentou um bom alinhamento das fibras de colágeno. Dessa maneira, pode-se dizer, baseado nos dados da literatura já descritos que, o tratamento com US foi efetivo em melhorar a organização fibras colágenas garantindo assim, um osso mais forte e denso.

A fim de visualizarmos as fibras colágenas, expomos algumas imagens obtidas através do microscópio de luz polarizada. Como dito, o colágeno é um material anisotrópico, indicando que, quando suas fibras são alinhadas transversalmente à direção de propagação da luz, há uma mudança na direção da refração da luz, resultando em um brilho máximo. Por outro lado, quando as fibras de colágeno são alinhadas ao longo do eixo de propagação da luz, não ocorre nenhuma refração e a amostra aparece escura ou extinta.

A avaliação do grau de birrefringência nos permitiu observar que os animais Diabéticos, tanto os exercitados quanto os tratados apresentaram melhores resultados que os controles. Dessa forma, pode-se afirmar que o exercício e o US melhoraram a qualidade do osso diabético assim como os fortaleceu, visto que o colágeno é uma estrutura que favorece força e rigidez ao tecido ósseo..

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, a avaliação histológica nos permitiu observar a qualidade do osso osteotomizado (fíbula) através do exercício físico e do tratamento com ultra-som. Quanto à qualidade óssea, os resultados mais evidentes foram dos grupos Controle Exercitado (CE), Controle Exercitado Tratado (CET) e Controle Sedentário Tratado (CST) e, entre os Diabéticos, os grupos: Diabético Sedentário (DS), Diabético Exercitado Tratado (DET) e Diabético Sham (DSh) indicando que tanto o exercício quanto o US melhoraram a qualidade do calo ósseo neoformado.

Por outro lado, a avaliação do grau de birrefringência nos permitiu observar que os animais Diabéticos, tanto os exercitados quanto os tratados apresentaram melhores resultados que os controles.

Isso nos faz concluir que o tratamento com ultra-som de baixa intensidade combinado ao exercício físico foi mais eficaz na consolidação de osteotomias experimentais.

8. SUGESTÕES

A fim de esclarecer melhor o papel do estímulo ultra-sônico e do exercício físico, sugere-se para trabalhos futuros, o uso desses dois procedimentos isoladamente.

REFERÊNCIAS

ARNER, P. (1999)..Physiopathology of visceral adipose tissue..In: INTERNATIONAL CONGRESS ON OBESITY, 8., 1998, França..**Progress in Obesity Research**..[S.l.:s.n.]..Cap.67, p.567-572.

ASCENZI, A; BENVENUTI, A. (1996). Orientation of collagen fibers at boundary between two successive osteonic lamellae and its mechanical interpretation. **J Biomech** 19: 455-463.

BANERJI, M.A. (2002)..Impaired beta-cell and alpha-cell function in African-American children with type 2 diabetes mellitus – “Flatbush Diabetes”..**Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, Israel, v.15, supl.1, p.493-501, Apr.

BEAM, H.A.; PARSONS, R.; LIN, S.S. (2002)..The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus..**Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.20, n.6, p.1210-1216, Nov.

BEMBEN, D.A. (1999)..Exercise interventions for osteoporosis prevention in postmenopausal women..**Journal of the Oklahoma State Medical Association**, Oklahoma, v.92, n.2, p.66-72, Feb.

BETTERIDGE, J.; VINCE, M. (1997)..**Dyslipidemia**. In: OBESITY..Mitfords: Colwood House Medical.

BROMAGE, et al. (2003). Circularly polarized light standards for investigation of collagen fiber orientation in bone. **The anatomical record** (part B: New Anat.), New York, 274B: 157-168.

BRAGA, W.R.C. (2002). **Diabetes Mellitus**..2.ed..São Paulo: Medsi..p.349-362.

BURR, D.B. (2002). The contribution of the organic matrix to bone's material properties. **Bone**, USA, v.31, n.1, p.8-11, july.

