



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**MARCOS PAULO GALDINO COUTINHO**

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA DE RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS AO TREINO  
RESISTIDO.**

**RECIFE**

**2015**

**MARCOS PAULO GALDINO COUTINHO**

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA DE RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS AO TREINO  
RESISTIDO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Grau de Mestre em Fisioterapia.

**Linha de Pesquisa:** Desempenho físico-funcional e qualidade de vida.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Regina Arruda de Moraes.

**RECIFE  
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

C871a Coutinho, Marcos Paulo Galdino.  
Avaliação do comportamento da musculatura esquelética de ratos diabéticos submetidos ao treino resistido / Marcos Paulo Galdino Coutinho. – Recife: O autor, 2015.  
118 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Sílvia Regina Arruda de Moraes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, 2015.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Diabetes Mellitus. 2. Exercício. 3. Fenômenos Biomecânicos. 4. Miosinas. 5. Ratos Wistar. I. Moraes, Sílvia Regina Arruda de. (Orientadora). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-169)

**“AVALIAÇÃO DO COMPARTAMENTO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS AO TREINO RESISTIDO”.**

**MARCOS PAULO GALDINO COUTINHO**

**APROVADA EM: 30/4/2015**

**ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SÍLVIA REGINA ARRUDA DE MORAES**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANNA MYRNA JAGUARIBE DE LIMA – MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL / UFRPE**

---

**PROF<sup>o</sup>. DR. EDUARDO CARVALHO LIRA – FISILOGIA E FARMACOLOGIA / UFPE**

---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DENISE MARIA MARTINS VANCEA – EDUCAÇÃO FÍSICA / UPE**

**Visto e permitida à impressão**

---

**Coordenadora do PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE**

Com toda gratidão e amor, dedico esta Dissertação:

Aos meus Pais, *Maria de Lourdes e Carlos Alberto*, por terem me dado o dom da vida e me ensinado princípios que servem como um alicerce muito firme em todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, *Marciana Galdino e Flávio Galdino*, pela presença, amizade, e o amor em todos os momentos dessa vida.

Aos membros da Família Galdino e Coutinho pelo incentivo e incondicional torcida pelo meu sucesso.

## AGRADECIMENTOS

Se tornar mestre foi um sonho cultivado desde a graduação, e que sensacional é chegar até aqui e sentir essa conquista! E esses dois anos dedicados ao mestrado, sem dúvida, foram engradecedores em todos os aspectos, ganhei ensinamentos e adquiri valores que levarei para vida toda, e eles não foram apenas aprendizados científicos, ou seja, vão muito além do que eu esperava. E como toda boa jornada e luta travada com êxito, recebi ajuda de grandes pessoas e com todo amor agradeço...

A Deus, pelo dom da vida e pelo amor que emana de sua existência recebido por todos os que acreditam em vós, pois é por meio desse que conseguimos forças para travar qualquer batalha. Deus você que sabe de tudo!

Ao meu porto seguro, Minha Mãe, *Maria de Lourdes*. Mãe, Obrigado por tudo que você faz e fez em minha vida, sou grato por ter seu amor e estar ao seu lado aprendendo valores os quais não existem preços que paguem para recebê-los. Mulher de fé, com um espírito elevadíssimo em Deus o tempo todo, e que com tantos problemas de saúde consegue batalhar seu dia-dia sempre em prol de nossa família. Amo-te muito e sempre vou te amar e admirar.

Ao meu Pai, *Carlos Alberto*, que do seu jeito, sempre batalhou pelo meu sucesso. Amo muito você e reconheço todo seu esforço!

Aos meus irmãos, *Marcy Galdino e Flávio Galdino*, obrigado por estarem ao meu lado por toda uma vida e me proporcionando momentos felizes. Amo muito vocês!

A todos os familiares das Famílias Galdino e Coutinho, agradeço imensamente por vocês estarem sempre comigo, minha maior torcida.

Aos meus amigos de toda uma vida *Daniel Joventino, Eneas Henrique, Patrícia Verçosa, Rennan gondim, Arthur Perrier, Marcos Vinicius Amaral e Bruna Soares*. Obrigado por todo apoio em todos os momentos difíceis e pelas alegrias quando estamos juntos.

Aos meus amigos da faculdade, em especial *Patrícia Verçosa, Rennan Gondim, Camilla Montarroyos Lana Loibman, Nathalia Padilha, Amanda Santiago e Denielle los*. A amizade de vocês é muito importante em minha vida.

A minha Orientadora, *Sílvia Moraes*, pelo aprendizado, amizade, e respeito desde a época da iniciação científica até essa etapa do mestrado. Obrigado por tudo.

Aos meus *irmãos científicos* do LAPLAN: *Patricia Verçosa, Ana Cristina, Márcio Bezerra, Deniele Lós, Cybelle Nery, Camilla Rodrigues, Kamilla Dinah, Suzy Kelly, Marcos Vinícius Amaral, Bruna Soares, Karyne Albino, Gabriel Mesquita, Ana Camila, Rafael Dornelas, Filipe Miranda, Rodrigo Valte, Marina Lira, Diogo Arruda, Elvis Rodrigues, Marina Cerqueira, Sílvia Marques e Layla Marjorye*, o apoio durante essa caminhada foi essencial, e sem a presença de vocês nada tinha dado certo. Obrigado pelos momentos sempre alegres.

Aos meus Alunos de iniciação científica, *Marcos Vinicius Amaral e Bruna Soares*, por dividirem comigo a construção desse trabalho com tanta responsabilidade e compromisso, verdadeiros parceiros e meus filhos científicos.

Ao Departamento de Engenharia Mecânica (UFPE), em especial ao *Prof. Dario Ferraz e Prof. Luiz Carlos* pela colaboração para iniciar esse trabalho.

Ao Laboratório de Biopolímeros (UFPE), em especial ao Doutorando *Magno Teixeira* pela parceria de longa data. Obrigado pela contribuição essencial.

Aos meus colegas da Turma V do mestrado: *Alessandra Boaviagem, Caio Morais, Rafael Sales, Adriane Cardim, Larissa Sayão, Paula Drielly, Maira*

*Belo, Maira Creusa, Débora, Kassia, Marcellly Kellyane, Bárbara Barros, Lais Holanda, Marian Queiroz, Jasiel Frutuoso, Helen Soares e Gabriela Almeida.*

*Ao Departamento de Fisioterapia da UFPE, especialmente a secretária da pós-graduação, Niége Melo. e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, em especial a professora Andrea lemos.*

*Ao Departamento de Biofísica, em especial ao Professor Cláudio Gabriel*

*A todos os Funcionários do Hospital IMIP e Barão de Lucena, em especial a equipe de Fisioterapia em UTI Neopediátrica: Danielle Maux, Roberta Bionne, Vanessa Vieira, Gabriela Menezes, Jaqueline Bezerra, Ana Patricia, Livia melo, Karyne Albino, Josicleide Sobral, Márcia Angelica, André cerqueira, Alessandra Muniz, Marina Ramos, Rafael Justino, Camilla Rodrigues, Hamanda Medeiros, Anne Cortez, Richelle Novaes, Thiago Ferraz, Renata Consulmagnos, Josevaldo Sobral, Karla Abobreira e todos os outros que fazem parte dessas equipes maravilhosas.*

*Ao CETENE, em especial a Ane Gabriely (Gabi) e Fábria Melo (Fabete) pela colaboração na fase final dessa dissertação, e também pelo carinho e amizade construído nesse período.*

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do treinamento resistido de salto livre com sobrecarga sobre a composição muscular e as propriedades biomecânicas do complexo gastrocnêmio-plantar de ratos induzidos ao diabetes experimental tipo 1. **Métodos:** Foram utilizados oitenta e oito ratos da linhagem *Wistar*, com 60 dias de vida, distribuídos em quatro grupos: Grupo Controle Sedentário – GCS (n=15), Grupo Diabético Sedentário – GDS (n=27), Grupo Controle Treinado – GCT (n=17), Grupo Diabético Treinado – GDS (n=29). A indução ao diabetes foi feita por estreptozotocina. O protocolo de exercício resistido de salto teve duração de 9 semanas. Foram avaliadas glicemia e peso corpóreo dos animais do início ao fim do experimento. Com o término do protocolo de exercício o complexo gastrocnêmio-plantar direito dos animais foram coletados, com parte da amostra (n=65) sendo encaminhada para avaliação das propriedades mecânicas, e a outra parte da amostra (n=22) sendo encaminhada para a imunohistoquímica. **Resultados:** Os animais de todos os grupos diabéticos apresentaram pesos corporais finais inferiores ( $p < 0,05$ ) e valores glicêmicos superiores a 200mg/dl desde a indução até o fim do experimento em relação aos controles. Foi evidenciado uma redução na Força máxima, Deformação, Deformação Específica, Energia/Área, Rigidez, Área de Secção Transversal nos músculos dos animais do GDS comparado aos animais do GCS ( $p < 0,05$ ). A Tensão na Força Máxima e o Módulo Elástico não diferiram entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Com relação ao efeito do treino resistido no diabetes, ao comparar os músculos dos animais do GDT com o GDS observamos aumento para o parâmetro Força Máxima e Rigidez ( $p < 0,05$ ). Nos demais parâmetros não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Foi observado que os pesos dos músculos gastrocnêmios laterais mostraram-se reduzidos no GDS quando comparado ao GCS ( $p < 0,05$ ), comportamento semelhante foi visto na comparação ao GCS com GCT ( $p < 0,05$ ). Já na comparação entre os animais do GDS e GDT não houve diferença significativa. Na análise da miosina rápida e lenta, através da imunohistoquímica, não houve diferença entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** O Diabetes experimental promove prejuízos em parâmetros mecânicos no complexo muscular gastrocnêmio-plantar e o exercício resistido exerce papel protetor na Força Máxima e na Rigidez extrínseca muscular dos animais treinados. Com relação à composição muscular, a miopatia diabética não altera a distribuição normal da miosina rápida e lenta no músculo gastrocnêmio lateral, e o treino resistido de força não apresenta qualquer efeito sobre a distribuição dessa proteína.

**Palavras Chave:** Diabetes *Mellitus*. Músculo. Exercício. Fenômenos Biomecânicos. Miosina. Ratos *Wistar*.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effects of a resistance training protocol on muscle composition and biomechanical properties of the gastrocnemius-plantaris complex of rats induced to experimental diabetes. **Methods:** At the age of 60 days eighty-eight Wistar rats were divided into four groups: Sedentary Control Group - SCG (n = 15), Sedentary Diabetic Group - SDG (n = 27), Trained Control Group - TCG (n = 17), Trained Diabetic Group - TDG (n = 29). Diabetic animals were induced to diabetes by streptozotocin. Exercise protocols had a 9 weeks duration. We evaluated animal's blood glucose and body weight in the beginning and in the end of the experiment. At the end of the exercise protocol the right gastrocnemius-plantaris complex was collected, then part of the sample (n = 65) was referred for evaluation of mechanical properties, and the other portion of the sample (n = 22) was referred to the immunohistochemistry. **Results:** Animals of all diabetic groups showed lower final body weight ( $p < 0.05$ ) and blood glucose levels greater than 200 mg/dl from induction to the end of the experiment compared to control animals. A reduction in maximum strength, deformation, strain, energy/area, stiffness, section transverse area in the muscles of SDG animals compared to animals of SCG was noted ( $p < 0.05$ ). The Maximum Stress and the Elastic Modulus did not differ between groups ( $p > 0.05$ ). Trained diabetic animals showed muscles with increased Maximum Force and Stiffness compared to SDG animals ( $p < 0.05$ ). The other parameters did not differ between the groups ( $p > 0.05$ ). It was observed lower lateral gastrocnemius muscle weights in SDG animals compared to SCG animals ( $p < 0.05$ ). Similar behavior was seen when compared SCG to TCG ( $p < 0.05$ ). In the comparison between the TDG animals and the SDG animals no significant difference was found. In the analysis of fast and slow myosin by immunohistochemistry, there was no difference between groups ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** Experimental diabetes promoted damage in mechanical parameters in gastrocnemius-plantaris complex and resistance exercise had a protective role in Maximum Strength and muscle stiffness of Trained Diabetic Group. With respect to muscle composition, diabetic myopathy did not alter the normal distribution of the fast and slow myosin in the lateral gastrocnemius muscle, and the resistance training had no effect on the distribution of this protein.

**Key Words:** Diabetes Mellitus. Muscle. Exercise. Biomechanical Phenomena. Myosin. *Wistar*, rats.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs - Produtos Finais da Glicação avançada

AST- Área de Secção Transversa

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CC - Componente Contrátil

CEP- Componente Elástico em Paralelo

CES - Componente Elástico em Série

CETENE - Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

CPM - Cadeia Pesada de Miosina

CLM – Cadeia Leve de Miosina

cm – Centímetro

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

C – Celsius

CEEA – Comissão de ética em experimentação animal

COA - Coenzima A

COBEA – Comité Brasileiro de experimentação animal

D – Deformação

DAB - Diaminobenzedina

DE - Deformação Específica

dL - Decilitro

DM - Diabetes Mellitus

E/A - Energia por área

F/ L - Força por largura

FM - Força Máxima

GCS - Grupo Controle Sedentário

GCT - Grupo Controle Treinado

GDS - Grupo Diabético Sedentário

GDT - Grupo Diabético Treinado

GH - Hormônio do Crescimento

GLUT-4 - Transportador de Glicose Tipo 4

h – Hora

IDF- Federação Internacional de Diabetes

IGF1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-6 - Interleucina 6

Kg - Kilograma

Kgf - Quilograma-força

LAPLAN - Laboratório de Plasticidade Neuromuscular

ME - Módulo Elástico

MPa - Mega Pascal.

mm – Milímetro

mM - Milimolar

mG – Milígrama

N - Newtons

OCT - *Optimal Cutting Temperature*

PAI-1 - Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo 1

PFA - Paraformolaldeído

PH - Potencial Hidrogeniônico

s – Segundos

STZ – Estreptozotocina

SPSS – Statistical Package for Social Sciences

TF<sub>máx</sub> - Tensão na Força Máxima

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

USP - Universidade de São Paulo

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Valores médios com os intervalos de confiança do ensaio biomecânico do complexo gastrocnêmio-plantar.....	44
<b>Tabela 2 –</b> Valores médios dos parâmetros biomecânicos.....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Procedimento de indução ao diabetes experimental.....	29
<b>Figura 2.</b> (A) Tanque utilizado para o exercício de salto em meio aquático (B) Demonstração do exercício de salto.....	31
<b>Figura 3.</b> Complexo gastrocnêmio-plantar após dissecação.....	32
<b>Figura 4.</b> Ruptura do ventre muscular durante o ensaio de tração.....	33
<b>Figura 5.</b> Representação gráfica do comportamento biomecânico do músculo .....	34
<b>Figura 6.</b> Peso corporal dos animais ao final do experimento (Artigo 1).....	43
<b>Figura 7.</b> Expressão da glicemia (mg/dL) dos animais ao longo do experimento.....	43
<b>Figura 8.</b> Peso corporal dos animais ao final do experimento (Artigo 2) .....	60
<b>Figura 9.</b> Valores glicêmicos expostos em média dos grupos da pré-indução até o fim do experimento.....	61
<b>Figura 10.</b> Peso corporal dos animais ao final do experimento (Artigo 3).....	85
<b>Figura 11.</b> Valores glicêmicos expostos em média dos grupos da pré-indução até o fim do experimento.....	86
<b>Figura 12.</b> Peso muscular dos animais ao final do experimento.....	87
<b>Figura 13.</b> Valores em pixels da quantificação da miosina rápida (FAST).....	88
<b>Figura 14.</b> Valores em pixels da quantificação da miosina lenta (SLOW).....	88

## SUMÁRIO

<b>1.APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>3.REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
3.1.Diabetes e Alterações no Tecido muscular .....	24
3.2.Diabetes e treino resistido .....	26
3.3.Ensaio mecânico de tração .....	27
<b>4.HIPÓTESES DO ESTUDO.....</b>	<b>28</b>
<b>5.OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
5.1.Geral.....	29
5.2. Específicos .....	29
<b>6.MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
6.1. Desenho do Estudo .....	30
6.2. Local do Estudo .....	30
6.3. Amostra.....	30
6.4. Grupos Experimentais .....	30
6.5. Indução ao Diabetes.....	31
6.6. Avaliação ponderal e da glicemia.....	31
6.7.Treino Resistido.....	32
6.8. Eutanásia e Coleta do Material .....	33
6.9. Ensaio Mecânico.....	35
6.10. Preparação do material coletado.....	37
6.11. Processamento e análise Histológica .....	38
6.12. Análise estatística.....	38

<b>7.RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
7.1 DOES TYPE 1 DIABETES INDUCE BIOMECHANICAL CHANGES IN SKELETAL MUSCLES OF <i>WISTAR</i> RATS?.....	39
7.2 EFEITO DO TREINO RESISTIDO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO COMPLEXO GASTROCNEMIOS-PLANTAR DE RATOS INDUZIDOS AO DIABETES EXPERIMENTAL.....	52
7.3 COMPORTAMENTO DA MIOSINA RÁPIDA E LENTA EM RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS AO TREINO RESISTIDO .....	76
<b>8.LIMITAÇÃO DO ESTUDO .....</b>	<b>95</b>
<b>9.CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO E .....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO F .....</b>	<b>117</b>

## 1. APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi desenvolvida como continuidade dos estudos de uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (LAPLAN) – Departamento de Anatomia da UFPE, que tem como intuito avaliar as alterações do diabetes *mellitus* sobre as estruturas do sistema locomotor em modelos animais e como o treinamento físico pode atuar diminuindo ou prevenindo as alterações em tais comorbidades.

Atualmente o Diabetes Mellitus (DM) é caracterizado como uma pandemia em virtude de suas enormes proporções, considerada, portanto um desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2013). Já está bem estabelecido que essa síndrome promove perturbações em diversos órgãos e sistemas, inclusive o sistema musculoesquelético (DCCT, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As alterações no sistema musculoesquelético quando existentes promovem agravamento no estado geral e de saúde levando a piora na qualidade de vida de indivíduos diabéticos (AKTURK *et al.*, 2002; BOLTON *et al.*, 2005).

Impulsionados por esse conhecimento o LAPLAN vem realizando investigações importantes em animais acerca das alterações do Diabetes no sistema locomotor e avaliando o efeito do exercício físico como terapêutica ou de cunho preventivo.

Baseado em toda a relevância do tema supracitado nosso grupo de pesquisa, inicialmente, avaliou e constatou um estado de fragilidade tendínea em animais com diabetes crônica experimental não controlada (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e, posteriormente verificou os efeitos benéficos do exercício aeróbio em esteira (OLIVEIRA *et al.*, 2012) assim como benefícios do exercício de natação de caráter preventivo (BEZERRA *et al.*, 2013) e terapêutico (NERY *et al.*, 2013) sobre as alterações na estrutura tendínea no diabetes experimental.

Mais recentemente, foi realizado um estudo para avaliar os efeitos de modalidades distintas de exercício na terapêutica das alterações biomecânicas

do tecido ósseo que já são bem estabelecidas na literatura (SILVEIRA *et al.*,2014)

Com relação ao sistema muscular, a literatura especializada demonstra preocupação com as alterações nesse sistema provocada pelo Diabetes *mellitus* e já a caracteriza como Miopatia diabética.

No entanto não se verifica ainda a existência de estudos que avaliem o efeito de um programa de treino resistido na composição muscular e nem como as propriedades mecânicas desse tecido se comportam frente ao quadro de alteração da saúde do sistema musculoesquelético acometido pelo diabetes e como responderia a um programa de treinamento. Isso tudo motivou a elaboração e desenvolvimento desse estudo.

Atendendo às normas vigentes do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Fisioterapia da UFPE para a elaboração da dissertação, o presente exemplar foi estruturado da seguinte maneira:

1. Introdução (contemplando o referencial teórico do tema abordado nessa dissertação)
2. Hipótese
3. Objetivos
4. Materiais e Métodos
5. Referências: do corpo da dissertação.
6. Resultados – apresentação dos resultados desse estudo no formato de três artigos originais:

Artigo Original 1: **O diabetes tipo 1 induz a alterações biomecânicas na musculatura esquelética de ratos *Wistar*?** – teve como objetivo avaliar as propriedades biomecânicas do complexo gastrocnêmios-plantar de ratos induzidos ao diabetes experimental Será submetido à publicação no periódico ***Diabetologia*** Conceito A1 na área 21 da CAPES.

Artigo Original 2: **O efeito do treino resistido sobre as propriedades mecânicas do Complexo gastrocnêmios-plantar de ratos induzidos ao diabetes experimental** – teve como objetivo avaliar se as alterações biomecânicas sofridas pelos músculos no estado diabético são revertidas por meio do uso de um programa de exercício resistido. Será submetido

ao periódico *International Journal of Sports Medicine*, Conceito A1 na área 21 da CAPES.

Artigo Original 3: **Comportamento da miosina rápida e lenta em ratos diabéticos submetidos ao Treino resistido** – teve como objetivo avaliar o comportamento da miosina rápida e lenta em músculo de animais diabéticos submetidos ou não a um treino resistido de força. Será submetido ao periódico *Diabetic Medicine*, Conceito A2 na área 21 da CAPES.

7. Considerações Finais.
8. Limitações do Estudo.
9. Anexos
10. Apêndices

## 2.INTRODUÇÃO

Atualmente o *Diabetes Mellitus* (DM) é caracterizado como uma pandemia com crescimento alarmante de suas proporções, considerada um desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2013).

Segundo o *International Diabetes Federation* (IDF) há cerca de 382 milhões de diabéticos no mundo e uma estimativa que em 21 anos haverá 592 milhões. No Brasil mais de 7 milhões de pessoas são portadores do diabetes e 80 mil morrem por ano (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2013).

De uma forma geral o DM está associado com várias complicações patológicas, tais como vasculopatias, neuropatias, nefropatias, retinopatias, doenças no sistema musculoesquelético, entre outros (BROWNLEE, 2005). No tecido muscular poucos estudos têm avaliado as alterações que acometem esse tecido em decorrência do estado diabético, mesmo sendo uma condição clínica comum e que é caracterizada por diminuição na massa muscular, fraqueza muscular e capacidade física reduzida (ANDERSEN *et al.*, 1996, 1997; ANDERSEN; GJERSTAD; JAKSOBSEN, 2004; ANDERSEN; SCHMITZ; NILSEN, 2005).

A Miopatia Diabética promove efeitos negativos no tecido muscular tais como ruptura de sarcômeros, distúrbios no metabolismo do  $Ca^{2+}$ , diminuição da capacidade oxidativa do músculo, aumento do lipídeo intramuscular, diminuição da síntese proteica e aumento da proteólise (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE, 2010). Somadas essas alterações à insulinoopenia característica do DM, interfere também no metabolismo de carboidratos e proteínas do músculo esquelético, promovendo um desequilíbrio entre a taxa de síntese e a taxa de degradação das proteínas intracelulares (KIMBALL; VARY; JEFFERSON, 1994), o que leva a perda de massa muscular (atrofia).

