UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

Juliana Netto Maia

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO TECIDO NERVOSO PERIFÉRICO EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL

Recife
2012

Juliana Netto Maia

Efeitos do Treinamento Físico na Organização Estrutural e Funcional do Tecido Nervoso Periférico em Ratos com Diabetes Experimental

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, área de concentração em Neurociências, pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Profª. Drª. Silvia Regina Arruda de Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

Recife
2012

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

M217e Maia, Juliana Netto.
Efeitos do treinamento físico na organização estrutural e funcional do tecido nervoso periférico em ratos com diabetes experimental / Juliana Netto Maia. – 2012.
123 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Silvia Regina Arruda de Moraes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2012.
Inclui Referências e anexos.

1. Ratos. 2. Neuropatias diabéticas. 3. Sistema Nervoso Periferico. 4. Exercício. 5. Diabetes Mellitus Experimental. I. Moraes, Silvia Regina Arruda de. (Orientadora). II. Título.

612.665 CDD (22.ed.) UFPE (CCS213-2016)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento

45ª DEFESA DE TESE

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DA DOUTORANDA JULIANA NETTO MAIA

No dia 22 de junho de 2012, às 13h, no Auditório do 2º andar do Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os Professores: Celina Cordeiro de Carvalho, Doutora Professora do Departamento de Fisioterapia da Faculdade Estácio do Recife; Andrea Lemos Bezerra de Oliveira, Doutora Professora do Departamento Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco; Maria das Graças Wanderley de Sales Coriolano, Doutora Professora do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco; Kátia Karina do Monte Silva, Doutora Professora do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco e Otávio Gomes Lins, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüiram a Doutoranda, JULIANA NETTO MAIA sobre a sua Tese intitulada **"EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO TECIDO NERVOSO PERIFÉRICO EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL"** orientada pela professora Drª. Silvia Regina Arruda de Moraes. Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da Doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Profª. Drª. Celina Cordeiro de Carvalho	APROVADA
Profª. Drª. Andrea Lemos Bezerra de Oliveira	APROVADA
Profª. Drª. Maria das Graças W. de Sales Coriolano	APROVADA
Profª. Drª. Kátia Karina do Monte Silva	Aprovada
Prof. Dr. Otávio Gomes Lins	Aprovado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

COORDENADOR

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

CORPO DOCENTE

Profa. Dra. Ângela Amâncio dos Santos

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Prof. Dr. Everton Botelho Sougey

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Prof. Dr. Hildo Rocha Cirne de Azevedo Filho

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de oliveira

Profa. Dra. Kátia Karina do Monte Silva

Prof. Dr. Lúcio Vilar Rabelo Filho

Prof. Dr. Luis Ataíde júnior

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Profa. Dra. Maria Lúcia Bustamantes Simas

Prof. Dr. Murilo Duarte da Costa Lima

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

Prof. Dr. Othon Coelho Bastos Filho

Profa. Dra. Patrícia Maria Albuquerque de Farias

Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Profa. Dra. Sandra Lopes de Souza

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

Dedico este trabalho a todos àqueles que contribuíram para que eu chegasse até aqui, principalmente à Deus e aos meus pais Maurício e Dolores, meus irmãos Victor e Daniel e à Romerinho por toda paciência que tiveram comigo e o incentivo incondicional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus por nos momentos de maior desespero sempre me mostrar um caminho e por todas as graças que por toda minha vida Ele me dá;

o Aos meus amados pais Maurício e Dolores por sempre acreditarem em mim e mostrarem o quanto é importante corrermos atrás dos nossos sonhos. Aguentaram meu mau humor e me mostram, sempre, que unidos e com amor vencemos tudo;

o A meu pai por usar toda sua engenharia para construir nosso material de estudo;

o À minha mãe pela paciência em me ouvir e me inspirar sempre;

o Aos meus irmãos Vic e Dan, pela paciência o amor e carinho que sempre tem comigo.

o À Romerinho pela enorme paciência com meu péssimo humor e que nunca me deixou desistir, até nos momentos em que tudo parecia não dá certo, estava lá com carinho e palavras para que eu continuasse seguindo.