CAMPOS, D.P.R. (entre 1991 e 1992)..Diabetes Melito: considerações diagnósticas, classificação e controle..**Laes/Haes**, São Paulo, p.20-48, dez./jan.

DAUGGARD, J.R. et al. (2000)..Fiber type-specific expression of Glut 4 in human skeletal muscle: influence of exercise training..**Diabetes**, New York, v.49, n.7, p.1092-1095, July.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. (2004)..Modeling bone tissue fracture and healing: a review..**Engineering Fracture Mechanics**, New York, v.71, n.13/14, p.1809-1840, Sept.

DUARTE, A.C.G.O. (1996)..**Estudo experimental dos efeitos da estimulação ultra-sônica de baixa intensidade na consolidação óssea em ratos submetidos ao diabetes aloxânico**..Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1996.

DUARTE, F.O. (2001)..**Adaptações metabólicas a dois tipos de treinamento moderado de natação, contínuo e intermitente, em ratos machos adultos alimentados com dieta normocalórica e hipercalórica**..Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002

DUARTE, L.R. (1977)..**Estimulação ultra-sônica do calo osseo**..Tese (Livre-Docência) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1977.

DUARTE, L.R. (1983)..The stimulation of bone growth by ultrasound..**Archives of Orthopaedic Traumatic Surgery**, Munchen, v.101, n.3, p.153-159.

DUARTE, L.R. (1985)..**Methods for healing fractures with ultrasound**..United States Patent..N.4.530.360, 12 Nov. 1982, 23 July 1985.

DYSON, M. (1987)..Mechanisms involved in therapeutic ultrasound..**Physioterapy**, London, v.73, n.3, p.116-120, Mar.

FALK, D.S; BILL, D.R; STORK, D.G. (1986). Scattering and polarization. In: seeing the light: optics in nature, photography, color, vision and holography. New York: Harper & Publishers, cap. 13, p. 347-366.

FARREL et al. (1999). Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. **The American Physiological Society**, Pennsylvania, p. 1075-1082, May.

FELSENBERG, D.; GOWIN, W. (1998)..Bone densitometry: applications in sports-medicine..**European Journal of Radiology**, Amsterdam, v.28, n.2, p.150-154, Sept.

FERRARI, A.L. (1987)..**Efeito da interação do ultra-som com sistemas biológicos: revisão de literatura..Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1988.**

FUKADA, E.; YASUDA, I..(1957). On piezoelectric effect of bone. **Journal of the Physiological Society of Japan**, Japan, v.12, n.10, p.1152-1162, Oct.

FUNK, J. et al. (1997). Biomechanical evaluation of fracture healing in normal and diabetic rats. **American Society of biomechanics**, South Carolina, p.24-27, September.

GEBAUER, G.P. et al. (2002). Low-intensity pulsed ultrasound increases the fractures callus strength in diabetic BB wistar rats but does not effect cellular proliferation..**Journal of Orthopaedic research**, New York, v.20, n.3, p.587-592, May.

GUERINO, M.R. et al. (1999)..Effects of chronic physical activity and of ultrasound treatment on bone consolidation..**Physiological Chemistry and Physics and Medical**, Melville, v.31, n.2, p.131-138.

GUYTON; HALL. (2002). **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 10º ed. 973p.

HANSEN, B.C.; SAYE, J.; WENNOGLE, L.P. (Ed.). (1999)..The metabolic syndrome X: convergence of insulin resistance, glucose intolerance, hypertension, obesity, and

dyslipidemias-searching for the underlying defect..**Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.892, p.1-24, Nov.

HARDMAN, A.E. (1999)..Physical activity, obesity and blood lipids..**International Journal of Obesity**, London, v.23, Suppl.3, p.S64-S71.

HONG, Y. et al. (1998)..Familial clustering of insulin and abdominal visceral fat: the HERITAGE family study..**Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Lawrence, v.83, n.12, p.4239-4245.

JOHN, L.I.; TED, W.Z.; DONAVAN, L.F. (1999)..Prevention and treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus..In: HOLLOSZY, J.O. (Ed.)..**Exercise and sports sciences reviews**..Baltimore: William & Wilkins..v.27, cap.1, p.1-35..(American College of Sports Medicine Series).