A degradação protéica vai afetar proteínas importantes do tecido muscular como a miosina que apresenta diferentes isoformas e proteínas

similares que se diferenciam apenas na sequência de aminoácidos identificadas por anticorpos específicos, e ao depender do tipo dessa proteína vai determinar as características das fibras musculares em fibras de contração lenta, chamadas Tipo I, e de contração rápida, as tipo II (JERKOVIC; ARGENTINI; SERRANO-SANCHEZ, 1997; BOBINAC., *et al.*, 2000)

Além disso, a miosina é responsável pela determinação das propriedades contráteis do músculo (IORGA; ADAMEK; GEEVES, 2007). Com a progressão do diabetes a literatura demonstra que o músculo sofre alterações em sua histoquímica e morfometria (KLUEBER *et al.*, 1989; MEDINA *et al.*, 1992; KLUEBER; FECZKO, 1994).

A hiperglicemia crônica promove alteração nas proteínas estruturais do tecido conectivo como o colágeno, devido a formação dos Produtos Finais da Glicação não Enzimática (AGES) que estão aumentados no diabetes e promovem o surgimento de ligações intermoleculares na estrutura do colágeno o que o torna menos flexível como foi comprovado tanto em indivíduos diabéticos (SCHNEIDER E KOHN, 1982) como experimentalmente em animais diabéticos (ANDREASSEN *et al.*, 1981). Sabe-se que a ação do colágeno no tecido é essencialmente mecânica e que as alterações desse tecido vão repercutir nas propriedades mecânicas do músculo (ARONSON, 2002; YU *et al.*, 2002).

O processo da atrofia muscular ligada a miopatia por sua vez, pode ser visto como uma expressão da deterioração muscular em resposta as alterações funcionais ou patológicas e está associado a inúmeras alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que repercutem na funcionalidade dos músculos afetados, como por exemplo, alterações das propriedades contráteis, redução na atividade elétrica, e proliferação de tecido conjuntivo intramuscular, o que pode resultar em perda da extensibilidade e aumento na rigidez tecidual (FERREIRA *et al.*, 2004; CAIERÃO; TEODORI; MINAMOTO, 2007). Desta forma, estas alterações tornam o músculo biomecanicamente mais propenso ao risco de lesão frente a uma situação que exija uma resposta muscular mais eficiente (CAIERÃO; TEODORI; MINAMOTO, 2007).

O músculo esquelético é considerado um biomaterial que por sua vez exhibe propriedades mecânicas e é dotado da capacidade de responder a imposição de cargas podendo se relacionar com ocorrência ou agravamento de lesões (CORNWALL, 1984). O estudo da mecânica das estruturas corporais é indispensável. Em estruturas como o tecido muscular, entender a sua biomecânica e o comportamento histomorfofuncional é de grande relevância para o esclarecimento de lesões e alterações da capacidade adaptativa que podem estar presentes na miopatia diabética (WHITING e ZERNICKE, 2001). Além de, auxiliar no processo terapêutico (CARVALHO, 2004).

Tendo o tecido muscular uma grande capacidade plástica e o exercício ser capaz de estimular reações bioquímicas importantes para o desenvolvimento de massa muscular (LUCIANO; MELLO, 1998), o treinamento físico desponta como uma possibilidade de reverter as alterações protéicas provocadas pelos estados de deficiência de insulina em estruturas celulares do músculo (MIDAOUJ; TANCREDE; NADEAU, 1996).

Especificamente o Treino resistido é capaz de produzir mudanças favoráveis na massa muscular (Hipertrofia), ganho de força com melhor rendimento de energia com melhor funcionalidade, melhora nos níveis de glicose sanguínea e diminuição dos valores da Hemoglobina Glicada (RICHTER; HANSEN; HANSEN, 1988; BOULÉ *et al.*, 2001; BERGMAN *et al.* 2012). Estudos com pacientes diabéticos demonstraram que o treino resistido promove melhoras na sensibilidade a insulina semelhantes aquelas atingidas pelo treino aeróbio, além de diminuir a gordura subcutânea e visceral e aumentar a massa magra (BACCHI *et al.*, 2012). Portanto, o exercício resistido pode ser uma eficaz ferramenta para melhorar a resistência à insulina (HALL *et al.*, 2013)

Estudos que retratem as alterações na composição e biomecânica do tecido muscular no estado diabético são escassos, bem como a forma como o treinamento resistido pode atuar sobre estas alterações. Para tanto, a reprodução das alterações provocadas pelo diabetes em animais de experimentação, com subsequente aplicação de um protocolo de treinamento físico, parece ser o caminho mais apropriado para se obter respostas concretas

para tais questionamentos, por oferecer estudos aleatórios de longo seguimento, com uniformidade da amostra e controle das variáveis.

### **3.REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1.Diabetes e Alterações no Tecido muscular**

O estado diabético promove disfunção da célula muscular que está relacionada a fatores patofisiológicos dessa doença (OHLENDIECK, 2010). Essa disfunção ocasionada nos miócitos resulta dos níveis glicêmicos elevados, aumento de lipídeos intramuscular, diminuição de insulina, aumento de marcadores como a Interleucina 6 (IL-6), diminuição do Fator de crescimento relacionado à Insulina (IGF1) e elevação de hormônios (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE, 2010).

Níveis glicêmicos elevados produzem reação oxidativa responsável pela formação dos AGEs (produtos finais da glicação avançada) (ALT *et al.*, 2004; SNOW *et al.*, 2006, 2007) desregulando a ação das proteínas contráteis de miosina e, mais especificamente, as das fibras musculares tipo II (RAMAMURTHY *et al.*, 2001). Outro mecanismo pelo qual o estado hiperglicêmico afeta o músculo é pela ativação da via dos Polióis e deve-se a diminuição da capacidade de defesa da célula contra o estresse oxidativo da via (GHAHARY *et al.*, 1991; BROWNLE, 2005).

No diabetes tipo 1 ocorre um acúmulo de lipídeos intramoleculares no músculo esquelético, verificado pelo aumento de ácidos graxos não esterificados e triglicerídeos no plasma (STANDL *et al.*, 1980). Cadeias longas de Acetil COA, ceramídeos e diacilglicerídeos podem estar associados com efeitos negativos no tecido muscular (MUOIO, 2009; COEN *et al.*, 2010).

O aumento da secreção de glicocorticóides no diabetes está relacionado à atrofia muscular, um exemplo disso ocorre no aumento do

cortisol no quadro diabético, responsável por efeito negativo no *turnover* proteico e promovedor da deterioração muscular (ROY; COLLIER; ROY, 1990; CHAN *et al.*, 2003;). Outro hormônio alterado no estado diabético é o Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo 1 (PAI-1) que em níveis elevados promove a inibição da regeneração muscular (GORDIN *et al.*, 1989)

No que diz respeito ao aumento de marcadores como IL-6, sabe-se que no estado crônico do diabetes, níveis elevados promovem efeito deletério no músculo por baixa regulação de fatores de crescimento intracelulares o que leva a atrofia muscular (HADDAD *et al.*, 2005). No estado de catabolismo muscular nota-se diminuição de IGF1, porém, ainda não está claro como acontece a diminuição desse fator no diabetes tipo 1. Acredita-se existir uma alteração do Eixo GH/IGF1 com aumento do GH e diminuição do IGF1 (JEHLE *et al.*, 1998; WEDRYCHOWICZ *et al.*, 2005; MOYER-MILEUR *et al.*, 2008).

Quando instalada, a miopatia diabética irá promover no tecido muscular ruptura de sarcômeros, distúrbios no metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$ , diminuição da capacidade oxidativa do músculo, aumento do lipídeo intramuscular, diminuição da síntese proteica e aumento da proteólise (KRAUSE; RIDDEL; HAWKE, 2010).

O prejuízo ocasionado pelo diabetes ao tecido muscular resultará, do ponto de vista funcional, na redução da capacidade física, força e massa muscular (ANDERSEN *et al.*, 1996, 1997; ANDERSEN; GJERSTAD; JAKSOBSEN, 2004; ANDERSEN; SCHMITZ; NILSEN, 2005). A miopatia diabética também promove influência na funcionalidade das células satélites, importantes células de regeneração e reparo do tecido muscular, resultando na perda da sua capacidade de regeneração tecidual (JEONG *et al.*, 2013).

Quanto à influência da insulinoopenia no tecido muscular, a insulina desempenha um papel fundamental no crescimento e manutenção da massa muscular, sendo capaz de estimular a síntese proteica e inibir a proteólise. Este hormônio possui características anabólicas e sua síntese é controlada através dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos (DALL'AGO *et al.*, 2002). A ação da insulina no processo celular da síntese protéica é feita por interação

com receptores de membrana (SMITH, 2003; BORTOLOTTI, 2007) e estimulação dos transportadores de glicose (GLUT-4), os quais facilitam a entrada do carboidrato para a célula (MUECKLER, 1994; AUGUSTIN, 2010). No quadro instalado de insulinoopenia diabética, ocorre um desbalanço entre as taxas de síntese e degradação protéicas (ROGATTO & LUCIANO, 2001; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD 2002).

Dentre as proteínas que compõem o tecido muscular destaca-se a molécula de miosina, que apresenta diferentes isoformas, proteínas similares, que podem diferenciar apenas na sequência de aminoácidos, e são responsáveis pela determinação das propriedades contráteis do músculo. A miosina é um heterohexâmetro dotado de duas cadeias pesadas (CPM) e quatro cadeias leves (CLM). A CPM relaciona-se com mecanismos de geração de força para contração muscular e a CLM com mecanismos modulatórios da contração. Já está estabelecido que as propriedades mecânicas essenciais do músculo estão relacionadas ao tipo de CPM que o constitui, e que essa quantidade pode ser moldada de acordo com estímulo que o músculo é exposto e dessa forma, pode-se alterar a composição da fibra muscular (IORGA ; ADAMEK ; GEEVES, 2007). Com a diminuição dos níveis de insulina no Diabetes ocorre queda na síntese da cadeia pesada de miosina esse hormônio é estimulador da síntese dessa molécula para o tecido muscular (VANDENBURGH *et al.*, 1991).

### **3.2.Diabetes e treino resistido**

A utilização do treino físico aeróbio isolado ou sua associação com exercício de resistência têm demonstrado resultados relevantes no equilíbrio glicêmico (SIGAL *et al.*, 2007) por induzir melhora na ação da insulina (KEMMER; BERGER, 1983). O exercício age facilitando a captação periférica da glicose e o metabolismo de glicogênio e proteínas (LUCIANO; MELLO, 1998; OLIVEIRA; ROGATTO; LUCIANO, 2002), melhorando as condições de saúde geral do indivíduo diabético (REID *et al.*, 2010).

Por esse motivo, o treino físico desponta atualmente como uma das terapêuticas para o tratamento do diabetes (TURNER *et al.*, 1998) e já existe um consenso que a prática de exercícios físicos exerce efeitos positivos na prevenção e/ou manutenção do controle glicêmico no estado diabético (ALBRIGHT *et al.*, 2000; YAVARI *et al.*, 2012).

Em relação ao tecido muscular, evidências apontam que a atividade contrátil é fundamental para o desenvolvimento da massa muscular. O aumento do trabalho muscular durante o exercício é capaz de elicitar várias reações bioquímicas que são essenciais para hipertrofia do músculo (LUCIANO; MELLO, 1998). Além disso, o treinamento físico tem a capacidade de reverter às alterações nas proteínas mitocondriais musculares provocadas pelos estados de deficiência de insulina (MIDAOUJ; TANCREDE; NADEAU, 1996). Com relação ao treino resistido os benefícios relatados são: Hipertrofia muscular, aumento da qualidade muscular, ganho de força e maior desenvolvimento da energia com melhor funcionalidade em diabéticos (BOULÉ *et al.*, 2001).

Alguns estudos na literatura reportam avaliação muscular frente ao treino de endurance no estado diabético, porém poucos são aqueles que reportam o efeito do treino resistido na miopatia diabética (Farreal *et a.*, 1999), ainda mais na avaliação das propriedades biomecânicas e composição muscular

### **3.3. Ensaio mecânico de tração**

O ensaio mecânico de tração é um teste empregado com o objetivo de avaliar as propriedades mecânicas dos materiais. Seu mecanismo consiste em submeter um material (corpo de prova) a um esforço que realiza um alongamento (deformação) possibilitando que a carga cresça de forma lenta, permitindo avaliar a resistência do material até a completa ruptura. O ensaio mecânico é considerado muito importante e muito utilizado na avaliação das propriedades mecânicas dos materiais devido a facilidade de execução e reprodutibilidade (SOUZA, 1974).

Esse teste é considerado o mais utilizado para determinar o comportamento mecânico dos materiais biológicos (SHIMANO; SHIMANO, 2000), tendo em vista que, tecidos biológicos como músculos ou ossos quando sujeitos a ação de cargas externas sofrem deformação (JAMES *et al.*, 1997). Vale ressaltar que além da resistência esse teste também fornece o trabalho transformado em energia pela a força externa aplicada durante o ensaio (SOUZA, 1974).

Conhecer o comportamento biomecânico e as características de resistência de tecidos, como o muscular, que é solicitado a esforços ligados a tração (SHIMANO; SHIMANO, 2000), torna-se importante na medicina ortopédica e esportiva (GOULD III, 1993), já que as lesões que ocorrem nos tecidos biológicos quase sempre estão vinculadas a estresse de tração que ultrapassa a resistência do tecido biológico (CORNWALL, 1984). A avaliação dos parâmetros mecânicos é obtida pela análise das curvas carga x alongamento e tensão x deformação (BRUHAT; FOCCK, 1964).

Na literatura foram descritos alguns estudos realizados com o objetivo de avaliar por meio do ensaio mecânico de tração as propriedades biomecânicas do tecido muscular submetido a atrofia por imobilização (MATHEUS *et al.*, 2007, 2008; CARVALHO; SHIMANO; PICADO, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009) e até qual seria o efeito do exercício físico nas propriedades biomecânicas de músculos submetidos a atrofia por desuso (MILANI *et al.*, 2008). Entretanto, com relação ao tecido muscular acometido pela miopatia diabética, a literatura atual carece de estudos que avaliem as propriedades biomecânicas desse tecido, bem como os efeitos do treino resistido na miopatia diabética, o que motiva a realização do presente estudo.

#### **4.HIPÓTESES DO ESTUDO**

- O *Diabetes mellitus* promove prejuízos estruturais e biomecânicos na musculatura esquelética.

- O treino físico resistido de salto livre com sobrecarga é capaz de reverter os prejuízos estruturais (alterações da composição da miosina rápida e lenta) e biomecânicos decorrentes da Miopatia diabética.

## **5.OBJETIVOS**

### **5.1.Geral**

Avaliar os efeitos do treinamento resistido de salto livre com sobrecarga sobre a composição muscular e as propriedades biomecânicas do complexo muscular gastrocnêmio-plantar de ratos induzidos ao diabetes experimental tipo 1

### **5.2. Específicos**

- Avaliar a evolução ponderal e glicêmica dos animais.
- Avaliar o trofismo do complexo gastronemio-plantar através da aferição do comprimento e da área de secção transversa (AST).
- Identificar e quantificar a miosina rápida e lenta presentes nos músculos gastrocnêmios laterais através da reação de imunohistoquímica para avaliação da expressão de miosina rápida e lenta.
- Avaliar, através do ensaio mecânico de tração, as alterações biomecânicas dos músculos gastrocnêmios através da análise dos parâmetros: Força Máxima, Deformação Máxima, Deformação específica Energia/Área, Rigidez, Tensão Máxima, Módulo elástico.

## **6.MÉTODOS**

### **6.1. Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo do tipo experimental, com avaliação quantitativa dos dados amostrais.

### **6.2. Local do Estudo**

As diversas etapas desse estudo foram realizadas no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (Depto de Anatomia – UFPE), no Laboratório de Materiais Poliméricos (Depto de Engenharia de Química- UFPE), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA da UFPE.

### **6.3. Amostra**

A amostra foi composta por 88 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, mantidos em gaiolas de polipropileno (41x34x16 cm) em grupos de três a quatro animais em ciclos claro/escuro invertido de 12 horas e temperatura de  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os ratos receberam dieta padrão (Labina<sup>®</sup> - Purina) e água *ad libitum*. O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 021332/2013-72).

### **6.4. Grupos Experimentais**

Aos 60 dias de vida, os animais foram distribuídos em quatro grupos: a) Grupo Controle Sedentário – GCS (n=15) constituído por ratos sadios e sedentários; b) Grupo Controle Treinado – GCT (n= 17) constituído por ratos sadios e treinados; c) Grupo Diabético Sedentário – GDS (n=27) constituído com ratos diabéticos e sedentários; d) Grupo Diabético Treinado – GDT (n=29) constituído por ratos diabéticos e treinados

### 6.5. Indução ao Diabetes

Os animais dos grupos GDS e GDT, após jejum de 12 horas, foram induzidos ao diabetes pela administração única, via intraperitoneal, de uma solução de Estreptozotocina (STZ – *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*), (Figura 1), diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose de 60mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos receberam doses equivalentes da solução tampão citrato de sódio objetivando um estresse equivalente do ofertado para os grupos diabéticos. Ao final de 30 minutos após o tratamento os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO *et al.*, 2002).



**Figura 1** – Procedimento de indução do diabetes experimental com solução de Estreptozotocina (60mg/kg de peso do animal em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5).

### 6.6. Avaliação ponderal e da glicemia

O peso corpóreo dos animais foi aferido semanalmente ao longo de todo o experimento por balança eletrônica (Toledo, modelo 9094). A verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) aconteceu após jejum de 12 horas, antes da indução ao diabetes, no 3º e 7º dias após a indução, e, após a confirmação do diabetes, semanalmente até o fim do experimento. Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram glicose

sanguínea acima de 200mg/dL (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003). A glicose sanguínea foi dosada (tiras reagentes Accu-Chek Active) após coleta de uma gota de sangue na ponta da cauda do animal.

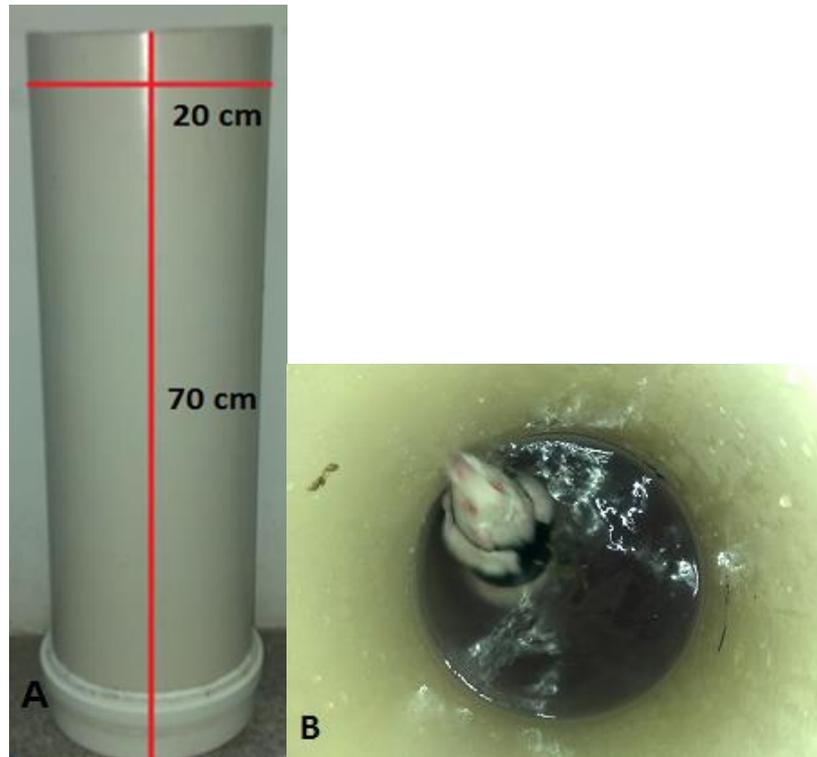
### **6.7. Treino Resistido**

Na primeira semana após a indução os animais foram submetidos a um programa de exercício resistido (ROGATTO; LUCIANO, 2001) com duração de nove semanas e frequência de cinco sessões por semana,. O protocolo consistiu na realização de saltos em meio aquático, utilizando um tanque cilíndrico com 20cm de diâmetro e 70 cm de comprimento (Figura 2). Para conferir sobrecarga ao exercício, um colete com carga pré-determinada era acoplado ao tórax do animal. Para ajuste da sobrecarga utilizada por cada animal, os ratos eram pesados no primeiro dia de cada semana e a partir daí era calculada a sobrecarga individual para cada um.

Para realização de cada série de saltos, o animal era colocado na superfície da água, e após submergir diante da sobrecarga do colete, o mesmo realizava um esforço de emergência através do salto em direção à superfície. O animal era retirado do tanque após realizar 10 saltos consecutivos que atingissem a superfície da água.

A primeira semana do protocolo foi destinada a adaptação dos animais, onde eles fizeram inicialmente três séries de 10 saltos com um minuto de intervalo entre as séries, inicialmente com carga de 30% do peso corporal nos dois primeiros dias da semana, 40% no terceiro e quarto dia, e 50% do peso corporal no quinto dia da semana. A profundidade da água também foi sendo aumentada progressivamente, iniciando com 100% do comprimento dos animais no primeiro dia, 120% no segundo e terceiro dias e 140% nos quarto e quinto dias da semana. A partir da segunda semana, as sessões de exercício consistiram na realização de quatro séries de 10 saltos com sobrecarga equivalente a 50% do peso corpóreo, com um minuto de intervalo entre as

séries (ROGATTO; LUCIANO, 2001) e com a profundidade da água correspondendo a 140% do comprimento corporal do rato (ROGATTO; LUCIANO, 2001; ROGATTO, 2001). A temperatura da água foi mantida a  $32^{\circ} \pm 1$  C.



**Figura 2** – (A) Foto ilustrativa do tanque utilizado para o exercício de salto em meio aquático; (B) Demonstração do exercício de salto.

### 6.8. Eutanásia e Coleta do Material

Após o término do período referente ao exercício, os animais de todos os grupos foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml para cada 100g de peso.

Foi realizada uma incisão ao longo da superfície posterior da pata direita do animal para remoção da pele e de algumas partes moles, seguida da desarticulação do tornozelo e quadril, mantendo-se a integridade e as inserções distais e proximais do complexo muscular Gastrocnemio-plantar, (Figura 3).