o À meu avô Edson e minhas avós Jandira e Evelina, verdadeiros exemplos de vida, luta e coragem e que sempre me mostraram o quanto é importante a família crescer unida pois assim ganhamos força para enfrentar tudo na vida;

o A toda minha família, tios, tias, primos, primas que nunca deixaram de me incentivar e mostrar o quanto estão felizes com as minhas conquistas;

o Às minhas cunhadas e cunhados pela força, reza e torcida sempre!!!;

o A todos os meus amigos que torceram por mim, de longe ou de perto sempre rezando para tudo correr bem, desde a seleção até agora. Tendo paciência e compreendendo meus sumiços.

o Em especial a uma grande amiga que Deus colocou na minha vida Celina Cordeiro de Carvalho, pois sem ela com certeza não estaria aqui, toda a sua dedicação disponibilidade e socorro de sempre, não só na parte científica mas também no apoio incondicional para todas as minhas crises existenciais", não tenho palavras para agradecer, muuuuito obrigada meeeeeesmo, do fundo do coração!!!

o A minha eterna orientadora Andrea Lemos, que desde a graduação está sempre presente nestes momentos da minha vida, sempre se doando e colaborando com todas as minhas pesquisas, obrigada pela dedicação de sempre!!!!

o À minha orientadora Silvia Moraes, pelo apoio e contribuições de sempre.

o Ao meu co-orientador Otávio Lins, um dos presentes que Deus colocou na minha vida e que foi fundamental para eu está aqui hoje. Um profissional dedicado, sempre atencioso e paciente para que tudo desse certo; me permitindo "roubar", em seus finais de semana, o

convívio com sua família, para que tudo estivesse pronto a tempo! Muito obrigada mesmo, minha eterna gratidão;

o A todos que realizaram junto comigo esta pesquisa: Rodriguinho, Rodrigo Fragoso, Márcio, Dinah, Pati, Marquinhos, Karine, Gabriel, Thainá, Ana, Ivson, Deniele, sem vocês nada disso estaria acontecendo, muito obrigada pela paciência e atenção sempre que precisei;

o À Mel e Martinha do laboratório de eletromiografia que se entregaram de corpo e alma a nossa pesquisa. Atenção, amor, carinho infinitas qualidades que só Deus poderia colocar pessoas tão maravilhosas assim no meu caminho;

o Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CETENE – UFPE, Gabi, Ceça, Josi, Catarina por toda paciência em fazer e refazer nosso material até que estivesse perfeito!!!.

o Ao pessoal do Departamento de Fisioterapia da UFPE pela força e coragem que sempre me deram;

o Aos amigos da Faculdade Maurício de Nassau que sempre me apoiaram e me deram força para eu chegar até aqui;

o Aos meus atuais alunos e eternos alunos, e pacientes queridos que sempre me apoiaram e torceram por mim, entendendo sempre o momento em que estava e que às vezes me fez ausente, mesmo assim só recebi carinho e torcida!

"A vontade de Deus nunca irá levá-lo aonde a Graça de Deus não irá protegê-lo."