JONES, K.L. (2000)..The management of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents..In: ANNUAL MEETING THE ENDOCRINE SOCIETY, 82., 2000, Toronto..**Program & Abstracts**. Toronto: Endocrine Society.

JUNQUEIRA, P.A.A. et al (2001). Osteoporose. **Revista de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v.12, n.3, p.142-156.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. (1974). Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 3º ed. 482p.

KATAYAMA, Y. et al (1997). Nonenzymatic glycation of type I collagen modifies interaction with UMR 201-10B preosteoblastic cells. **Bone**, Austrália, v.21, n.3, p.237-242. September.

KAWANAKA, K. et al (1997)..Changes in insulin-stimulated glucose transport and GLUT-4 protein in rat skeletal muscle after training..**Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.83, n.6, p.2043-2047, Dec.

KUZUYA, T. et al. (2002). Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus..**Diabetes Research and Clinical Practice**, v.55, n.1, p.65-85, Jan..

KWOK-SUI, L. et al. (2004). Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Hong Kong, v.30, n. 1, p. 389-395, Nov.

LERARIO, D.D.G. et al. (2002).Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.1, p.4-11, fev.

LEUNG, K.S. et al (2004).Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound..**Ultrasound in Medicine and Biology**, Amsterdam, v.30, n.3, p.389-395, Mar.

MACHADO, L.J.C.; OLIVEIRA JÚNIOR, A.R. (2002). **Insulina**. BRAGA, W.R.C. (Ed.)..Diabetes mellitus..Rio de Janeiro: Medsi..v.1, p.491-502.

MARCUS, R. et al. (1996). **Osteoporosis**..Londres: Academic Press.

MARTINI, F.H. (1998). **Fundamentals of anatomy and physiology**. 4thed. New Jersey: Prentice Hall.

MARTINS, D.M. (2000)..**Exercício físico no controle do Diabetes Mellitus**. São Paulo: Phorte.

MASON, W.P. (1981). Piezoelectricity, its history and applications. **Journal of Acoustical Society of America**, New York, v.70, n.6, p.1561-1566, Dec.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2004).

Disponível em:<<http://hiperdia.datasus.gov.br>>. Acesso em: 31 ago. 2004.

MISHIMA, N. et al. (2002). Effect of streptozotocin-induced diabetes melitus on alveolar bone deposition in the rat..**Archives of Oral Biology**, New York, v.47, n.12, p.843-849, Dec.

NOLASCO, M.A. (1993)..**Efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos**..Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1993.

PAPLER, P.G.; MEIRELLES, E.S. (1999)..Osteoporese e exercícios..In: GREVE, J.M.A.;AMATUZZI, M.M..**Medicina de reabilitação aplicada a ortopedia e traumatologia**..São Paulo: Roca..p.361-380.

PIETROBELLI, A. et al. (1999). An independent, inverse association of high-density-lipoprotein-cholesterol concentration with nonadipose body mass..**American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.69, n.4, p.614-620, Apr.

REDDY, G.K. et al. (2001)..The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes..**Diabetes Research and Clinical Practice**, Brookvale Plaza, v.54, n.1, p.1-8, Oct.

RICHARD, A.D. et al. (2003). Angiogenesis and bone repair. **Research Focus**, USA, v.8, n.21, p. 980-989. November.

RICHTER, E.A.; DERAIVE, W.; WOJTASZEWSKI, J.F. (2001)..Glucose exercise and emerging concepts..**Journal of Physiology**, London, v.535, n.2, p.313-322, Sept.

RICHTER, E.A. et al. (1992)..Metabolic responses to exercise effects of endurance training and implications for diabetes..**Diabetes Care**, New York, v.15, n.11, p.1767-1776, Nov.

RIX, M.; ANDREASSEN, H.; ESKILDSEN, P. (1999)..Impact of peripheral neuropathy on bone density in patients with type I diabetes..**Diabetes Care**, New York, v.22, n.5, p.827-831, May.