A escolha do complexo gastrocnêmio-plantar para realização desse estudo está ligado a fatores metodológicos do ensaio mecânico. Sua localização anatômica permite preservar as características anatômicas quanto a origem e inserção após dissecação, o que proporciona uma boa fixação a máquina de ensaio mecânico de tração. Isto garante uma análise completa da estrutura e mimetiza de forma fidedigna a solicitação mecânica e fisiológica do complexo muscular. Outra condição é que esse músculo, em específico, trabalha sob condições de atividade física extrema, o que tem um risco aumentado para lesões e rupturas (JÄRVINEN; EINOLA; VIRTANEN, 1992; ABDALLA; BERTONCELLO; CARVALHO, 2009; SENE; SHIMANO; PICADO, 2009).

Os espécimes coletados para a realização do ensaio mecânico tiveram preservada sua inserção proximal no terço distal do fêmur e sua inserção distal no calcâneo. As inserções ósseas foram mantidas para facilitar a fixação da amostra à máquina de ensaio (MATHEUS *et al.*, 2007).

Após a dissecação, foi mensurado o comprimento dos músculos com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo® 0,05mm, São Paulo-SP, Brasil) e foi feito o cálculo da área de secção transversa (AST) pela fórmula da área da elipse  $AST = CSA = \left(\frac{D \cdot T}{4}\right) \pi$ , sendo o D = a largura do terço médio dos músculos, T = a espessura do terço médio dos músculos e  $\pi$  aproximadamente 3,1416. Em seguida, as amostras foram mantidas em solução de lactato de Ringer (Baxter Hospitalar LTDA, São Paulo-SP, Brasil) por um período máximo de 2 horas, em temperatura ambiente, até o momento da realização do ensaio mecânico

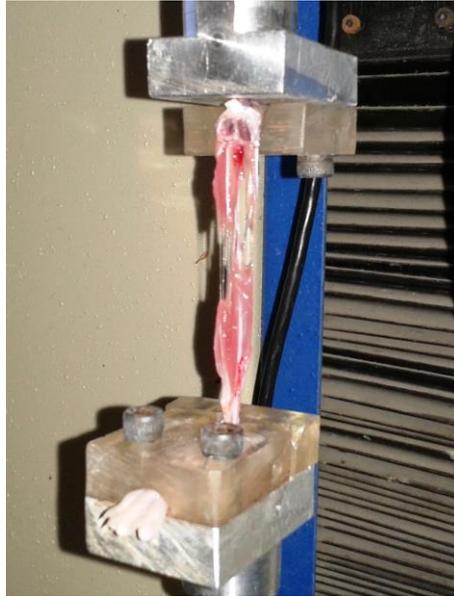
Da amostra destinada ao procedimento da imunohistoquímica foram coletados os músculos gastrocnêmios laterais da pata direita com posterior obtenção da quantificação da miosina rápida e lenta.



**Figura 3** – Complexo gastrocnêmio-plantar após dissecação.

### **6.9. Ensaio Mecânico**

Para o ensaio de tração dos músculos gastrocnêmios foi utilizada a máquina universal de ensaios (marca *EMIC*®, modelo DL500, Paraná, Brasil) do Laboratório de Engenharia Química da UFPE, equipada com célula de carga de capacidade de 50kgf. Dois acessórios especiais foram confeccionados para a fixação da espécime a ser testada, sendo um para fixação do fêmur e outro para fixação do calcâneo, mantendo o joelho e tornozelo com 90° de angulação. Esses fixadores foram confeccionados no Departamento de Engenharia Mecânica da UFPE (Figura 4). No momento do ensaio, os músculos foram acoplados à máquina e foi dada uma pré-carga de 200g durante o tempo de acomodação de 30 segundos, com o intuito de promover a acomodação do sistema. Após a pré-carga, o ensaio prosseguiu por, em média, oito minutos, com velocidade preestabelecida para o ensaio de 10mm/minuto (MATHEUS *et al.*, 2007).

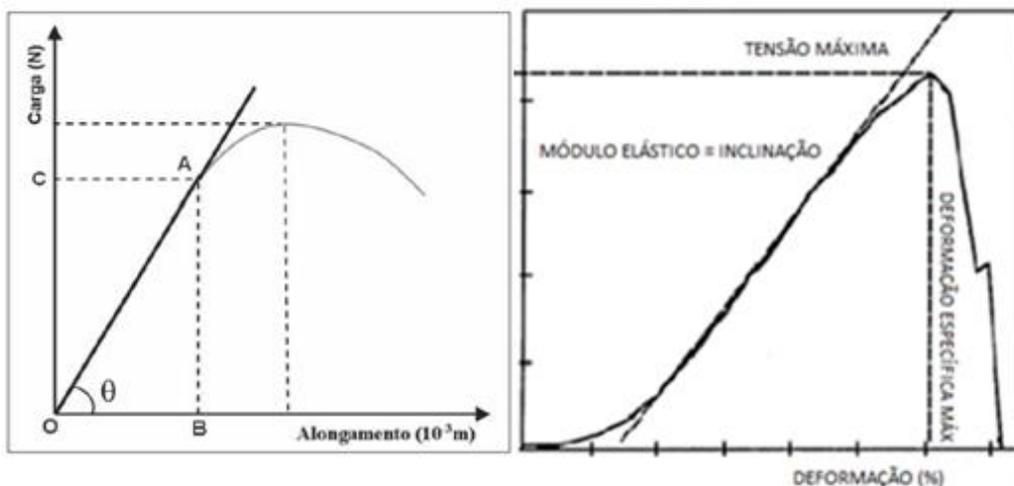


**Figura 4** – Ruptura do ventre muscular durante o ensaio de tração

A carga aplicada foi registrada pelo *software Tesc®* em intervalos regulares de alongamento até o momento de ruptura do músculo, sendo gerados gráficos da carga *versus* deformação e tensão *versus* deformação de cada ensaio (Figura 5), a partir dos quais foram obtidas e analisados os seguintes parâmetros:

- Força máxima – máximo de carga suportada passivamente pelo músculo tracionado;
- Deformação máxima – o máximo de alongamento imposto ao músculo até a completa ruptura;
- Energia – quantidade de energia armazenada pela deformação elástica do músculo;
- Tensão máxima – calculada pelo quociente da força máxima suportada pela área de seção transversal do músculo (identifica a quantidade de tensão suportada pelas estruturas intrínsecas do músculo);
- Rigidez - Obtida por meio da tangente do ângulo formado pela parte curva carga *versus* alongamento, representa a rigidez extrínseca do material;
- Deformação específica – taxa de alongamento do músculo (calculada pelo quociente entre o comprimento inicial pelo comprimento final);

- Módulo Elástico – determinado pela inclinação encontrada na curva tensão x deformação (viscoelasticidade ou rigidez representativa do músculo quanto material biológico).



**Figura 5** – Representação gráfica do comportamento biomecânico do músculo.

### 6.10. Preparação do material coletado

Após a coleta, os músculos gastrocnêmios laterais seguiram para o processamento histológico e para imunohistoquímica, a fim de quantificar o número de fibras e avaliar a expressão da miosina rápida e lenta, respectivamente. Os músculos foram fixados em paraformolaldeído (PFA 4%) por 2 horas, mantidos em sacarose a 15% e em seguida a 30% após 24 horas para ambos. Após os ciclos na sacarose as amostras foram montadas em *Optimal Cutting Temperature* (OCT) e resfriadas em N-Hexano, congeladas em nitrogênio líquido a  $-160^{\circ}\text{C}$  e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram feitos cortes transversais ( $10\mu\text{m}$ ) no criostato (Zeiss, HYRAX C 25), e montados em lâminas com Silano (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). As lâminas seguiram para o processamento histológico e para imunohistoquímica, a fim de quantificar o número de fibras, por meio da expressão da miosina rápida e lenta.

### 6.11. Processamento e análise Histológica

As lâminas encaminhadas para imunohistoquímica foram colocadas em contato com a solução de bloqueio em seguida incubados com anticorpo primário antimiosina esquelética lenta (M-8421, [1:50], produzido em camundongo, Sigma-Aldrich) e antimiosina esquelética rápida (M-4276, [1:50], produzido em camundongo, Sigma-Aldrich) *overnight*, seguidos do anticorpo secundário Cy2 anticamundongo ([1:200], purificado em cabra, Jackson).

Após incubação com os anticorpos, o material foi posto em contato com o diaminobenzedina (DAB), o cromógeno que permite a emissão da coloração e contracorado com hematoxilina. Foram feitas 12 imagens de cada lâmina em (LEICA DM 500) com câmera acoplada por meio do programa LAS EZ (versão: 2.0.0 ICC50), e, através da quantificação do número de pixels de cada imagem (Software Gimp 2.8) foi possível identificar a proporção de miosinas lenta e rápida em cada músculo avaliado.

### 6.12. Análise estatística

Com os dados obtidos após os ensaio mecânico de tração e a análise da Imunohistooquímica foi construído um banco de dados e posteriormente analisados através do software SPSS versão 18. Após a confirmação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi utilizado o teste *t* Student para comparação entre dois grupos. Para comparação entre três ou mais grupos foi usado a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo *post hoc* de Tukey, para as variáveis com distribuição não normal foi usado o Kruskal-Wallis e Mann whitney. O nível de significância adotado foi 5%.

## **7.RESULTADOS**

### **7.1 DOES TYPE 1 DIABETES INDUCE BIOMECHANICAL CHANGES IN SKELETAL MUSCLES OF *WISTAR* RATS?**

Este artigo será submetido para publicação na Revista Diabetologia, conceito A1 para a área 21 da CAPES.

#### **Abbreviations:**

CSA	Cross-Sectional Area
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D	Deformation
DM	Diabetes Mellitus
SD (DE)	Deformação Específica
E/A	Energy per area
F/W	Force per width
MF	Maximal Force
CG	Control Group
DG	Diabetic Group
Kgf	Kilogram-force
EM	Elastic Modulus
STZ	streptozotocine
TS <sub>max</sub>	Maximum Tensile Strength
UFPE	Federal University of Pernambuco

## INTRODUCTION

Type 1 Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder and is related to an autoimmune reaction of pancreatic beta cells and insulin deficiency [1,2]. This causes chronic hyperglycemia associated with damage, dysfunction and failure of various organs and systems, including the musculo-skeletal system [3,4]. The dysfunctions observed in this system are the result of metabolic perturbations such as glycosylation of proteins and collagen accumulation in periarticular structures, causing changes to connective tissue [5,6].

Specifically in muscle tissue, insulin plays a vital role in the growth and maintenance of muscle mass. This hormone has anabolic characteristics and its synthesis is controlled by circulating levels of glucose and amino acids [7]. The action of insulin on the cellular process of protein synthesis is mediated by interaction with membrane receptors [8,9] and stimulation of glucose transporters (GLUT-4), which facilitate the entry of the carbohydrate into the cell [10,11]. As part of the syndrome of induced diabetic insulin deficiency, an imbalance occurs between the rates of protein synthesis and degradation [12,7], resulting in a condition well-known in the literature and called diabetic myopathy. This condition is responsible for promoting negative effects in muscle tissue such as sarcomere breakage, disturbances in  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism, decreased oxidative capacity of muscles, increased intramuscular lipids, decreased protein synthesis and increased proteolysis and a decrease in the amount and functionality of progenitor cells [13,14] which is characterized by reduced exercise capacity, strength, and muscle mass [15,16].

In turn, muscular atrophy leads to persistent changes in contractile properties, a reduction in electrical activity of muscles and proliferation of intramuscular connective tissue, resulting in a loss of extensibility and increased tissue stiffness frequently observed in individuals with severe insulin deficiency [17,18]. It is assumed that this syndrome, most likely, makes muscles more susceptible to injury as they are in a biomechanically altered state [19].

It is recognized that the use of mechanical tensile tests can reliably mimic the stresses biological tissues are exposed to [20]. Thus, knowledge of the biomechanical behavior of muscle tissue in DM enables a better basis for making clinical decisions to

treat diabetic myopathy. However, in the literature to date, there are no reports of investigations of biomechanical characteristics of muscles in the diabetic state. Therefore, the aim of this study was to evaluate the biomechanical properties of the gastrocnemius-plantar complex of rats induced to experimental diabetes.

## **METHODS**

**Animals:** The sample consisted of 30 male rats of the species *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* lineage, kept in cages in groups of three to four animals in an inverted light/dark cycle of 12 hours, temperature of  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and free access to water and ration (Labina<sup>®</sup> - Purina). At 60 days old, the animals were divided into two groups: a) Control Group - CG (n=11) consisting of healthy rats and; b) Diabetic Group - DG (n=19) consisting of diabetic rats. The animal experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of UFPE, under the following file number: 021332/2013-72.

**Induction of diabetes:** Animals of the DG, after fasting for 12 hours, were induced to type 1 diabetes by the single administration, intraperitoneally, of a solution of streptozotocin (STZ - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluted in 0.01 mol/L sodium citrate buffer, pH 4.5, at a dose of 60mg/kg of body weight. The animals of the CG received equivalent doses of sodium citrate buffer solution aiming at leveling the stress experienced by the diabetic group. After 30 minutes of treatment, the animals were fed normally [21]. Blood glucose levels were measured in the animals on the day of induction, and the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day after induction to confirm the diabetic state and only animals with blood glucose levels above 200 mg/dL [22] were included in the study. Blood glucose was measured by glucometer (Accu Chek Active, Roche, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany) after collecting a drop of blood from the tip of the animal's tail. The weight and blood sugar of the animals were measured weekly over the nine weeks of the experiment.

**Collection of Material:** Nine weeks after induction, the animals of all groups were anesthetized with a xylazine solution (Rompum<sup>®</sup> - Bayer) (Sespo Indústria e Comércio LTD, Paulínia-SP, Brazil - 10mg/kg) and ketamine (Ketalar<sup>®</sup>) (Sespo Indústria e

Comércio LTD, Paulínia-SP, Brazil - 25mg/kg), 0.009 ml/kg and 0.25 ml/kg, respectively. An incision was made along the bottom surface of the right paw of the animal to remove soft tissue, followed by the disarticulation of the ankle and hip, maintaining the integrity of the gastrocnemius-plantar complex and preserving its proximal insertions to the distal third of the femur and its distal insertion to the calcaneus. The bony insertions were maintained to facilitate attachment of the piece to the testing machine [23]. After dissection, the length of the muscles was measured with the aid of a caliper (Mitutoyo® 0.05mm, São Paulo-SP, Brazil) and the cross-sectional area (CSA) was calculated by using the formula of the ellipse:  $CSA = \left(\frac{D \cdot T}{4}\right) \pi$ , where D = the diameter of the middle third of the muscles, T = the thickness of the middle third of the muscles and  $\pi$  = approximately 3.1416. Next, the samples were kept in Ringer lactate solution (Baxter Hospitalar LTDA, São Paulo-SP, Brazil) for a maximum period of 2 hours at room temperature, until performing the mechanical test [23]. Subsequently, the animals were euthanized with an overdose of anesthetic.

**Mechanical test:** For the tensile strength test of the gastrocnemius-plantar complex a universal testing machine (EMIC® brand, model DL500, Paraná, Brazil) was used at the Chemical Engineering Laboratory, UFPE, equipped with a load cell of 50 kgf capacity (kilogram-force). Two accessories were made to fix the piece to be tested, one for femoral fixation and one for setting the calcaneus, keeping the knee and ankle at an angle of 90°. At the time of assay, the muscles were attached to the machine and a pre-load of 200g was given during a settling time of 30 seconds in order to promote accommodation of the system [23]. After the pre-load, the test was continued for an average of eight minutes, with a predetermined speed for the test of 10 mm/min [23]. The applied load was recorded by the software Tesc® at regular intervals of extension until the moment of muscle rupture, generating graphs of load versus deformation and tension versus deformation for each test, from which were obtained and analyzed the following mechanical properties:

- Maximal Force - maximum load supported by passively tractioned muscle;
- Maximal Deformation - the maximum extension imposed on the muscle until complete rupture;

- Energy - amount of energy stored by the elastic deformation of the muscle;
- Maximum Tensile Strength - measured by the ratio of maximum strength supported by the cross-sectional area of the muscle (identifies the amount of tension supported by the intrinsic structures of the muscle);
- Strength / Width - obtained from the tangent of the angle formed by the curve of load versus extension, (represents the extrinsic stiffness of the material);
- Specific Deformation - extension rate reached by the muscle (calculated by dividing the initial length by the final length);
- Elastic Modulus - determined by the slope found in the tension versus deformation curve (viscoelasticity or representative stiffness of the muscle as biological material).

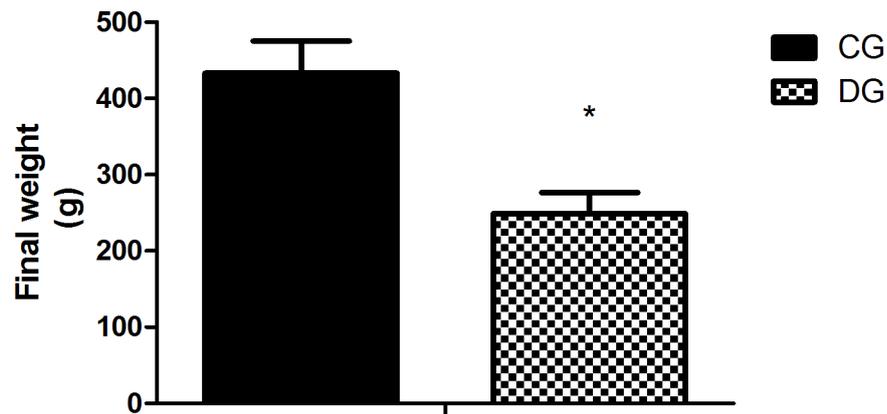
**Statistical Analysis:** The analysis was performed using SPSS version 18 software (SPSS - Hong Kong LTDA, Quarry Bay, Hong Kong, China) and the data were presented as mean  $\pm$  standard deviation and with confidence intervals. For the comparison between the two samples, the Student-t test or Mann-Whitney test were used as confirmation of normality, through the Kolmogorov-Smirnov test. The significance level was established at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

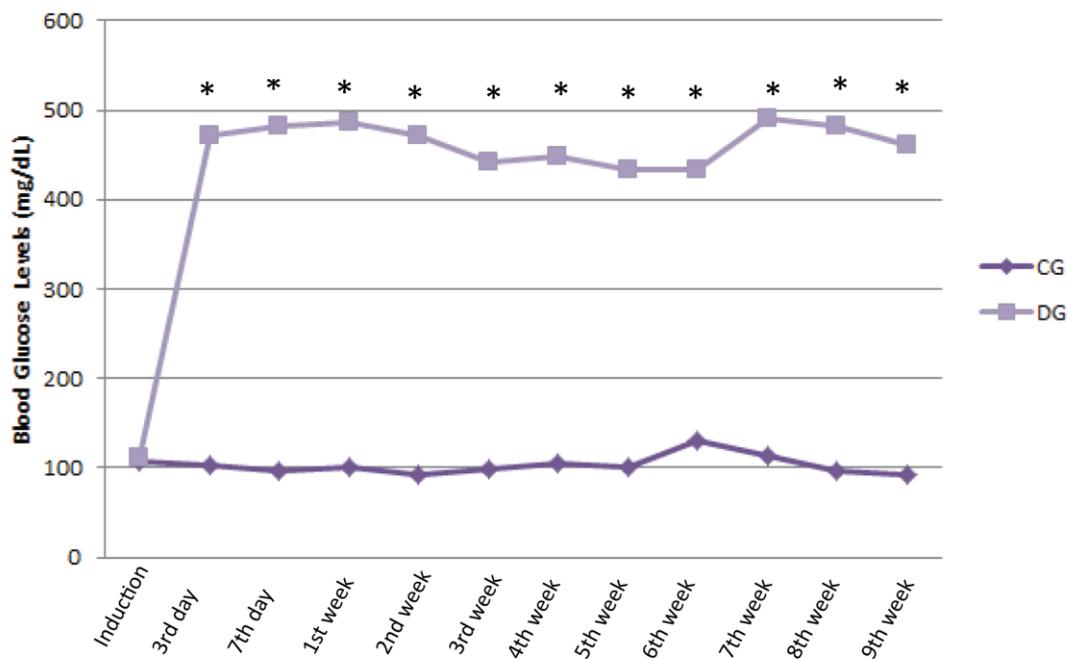
*Losses during the experiment* Of the 30 animals which started the experiment only 21 were included for data analysis due to the loss of nine animals of the DG from complications of the disease.

### *Clinical and metabolic characteristics of rats after nine weeks of experimental diabetes*

Experimental diabetes was associated with decreased body weight (CG  $433.2 \pm 42.03$ g / DG  $248.8 \pm 27.57$ g,  $p < 0.001$ ) (Figure 1) and increased blood glucose levels of the DG compared to the CG from the first week after induction to the end of the experiment (CG  $103.82 \pm 16.59$  / DG  $471.30 \pm 71.55$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2).



**Figure 6** - Body weight of animals at the end of the experiment. Values expressed as mean  $\pm$  standard deviation; CG = control group; DG = diabetic group. Student-t test \* $p < 0.05$ .



**Figure 7** - Expression of blood glucose levels (mg/dL) of animals throughout the experiment. Student-t test \* $p < 0.05$ .

*Experimental diabetes reduced the biomechanical properties of the gastrocnemius-plantar muscle complex* After nine weeks, the biomechanical test of the gastrocnemius-plantar complex showed lower values for the following variables: Maximal Force,

Deformation, Specific Deformation, Strength/Width, Energy/Area and Cross-sectional Area of the animals in the Diabetic Group (Table 1).

**Table 1 - Mean values with confidence intervals (CI) of the biomechanical test of the gastrocnemius muscles in control and diabetic groups.**

	<b>CONTROL GROUP</b>	<b>DIABETIC GROUP</b>	<b>p-value</b>	<b>Confidence Interval (CI)</b>
<b>Outcomes</b>				
<b>Maximal Force (N)</b>	51.5 ± 9.21	26.5 ± 9.74	0.0001 <sup>a</sup>	16.32 – 33.64
<b>Maximum Tensile Strength (MPa)</b>	0.18 ± 0.02	0.44 ± 0.24	0.007 <sup>a</sup>	-0.41 – -0.11
<b>Deformation (mm)</b>	17.85 ± 5.75	10.2 ± 3.30	0.002 <sup>a</sup>	3.29 – 11.99
<b>Specific Deformation (%)</b>	41.04 ± 15.89	26.59 ± 8.23	0.019 <sup>a</sup>	2.70 – 6.20
<b>Energy / Area (N.mm/mm<sup>2</sup>)</b>	7.57. ± 2.60	4.9 ± 2.21	0.02 <sup>b</sup>	0.44 – 4.88
<b>Elastic modulus (MPa)</b>	3.85 ± 0.89	4.63 ± 1.38	0.139	-1.83 – 0.27
<b>Strength / Width (N/mm)</b>	2.06 ± 0.37	1.05 ± 0.39	0.001 <sup>a</sup>	0.65 – 1.35
<b>Cross-sectional area (mm<sup>2</sup>)</b>	67.49 ± 16.37	30.13 ± 7.48	0.0001 <sup>a</sup>	25.64 – 49.08

mm – millimeters; N – Newtons; % - percentage; MPa – Mega Pascal. (a) significant Student-t test; (b) significant Mann-Whitney test.