Resumo

Neste estudo avaliou-se o efeito do treinamento físico aeróbico de moderada intensidade sobre a instalação da neuropatia periférica em ratos com diabetes experimental. Foram utilizados 40 ratos machos, adultos, da linhagem *Wistar*. Estes foram divididos em 4 grupos: controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS), diabético treinado (DT). A indução do diabetes foi realizada nos animais, com 70 dias de vida, através da administração intraperitoneal de estreptozotocina, dose única de 60 mg/kg. O protocolo de exercício constou de treino em esteira rolante por 8 semanas. Na primeira semana, adaptação, os animais correram por 10 minutos diariamente. Nas sete semanas seguintes a velocidade e o tempo foram aumentados gradativamente. O treino foi realizado cinco vezes por semana. Antes da indução e na semana seguinte após o término do protocolo do exercício, foi realizada a velocidade de condução nervosa (VCN). Após 10 semanas da indução, os animais foram anestesiados com solução de Cloridato de ketamina (50 mg) e de Xilasina a 2% (20 mg) (0,2 mL/100g), em seguida o nervo isquiático, foi dissecado e cortado proximalmente, seguindo para uma pré-fixação realizada com solução Karnowisky por 24h a 4°C, depois pós-fixado com solução de tetróxido de ósmio e processado para obtenção de cortes semi-finos (0,5µm), corados com azul de toluidina. Foram avaliados: a VCN, o diâmetro das fibras mielínicas (DFM) e do axônio mielínico (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM), razão "g" (RZG), área de secção transversa do nervo isquiático, quantidade e densidade de fibras nervosas mielínicas, percentual de fibras finas e grossas e quantidade de vasos endoneurais de 4 animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e havendo interação foi realizado o Post Hoc (Tukey HSD), sendo $p < 0,05$. Ao final do experimento observou-se que os animais diabéticos apresentaram peso inferior quando comparados aos seus grupo controle ($p=0,0001$). Não houve diferença entre os valores glicêmicos dos animais dos grupos DS e DT. A DFM e a DAM foi maior nos animais submetidos ao treinamento ($p= 0,0226$; $0= 0,0110$, respectivamente). A EBM não apresentou diferença entre os grupos. Os animais dos grupo DS apresentaram valores de RZG de 0,58, classificando-os em extramielinizados, os demais grupos apresentaram valores dentro na normalidade. Em relação à VCN, houve uma interação pelo ANOVA ($p=0,0124$; TUKEY: $p=0,0004$) mostrando que o grupo DS apresentou queda neste parâmetro. Houve uma diminuição na área e na quantidade de fibras mielínicas nos grupos diabéticos ($p<0,007$; $p=0,005$, respectivamente). No entanto o percentual de fibras grossa foi maior nos DT que no DS ($p=0,04$). Apesar de não haver diferença significativa, o número de vasos endoneurais foi melhor preservados nos animais DT que nos animais do grupo DS. Pode-se perceber que os animais do grupo DT apresentou valores dos parâmetros avaliados mais e próximos aos dos grupos controle. Diante destes resultados, pode-se observar que o treinamento físico parece melhorar/preservar a estrutura nervosa dos animais diabéticos.

Palavras-chave: Ratos, Neuropatia Diabética. Sistema Nervoso Periférico. Exercício físico. Diabetes mellitus experimental.

Abstract

This study evaluated the effect of moderate intensity aerobic exercise training on the peripheral neuropathy installation among rats with experimental diabetes. This experiment was conducted in 40 male mice, adult, Wistar breed. The experiment used 4 groups: sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary diabetic (SD), trained diabetic (TD). The induction of diabetes was performed in 70 days old animals by intraperitoneal administration of streptozotocin, in a single dose of 60 mg/kg. The exercise protocol consisted of treadmill training for 8 weeks. In the first week, adaptation week, animals ran for 10 minutes daily. In the following seven weeks, speed and time were increased gradually. The training was performed five times per week. Before the induction and after the exercise protocol, the nerve conduction velocity (NCV) was performed. After 10 weeks of induction, animals were anesthetized with ketamine hydrochloride solution (50mg) and xylazine 2% (20mg) (0,2ml/100g), then the sciatic nerve was dissected and proximal cut, then it was conducted a pre-setting with Karnowisk solution for 24h at 4°C, after that a postfixed was conducted with osmium tetroxide for obtaining semi-thin sections (0,5μm), stained with toluidine blue. Thus, it were evaluated: NCV, the diameter of myelinated fibers (DMF) and myelin axon (DMA), thickness of the myelin sheath (TMS), "g" ratio (RZG), cross-sectional area of the sciatic nerve, quantity and density of myelinated nerve fibers, the percentage of fine and coarse fibers and endoneural vessels amount of 4 animals of each group randomly selected. The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) method and in cases of interaction detected, it was performed Post Hoc test (Tukey HSD), $p < 0.05$. At the end of the experiment, it was observed that diabetic animals presented lower weight when compared to their control group ($p = 0.0001$). There was no difference between the glycemic values of SD and TC groups. The DMF and DMA were higher in animals exposed to training ($p = 0.0226$; $0 = 0.0110$, respectively). There were no TMS difference between the groups. The animals of the DS group had RZG values of 0.58, ranking them in extramielinizados, the other groups presented their values within the normal range. Regarding the NCV, there was an interaction by ANOVA ($p = 0.0124$; Tukey: $p = 0.0004$) presenting a SD decrease in this parameter. There was a decrease in the area and in the quantity of myelinated fibers in diabetic groups ($p < 0.007$; $p = 0.005$, respectively). However, the percentage of coarse fibers was higher in TD than in SD ($p = 0.04$). Even though no significant difference were found, the vessels endoneurial was better preserved in TD animals than in SD animals. Animals in TD group presented values of their evaluated parameters more closer to the control group. Considering those results, physical training seems to improve / maintain nerve structure in diabetic animals.