SACCO, I.C.N. (2001). Influência da neuropatia diabética no comportamento de respostas biomecânicas e sensoriais no andar em esteira rolante. **Tese (Doutorado)**- Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo: [s.n], 164 p.

SANTOS, J.W. (2000)..**Efeitos do treinamento físico prévio sobre a severidade do diabetes induzido por dose única de aloxana em ratos**..Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2000.

SARVAZYAN, A.P. (1993). Some general problems of biological action of ultrasound..**IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics**, New York, v.30, n.1, p.2-12, Jan.

SATO, W.; MATSUSHITA, T.; NAKAMURA, K. (1999). Acceleration of increase in bone mineral content by low-intensity ultrasound energy in leg lengthening. American Institute of Ultrasound in Medicine..**Journal of Ultrasound in Medicine**, Philadelphia, v.18, n.10, p.699-702, Oct.

SILVA, C.C. et al. (2001). Collagen – hydroxapatite films: piezoelectric properties..**Materials Science and Engineering B**, v.86, n.3, p.210-218, Oct.

SILVA, R.C.; DIB, S.A. (2002)..Patogênese e prevenção do diabetes mellitus tipo 1..In: BRAGA, W.R.C. (2002). **Diabetes Mellitus**..2.ed. São Paulo: Medsi..p.349-362.

SUN, J.S. et al. (2001). In vitro effects of low-intensity ultrasound sti on the bone cells. **Biomedical Mater Research**. Taipei, v. 57, n. 3, p. 449-456, Dec.

SWISSA-SIVAN, A. (1989). Effect of swimming on bone growth and development in Young rats..**Bone and Mineral**, Amsterdam, v.7, n.2, p.91-105, Sept.

TEIXEIRA, L.; MACHADO, A.C. (1999). Diabetes mellitus – novos critérios de classificação e diagnóstico..In: VILLAR, L. **Endocrinologia clínica**. Rio de Janeiro: Medsi. Cap. 28, p.353-381.

THULESEN, J. et al. (1997)..Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats..**Endocrinology**, Springfield, v.138, n.1, p.62-68, Jan.

TOMAS, E.; ZORZANO, A.; BUDERMAN, N.B. (2002)..Exercise effects on muscle insulin signaling and action exercise and insulin signaling: a historical perspective..**Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.93, n.2, p.765-772, Aug.

UENO, N. et al. (1997)..Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice: GDP binding and UCP m-RNA expression..**Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.95, n.1, p.92-104, Jan.

VALERIO, G. et al. (2004). Quantitative ultrasound of proximal phalanxes in patients with type 1 diabetes mellitas. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Italy, v. 64, p. 161-166. October.

VIANA, F.P. et al. (2001)..Dislipidemias..In: DÂMASO, A.R. (Coord.)..**Nutrição e exercício na prevenção de doenças**..São Paulo: Medsi..Cap.8, p.201-219.

VIDAL, B.C. (1987b). Métodos em biología celular. In: VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Biología celular**. Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu, p 5-40.

VILAR, L. et al. (1999)..**Endocrinologia clínica**..Rio de Janeiro: Medsi.

WARDEN, S.J. et al. (2001). Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury. **Bone**, Austrália, v. 29, n.5, p. 431-436. November.

WILD, S. et al. (2004)..Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030..**Diabetes Care**, New York, v.27, n.5, p.1047-1053, May.

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. (2001)..**Fisiologia do esporte e do exercício**..Tradução de Marcos Ikeda..2.ed..São Paulo: Manole.

WING, R.R. et al. (2001)..Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity, eating behavior, and physical activity..**Diabetes Care**, New York, v.24, n.1, p.117-123, Jan.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2003)..Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/diabetes/en/>>..Acesso em: 31 Aug. 2004.

XAVIER, C.A.M.; DUARTE, L.R. (1983). Estimulação ultrassônica no calo ósseo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.18, n.3, p.73-80, maio-junho.