## DISCUSSION

The induction of Type 1 Diabetes Mellitus performed in this study modified the biomechanical properties of the gastrocnemius-plantar complex of rats in a similar manner to diabetic myopathy as evidenced by a decrease in maximal force, deformation, specific deformation, strength/width, energy/area and cross-sectional area.

Understanding the biomechanical behavior of muscle tissue in the diabetic state is of great importance because it influences the response of the muscle to the imposition of loads, determining the appearance and/or aggravation of injury [24].

Regarding the cross-sectional area of the gastrocnemius-plantar complex of diabetic animals, a significant reduction was observed when compared to control animals. This atrophic condition in diabetic myopathy has a metabolic profile related to the effects of hyperglycemia and hypoinsulinemia and the presence, absence or altered expression of other hormones (cortisol, PAI-1, IGF-1, IL-6) [13]. Jerkovic *et al.* (2009) [25], evaluating the soleus and the long extensor digitorum muscles in diabetic animals, also observed a decrease in cross-sectional muscle area.

The parameter of maximal force represents the maximum load passively supported by muscles during the tensile strength test. There was a significant reduction when compared to control animals. The atrophy demonstrated by the reduction in cross-sectional area is more prominent in type 2 muscle fibers [13,25], glycolytic metabolism fibers and those responsible for generating force, the main targets of advanced glycation end products (AGE), suggesting, therefore, that strength reduction is closely related to the process of muscle atrophy generated by diabetic myopathy [13]. Matheus *et al.* (2007) [23] and Carvalho *et al.* (2009) [26], using a similar mechanical testing protocol but with a different physiological atrophy model, reported a reduction of the maximal force of the gastrocnemius muscles [13,14]

The maximum deformation and specific deformation were shown to be reduced in the muscles of diabetic animals. By definition, the deformation provided by the mechanical test is characterized by the maximum extension of the muscle until complete rupture, thus the decrease in this parameter reflects a smaller deformation capacity of diabetic muscle which can be explained by a reduction in motility of actin and myosin, the break up the Z lines and rupture of sarcomeres [13], which all converge to produce smaller muscle extensibility when compared to healthy muscle tissue. Other studies [23,26] described the reduction of deformation of muscles atrophied by immobilization and produced results similar to the findings of this study. However, this comparison needs to be made cautiously as they refer to different physiologies. The same applies to the specific deformation parameter which represents the extension rate (%) of the muscle until the moment of rupture calculated by dividing the initial length by the final length.

The parameter strength/width or extrinsic rigidity is obtained by the tangent of the angle formed by the most linear part of the curve load versus extension. A reduction of this parameter is a controversial finding, because it was expected that the gastrocnemius-plantar complex of diabetic animals, as having less contractile and extensibility function, would be more rigid than healthy muscles. In the literature there is a lack of studies evaluating this property in diabetic or non-diabetic muscles. Milani *et al.* (2008) [27], studying post-fixed atrophic gastrocnemius muscles, demonstrated a lower extrinsic resistance, as mentioned previously, comparison of the finding of Milani *et al.* (2008) and the present study requires caution due to the mechanism of the atrophy being different from that promoted by the diabetic state.

The energy absorbed in the elastic phase by the gastrocnemius-plantar complex of diabetic animals was less than that of the control animals. It is known that the ability of muscle tissue to absorb energy in the elastic phase without breaking is essential to preventing injury [28]. Thus, the results obtained in the diabetic animals with respect to this parameter (energy) showed muscle with a small absorption capacity, therefore, more likely to suffer injury under extreme stresses. In the study by Carvalho *et al.* (2009) [26], the atrophy observed after the immobilization also reduced energy absorption in the elastic phase by 45.67% in the muscle in comparison with the control animals, showing results similar to ours. However, diabetic myopathy showed a reduction in this parameter of 35.27%, calculated as the difference between the percentage of energy absorption in control and diabetic groups.

Regarding the maximum tensile strength and the elastic modulus, there was no significant difference. A possible explanation for the lack of difference in the maximum tensile strength parameter between the groups is the fact that it is mathematically defined as the ratio between the maximal force and the cross-sectional area. In the present study a proportional reduction was found in both the maximal force and cross-sectional area parameters of 48.54% and 55.36%, respectively, justifying the lack of difference in the maximum tensile strength. The elastic modulus is expressed mathematically as the ratio between the maximum tensile strength and deformation and represents the intrinsic stiffness of the diabetic muscle. An increase was expected, i.e. more rigid given that the diabetic muscle deformed less, however, it showed only a tendency to increase but there was no significant difference. The lack of studies

evaluating these biomechanical parameters in skeletal muscles in a diabetic state or even in any other atrophic states means there is no basis for a discussion of these findings.

The body weight of diabetic animals at the end of the experiment showed lower values. This was expected, in virtue of the changes such as muscle loss imposed by diabetic atrophy [29,30]. In 2013 Cheng, Liang and Li [30], using the same model of induced diabetes, showed results in body weight similar to ours for the experimental group. Almeida *et al.* (2012) [31] and Oliveira *et al.* (2011) [32], with the same induction protocol to experimental diabetes, also observed a decrease of this variable in diabetic animals which shows agreement with the experimental model adopted in this study.

The blood glucose levels of diabetics animals were elevated after induction and continued as such throughout the experiment, resulting from chronic hyperglycemia caused by diabetes [29,30]. The results are in agreement with the studies of Cheng, Liang and Li (2013), Adams *et al.* (2012) and Oliveira *et al.* (2011), who noted the same results in an experimental model of Type 1 Diabetes Mellitus.

In conclusion, type 1 diabetes produced a disadvantageous condition in most biomechanical parameters evaluated in the gastrocnemius-plantar complex, making them more fragile when subjected to traction, with less capacity for extension and even less ability to absorb energy in the elastic phase. These results suggest that the diabetic state is capable of reducing the biomechanical efficiency of the muscle when subjected to a mechanical load.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

To the Chemical Engineering Department at UFPE for conducting mechanical tests and to the Mechanical Engineering Department of UFPE for the preparation of couplers for mechanical testing.

## **FINANCING**

Financial support came from the National Council for Scientific and Technological Development CNPq (process: nº 476815/2011-8).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

## CONTRIBUTION STATEMENT

MPGC contributed to the conception, study design, trial period, analysis and interpretation of data, drafting and writing of the article. MFHBI helped in the conception, acquisition and interpretation of data. MVFA, BST, MFHBIT, PVC, MAB, and SRAM contributed to the study design, trial period, analysis and interpretation of data, drafting and writing of the article. All these authors cited gave final approval for publication of the article.

## REFERENCES

1. Paiva C (2001) Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. *Med Interna (Bucur)* 7:234–238.
2. American Diabetes Association (2013) Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care* 36 Suppl 1:S11–66.
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus — *NEJM. N Engl J Med* 329:977–986.
4. De Oliveira RR, de Lira KDS, Silveira PV de C, et al. (2011) Mechanical properties of achilles tendon in rats induced to experimental diabetes. *Ann Biomed Eng* 39:1528–34
5. Kim RP, Edelman S V., Kim DD (2001) Musculoskeletal Complications of Diabetes Mellitus. *Clin Diabetes* 19:132–135.
6. Arkkila PET, Gautier J-F (2003) Musculoskeletal disorders in diabetes mellitus: an update. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17:945–70.
7. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA (2002) Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 46:419–425.
8. Haber EP, Curi R, Carvalho CR, Carpinelli AR (2001) Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 45:219–227.
9. Zib I, Raskin P (2006) Novel insulin analogues and its mitogenic potential. *Diabetes Obes Metab* 8:611–20.

10. Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219:713–25.
11. Augustin R (2010) The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62:315–33.
12. Rogatto GP, Luciano E (2001) Influência do Treinamento Físico Intenso Sobre o Metabolismo de Proteínas. *Motriz* 7:75–82.
13. Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ (2010) Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: Clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatr Diabetes* 12:345–364.
14. Donna M, D'Souza DA-S and TJH (2013) Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front Physiol* 4:1–7.
15. Andersen H, Gadeberg PC, Brock B, Jakobsen J (1997) Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *Diabetologia* 40:1062–9.
16. Andersen H, Gjerstad MD, Jakobsen J (2004) Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 27:2382–5.
17. Flaim KE, Copenhaver ME, Jefferson LS (1980) Effects of diabetes on protein synthesis in fast- and slow-twitch rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 239:E88–95.
18. Luciano E, Mello MAR de (1998) Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. *Rev paul educ fís* 12:202–9.
19. Ferreira R et al (2004) Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. *Rev Port Ciências do Desporto*, 4:94–111.
20. Defino HLA, Shimano AC (2000) Ensaio mecânico com espaçadores vertebrais. *Rev bras ortop* 35:235–239.
21. Dall'Ago P, Silva VOK, De Angelis KLD, et al. (2002) Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Brazilian J Med Biol Res* 35:843–849.
22. Carvalho EN de, Carvalho NAS de, Ferreira LM (2003) Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cir Bras* 18:60–64.
23. Matheus JPC, Gomide LB, Oliveira JGP de, et al. (2007) Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Rev Bras Med do Esporte* 13:55–59.
24. Cornwall MW (1984) Biomechanics of noncontractile tissue. A review. *Phys Ther* 64:1869–73.

25. Jerković R, Bosnar A, Jurisić-Erzen D, et al. (2009) The effects of long-term experimental diabetes mellitus type I on skeletal muscle regeneration capacity. *Coll Antropol* 33:1115–9.
26. Carvalho L, Polizello J, Padula N (2009) Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. *Acta ortop bras* 17:269–272.
27. Oliveira Milani JGP, Matheus JPC, Gomide LB, et al. (2008) Biomechanical effects of immobilization and rehabilitation on the skeletal muscle of trained and sedentary rats. *Ann Biomed Eng* 36:1641–8.
28. Goldspink G (2002) Gene expression in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* 30:285–290.
29. Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, et al. (2000) Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 49:1123–30.
30. Cheng D, Liang B, Li Y (2013) Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Res Int* 2013:1-7.
31. Bezerra M, Mesquita G, Novaes K, et al. (2012) Evaluation of the biomechanical behavior of tendon in rats subjected to physical activity in water. *Phys Ther Sport* 13:e2–e3.
32. De Oliveira RR, Lemos A, de Castro Silveira P V, et al. (2011) Alterations of tendons in patients with diabetes mellitus: a systematic review. *Diabet Med* 28:886–95.

## **7.2 EFEITO DO TREINO RESISTIDO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO COMPLEXO GASTROCNEMIOS-PLANTAR DE RATOS INDUZIDOS AO DIABETES EXPERIMENTAL**

Este artigo será submetido para publicação no International Journal of Sports Medicine, conceito A1 para a área 21 da CAPES.

### **INTRODUÇÃO**

O Diabetes *mellitus* configura-se como um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica associada a complicações e disfunções em diversos sistemas, incluindo o musculoesquelético (ARKKILA; GAUTIER, 2003; KIM; EDELMAN; KIM, 2001; LUCIANO; MELLO, 1998).

Caracteriza-se por uma hiperglicemia conjugada à formação de produtos finais da glicação avançada (AGES), os quais promovem alterações no tecido muscular (ALT et al., 2004; SNOW; FUGERE; THOMPSON, 2007), desregulando a ação das proteínas contráteis (RAMAMURTHY et al., 2001). No estado de hiperglicemia, há ainda a ativação da via dos Polióis, que se deve a diminuição da capacidade de defesa da célula contra o estresse oxidativo dessa via (BROWNLEE, 2005; GHAHARY et al., 1991). Estes contribuem na formação da miopatia diabética, alteração que promoverá efeitos negativos no tecido muscular como: Ruptura de sarcômeros, distúrbios no metabolismo do  $Ca^{2+}$ , diminuição da capacidade oxidativa do músculo, aumento do lipídeo intramuscular, diminuição da síntese proteica e aumento da proteólise (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE, 2010).

O prejuízo ocasionado pelo diabetes ao tecido muscular irá promover, do ponto de vista funcional, redução da capacidade física, da força e massa muscular (ANDERSEN; GJERSTAD; JAKOBSEN, 2004; ANDERSEN;

SCHMITZ; NIELSEN, 2005; ANDERSEN et al., 1996, 1997). A miopatia diabética também interfere na funcionalidade das células satélites, importantes células de regeneração e reparo do tecido muscular, visto que foi demonstrado que ratos com diabetes experimental apresentaram menor capacidade de regeneração tecidual destas células (JEONG; CONBOY; CONBOY, 2013).

O processo da atrofia muscular está relacionado com alterações das propriedades contráteis, redução na atividade elétrica do músculo e proliferação de tecido conjuntivo intramuscular, o que pode resultar em perda da extensibilidade e aumento na rigidez tecidual (CAIERÃO; TEODORI; MINAMOTO, 2007; FERREIRA, 2004), tornando o músculo biomecanicamente mais propenso ao risco de lesão frente a uma situação que exija uma resposta muscular mais eficiente (CAIERÃO; TEODORI; MINAMOTO, 2007).

A disfunção no músculo está ligada aos níveis glicêmicos elevados e alterações de hormônios como glicocorticoides, aumentados no Diabetes, e a diminuição da insulina. Além disso, aumento de marcadores como Interleucinas 6 (IL-6), Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e diminuição do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) também se relacionam com estado diabético (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE, 2010).

A atividade física desponta atualmente como uma das terapêuticas para o tratamento do diabetes (TURNER; CLAPHAM, 1998) e já existe um consenso que a prática de exercícios físicos sendo eles de resistência ou sua associação com o aeróbio (SIGAL et al., 2006) exercem efeitos positivos na prevenção e/ou manutenção do controle glicêmico no estado diabético (ALBRIGHT et al., 2000; YAVARI; AZIZOVA, 2012).

O aumento do trabalho muscular durante o exercício é capaz de elicitar várias reações bioquímicas que são essenciais para hipertrofia do músculo.

Em relação ao tecido muscular, evidências apontam que a atividade contrátil é fundamental para o desenvolvimento da massa muscular (LUCIANO;

MELLO, 1998). No que diz respeito ao exercício resistido os benefícios relatados são: hipertrofia muscular, aumento da qualidade muscular (contribuição da hipertrofia e dos fatores neuromusculares às mudanças de força), ganho de força e maior desenvolvimento da energia com melhor funcionalidade em diabéticos (BOULÉ et al., 2001).

No entanto, ainda não é conhecido se o exercício resistido promoveria também benefícios no estado biomecânico dos músculos esqueléticos acometidos pelo estado diabético. Portanto o presente estudo objetiva avaliar se as alterações biomecânicas que acometem a musculatura no estado diabético podem ser revertidas por meio do uso de um programa de treinamento resistido

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo do tipo experimental, com avaliação quantitativa dos dados amostrais.

### **Local do Estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (Depto de Anatomia – UFPE), no Laboratório de Materiais Poliméricos (Depto de Engenharia de Química- UFPE), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE e no Laboratório de Keizo Asami-LIKA da UFPE.

### **Amostra**

A amostra foi composta por 65 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, mantidos em gaiolas de polipropileno (41x34x16 cm) em grupos de três a quatro animais e submetidos a ciclos claro/escuro invertido de 12 horas e temperatura de  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os ratos receberam uma dieta através de ração apropriada (Labina<sup>®</sup> - Purina) e água *ad libitum*. O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 021332/2013-72).

## Grupos Experimentais

Aos 60 dias de vida, os animais foram distribuídos em quatro grupos: a) Grupo Controle Sedentário – GCS (n=11) constituído por ratos sadios e sedentários; b) Grupo Controle Treinado – GCT (n= 14) constituído por ratos sadios e treinados; c) Grupo Diabético Sedentário – GDS (n=19) constituído com ratos diabéticos e sedentários; d) Grupo Diabético Treinado – GDT (n=21) constituído por ratos diabéticos e treinados

## Indução ao Diabetes

Os animais dos grupos GDS e GDT, após jejum de 12 horas, foram induzidos ao diabetes pela administração única, via intraperitoneal, de uma solução de Estreptozotocina (STZ – *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*), (Figura 1), diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose de 60mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos receberam doses equivalentes da solução tampão citrato de sódio objetivando um estresse equivalente do ofertado para os grupos diabéticos. Ao final de 30 minutos após o tratamento os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO *et al.*, 2002).

## Avaliação ponderal e da glicemia

O peso corpóreo dos animais foi aferido semanalmente ao longo de todo o experimento (Toledo, modelo 9094). A verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) aconteceu após jejum de 12 horas, antes da indução ao diabetes, no 3º e 7º dias após a indução, e, após a confirmação do diabetes, semanalmente até o fim do experimento. Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200mg/dL (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003). A glicose sanguínea foi dosada (tiras reagentes Accu-Chek Active) após coleta de uma gota de sangue na ponta da cauda do animal.

### **Treino Resistido**

Na primeira semana após a indução os animais (GCT e GDT) foram submetidos a um programa de exercício resistido (ROGATTO; LUCIANO, 2001) com duração de nove semanas e frequência de cinco sessões por semana. A realização dos saltos ocorreu em um tanque cilíndrico com 20cm de diâmetro e 70 cm de comprimento, com uma sobrecarga acoplada ao tórax do animal através de um colete. Para ajuste dessa sobrecarga utilizada por cada animal, os animais eram pesados no primeiro dia de cada semana e a partir daí era calculada a sobrecarga individual para cada animal. A primeira semana do protocolo foi destinada a adaptação dos animais, onde eles fizeram inicialmente três séries de 10 saltos com um minuto de intervalo entre as séries, (ROGATTO; LUCIANO, 2001) inicialmente com carga de 30% do peso corporal nos dois primeiros dias da semana, 40% no terceiro e quarto dia, e 50% do peso corporal no quinto dia da semana. A profundidade da água também foi sendo acrescida progressivamente, iniciando com 100% do comprimento dos animais no primeiro dia, 120% no segundo e terceiro dia e 140% nos quarto e quinto dias da semana. A partir da segunda semana, as sessões de exercício consistiram na realização de quatro séries de 10 saltos com sobrecarga equivalente a 50% do peso corpóreo, com um minuto de intervalo entre as séries (ROGATTO; LUCIANO, 2001; ROGATTO, 2001). A temperatura da água foi mantida a  $32^{\circ} \pm 1$  C.

### **Eutanásia e Coleta do Material**

Após o término do período referente ao exercício, os animais de todos os grupos foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml para cada 100g de peso e em seguida realizada uma incisão ao longo da superfície posterior da perna direita do animal para remoção da pele e de algumas partes moles, seguida da desarticulação do tornozelo e quadril, mantendo-se a integridade dos músculos e sendo preservada sua inserção proximal no terço distal do fêmur e sua inserção distal no calcâneo. As inserções ósseas foram

mantidas para facilitar a fixação da amostra à máquina de ensaio (MATHEUS et al., 2007).

### **Ensaio Mecânico**

Para o ensaio de tração dos músculos gastrocnêmios foi utilizada a máquina universal de ensaios (marca *EMIC*®, modelo DL500, Paraná, Brasil) do Laboratório de Engenharia Química da UFPE, equipada com célula de carga de capacidade de 50kgf. Dois acessórios especiais foram confeccionados para a fixação do espécime a ser testada, sendo um para fixação do fêmur e outro para fixação do calcâneo, mantendo o joelho e tornozelo com 90° de angulação. Esses fixadores foram confeccionados no Departamento de Engenharia Mecânica da UFPE (Figura 3). No momento do ensaio, os músculos foram acoplados à máquina e foi dada uma pré-carga de 200g durante o tempo de acomodação de 30 segundos, com o intuito de promover a acomodação do sistema. Após a pré-carga, o ensaio prosseguiu por, em média, oito minutos, com velocidade preestabelecida para o ensaio de 10mm/minuto (MATHEUS et al., 2007).

A carga aplicada foi registrada pelo *software Tesc*® em intervalos regulares de alongamento até o momento de ruptura do músculo, sendo gerados gráficos da carga *versus* deformação e tensão *versus* deformação de cada ensaio, a partir dos quais foram obtidas e analisados os seguintes parâmetros:

- Força máxima – máximo de carga suportada passivamente pelo músculo tracionado;
- Deformação máxima – o máximo de alongamento imposto ao músculo até a completa ruptura;
- Energia – quantidade de energia armazenada pela deformação elástica do músculo;
- Tensão máxima – calculada pelo quociente da força máxima suportada pela área de seção transversal do músculo (identifica a quantidade de tensão suportada pelas estruturas intrínsecas do músculo);

- Força/Largura - Obtida por meio da tangente do ângulo formado pela parte curva carga versus alongamento, representa a rigidez extrínseca do material;
- Deformação específica – taxa de alongamento do músculo (calculada pelo quociente entre o comprimento inicial pelo comprimento final);
- Módulo Elástico – determinado pela inclinação encontrada na curva tensão x deformação (viscoelasticidade ou rigidez representativa do músculo quanto material biológico).

### **Análise estatística**

Com os dados obtidos foi construído um banco de dados e posteriormente analisados através do software SPSS versão 18. Após a confirmação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi utilizado o teste *t* Student para comparação entre dois grupos. Para comparação entre três ou mais grupos foi usado a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo *post hoc* de Tukey, para as variáveis com distribuição não normal foi usado o Kruskal-Wallis e Mann whitney. O nível de significância adotado foi 5%.

### **Resultados**

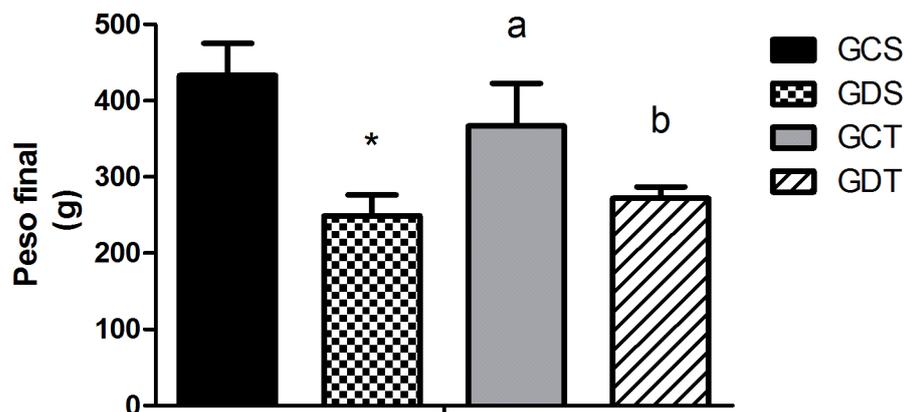
#### *Perdas durante o experimento*

Ao longo do período experimental houveram perdas amostrais atribuídas às complicações do estado diabético e por incapacidade de realização do treino resistido de salto. Nos grupos GDS e GDT foram totalizadas vinte perdas e no GCT três.

#### *Peso corporal*

O peso corporal dos animais do GDS ao fim do experimento se mostrou menor quando comparado com GCS ( $p < 0,05$ ), comportamento semelhante foi demonstrado quando comparamos o GCS com GCT ( $p < 0,05$ ). Já na comparação entre os animais do GDS e GDT não houve diferença significativa,

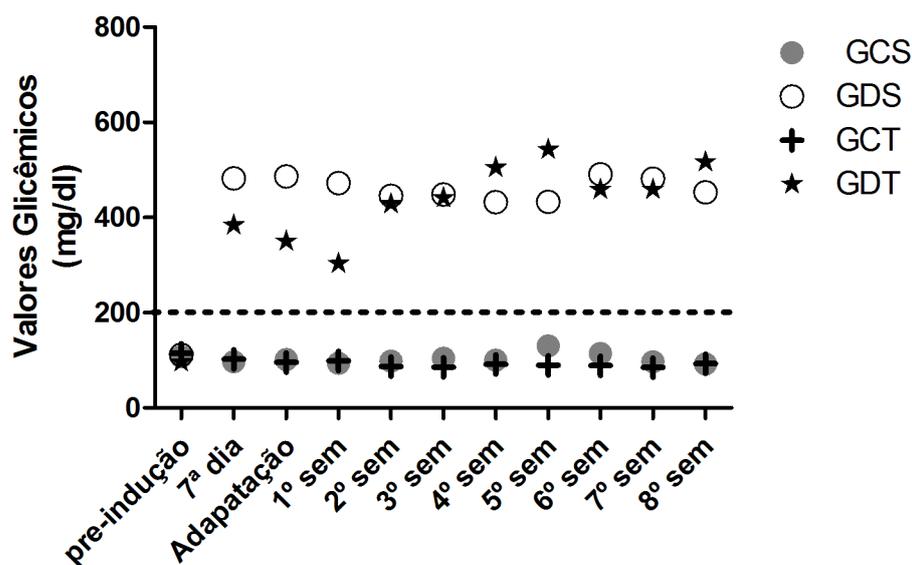
mas quando comparamos o GCT com GDT houve uma diminuição da variável peso para os diabéticos que realizaram o protocolo de treino ( $p < 0,05$ ), (Fig. 8).



**Figura 8** – Peso corporal dos animais ao final do experimento. Valores expressos em média  $\pm$  desvio Padrão;  $GDS < GCS$  \* -  $p < 0,05$ ,  $GCT < GCS$  <sup>a</sup> -  $p < 0,05$ ,  $GDT < GCT$  <sup>b</sup> (Anova com um fator com *post hoc* Tukey).

### Glicemia

Após o 7<sup>a</sup> dia pós-indução os níveis glicêmicos dos animais diabéticos apresentaram-se acima 200mg/dl até o final do experimento, já os animais do GCS e GCT apresentaram a glicemia abaixo do valor supracitado para o mesmo período, portanto, não sendo considerados diabéticos, (Fig.9).



**Figura 9** - Valores glicêmicos expostos em média dos grupos da pré-indução até o fim do experimento.

#### *Efeito do Diabetes nas propriedades biomecânicas dos músculos gastrocnêmios*

Foi evidenciado uma redução na Força máxima, Deformação, Deformação Específica, Energia/Área, Força/Largura e Área de Secção Transversa nos músculos dos animais do GDS comparado aos animais do GCS ( $p < 0,05$ ). A Tensão da Força Máxima e o Módulo Elástico não diferiram entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

#### *Efeito do Treinamento Resistido nas propriedades biomecânicas dos músculos gastrocnêmios*

Com relação ao efeito do treino resistido no diabetes, ao comparar os músculos dos animais do GDT com o GDS observamos aumento para o parâmetro Força Máxima e Força/Largura ( $p < 0,05$ ). Nos demais parâmetros não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela1).

**Tabela 2** – Valores médios dos Parâmetros biomecânicos: Força Máxima (FM); Tensão na Força Máxima (TFMáx); Deformação (D); Deformação Específica (DE); Energia/área (E/A); Módulo Elástico (ME); Área secção transversa (AST).

GRUPOS	FM (N)	TFMáx (MPa)	D (mm)	DE (%)	E/A (N.mm/mm <sup>2</sup> )	ME (MPa)	RIGIDEZ	AST
Grupo controle sedentário (GCS)	51,5 ± 9,21	0,77 ± 0,09	17,85 ± 5,75	41,04 ± 15,89 <sup>c</sup>	7,57 ± 2,59	3,85 ± 0,89	2,05 ± 0,36	67,49 ± 16,37
Grupo Diabético sedentário (GDS)	26,5 ± 9,74 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,18	10,2 ± 3,30 <sup>a</sup>	26,59 ± 8,23	4,90 ± 2,21 <sup>a</sup>	4,63 ± 1,38	1,05 ± 0,36 <sup>a</sup>	30,13 ± 7,48 <sup>a</sup>
Grupo controle treinado (GCT)	47,57 ± 7,52	0,77 ± 0,12	18,81 ± 5,57	56,57 ± 16,06	8,25 ± 2,12	2,7 ± 0,79	1,9 ± 0,3	62,41 ± 13,45
Grupo diabético treinado (GDT)	37,71 ± 3,63 <sup>d</sup>	0,91 ± 0,14	12,04 ± 1,27	35,77 ± 5,09	5,97 ± 1,25	4,1 ± 1,09	1,5 ± 0,14 <sup>d</sup>	41,59 ± 6,74

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão (DP) - <sup>a</sup> GDS < GCS – p < 0,05, <sup>d</sup> GDS < GDT – p < 0,05 Anova com um fator (*One way*) com *post hoc Tukey*.

## Discussão

A escolha do complexo gastrocnêmio-plantar para realização desse estudo está ligado a fatores metodológicos do ensaio mecânico. Sua localização anatômica permite preservar as características anatômicas quanto a origem e inserção após dissecação, o que proporciona uma boa fixação a máquina de ensaio mecânico de tração. Isto garante uma análise completa da estrutura e mimetiza de forma fidedigna a solicitação mecânica e fisiológica do complexo muscular. Outra condição é que esse músculo, em específico, trabalha sob condições de atividade física extrema, o que tem um risco aumentado para lesões e rupturas (JÄRVINEN; EINOLA; VIRTANEN, 1992; ABDALLA; BERTONCELLO; CARVALHO, 2009; SENE; SHIMANO; PICADO, 2009). Além disso, esse músculo apresenta características morfofuncionais em ratos semelhantes às aquelas encontradas no músculo da espécie humana (BROOKE; KAISER, 1970; BROOKER; WILLIAMSON; KAISER, 1971). No diabetes observa-se fraqueza muscular mais presente nos membros inferiores de pacientes com essa patologia (ANDERSEN; GJERSTAD; JAKOBSEN, 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a miopatia ocasionada pelo Diabetes experimental tipo 1 promove prejuízos em grande parte das propriedades biomecânicas do complexo gastrocnêmio-plantar, e que o treino resistido de salto promoveu melhoria nos parâmetros da força máxima e da resistência extrínseca (Força/largura), apesar de não restaurar aos valores de normalidade, caracterizando, entretanto, um efeito protetor à estrutura.

A miopatia diabética promove diversos prejuízos ao tecido muscular dentre eles, redução da força e da massa muscular (ANDERSEN *et al.*, 1997; ANDERSEN; GJERSTAD; JAKOBSEN, 2004). Nos dados apresentados nesta pesquisa, a força máxima suportada pelo músculo diabético se mostrou reduzida. Baseado no modelo mecânico muscular de Hill (1938), apresentando componente elástico em paralelo (CEP), componente elástico em série (CES) e o componente contrátil (CC) em sua arquitetura é possível inferir que a Diabetes consegue promover um desarranjo no CEP do

complexo muscular estudado. O CEP é representado pelas estruturas do tecido conjuntivo: Endomísio, perímísio, epimísio, (HILL, 1938; MARTINS *et al.*, 1998) e a alteração delas repercute na diminuição da força máxima suportada pelo músculo durante aplicação de tensão. Sabe-se que metodologia empregada no ensaio mecânico de tração realiza a avaliação sem ativação neural do músculo, levando em consideração apenas a composição estrutural, não havendo influência das pontes cruzadas, da Actina e da Miosina, (STONE *et al.*, 1996), que no modelo de Hill são estruturas formadoras do componente contrátil (CC).

Uma explicação para a alteração do componente elástico (CEP) no músculo diabético pode estar relacionada com o efeito da hiperglicemia crônica na estrutura do colágeno. A formação dos AGES na Diabetes vão promover uma maior formação das *cross-links* (i.e. ligações intermoleculares) no colágeno o que resulta num menor deslizamento no tecido, elevando sua *stiffness* (PAUL; BAILEY, 1996; AVERY; BAILEY, 2005). Isso também pode explicar a repercussão negativa do diabetes em outros parâmetros biomecânicos avaliados no presente estudo, como a Deformação e a Deformação específica que se mostraram menores, evidenciando uma menor extensibilidade do tecido muscular quando submetido a uma força externa.

Vale ressaltar que ação do colágeno no tecido é essencialmente mecânica, e que os AGES aumentados vão promover alterações nas propriedades mecânicas (ARONSON, 2002; YU *et al.*, 2002), as quais nunca foram avaliadas por meio do ensaio mecânico de tração, o que garante o pioneirismo do presente estudo.

O aumento das *Cross-links* do tecido conjuntivo muscular no estado diabético, que leva a aumento da rigidez tecidual, pode ser a explicação mais plausível no que diz respeito à diminuição da Resistência (Força/largura) no complexo gastrocnêmio-plantar, parâmetro que é definido como a tangente formada pela parte mais linear da Curva Carga *versus* Alongamento e quando diminuída remete a uma rigidez mais acentuada do espécime (JÄRVINEN; EINOLA; VIRTANEN, 1992; MATHEUS *et al.*, 2007).

No Parâmetro Energia/área houve uma redução nos músculos dos animais diabéticos sedentários evidenciando que o mesmo armazenam menor conteúdo energético na fase elástica. A habilidade do tecido muscular em absorver energia na fase elástica sem se romper, é fundamental na prevenção de lesões (GOLDSPINK, 2002). Carvalho e colaboradores (2009) demonstraram que o estado de atrofia observada pós imobilismo também reduziu a absorção de energia na fase elástica. Sugerimos que a atrofia subsequente ao estado de miopatia diabética, possa ter promovido resultados semelhantes do ponto de vista funcional nesse parâmetro.

Nos resultados expostos não evidenciamos diferença nos parâmetros tensão da força máxima e o módulo elástico. A tensão da força máxima é definida matematicamente pela razão entre a força máxima e a área de secção transversa. O módulo elástico é expresso matematicamente pela razão entre a tensão máxima e a deformação e representa a rigidez intrínseca do músculo. De acordo com Kodoma e colaboradores (2012) são escassos os estudos que avaliaram os parâmetros tensão da força máxima e o módulo elástico de músculos esqueléticos e ressaltam em seu estudo a impossibilidade de mensurar adequadamente a área de secção transversa. Os mesmos realizaram a avaliação apenas pela curva carga x deformação, o que não permite obter valores da tensão e do módulo elástico. No presente estudo utilizamos a fórmula da elipse, já utilizada em outros estudos do nosso laboratório para mensurar a área de secção transversa no intuito de obter o comportamento desses parâmetros. (OLIVEIRA *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2012)

A miopatia diabética possui um perfil ligado a um desbalanço na síntese proteica com maior proteólise o que está relacionado a hiperglicemia. Esse perfil levará a um estado atrofico do músculo (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE, 2010). Em um estudo com animais diabéticos que avaliaram o sóleo e o extensor longo dos dedos, foi evidenciada uma menor área de secção transversa no músculo (JERKOVIĆ *et al.*, 2009), achado semelhante ao do nosso estudo.

O Protocolo de exercício resistido em meio aquático só foi capaz de melhorar os valores da Força Máxima e da Força/largura dos músculos de animais diabéticos. Desde 1950 que Joslin recomenda o exercício como componente na regulação da glicose sanguínea em indivíduos diabéticos, dessa forma, esperávamos que outros parâmetros se mostrassem aumentados após o protocolo de 9 semanas de treino.

A força máxima mostrou valores maiores nos animais Diabéticos que realizaram o protocolo de exercício quando comparado aos Diabéticos sedentários, porém esses valores não alcançaram os patamares de valores de normalidade. Essa diferença de resultados entre os grupos diabéticos pode ser atribuída ao fato de que o exercício é capaz de induzir o alinhamento funcional das fibras de colágeno, e também aumentar a resistência do tecido conjuntivo e a massa muscular tornando a estrutura muscular mais resistente (STONE *et al.*, 1996; ABDALLA; BERTONCELLO; CARVALHO, 2009). No que diz respeito o aumento da massa muscular, que indiretamente pode demonstrar aumento da força, Farrell e colaboradores (1999) demonstraram que ratos diabéticos submetidos ao treino resistido durante 10 semanas obtiveram aumento de sua massa muscular. Entretanto, os ratos do grupo controle treinado só demonstraram o mesmo aumento quando a intensidade do treino foi aumentada, ou seja, maior do que àquela a que foram submetidos os animais Diabéticos treinados. Podemos perceber que comportamento similar ocorreu nesse estudo já que o grupo controle treinado não aumentou a força máxima em relação ao seu controle. Farreal e colaboradores (1999) concluíram em seu estudo que sob condições de atrofia muscular, o exercício resistido pode melhorar o aumento da massa muscular, porém exercício de mesma intensidade não altera a massa muscular em animais sem atrofia. Talvez se a intensidade do exercício resistido de salto tivesse sido aumentada o GCT apresentaria aumento da variável força máxima.

A rigidez extrínseca mostrou valores aumentados no complexo muscular avaliado nos diabéticos que realizaram o exercício resistido. No músculo, a resistência a tração é fornecida pela matriz extracelular e

pela titina, proteína presente no sarcômero que garante a resistência passiva natural do músculo, tendo essa última um papel de “mola” na unidade contrátil (GAUTEL; MUES; YOUNG, 1999; TSKHOVREBOVA; TRINICK, 2003).

A matriz extracelular e a titina se apresentam alteradas no estado diabético. No caso da proteína titina a patologia diabética promove redução da expressão gênica dessa estrutura (IKEDA et al., 2003, TERAN-GARCIA et al., 2005). o que pode justificar a redução da resistência extrínseca, já a matriz extracelular também sofre modificações, pois a exposição dessa estrutura a níveis elevados de glicose promove glicação nas proteínas que a compõem, inclusive no próprio colágeno (AVERY; BAILEY, 2005).

O treino resistido de salto promoveu aumento do parâmetro rigidez extrínseca quando comparado ao grupo diabético não treinado, sem, entretanto, atingir os valores de normalidade. Isso demonstra que o protocolo usado de 9 semanas de exercício resistido foi capaz de diminuir a rigidez muscular na miopatia diabética. A expressão gênica da proteína titina é aumentada em resposta ao exercício físico (TERAN-GARCIA et al., 2005).

Pela diminuição da rigidez extrínseca do músculo dos animais diabéticos treinados desse estudo acreditamos que indiretamente a proteína titina foi otimizada na estrutura muscular, em resposta ao programa de treino de resistido de 9 semanas, pois as unidades contrateis são constantemente moldadas e remodeladas para se adaptar às mudanças na carga mecânica (LANGE et al., 2005).

Nos demais parâmetros mecânicos avaliados observamos que o treinamento não conseguiu reverter, os prejuízos instalados na estrutura muscular no estado diabético, o que não era esperado ao fim do estudo. Embora o músculo seja dotado de uma capacidade notável de moldar o fenótipo em resposta à atividade muscular imposta por exercícios (PLAGHKI, 1985; HARRIS, 2003), o estado diabético promove alterações prejudiciais importantes não apenas no músculo, mas em vasos sanguíneos que o irrigam, e em ramos nervosos, estruturas importantes no reparo do músculo (PLAGHKI, 1985; FAULKNER; CÔTÉ, 1986). Além disso, o estado de insulinoopenia e falta

de glico-regulação a que foram submetidos os animais por um período de 9 semanas seria tempo suficiente para promover a glicação de proteínas importantes para o músculo (TAHARA; SHIMA, 1995). Assim, acreditamos que a hiperglicemia e a falta de insulina possam ter influenciado o efeito restaurador do exercício na maioria dos parâmetros biomecânicos.

Sabe-se que no estado de hiperglicemia diversos fatores vão contribuir para alterar a estrutura do músculo e levá-lo ao estado miopático, que promoverá efeitos negativos no tecido como: Ruptura de sarcômeros, distúrbios no metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$ , diminuição da capacidade oxidativa do músculo, aumento do lipídeo intramuscular, diminuição da síntese proteica e aumento da proteólise (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE, 2010).

A proposta do presente estudo foi avaliar o potencial do treino resistido, de forma isolada, em tratar os prejuízos biomecânicos observados na miopatia diabética. No entanto, o efeito terapêutico do treinamento não foi expressivo em todas as variáveis biomecânicas avaliadas. Talvez, estes resultados possam traduzir uma ineficiência do treino resistido, frente a ausência da insulina, em exercer estímulo anabólico capaz de combater todas as alterações instaladas nos músculos diabéticos.

A insulina é uma grande responsável por estimular a síntese protéica (JEFFERSON, 1980; GARLICK; FERN; PREEDY, 1983; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002), e uma grande inibidora da proteólise (PACY *et al.*, 1989). Fluckey Colaboradores. (1996) utilizando um treinamento resistido, demonstraram que em situação de privação de insulina, ocorre uma diminuição nas taxas de síntese de proteínas pós-exercício. Diante desta ideia, acredita-se que a associação do treino resistido com a terapia insulínica promoveria um maior efeito terapêutico do treinamento sobre os parâmetros mecânicos do músculo no estado diabético.

.Curiosamente apenas a força máxima e a rigidez foram alterados de forma positiva com o uso protetor do exercício ao fim dessa pesquisa mesmo com níveis diminuídos de insulina e com os consequentes níveis elevados de glicose em nossos animais diabéticos, mostrando que o exercício resistido possa por meio de suas contrações musculares proporcionaram um efeito

anabolizante. Alguns trabalhos vêm afirmando ativação do IGF-1 durante o exercício de força, proteína com grande papel anabólico (FARRELL *et al.*, 1999; NINDL *et al.*, 2001; TOMAS *et al.*, 1991).

Na análise do peso corpóreo e glicemia dos animais, os resultados obtidos pelo presente estudo foram semelhantes aos de estudos prévios. O peso corpóreo ao fim do experimento foi menor em todos os animais diabéticos em comparação aos controles (REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 2001; LERCO *et al.*, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2012; CHENG; LIANG; LI, 2013). A glicemia dos animais diabéticos sedentários e treinados desde o sétimo dia pós-indução até o fim do experimento manteve-se acima de 200mg/dl, não havendo influência do treinamento nesta variável, como demonstrado por estudos anteriores (GOMES *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Portanto, concluímos que o Diabetes tipo 1 induzido por meio da Streptozotocina em animais promove prejuízos nos parâmetros mecânicos do complexo muscular gastrocnêmio-plantar e que o protocolo de treino resistido exerceu um papel protetor parcial na biomecânica muscular de ratos diabéticos.

## Referências

- ABDALLA, D. R.; BERTONCELLO, D.; CARVALHO, L. C. Avaliação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas imobilizado e submetido à corrente russa. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 16, n. 1, p. 59–64, 2009.
- ALBRIGHT, A. et al. Exercise and Type 2 Diabetes. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 7, p. 1345–1360, 2000.
- ALT, N. et al. Chemical modification of muscle protein in diabetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 425, p. 200–206, 2004.
- ANDERSEN, H. et al. Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. **Diabetes**, v. 45, n. 4, p. 440–5, 1996.
- ANDERSEN, H. et al. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. **Diabetologia**, v. 40, n. 9, p. 1062–9, 1997.
- ANDERSEN, H.; GJERSTAD, M. D.; JAKOBSEN, J. Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. **Diabetes care**, v. 27, n. 10, p. 2382–5, 2004.
- ANDERSEN, H.; SCHMITZ, O.; NIELSEN, S. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 22, n. 10, p. 1401–7, 2005.
- ARKKILA, P. E. T.; GAUTIER, J.-F. Musculoskeletal disorders in diabetes mellitus: an update. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 17, n. 6, p. 945–70, 2003.
- ARONSON, D. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure. **Medical hypotheses**, v. 59, n. 3, p. 297–301, 2002.
- AVERY, N. C.; BAILEY, A. J. Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: Relevance to aging and exercise. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 15, p. 231–240, 2005.

- BEZERRA, M. et al. Evaluation of the biomechanical behavior of tendon in rats subjected to physical activity in water. **Physical Therapy in Sport**, v. 13, n. 3, p. e2–e3, 2012.
- BOULÉ, N. G. et al. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. **JAMA**, v. 286, n. 10, p. 1218–27, 2001.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–25, 2005.
- CAIERÃO, Q.; TEODORI, R.; MINAMOTO, V. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 20, p. 87–92, 2007.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
- CARVALHO, E. N. DE; CARVALHO, N. A. S. DE; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 60–64, 2003.
- CHENG, D.; LIANG, B.; LI, Y. Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 843–849, 2002.
- DE OLIVEIRA, R. R. et al. Mechanical properties of achilles tendon in rats induced to experimental diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528–1534, 2011.
- DURAK, E. P.; JOVANOVIC-PETERSON, L.; PETERSON, C. M. Randomized crossover study of effect of resistance training on glycemic control, muscular strength, and cholesterol in type I diabetic men. **Diabetes care**, v. 13, n. 10, p. 1039–43, 1990.
- FARRELL, P. A et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise exercise synthesis with acute exercise

in rats Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. **J Appl Physiol**, v. 87, p. 1075–1082, 1999.

FAULKNER, J. A.; CÔTÉ, C. Functional deficits in skeletal muscle grafts. **Federation proceedings**, v. 45, n. 5, p. 1466–9, 1986.

FERREIRA, R. ET AL. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.4, n.6, p.94-111, 2004.

FLUCKEY, J. D. et al. Augmented insulin action on rates of protein synthesis after resistance exercise in rats. **The American journal of physiology**, v. 270, n. 2 Pt 1, p. E313–9, 1996.

GARLICK, P. J.; FERN, M.; PREEDY, V. R. The effect of insulin infusion and food intake on muscle protein synthesis in postabsorptive rats. **The Biochemical journal**, v. 210, n. 3, p. 669–76, 1983.

GAUTEL, M.; MUES, A.; YOUNG, P. Control of sarcomeric assembly: the flow of information on titin. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 138, p. 97–137, 1999.

GHAHARY, A. et al. Effect of insulin and statil on aldose reductase expression in diabetic rats. **Diabetes**, v. 40, n. 11, p. 1391–6, 1991.

GOLDSPINK, G. Gene expression in skeletal muscle. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 285–290, 2002.

GOMES, R. J. et al. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 16, n. 5-6, p. 326–31, 2006.

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 933–45, 2003.

HILL, A. V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. **Proceedings of the Royal Society of London**, p. 136–195, 1938.

JÄRVINEN, M. J.; EINOLA, S. A.; VIRTANEN, E. O. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius

muscle. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 73, n. 3, p. 253–7, 1992.

JEFFERSON, L. S. Role of insulin in the regulation of protein synthesis. **Diabetes (USA)**, v.29, n.6, 1980.

JEONG, J.; CONBOY, M. J.; CONBOY, I. M. Pharmacological inhibition of myostatin/TGF- $\beta$  receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 8, p. 1052–60, 2013.

JERKOVIĆ, R. et al. The effects of long-term experimental diabetes mellitus type I on skeletal muscle regeneration capacity. **Collegium antropologicum**, v. 33, n. 4, p. 1115–9, 2009.

JOHNSTON, A. P. W. et al. Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 3, p. C1033–40, 2007.

JOSLIN, E. P.; WILSON, J. L. Lessons for future treatment from 472 fatalities in diabetic children. **British medical journal**, v. 2, n. 4692, p. 1293–6, 1950.

KALYANI, R. R. et al. Quadriceps strength, quadriceps power, and gait speed in older U.S. adults with diabetes mellitus: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 61, p. 769–75, 2013.

KIM, R. P.; EDELMAN, S. V.; KIM, D. D. Musculoskeletal Complications of Diabetes Mellitus. **Clinical Diabetes**, v. 19, n. 3, p. 132–135, 2001.

KIMBALL, S. R.; VARY, T. C.; JEFFERSON, L. S. Regulation of protein synthesis by insulin. **Annual review of physiology**, v. 56, p. 321–48, 1994.

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: Clinical observations and physiological mechanisms. **Pediatric Diabetes**, v. 12, n. 2, p. 345–364, 2011.

LANGE, S. et al. The Kinase Domain of Titin. **Science**, v. 308, p. 1599–1603, 2005.

LEHTI, T. M. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of extracellular matrix proteins in mouse skeletal

muscle. **Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.290, p. 900–907, 2006.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132–142, 2003.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. DE. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. paul. educ. fís**, v. 12, n. 2, p. 202–9, 1998.

MANDROUKAS, K. et al. Muscle adaptations and glucose control after physical training in insulin-dependent diabetes mellitus. **Clinical physiology (Oxford, England)**, v. 6, n. 1, p. 39–52, 1986.

MARTINS, J. A. C. et al. A numerical model of passive and active behavior of skeletal muscles. **Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering**, v. 151, n. 97, p. 419–433, 1998.

MATHEUS, J. P. C. et al. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 1, p. 55–59, 2007.

NINDL, B. C. et al. Overnight responses of the circulating IGF-I system after acute, heavy-resistance exercise. **Journal of applied physiology**, v. 90, n. 4, p. 1319–26, 2001.

PACY, P. J. et al. Failure of insulin infusion to stimulate fractional muscle protein synthesis in type I diabetic patients. Anabolic effect of insulin and decreased proteolysis. **Diabetes**, v. 38, n. 5, p. 618–24, 1989.

PAUL, R. G.; BAILEY, A. J. Glycation of Collagen : the Basis of its Central Role in the Late Complications of Ageing and Diabetes. **Int. J. Biochem Cell Biol.**, v. 28, n. 12, p. 1297–1310, 1996.

PLAGHKI, L. [Regeneration and myogenesis of striated muscle]. **Journal de physiologie**, v. 80, n. 2, p. 51–110, 1985.

RAMAMURTHY, B. et al. Changes in myosin structure and function in response to glycation. **FASEB journal: official publication of the Federation of**

**American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 13, p. 2415–22, 2001.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 9, n. 3, p. 248–55, 2001.

ROGATTO, G. P. **Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar** Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Rio Claro. Instituto de Biociências, 2001.

ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Influência do Treinamento Físico Intenso Sobre o Metabolismo de Proteínas. **Motriz**, p.75-82, 2001.

SENE, G. L.; SHIMANO, A. C.; PICADO, C. H. F. Recuperação mecânica muscular com laser. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 46–49, 2009.

SIGAL, R. J. et al. Physical activity/exercise and type 2 diabetes: A consensus statement from the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1433–1438, 2006.

SNOW, L. M.; FUGERE, N. A.; THOMPSON, L. V. Advanced glycation end-product accumulation and associated protein modification in type II skeletal muscle with aging. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 62, n. 11, p. 1204–10, 2007.

STONE, J. et al. Adaptive responses of hypertrophying skeletal muscle to endurance training. **Journal of applied physiology**, v. 81, n. 2, p. 665–72, 1996.

TAHARA, Y.; SHIMA, K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. **Diabetes care**, v. 18, n. 4, p. 440–7, 1995.

TERAN-GARCIA, M. et al. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 288, n. 6, p. E1168–78, 2005.

TOMAS, F. M. et al. Increased weight gain, nitrogen retention and muscle protein synthesis following treatment of diabetic rats with insulin-like growth

factor (IGF)-I and des(1-3)IGF-I. **The Biochemical journal**, v. 276 ( Pt 2, p. 547–54, 1991.

TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, J. Titin: properties and family relationships. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 9, p. 679–89, 2003.

TURNER, N. C.; CLAPHAM, J. C. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. **Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progrès des recherches pharmaceutiques**, v. 51, p. 33–94, 1998.

VERHAEGHE, J. et al. Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. **Bone**, v. 27, n. 2, p. 249–56, ago. 2000.

YAVARI, A.; AZIZOVA, G. I. Effect of oxidative stress on immunological parameters in type 2 diabetes mellitus in the Azerbaijan Republic. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 6, n. 4, p. 195–8, 2012.

YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50230–6, 2002.

### **7.3 COMPORTAMENTO DA MIOSINA RÁPIDA E LENTA EM RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS AO TREINO RESISTIDO**

Este artigo será submetido para publicação na Revista *Diabetic Medicine*, conceito A2 para a área 21 da CAPES.

## **INTRODUÇÃO**

A miopatia diabética é uma alteração comum no estado diabético, porém menos estudada na literatura atual caracterizando-se por atrofia muscular, diminuição da capacidade física e fraqueza (ANDERSEN *et al.*, 1997; ANDERSEN; SCHMITZ; NIELSEN, 2005). O músculo esquelético é o local de maior consumo energético do corpo, portanto a disfunção da célula muscular é um importante fator patofisiológico no Diabetes.

Dentre as proteínas que compõem o tecido muscular merece grande destaque a miosina, responsável pela determinação das propriedades contráteis do músculo. A quantidade dessa proteína pode ser moldada de acordo com estímulo que o músculo é exposto, dessa forma pode-se alterar a composição da fibra muscular (IORGA; ADAMEK; GEEVES, 2007). Com a diminuição dos níveis de insulina, característico no Diabetes, ocorre queda na síntese de miosina, já que esse hormônio é estimulador da síntese dessa molécula para o tecido muscular (VANDENBURGH *et al.*, 1991).

Com relação ao efeito do Diabetes mellitus tipo 1 no comportamento das fibras musculares a literatura ainda não é clara. Uma atrofia específica de fibras de metabolismo glicolítico, ou seja, fibras de contração rápida é evidenciado em modelos animais nessa patologia. De forma típica, as fibras de contração lenta (Tipo I) são minimamente alteradas, diferentemente da atrofia severa sofrida pelas fibras de contração rápida (Tipo IIB), o que pode explicar a redução da força muscular no estado diabético (COTTER *et al.*, 1993; KRAUSE *et al.*, 2009). No entanto, em estudos com humanos esse achado não é comprovado, nesse caso, um aumento das fibras de contração rápida com uma atrofia maior das fibras lentas foi constatada (CROWTHER *et al.*, 2003;

FRITZSCHE *et al.*, 2008) Essa diferença entre os achados dos trabalhos com humanos e animais pode ser explicada por múltiplos fatores, como a idade, duração da doença, níveis de atividade física, dieta, e o que pode ser mais importante é o tratamento com insulina que proporciona o controle glicêmico nas pesquisas com humanos (SNOW *et al.*, 2005).

Com relação ao efeito do exercício no músculo, é visto que a atividade contrátil é fundamental para o desenvolvimento da massa muscular. O aumento do trabalho muscular durante o exercício é capaz de elicitar várias reações bioquímicas que são essenciais para hipertrofia do músculo (LUCIANO; MELLO, 1998), alterações estas já comprovadas pela capacidade plástica notável do tecido muscular, na qual fenômeno no qual as estruturas musculares podem constantemente ser moldadas e remodeladas para se adaptar às mudanças na carga mecânica (PLAGHKI, 1985; HARRIS, 2003 LANGE *et al.*, 2005).

Além disso, o exercício físico tem a capacidade de reverter as alterações nas proteínas mitocondriais musculares provocadas pelos estados com de deficiência da insulina (MIDAOUJ; TANCREDE; NADEAU, 1996). Com relação ao exercício resistido os benefícios relatados são: hipertrofia muscular, aumento da qualidade muscular e ganho de força muscular (BOULÉ *et al.*, 2001).

Portanto, como ainda não está claro o comportamento da miosina na musculatura esquelética nem se o treino resistido de força consegue reverter as possíveis alterações na composição das fibras musculares de diabéticos. Esse trabalho objetiva avaliar o comportamento da miosina rápida e lenta em músculo de animais diabéticos submetidos a um treino resistido.

## **Materiais e Métodos**

### **Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo do tipo experimental, com avaliação quantitativa dos dados amostrais.

### **Local do Estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (Depto de Anatomia – UFPE), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

### **Amostra**

A amostra foi composta por 23 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, mantidos em gaiolas de polipropileno (41x34x16 cm) em grupos de três animais e submetidos a ciclos claro/escuro invertido de 12 horas e temperatura de  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os ratos receberam uma dieta através de ração apropriada (Labina<sup>®</sup> - Purina) e água *ad libitum*. O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 021332/2013-72).

### **Grupos Experimentais**

Aos 60 dias de vida, os animais foram distribuídos em quatro grupos: a) Grupo Controle Sedentário – GCS (n=3) constituído por ratos saudáveis e sedentários; b) Grupo Diabético Sedentário – GDS (n= 8) constituído com ratos diabéticos e sedentários; c) Grupo Controle Treinado – GCT (n=3) constituído por ratos saudáveis e treinados; d) Grupo Diabético Treinado – GDT (n=8) constituído por ratos diabéticos e treinados.

### **Indução ao Diabetes**

Os animais dos grupos GDS e GDT, após jejum de 12 horas, foram induzidos ao diabetes pela administração única, via intraperitoneal, de uma solução de Estreptozotocina (STZ – *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*),

(Figura 1), diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose de 60mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos receberam doses equivalentes da solução tampão citrato de sódio objetivando um estresse equivalente do ofertado para os grupos diabéticos. Ao final de 30 minutos após o tratamento os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO *et al.*, 2002).

### **Avaliação ponderal e da glicemia**

O peso corpóreo dos animais foi aferido semanalmente ao longo de todo o experimento (Toledo, modelo 9094). A verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) aconteceu após jejum de 12 horas, antes da indução ao diabetes, no 3<sup>o</sup> e no 7<sup>o</sup> dias após a indução, e, após a confirmação do diabetes semanalmente até o fim do experimento.

Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200mg/dL (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003). A glicose sanguínea foi dosada (tiras reagentes Accu-Chek Active) após coleta de uma gota de sangue na ponta da cauda do animal.

### **Treino Resistido**

Na primeira semana após a indução os animais foram submetidos a um programa de exercício resistido (ROGATTO; LUCIANO, 2001) com duração de nove semanas e frequência de cinco sessões por semana. A realização dos saltos ocorreu em um tanque cilíndrico com 20cm de diâmetro e 70cm de comprimento, com uma sobrecarga acoplada ao tórax do animal através de um colete. Para ajuste dessa sobrecarga utilizada por cada animal, os animais eram pesados no primeiro dia de cada semana e a partir daí era calculada a sobrecarga individual para cada animal.

A primeira semana do protocolo foi destinada a adaptação dos animais, onde eles fizeram inicialmente três séries de 10 saltos com um minuto de intervalo entre as séries, inicialmente com carga de 30% do peso corporal nos

dois primeiros dias da semana, 40% no terceiro e quarto dia, e 50% do peso corporal no quinto dia da semana. A profundidade da água também foi sendo acrescida progressivamente, iniciando com 100% do comprimento dos animais no primeiro dia, 120% no segundo e terceiro dia e 140% nos quarto e quinto dias da semana.

A partir da segunda semana, as sessões de exercício consistiram na realização de quatro séries de 10 saltos com sobrecarga equivalente a 50% do peso corpóreo, com um minuto de intervalo entre as séries (ROGATTO; LUCIANO, 2001) e com a profundidade da água correspondendo a 140% do comprimento corporal do rato (ROGATTO; LUCIANO, 2001; ROGATTO, 2001). A temperatura da água foi mantida a  $32^{\circ} \pm 1$  C.

### **Eutanásia e Coleta do Material**

Após o término do período referente ao exercício, os animais de todos os grupos foram anestesiados com solução de Xilazina (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml para cada 100g de peso e em seguida realizada uma incisão ao longo da superfície posterior da perna direita do animal para remoção da pele e de algumas partes moles. O músculo foi separado das inserções proximal e distal mantendo sua integridade muscular. Em seguida o gastrocnêmio lateral foi separado do medial e pesado em balança digital de precisão (Toledo, modelo-AR3130, sensibilidade de 0,001g).

### **Preparação do material coletado.**

Após a coleta, os músculos gastrocnêmios laterais seguiram para o processamento histológico e para imunohistoquímica, a fim de quantificar o número de fibras e avaliar a expressão da miosina rápida e lenta, respectivamente. Os músculos foram fixados em paraformolaldeído (PFA 4%)

por 2 horas, mantidos em sacarose a 15% e em seguida a 30% após 24 horas para ambos. Após os ciclos na sacarose as amostras foram montadas em *Optimal Cutting Temperature* (OCT) e resfriadas em N-Hexano, congeladas em nitrogênio líquido a  $-160^{\circ}\text{C}$  e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram feitos cortes transversais ( $10\mu\text{m}$ ) no criostato (Zeiss, HYRAX C 25), e montados em lâminas com Silano (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). As lâminas seguiram para o processamento histológico e para imunohistoquímica, a fim de quantificar o número de fibras, por meio da expressão da miosina rápida e lenta

### **Processamento e análise imunohistoquímica**

As lâminas encaminhadas para imunohistoquímica foram colocadas em contato com a solução de bloqueio em seguida incubados com anticorpo primário antimiosina esquelética lenta (M-8421, [1:50], produzido em camundongo, Sigma-Aldrich) e antimiosina esquelética rápida (M-4276, [1:50], produzido em camundongo, Sigma-Aldrich) *overnight*, seguidos do anticorpo secundário Cy2 anticamundongo ([1:200], purificado em cabra, Jackson).

Após incubação com os anticorpos, o material foi posto em contato com o diaminobenzedina (DAB), o cromógeno que permite a emissão da coloração e contracorado com hematoxilina. Foram feitas 12 imagens de cada lâmina em (LEICA DM 500) com câmera acoplada, e, através da quantificação do número de pixels de cada imagem (Software Gimp 2.8) foi possível identificar a proporção de miosinas lenta e rápida em cada músculo avaliado.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão em seguida construído um banco de dados analisados através do software SPSS versão 18. Após a confirmação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-

Smirnov foi usado a análise de variância (ANOVA *one way*) seguido do *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado foi 5%.

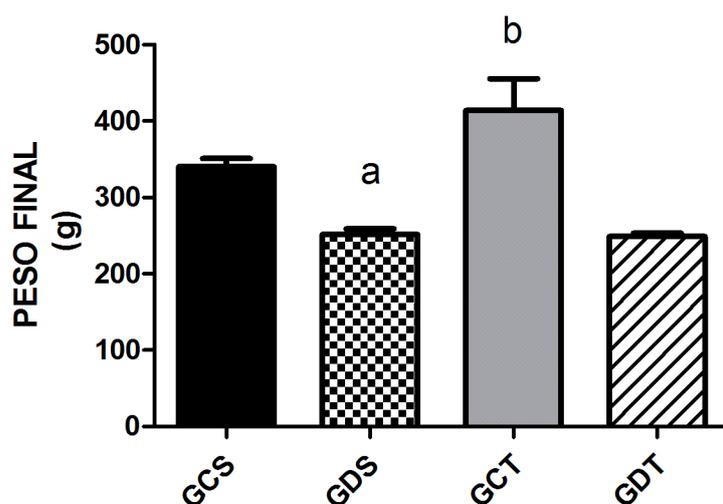
## Resultados

### *Perda amostral*

Ao longo do período experimental houveram perdas amostrais atribuídas às complicações do estado diabético e por incapacidade de realização do treino resistido de salto. Nos grupos GDS e GDT foram totalizadas 11 perdas.

### *Peso Corporal*

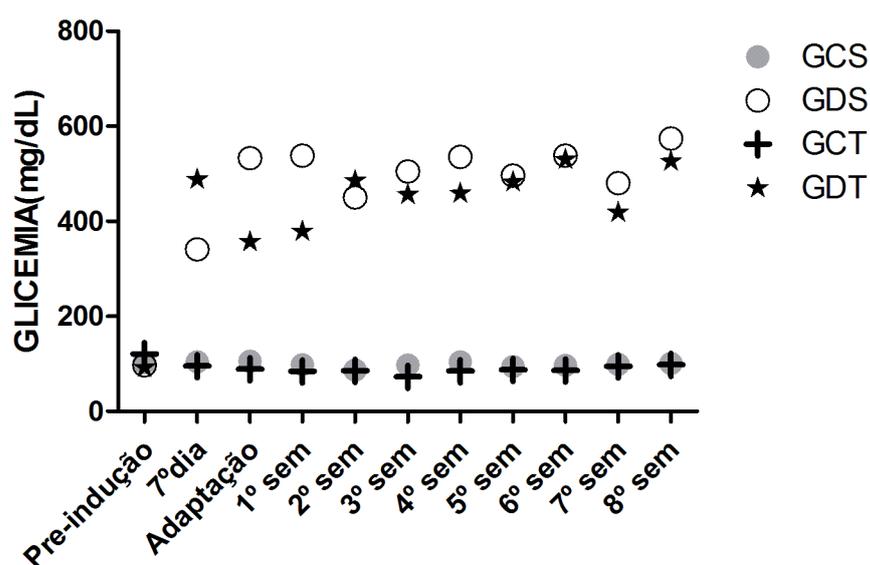
Ao fim do experimento o peso corporal dos animais do GDS foi menor quando comparados ao GCS ( $p < 0,05$ ). Na comparação do GDS com o GDT não houve diferença significativa. Os animais do GDT ao serem comparados com GCT apresentaram-se com menor peso ( $p < 0,05$ ). Já o GDT ao ser comparado com GCT apresenta o peso corporal menor ( $p < 0,05$ ), fig.1.



**Figura 10** – Peso corporal dos animais ao final do experimento. Valores expressos em média  $\pm$  desvio Padrão; GDS < GCS<sup>a</sup> -  $p < 0,05$ , GCS < GCT<sup>b</sup> -  $p < 0,05$ , (ANOVA com um fator com *post hoc* Tukey).

### Glicemia

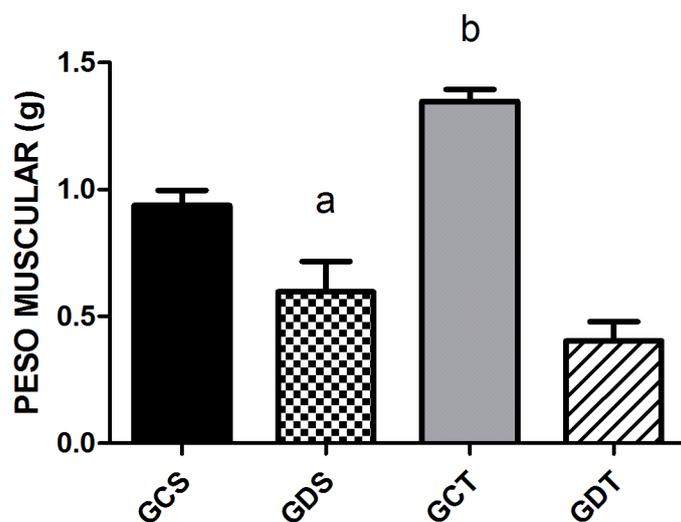
O 7<sup>a</sup> dia após a indução os níveis glicêmicos dos animais induzidos ao diabetes apresentaram-se acima 200mg/dl até o final do experimento. Os animais do GCS e GCT apresentaram a glicemia abaixo do valor supracitado em todos os momentos de aferição, portanto, não sendo considerados diabéticos.



**Figura 11**- Valores glicêmicos expostos em média dos grupos da pré-indução até o fim do experimento

### Pesos dos músculos

Os pesos dos músculos gastrocnêmios laterais ao fim do experimento mostraram-se reduzidos no GDS quando comparado ao GCS ( $p < 0,05$ ), comportamento semelhante foi visto na comparação do GCS com GCT ( $p < 0,05$ ).

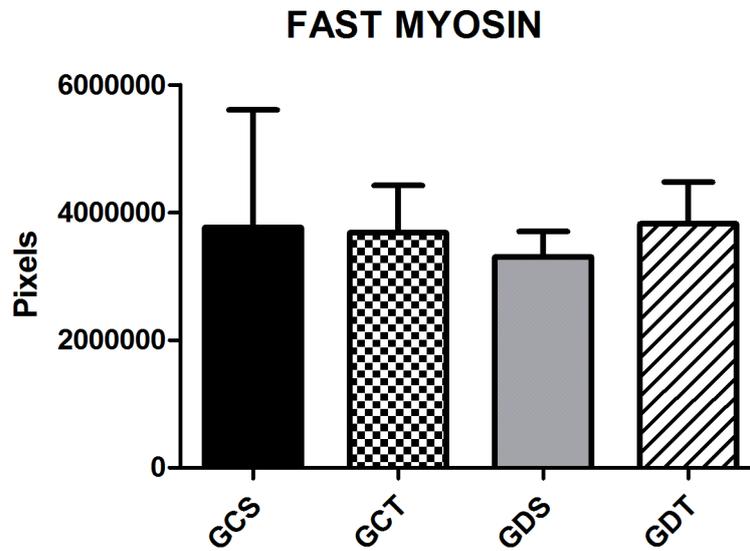


**Figura 12** – Peso muscular dos animais ao final do experimento. Valores expressos em média  $\pm$  desvio Padrão; GDS < GCS <sup>a</sup> -  $p < 0,05$ , GCS < GCT <sup>b</sup> -  $p < 0,05$ , (Anova com um fator com *post hoc* Tukey).

#### *Imunohistoquímica*

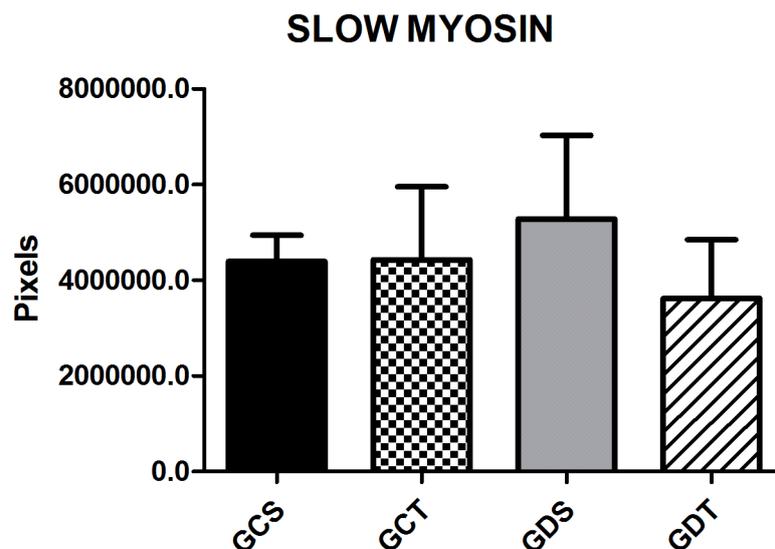
Para os dados avaliados na imunohistoquímica não ocorreu diferença entre os grupos na quantificação da miosina rápida (FAST) na comparação do GCS ( $3764240,778 \pm 1842222,855$ ) com o GDS ( $3304717,778 \pm 399358,839$ ), nem

quando comparamos GDS com o GDT ( $3820746,111 \pm 656269,606$ ). (Fig.15).



**Figura 13.** Valores em pixels da quantificação da miosina rápida (FAST)

Na quantificação da Miosina lenta (SLOW) não foi evidenciado diferença entre na comparação do GCS( $4395522 \pm 550368$ )com GDS( $5283831 \pm 1747266$ ), o mesmo comportamento ocorreu na comparação do GDS com GDT( $3620181 \pm 1228056$ ), fig.5.



**Figura 14.** Valores em pixels da quantificação da miosina lenta (SLOW)

## Discussão

No presente estudo não foi encontrado nenhuma alteração significativa na quantificação da miosina rápida e lenta do músculo gastrocnêmio lateral de ratos diabéticos. No que diz respeito ao efeito do treino resistido de 9 semanas, os resultados não evidenciaram mudanças no comportamento da tipologia muscular.

No estado Diabético o tecido muscular é alterado por diversas modificações, sendo a Hiperglicemia e Hipoinsulinemia as mais crucias no prejuízo a esse tecido (ALT *et al.*, 2004; SNOW *et al.*, 2006, SNOW *et al.*, 2007). Sabe-se que a privação da insulina, mesmo que por curto período, é capaz de diminuir a síntese de proteínas contrateis importantes como a miosina (CHARLTON;BALAGOPAL;NAIR,1997).Era esperado que nos músculos dos animais diabéticos houvesse uma redução importante na quantidade de miosina rápida,e que fosse identificada uma maior quantidade da miosina lenta, o que não ocorreu.

Os estudos desenvolvidos com animais que são induzidos ao diabetes experimental (seja por aloxano ou STZ) apresentam resultados ainda

discrepantes no que diz respeito à diminuição da força, porém relatam um achado comum que é a diminuição de fibras rápidas na musculatura dos animais com diabetes experimental, ou seja, existe uma maior resistência das fibras oxidativas (tipo I) em relação ao tipo IIA/IIB (KRAUSE, RIDDELL, HAWKE, 2010). Sanchez *et al.* (2005) apresentaram em seus achados com músculos de animais induzidos ao diabetes uma atrofia preferencial nas fibras de tipo II (miosina rápida) no músculo extensor longo dos dedos (ELD), visto que as fibras tipo I do músculo sóleo não desenvolveram atrofia. Em outros estudos dois modelos de diabetes experimental em animais o gastrocnêmio lateral demonstrou uma atrofia de fibras tipo II (Miosina rápida), já Snow *et al.* (2005) estudando o soléo de ratos diabéticos demonstrou maior quantidade de fibras com expressão da miosina rápida achado diferente dos estudos supracitados. O presente estudo não apresentou diferença na quantificação da miosina com relação ao diabetes.

No que diz respeito ao treinamento imposto aos animais, não foi obtido nenhum efeito na expressão da miosina rápida e lenta entre os grupos. Snow *et al.* (2005) Utilizando um treino de endurance em ratos diabéticos para avaliar a tipologia muscular por meio da das isoformas de miosina revelou que o protocolo de treinamento não foi capaz de influenciar a expressão da miosina no músculo Sóleo dos diabéticos. Esperávamos em nossos resultados uma expressão significativa da miosina Rápida (Fibras tipo II) no grupo de ratos que realizaram o treino resistido, tendo em vista sua capacidade de gerar hipertrofia (aumento do diâmetro da fibra) e consequente aumento da força (FLAI ;COPENHAVER;JEFFERSON,1980; FIATARONE *et al.*, 1990; BOULÉ *et al.*, 2001 ) uma outra justificativa para o comportamento proteico da miosina nos animais diabéticos treinados do presente estudo talvez esteja ligada a menor taxa de síntese proteica do Gastrocnêmio lateral (parte branca) vista no estudo de Farreal *et al* (2009) no qual os animais exercitados com diabetes (treino resistido) demonstrou uma menor taxa dessa síntese na parte branca do Gastrocnêmio.

Os valores obtidos ao fim do experimento para variável peso corporal e peso muscular apresentaram o mesmo comportamento, os animais diabéticos que não realizaram protocolo de exercício apresentaram uma diminuição do peso corporal e muscular em relação aos animais controle saudáveis, resultado já esperado tendo em vista a atrofia muscular ligada ao diabetes (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE 2010), e no que diz respeito ao peso corporal, vários estudos que utilizam a STZ para indução ao diabetes reportam esse comportamento (AUGHSTEEN; KHAIR; SULEIMAN, 2006; KRAUSE *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011 ; ALMEIDA *et al.*, 2012; CHENG; LIANG; LI, 2013).

Com relação aos animais submetidos ao exercício induzidos ao diabetes podemos afirmar que o exercício resistido não foi capaz de reverter a diminuição do peso corporal. Farreal *et al.* (2009) demonstrou em seus resultados para variável peso que ratos submetidos ao treino resistido de força (levantamento de peso) ao ser comparado com ratos diabéticos sedentários apresentam aumento do peso corporal, resultado diferente do encontrado nesse trabalho, mas devemos lembrar que além da modalidade, tempo de protocolo (utilizou 8 semanas) e o tamanho amostral de Farreal *et al.*, (2009) serem diferentes do presente estudo o protocolo de indução ao diabetes foi também foi diferente, com o uso da pancreatectomia.

Um achado interessante no nosso estudo foi que os animais do GCT mostraram um aumento do peso ao fim do período de treino na comparação com GCS, diferente do encontrado em outro estudo (Farreal *et al.*, 2009) que justifica que ocorre uma menor velocidade de ganho de peso de ratos saudáveis exercitados.

Com relação ao peso dos músculos gastrocnêmios laterais, o diabetes promoveu uma diminuição significativa e o exercício resistido de salto não foi capaz de reverter essa perda. No estudo de Farreal *et al.* (2009) o diabetes diminuiu o peso do complexo gastrocnêmio plantar, resultado similar ao nosso. Já o treino resistido de força possibilitou a hipertrofia dos animais que realizaram o protocolo de exercício. Justificamos que talvez a ausência do

aumento da massa muscular do gastrocnêmio lateral, parte escolhida para nosso estudo, esteja ligada a análise de síntese protéica das partes do complexo gastrocnêmio plantar feita pelo estudo de Farreal et al (2009) anteriormente citada.

Os animais do GCT do nosso estudo apresentaram um aumento do peso muscular do gastrocnêmio lateral em relação ao dos controles sedentários, evidenciando que o treino é capaz de gerar hipertrofia, nos achados de Farrel et al (2009) o gastrocnêmio lateral foi o único que não apresentou diferença na síntese proteica quando comparado ao seu controle, no entanto não avaliamos a síntese proteica dos músculos do nosso estudo o que pode ser uma limitação em afirmar a hipertrofia ligada ao exercício estabelecido.

O comportamento dos grupos em relação ao padrão glicêmico durante todo o experimento dos grupos já era esperado e demonstra que o protocolo de treino não foi capaz de reverter a hiperglicemia pós indução o que está de acordo com os estudos com diabetes experimental (KRAUSE et al., 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012; CHENG, LIANG E LI., 2013).

Portanto, evidenciamos nesse estudo que o treino resistido de salto em meio aquático não foi capaz de alterar a expressão da miosina rápida e lenta de ratos diabéticos. no entanto mais estudos devem ser realizados para elucidar a composição muscular de ratos submetidos ao diabetes experimental associados ao treino resistido.

## REFERÊNCIAS

ALT, N. et al. Chemical modification of muscle protein in diabetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 425, p. 200–206, 2004.

ANDERSEN, H. et al. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. **Diabetologia**, v. 40, n. 9, p. 1062–9, set. 1997.

ANDERSEN, H.; SCHMITZ, O.; NIELSEN, S. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 22, n. 10, p. 1401–7, out. 2005.

AUGHSTEEN, A. A.; KHAIR, A. M. B.; SULEIMAN, A. A. Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats. **Journal of the Pancreas**, v. 7, n. 4, p. 382–389, 2006.

BEZERRA, M. et al. Evaluation of the biomechanical behavior of tendon in rats subjected to physical activity in water. **Physical Therapy in Sport**, v. 13, n. 3, p. e2–e3, 8 ago. 2012.

BOULÉ, N. G. et al. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. **JAMA**, v. 286, n. 10, p. 1218–27, 12 set. 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–25, jun. 2005.

CARVALHO, E. N. DE; CARVALHO, N. A. S. DE; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. spe, p. 60–64, 2003.

CHARLTON, M. R.; BALAGOPAL, P.; NAIR, K. S. Skeletal muscle myosin heavy chain synthesis in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 46, n. August, p. 1336–1340, 1997.

CHENG, D.; LIANG, B.; LI, Y. Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1–7, jan. 2013. 101

COTTER, M. A. et al. Polyol pathway-related skeletal muscle contractile and morphological abnormalities in diabetic rats. **Experimental physiology**, v. 78, n. 2, p. 139–55, mar. 1993.

CROWTHER, G. J. et al. Altered energetic properties in skeletal muscle of men with well-controlled insulin-dependent (type 1) diabetes. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 284, n. 4, p. E655–E662, 1 abr. 2003.

DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 843–849, jul. 2002.

DE OLIVEIRA, R. R. et al. Mechanical properties of achilles tendon in rats induced to experimental diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528–1534, 2011.

EL MIDAOU, A.; TANCRÈDE, G.; NADEAU, A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 45, n. 7, p. 810–6, jul. 1996.

FARRELL, P. A. et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise exercise synthesis with acute exercise in rats Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. **J Appl Physiol**, v. 87, p. 1075–1082, 1999.

FIATARONE, M. A. et al. High-intensity strength training in nonagenarians. Effects on skeletal muscle. **JAMA**, v. 263, n. 22, p. 3029–34, 13 jun. 1990.

FLAIM, K. E.; COPENHAVER, M. E.; JEFFERSON, L. S. Effects of diabetes on protein synthesis in fast- and slow-twitch rat skeletal muscle. **The American journal of physiology**, v. 239, n. 1, p. E88–95, jul. 1980.

FRITZSCHE, K. et al. Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibers are altered in patients with type 1 diabetes. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 116, n. 10, p. 606–13, nov. 2008.

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 933–45, 15 dez. 2003.

IORGA, B.; ADAMEK, N.; GEEVES, M. A. The Slow Skeletal Muscle Isoform of Myosin Shows Kinetic Features Common to Smooth and Non-muscle Myosins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 6, p. 3559–3570, 30 nov. 2007. 102

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: Clinical observations and physiological mechanisms. **Pediatric Diabetes**, v. 12, n. ii, p. 345–364, 2011.

KRAUSE, M. P. et al. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita<sup>+/-</sup> and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 106, n. February 2009, p. 1650–1659, 2009.

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: Clinical observations and physiological mechanisms. **Pediatric Diabetes**, v. 12, n. ii, p. 345–364, 2010.

LANGE, S. et al. The Kinase Domain of Titin. **Science**, v. 308, p. 1599–1603, 2005.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. DE. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. paul. educ. fís**, v. 12, n. 2, p. 202–9, 1998.

PLAGHKI, L. Regeneration and myogenesis of striated muscle]. **Journal de physiologie**, v. 80, n. 2, p. 51–110, jan. 1985.

ROGATTO, G. P. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar. **Rev Bras Med Esporte**, v. 08, n. 06, p. 219–224, 2001.

ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. **Influência do Treinamento Físico Intenso Sobre o Metabolismo de Proteínas**. *Motriz*, v.9, n.2, p. 75-82 Jul-Dez 2001

SANCHEZ, O. A et al. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 99, p. 472–478, 2005.

SNOW, L. M. et al. Myosin heavy chain isoform immunolabelling in diabetic rats with peripheral neuropathy. **Acta Histochemica**, v. 107, p. 221–229, 2005.

SNOW, L. M. et al. Advanced glycation end product in diabetic rat skeletal muscle in vivo. **Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 73, n. 5, p. 244–51, jan. 2006.

SNOW, L. M.; FUGERE, N. A.; THOMPSON, L. V. Advanced glycation end-product accumulation and associated protein modification in type II skeletal muscle with aging. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 62, n. 11, p. 1204–10, nov. 2007. 103

VANDENBURGH, H. H. et al. Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. C475–84, mar. 1991.

### **8.Limitações do estudo**

A metodologia empregada por meio da Estreptozotocina na indução do Diabetes, apesar de ser muito utilizada em vários trabalhos com diabetes experimental, promove um estado diabético com índices glicêmicos de difícil controle em cada animal, o que leva a diversas perdas amostrais no estudo provenientes das complicações responsáveis por debilidades em alguns animais. Outro fator relacionado às limitações é a toxicidade da estreptozotocina em diversos órgãos e até no tecido muscular estudado, mas deve-se ressaltar que seu uso ainda é bem aceito na literatura.

Outro ponto importante é a questão da dificuldade de controlar o estresse que os animais são submetidos durante o exercício físico, o que pode dificultar o seu desempenho e ainda piorar seu estado clínico, aumentando assim a mortalidade do estudo.

### **9. Considerações Finais**

- O diabetes *mellitus* induzido por meio da estreptozotocina promove prejuízos nos parâmetros biomecânicos do complexo gastrocnêmio-plantar de ratos *wistar*. Portanto, os músculos tornam-se mais frágeis quando submetidos à tração, com menor capacidade de alongamento e ainda com menor capacidade de absorver energia na fase elástica, sugerindo que o estado diabético é capaz de diminuir a eficiência biomecânica do músculo quando submetido a uma sobrecarga mecânica.

- O exercício resistido exerceu uma ação protetora sobre a força máxima e a resistência extrínseca no tecido muscular, minimizando os prejuízos impostos pelo estado diabético.

A composição muscular analisada pela quantificação da miosina rápida e lenta no gastrocnêmio lateral não sofreu influência do estado diabético ou do exercício físico utilizado no estudo

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. R.; BERTONCELLO, D.; CARVALHO, L. C. Avaliação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas imobilizado e submetido à corrente russa. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 16, n. 1, p. 59–64, mar. 2009.

ALBRIGHT, A. et al. Exercise and Type 2 Diabetes. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 7, p. 1345–1360, jul. 2000.

ALT, N. et al. Chemical modification of muscle protein in diabetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 425, p. 200–206, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2015. **Diabetes care**, v. 38 Suppl 1, n. Supplement\_1, p. S1– 10, jan. 2015.

ANDERSEN, H. et al. Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. **Diabetes**, v. 45, n. 4, p. 440–5, abr. 1996.

ANDERSEN, H. et al. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. **Diabetologia**, v. 40, n. 9, p. 1062–9, set. 1997.

ANDERSEN, H.; GJERSTAD, M. D.; JAKOBSEN, J. Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. **Diabetes care**, v. 27, n. 10, p. 2382–5, out. 2004.

ANDERSEN, H.; SCHMITZ, O.; NIELSEN, S. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, v. 22, n. 10, p. 1401–7, out. 2005.

ANDREASSEN, T. T.; SEYER-HANSEN, K.; BAILEY, A. J. Thermal stability, mechanical properties and reducible cross-links of rat tail tendon in experimental diabetes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 677, n. 2, p. 313–7, 12 out. 1981.

ARKKILA, P. E. T.; GAUTIER, J.-F. Musculoskeletal disorders in diabetes mellitus: an update. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 17, n. 6, p. 945–70, dez. 2003.

ARONSON, D. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure. **Medical hypotheses**, v. 59, n. 3, p. 297–301, set. 2002.

AUGHSTEEN, A. A.; KHAIR, A. M. B.; SULEIMAN, A. A. Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats. **Journal of the Pancreas**, v. 7, n. 4, p. 382–389, 2006.

AUGUSTIN, R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. **IUBMB life**, v. 62, n. 5, p. 315–33, maio 2010.

AVERY, N. C.; BAILEY, A. J. Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: Relevance to aging and exercise. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 15, p. 231–240, 2005.

BACCHI, E. et al. Metabolic effects of aerobic training and resistance training in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled trial (the RAED2 study). **Diabetes care**, v. 35, n. 4, p. 676–82, 1 abr. 2012

BERGMAN, B. C. et al. Features of hepatic and skeletal muscle insulin resistance unique to type 1 diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 97, n. 5, p. 1663–72, 22 maio 2012.

BEZERRA, M. et al. Evaluation of the biomechanical behavior of tendon in rats subjected to physical activity in water. **Physical Therapy in Sport**, v. 13, n. 3, p. e2–e3, ago. 2012.

BORTOLOTTI, L. A. Alterações das propriedades funcionais e estruturais de grandes artérias no diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 176–184, mar. 2007.

BOBINAC, D. et al. Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle. **Croatian medical journal**, v. 41, n. 3, p. 294–7, set. 2000

BOULÉ, N. G. et al. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. **JAMA**, v. 286, n. 10, p. 1218–27, set. 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–25, jun. 2005.

BRUHAT, G.; FOCCK, A. Curso de física geral - mecânica II. 6. ed. São Paulo: **Difusão Européia do Livro**, 1964. p.371-373.

CAIERÃO, Q.; TEODORI, R.; MINAMOTO, V. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 20, p. 87–92, 2007.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, ago. 2002.

CARVALHO, E. N. DE; CARVALHO, N. A. S. DE; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. spe, p. 60–64, 2003

CARVALHO, L. C. **Estimulação elétrica neuromuscular e alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado**. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC,. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

CARVALHO, L.; POLIZELLO, J.; PADULA, N. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. **Acta ortop. bras.**, v. 17, n. 5, p. 269–272, 2009.

CARVALHO, L. C.; SHIMANO, A. C.; PICADO, C. H. F. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado **Acta Ortopédica Brasileira**, v.16, n.3, p.161-164, 2008.

CHAN, P. et al. Antihyperglycemic action of angiotensin II receptor antagonist, valsartan, in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of hypertension**, v. 21, n. 4, p. 761–9, abr. 2003.

CHARLTON, M. R.; BALAGOPAL, P.; NAIR, K. S. Skeletal muscle myosin heavy chain synthesis in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 46, n. August, p. 1336–1340, 1997.

CHENG, D.; LIANG, B.; LI, Y. Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **BioMed research international**, v. 2013, p. 162724, jan. 2013.

COEN, P. M. et al. Insulin resistance is associated with higher intramyocellular

triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 80–8, jan. 2010

CORNWALL, M. W. Biomechanics of noncontractile tissue. A review. **Physical therapy**, v. 64, n. 12, p. 1869–73, dez. 1984.

COTTER, M. A. et al. Polyol pathway-related skeletal muscle contractile and morphological abnormalities in diabetic rats. **Experimental physiology**, v. 78, n. 2, p. 139–55, mar. 1993.

CROWTHER, G. J. et al. Altered energetic properties in skeletal muscle of men with well-controlled insulin-dependent (type 1) diabetes. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 284, n. 4, p. E655–E662, 1 abr. 2003.

DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 843–849, jul. 2002.

DE OLIVEIRA, R. R. et al. Mechanical properties of achilles tendon in rats induced to experimental diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528–1534, 2011a.

DE OLIVEIRA, R. R. et al. Alterations of tendons in patients with diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 28, n. 8, p. 886–95, ago. 2011b.

DEFINO, H. L. A.; SHIMANO, A. C. Ensaios mecânicos com espaçadores vertebrais . **Rev. bras. ortop**, v. 35, n. 7, p. 235–239, 2000.

DONNA M. D'SOUZA; AL- SAJEE, D.;HAWKE, T. J. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells **Front Physiol**, v. 4,p1–7,dez 2013

DURAK, E. P.; JOVANOVIC-PETERSON, L.; PETERSON, C. M. Randomized crossover study of effect of resistance training on glycemic control, muscular strength, and cholesterol in type I diabetic men. **Diabetes care**, v. 13, n. 10, p. 1039–43, out. 1990.

EL MIDAOU, A.; TANCRÈDE, G.; NADEAU, A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 45, n. 7, p. 810–6, jul. 1996.

FARRELL, P. A et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. **J Appl Physiol**, v.87 p. 1075–1082,1999.

FERREIRA, R. ET AL. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 4, n. 3, p. 94–111, 2004.

FAULKNER, J. A.; CÔTÉ, C. Functional deficits in skeletal muscle grafts. **Federation proceedings**, v. 45, n. 5, p. 1466–9, abr. 1986.

FLAIM, K. E.; COPENHAVER, M. E.; JEFFERSON, L. S. Effects of diabetes on protein synthesis in fast- and slow-twitch rat skeletal muscle. **The American journal of physiology**, v. 239, n. 1, p. E88–95, jul. 1980.

FLUCKEY, J. D. et al. Augmented insulin action on rates of protein synthesis after resistance exercise in rats. **The American journal of physiology**, v. 270, n. 2 Pt 1, p. E313–9, 1996.

FRITZSCHE, K. et al. Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibers are altered in patients with type 1 diabetes. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 116, n. 10, p. 606–13, nov. 2008.

GARLICK, P. J.; FERN, M.; PREEDY, V. R. The effect of insulin infusion and food intake on muscle protein synthesis in postabsorptive rats. **The Biochemical journal**, v. 210, n. 3, p. 669–76, mar. 1983.

GAUTEL, M.; MUES, A.; YOUNG, P. Control of sarcomeric assembly: the flow of information on titin. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 138, p. 97–137, jan. 1999.

GHAHARY, A. et al. Effect of insulin and statil on aldose reductase expression in diabetic rats. **Diabetes**, v. 40, n. 11, p. 1391–6, nov. 1991.

GOLDSPINK, G. Gene expression in skeletal muscle. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 285–290, 2002.

GOMES, R. J. et al. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 16, n. 5-6, p. 326–31, 2006.

GORDIN D., FORSBLOM C., RONNBACK M. Acute hyperglycaemia induces an inflammatory response in young patients with type 1 diabetes. **Ann Med** v.40 p.627–633, 2008.

GOULD III, J.A. Biomecânica básica na terapia esportiva e ortopédica In: **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte**. São Paulo: Manole.1993,p.3-83

HABER et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**,v. 45,n.3:219–227,jun.2001

HADDAD, F. et al. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 98, n. November 2004, p. 911–917, 2005.

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

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 933–45, dez. 2003.

HILL, A. V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. **Proceedings of the Royal Society of London**, p. 136–195, 1938.

IORGA, B.; ADAMEK, N.; GEEVES, M. A. The Slow Skeletal Muscle Isoform of Myosin Shows Kinetic Features Common to Smooth and Non-muscle Myosins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 6, p. 3559–3570, 30 nov. 2007.

JAMES, R. S. et al. Mechanical properties of rabbit latissimus dorsi muscle after stretch and/or electrical stimulation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 83, p. 398–406, 1997.

JÄRVINEN, M. J.; EINOLA, S. A.; VIRTANEN, E. O. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle.

**Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 73, n. 3, p. 253–7, mar. 1992.

JEHLE, P. M. et al. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. **The Journal of endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 297–306, nov. 1998

JEFFERSON, L. S. Role of insulin in the regulation of protein synthesis. **Diabetes (USA)**, v.29, n.6, 1980.

JEONG, J.; CONBOY, M. J.; CONBOY, I. M. Pharmacological inhibition of myostatin/TGF- $\beta$  receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 8, p. 1052–60, ago. 2013.

JERKOVIC, R. et al. Early Myosin Switching Induced by Nerve Activity in Regenerating Slow Skeletal Muscle. **Cell Structure and Function**, v. 22, n. 1, p. 147–153, 27 mar. 1997.

JERKOVIĆ, R. et al. The effects of long-term experimental diabetes mellitus type I on skeletal muscle regeneration capacity. **Collegium antropologicum**, v. 33, p. 1115–1119, 2009.

JOHNSTON, A. P. W. et al. Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 3, p. C1033–40, mar. 2007.

JOSLIN, E. P.; WILSON, J. L. Lessons for future treatment from 472 fatalities in diabetic children. **British medical journal**, v. 2, n. 4692, p. 1293–6, 1950.

KALYANI, R. R. et al. Quadriceps strength, quadriceps power, and gait speed in older U.S. adults with diabetes mellitus: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 61, p. 769–75, 2013.

KEMMER, F. W.; BERGER, M. Exercise and diabetes mellitus: physical activity as a part of daily life and its role in the treatment of diabetic patients. **International journal of sports medicine**, v. 4, n. 2, p. 77–88, maio 1983.

KIM, R. P.; EDELMAN, S. V.; KIM, D. D. Musculoskeletal Complications of Diabetes Mellitus. **Clinical Diabetes**, v. 19, n. 3, p. 132–135, jul. 2001.

KIMBALL, S. R.; VARY, T. C.; JEFFERSON, L. S. Regulation of protein synthesis by insulin. **Annual review of physiology**, v. 56, p. 321–48, jan. 1994.

KLUEBER, K. M. et al. Skeletal muscle in the diabetic mouse: histochemical and morphometric analysis. **The Anatomical record**, v. 225, n. 1, p. 41–5, set. 1989.

KLUEBER, K. M.; FECZKO, J. D. Ultrastructural, histochemical, and morphometric analysis of skeletal muscle in a murine model of type I diabetes. **The Anatomical record**, v. 239, n. 1, p. 18–34, maio 1994

KRAUSE, M. P. et al. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita<sup>+/-</sup> and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 106, n. February 2009, p. 1650–1659, 2009

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: Clinical observations and physiological mechanisms. **Pediatric Diabetes**, v. 12, n. ii, p. 345–364, 2010.

LANGE, S. et al. The Kinase Domain of Titin. **Science**, v. 308, p. 1599–1603, 2005.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132–142, mar. 2003.

LEHTI, T. M. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of extracellular matrix proteins in mouse skeletal muscle. **Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.290, p. 900–907, 2006.

LORTZ, S. et al. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. **Diabetes**, v. 49, n. 7, p. 1123–30, jul. 2000.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. DE. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. paul. educ. fís**, v. 12, n. 2, p. 202–9, 1998.

MANDROUKAS, K. et al. Muscle adaptations and glucose control after physical training in insulin-dependent diabetes mellitus. **Clinical physiology (Oxford, England)**, v. 6, n. 1, p. 39–52, fev. 1986.

MARTINS, J. A. C. et al. A numerical model of passive and active behavior of skeletal muscles. **Computer Methods in Applied Mechanics and**

**Engineering**, v. 151, n. 97, p. 419–433, 1998.

MATHEUS, J. P. C. et al. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 34, p. 55–59, 2007.

MATHEUS, J.; MILANI, J.; GOMIDE, L. Análise biomecânica dos efeitos da crioterapia no tratamento da lesão muscular aguda. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 6, p. 372–375, 2008.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 219, n. 3, p. 713–25, fev. 1994.

MEDINA SÁNCHEZ, M. et al. Ultrastructural study of neuromuscular junction in rectus femoris muscle of streptozotocin-diabetic rats. **Histology and histopathology**, v. 7, n. 4, p. 607–10, out. 1992.

MOYER-MILEUR, L. J. et al. IGF-1 and IGF-binding proteins and bone mass, geometry, and strength: relation to metabolic control in adolescent girls with type 1 diabetes. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 12, p. 1884–91, dez. 2008.

NINDL, B. C. et al. Overnight responses of the circulating IGF-I system after acute, heavy-resistance exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 90, n. 4, p. 1319–26, abr. 2001.

OHLENDIECK, K. Proteomics of skeletal muscle differentiation, neuromuscular disorders and fiber aging. **Expert review of proteomics**, v. 7, n. 2, p. 283–96, 9 abr. 2010.

OLIVEIRA MILANI, J. G. P. et al. Biomechanical effects of immobilization and rehabilitation on the skeletal muscle of trained and sedentary rats. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 10, p. 1641–1648, 2008.

OLIVEIRA, C. A. M. DE; ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 219–224, dez. 2002

PACY, P. J. et al. Failure of insulin infusion to stimulate fractional muscle protein synthesis in type I diabetic patients. Anabolic effect of insulin and decreased proteolysis. **Diabetes**, v. 38, n. 5, p. 618–24, maio 1989.

PAIVA C. Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. **Med Interna (Bucur)** v.7, n.4:234–238.2001

PAUL, R. G.; BAILEY, A. J. Glycation of collagen: The basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28, n. 12, p. 1297–1310, 1996.

PLAGHKI, L. [Regeneration and myogenesis of striated muscle]. **Journal de physiologie**, v. 80, n. 2, p. 51–110, jan. 1985.

RAMAMURTHY, B. et al. Changes in myosin structure and function in response to glycation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 13, p. 2415–22, nov. 2001.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 9, n. 3, p. 248–55, jan. 2001.

REID, R. D. et al. Effects of aerobic exercise, resistance exercise or both, on patient-reported health status and well-being in type 2 diabetes mellitus: a randomised trial. **Diabetologia**, v. 53, n. 4, p. 632–40, 13 abr. 2010

ROGATTO, G. P. **Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar** Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Rio Claro. Instituto de Biociências, 2001.

ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. **Influência do Treinamento Físico Intenso Sobre o Metabolismo de Proteínas**. Motriz, v.9, n.2, p. 75-82 Jul-Dez 2001

ROY, M.; COLLIER, B.; ROY, A. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients. **Psychiatry research**, v. 31, n. 1, p. 31–7, jan. 1990.

RICHTER, E. A.; HANSEN, B. F.; HANSEN, S. A. Glucose-induced insulin resistance of skeletal-muscle glucose transport and uptake. **The Biochemical journal**, v. 252, n. 3, p. 733–7, 15 jun. 1988.

SANCHEZ, O. A et al. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 99, p. 472–478, 2005.

SCHNIDER, S. L.; KOHN, R. R. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. **The Journal of clinical investigation**, v. 67, n. 6, p. 1630–5, jun. 1981

SENE, G. L.; SHIMANO, A. C.; PICADO, C. H. F. Recuperação mecânica muscular com laser. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 46–49, 2009.

- SHIMANO, A. C.; SHIMANO, M. M. Ensaios tecnológicos de materiais biológicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 17., 2000, Florianópolis. Anais...Florianópolis, 2000. p. 15-21.
- SHORT, K. R. et al. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 99, n. March 2005, p. 95–102, 2005.
- SIGAL, R. J. et al. Physical activity/exercise and type 2 diabetes: A consensus statement from the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1433–1438, 2006.
- SIGAL, R. J. et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. **Annals of internal medicine**, v. 147, n. 6, p. 357–69, 18 set. 2007
- SMITH, L. L. Musculoskeletal manifestations of diabetes mellitus. **British Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 1, p. 30–35, 1 fev. 2003.
- SNOW, L. M. et al. Myosin heavy chain isoform immunolabelling in diabetic rats with peripheral neuropathy. **Acta Histochemica**, v. 107, p. 221–229, 2005.
- SNOW, L. M. et al. Advanced glycation end product in diabetic rat skeletal muscle in vivo. **Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 73, n. 5, p. 244–51, jan. 2006.
- SNOW, L. M.; FUGERE, N. A.; THOMPSON, L. V. Advanced glycation end-product accumulation and associated protein modification in type II skeletal muscle with aging. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 62, n. 11, p. 1204–10, nov. 2007.
- SOUZA S.A.,. Ensaios mecânicos de materiais metálicos. São Paulo:Edgard beucher p.3-58,1974
- STANDL, E. et al. Muscle triglycerides in diabetic subjects. Effect of insulin deficiency and exercise. **Diabetologia**, v. 18, n. 6, p. 463–9, jun. 1980.
- STONE, J. et al. Adaptive responses of hypertrophying skeletal muscle to endurance training. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 81, n. 2, p. 665–72, ago. 1996.
- TAHARA, Y.; SHIMA, K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. **Diabetes care**, v. 18, n. 4, p. 440–7, abr. 1995.

TERAN-GARCIA, M. et al. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 288, n. 6, p. E1168–78, jun. 2005.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus — NEJM. **N Engl J Med** 329:977–986.

TOMAS, F. M. et al. Increased weight gain, nitrogen retention and muscle protein synthesis following treatment of diabetic rats with insulin-like growth factor (IGF)-I and des(1-3)IGF-I. **The Biochemical journal**, v. 276 ( Pt 2, p. 547–54, jun. 1991.

TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, J. Titin: properties and family relationships. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 9, p. 679–89, set. 2003.

TURNER, N. C.; CLAPHAM, J. C. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. **Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progrès des recherches pharmaceutiques**, v. 51, p. 33–94, jan. 1998.

VANDENBURGH, H. H. et al. Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. C475–84, mar. 1991.

VERHAEGHE, J. et al. Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. **Bone**, v. 27, n. 2, p. 249–56, ago. 2000.

WEDRYCHOWICZ, A. et al. Insulin-like growth factor-1 and its binding proteins, IGFBP-1 and IGFBP-3, in adolescents with type-1 diabetes mellitus and microalbuminuria. **Hormone research**, v. 63, n. 5, p. 245–51, jan. 2005.

WHITING WC; ZERNICKE RF. Biomecânica da lesão musculoesquelética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001

YAVARI, A.; AZIZOVA, G. I. Effect of oxidative stress on immunological parameters in type 2 diabetes mellitus in the Azerbaijan Republic. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 6, n. 4, p. 195–8, jan. 2012.

YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50230–6, dez. 2002.

ZIB, I.; RASKIN, P. Novel insulin analogues and its mitogenic potential. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 8, n. 6, p. 611–20, nov. 2006.

**ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Ciências Biológicas  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
 fax: (55 81) 2126 8350  
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de agosto de 2013.

Ofício nº 609/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 Para: **Profª Silvia Regina Arruda de Moraes**  
 Departamento de Anatomia  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 23076.021332/2013-72

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação do comportamento da musculatura esquelética de ratos diabéticos submetidos ao treino resistido.**"

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de Criação do Departamento de Nutrição/UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar albinos; Idade: 60 dias; Peso: 250g; Sexo: machos; Nº total de animais: 108.

Atenciosamente,

  
 Profª Tania Rieger  
 Presidente do CEUA/CCB-UFPE  
 SIAPE 2306924

CCB: Integrar para desenvolver

**ANEXO B – PRODUÇÃO TÉCNICA: Artigo Completo Publicado em Periódico, Revista Brasileira de Reumatologia**



Original article

**Is swimming able to maintain bone health and to minimize postmenopausal bone resorption?**

Tâmara Kelly Delgado Paes Barreto<sup>a</sup>, Fabiana Soares Bizarria<sup>b</sup>,  
Marcos Paulo Galdino Coutinho<sup>a</sup>, Patrícia Verçosa de Castro Silveira<sup>a</sup>,  
Karina de Carvalho da Silva<sup>c,\*</sup>, Ana Cristina Falcão Esteves<sup>d</sup>,  
Sílvia Regina Arruda de Moraes<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup>Hospital Agamenon Magalhães, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup>Faculdade Boa Viagem, Recife, PE, Brazil

<sup>d</sup>Department of Anatomy, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2013

Accepted 27 September 2013

Keywords:

Bone tissue

Monosodium glutamate

Ovariectomy

ABSTRACT

**Objective:** We studied the effect of swimming on the somatic and bone growth of female rats.

**Methods:** 40 neonate Wistar female rats were separated into: monosodium glutamate group (GluM, n = 20) and received MSG solution (4.0 mg/g) on alternate days during the first 14 days after birth, and Saline group (SAL, n = 20) which received saline solution for the same period of time and at the same dose. At 60 days of age, GluM group was ovariectomized (GluMO) and SAL group just suffered surgical stress. Subsequently, half the animals in each group started swimming, resulting in groups: sedentary saline (SALsed, n = 10), swimming saline (SALswi, n = 10), sedentary ovariectomized Glutamate (GluMOsed, n = 10) and swimming ovariecto-

imbalance of quadriceps and gluteus medius muscles can cause several clinical symptoms in the injured knee.

**Objective:** To assess knee pain and neuromuscular deficits associated with strength and postural control in women with PFPS.

**Methods:** Twenty young women agreed to participate in this study. The subjects were separated in two groups: G1) PFPS (n=10) with mean age of 21 years and body mass index of 22Kg/m<sup>2</sup>, and G2) Control group (no knee pain), with mean age of 22 years, and body mass index of 23Kg/m<sup>2</sup>. Both groups answered the questionnaires for functional inability and pain, Visual Analog Scale, Lysholm and Anterior Knee Pain Scale (AKPS). Muscular strength was assessed by dynamometer measurement (N), the subjects produced a maximal isometric contraction of quadriceps (Q), gluteus medius (GM) and hip external rotators (ER) muscles. Postural control was evaluated using a force platform under two conditions: bipedal support and unipedal with the injured limb for the PFPS group. Non-parametric Mann Whitney test was used to compare the groups for all variables.

**Results:** Both groups were homogeneous for the anthropometric characteristics. PFPS group presented higher pain than control (VAS=4 vs VAS=0; p=0.00); and more significant (p<0.01) disability signs by questionnaires (AKPS= 78 in PFPS vs AKPS=98 in control, and Lysholm= 82 in PFPS vs Lysholm= 99 in control. No difference between-group was found for muscular lower limb strength. However, poor postural control was observed for PFPS compared to the control group in both the conditions: bipedal support (p=0.02) and unipedal (p=0.00).

**Conclusion:** Women with PFPS presented more pain, joint instability, disability signs and poor postural control than a control group, despite the muscular strength of the injured lower-limb being preserved.

#### THE EFFECTS OF SWIMMING AND TREADMILL TRAINING ON THE BIOMECHANICAL BEHAVIOUR OF RATS FEMUR

M.V.F. Amaral<sup>1</sup>, G.N. Mesquita<sup>1</sup>, M.A. Bezerra<sup>2</sup>, K.D.S. Lira<sup>3</sup>, M.P.G. Coutinho<sup>4</sup>, S.R.A. Moraes<sup>5</sup>. <sup>1</sup>Graduation in Physiotherapy – UFPE, Brazil; <sup>2</sup>Master in Physiotherapy – UFPE, University of Ceará – UFC, Brazil; <sup>3</sup>Master in Physiotherapy – UFPE, Brazil; <sup>4</sup>Master's Program in Physiotherapy – UFPE, Brazil; <sup>5</sup>Anatomy Department, University of Pernambuco – UFPE, Brazil

load resistance. Whereas running improved the femur stiffness, nevertheless without a deficit in its load resistance.

#### SENSORY MOTOR TRAINING IMPROVES COORDINATION, AGILITY AND BALANCE IN SOCCER ATHLETES – BLIND RANDOMIZED CLINICAL TRIAL

Lucas Rafael Heleno<sup>1</sup>, Rubens Alexandre da Silva, Jr.<sup>2</sup>, Leonardo Shigaki<sup>3</sup>, Cynthia Gobbi Alves Araújo<sup>1</sup>, Cristiane Regina Coelho Candido<sup>1</sup>, Victor Hugo Alves Okazaki<sup>1</sup>, Robson Furlan Ricardo<sup>1</sup>, Jonas de Oliveira Pres<sup>1</sup>, Christiane de S. Guerino Macedo<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil; <sup>2</sup>Universidade do Norte do Paraná (UNOPAR, LAFUP), Londrina, PR, Brazil

**Introduction:** The role of the physiotherapist in soccer is well established for injury prevention and rehabilitation using sensory motor training (SMT).

**Objective:** Determine the efficacy of SMT designed exercises for coordination, agility and balance in athletes.

**Methods:** Twenty-three young male soccer athletes participated in this study during their competitions. Before SMT exercises, all athletes performed three functional tests: Figure-of-8 hop test (FB), Side Hop Test (SHT) and Star Excursion Balance Test (SEBT). Afterward, they performed three unipedal balance task with closed eyes on a force platform, for 30 seconds, while centre of pressure (COP) parameters were computed such as: elliptical area of COP (cm<sup>2</sup>) and mean velocity sway of COP in anteroposterior (VEL-AP) and mediolateral (VEL-ML) directions. Both lower limbs (LL) were evaluated: right (RL) and left (LL) by blinded evaluator. After testing, the athletes were randomized into a control group (n=10) and intervention SMT group (n=12). The SMT group performed (3x/week) static (land and foam), dynamic (jumps in different directions) and routes (S, Z and W) balance exercises. The intervention was done for five weeks with progression of exercises each week. At the end, all athletes were re-evaluated. For statistical analysis, the Student paired t test and non-paired was used.

**Results:** Significant improvement was observed for the SMT group after intervention for all variables in both the RL and LLL. Significant differences between groups were found on all functional tests: SHT (p<0.01), FB (p<0.01), and SEBT (p=0.024). An improvement in postural balance was also found in the A-COP (p<0.01), VEL-AP (p<0.01) and VEL-ML (p<0.01).

# CERTIFICADO

**SBD** DIABETES 2013  
 SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES  
**XIX CONGRESSO**  
 da Sociedade Brasileira de Diabetes  
 9 a 11. outubro.2013 | FLORIANÓPOLIS | SC

Certificamos que o trabalho

## **REPERCUSSÃO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO SEM CARGA SOBRE A RESPOSTA BIOMECÂNICA DO FÊMUR DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL**

de autoria de ANA CAMILA NOBRE DE LACERDA BRITO; PATRÍCIA VERÇOZA DE CASTRO SILVEIRA; MARCOS PAULO GALDINO COUTINHO; GABRIEL NUNES DE MESQUITA; MARCOS VINICIUS FALCÃO AMARAL; MÁRCIO ALMEIDA BEZERRA; IZABELLE MARIE TRINDADE BEZERRA; SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES foi apresentado na modalidade TEMAS LIVRES - PÔSTERES.

Florianópolis, 11 de outubro de 2013

Apoio

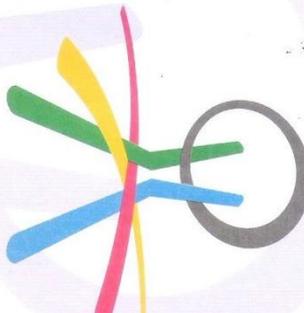
**MERCK**  
SERONO

Baldurino Tschiedel  
Presidente da SBD

Luiz Antônio de Araújo  
Presidente do Congresso

Amely Pereira Silva Balhazar  
Presidente da Comissão Científica Local  
Presidente da SBD-SC

## ANEXO F – PRODUÇÃO TÉCNICA: Resumo Publicado em Anais de Congresso



**VI CONGRESSO BRASILEIRO DA  
SOCIEDADE NACIONAL DE FISIOTERAPIA ESPORTIVA**  
IV Congresso Internacional da  
Sociedade Nacional de Fisioterapia Esportiva  
VI Jornada Brasil Argentina de Fisioterapia Esportiva  
I Feira de Fisioterapia Esportiva

**10**  
ANOS  
SONAFE

**14 a 17 de novembro de 2013**  
Centro de Convenções Rebouças - São Paulo - SP

Promoção:  
  
**SONAFE**  
Brasil

**O trabalho REPERCUSSÃO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO E TREINAMENTO EM ESTEIRA SOBRE A  
RESPOSTA BIOMECÂNICA DO FÊMUR DE RATOS**

Foi apresentado na forma de Pôster, durante o VI Congresso Brasileiro da Sociedade Nacional de Fisioterapia Esportiva, IV Congresso Internacional da SONAFE, VI Jornada Brasil Argentina e I Feira de Fisioterapia Esportiva, tendo como autores: **AMARAL, M.V.F. ; MESQUITA, G.N. ; BEZERRA, M.A. ; LIRA, K.D.S. ;  
COUTINHO, M.P.G. ; MORAES, S.R.A..**

São Paulo, 17 de Novembro de 2013.

  
**Felipe Tadiello**  
Presidente Sonafe 2012-2013

  
**Marcelo Barnhart Santos**  
Presidente do Congresso

**CERTIFICADO**

## ANEXO G – PRODUÇÃO TÉCNICA: Resumo Publicado em Anais de Congresso



Certificamos que

o trabalho 11.008 - EFEITO DO DIABETES MELLITUS SOBRE AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS. Nery CS, Coutinho MPG, Bezerra MA, Amarel MVF, Araujo BST, Silva RD, Walter RS, Moraes SRA, - Departamento de Anatomia - UFPE, foi apresentado sob a forma de painel na

XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no Centro de Convenções do Hotel Gloria em Caxambu - MG, de 27 a 30 de agosto de 2014.

  
Comissão Organizadora