Keywords: Rats. Diabetic Neuropathies. Peripheral Nervous System. Exercise. Diabetes mellitus experimental.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esteira motorizada utilizada para treinamento físico dos animais 39
Figura 2. Registro eletrofisiológico 43
Figura 3. Procedimento para retirada do nervo ciático 44
Figura 4. Fotomicrografia da secção transversa do nervo ciático 45
Figura 5. Representação do diâmetro da fibra mielínica e diâmetro do axônio mielínico. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico 41

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

CCS – Centro de Ciências da Saúde
DM – Diabetes Mellitus
OMS – Organização Mundial de Saúde
JNK – c-jun N-terminal kinase
IkK – Ikappa kinase
AHRQ – Agency for Healthcare Research and Qualitly
CS – Grupo Controle Sedentário
CT – Grupo Controle Treinado
DS – Grupo Diabetes Sedentário
DT – Grupo Diabetes Treinado
STZ – Estreptozotocina
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
DFM – Diâmetro da Fibra Mielínica
DAM – Diâmetro do Axônio Mielínico
EBM – Espessura da Bainha de Mielina
RZG – Razão “g”
VCN – Velocidade de Condução Nervosa

SUMÁRIO

1. **APRESENTAÇÃO** 16
2. **CONSIDERAÇÕES INICIAIS** 19
3. **HIPÓTESES** 22
4. **OBJETIVOS** 23
   a. Geral 23
   b. Específicos 23
5. **REVISÃO DA LITERATURA** 24
   a. 25
   b. Artigo de Revisão
6. **MATERIAIS E MÉTODOS** 37
   a. Animais 38
   b. Grupos de Estudo 38
   c. Indução do Diabetes Mellitus 38
   d. Verificação da Glicemia e do Peso 39
   e. Protocolo de Exercício Físico 39
   f. Estudo da velocidade de condução nervosa 42
   g. Coleta do Material e Processamento Histológico 43
   h. Análise Histomorfométrica 44
   i. Análise Estatística 46
7. **RESULTADOS** 47
   a. Artigo Original 1 48
   b. Artigo Original 2 61
8. **CONSIDERAÇÕES FINAIS** 72

REFERÊNCIAS 75

ANEXOS 86

Anexo A: Carta de aprovação do comitê de ética 87

Anexo B: Normas para publicação da revista: Diabetes/Metabolism Research and Reviews 88

Anexo C: Normas pra publicação da revista: Diabetologia 94

Anexo D: Normas para publicação da revista: European Journal of Endocrinology 104

Anexo E: Normas do programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento para elaboração da tese 115

1. APRESENTAÇÃO

Esta tese foi elaborada conforme a "Proposta para apresentação de dissertação/tese dos programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE", baseado em Souza MSL. Guia para redação e apresentação de teses. Editora Coopmed, 2ª Ed, 2002 e se encontra estruturada da seguinte forma:

2. Considerações iniciais;
3. Hipóteses;
4. Objetivos do trabalho;
5. Revisão da literatura: consta de um **artigo de revisão sistemática** que avalia as repercussões que a neuropatia diabética ocasiona na estrutura das fibras mielínicas dos nervo isquiático de humanos. Será submetido Diabetes Metabolism Research and Reviews e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista.
6. Materiais e Métodos;
7. Resultados: o capítulo de resultados está estruturado sob a forma de dois artigos originais: O primeiro (**Artigo Original 1)** descreve os resultado obtidos a partir da pesquisa desenvolvida com ratos de experimentação. Estes animais foram subdivididos inicialmente em dois grupos controle e diabetes, em seguida estes grupos foram subdivididos em animais sedentário e treinados. Este artigo teve como objetivos avaliar o efeito do treinamento físico sobre o diâmetro da fibras mielínicas, o diâmetro dos axônios mielínicos, a espessura da bainha de mielina, a razão "g" e a velocidade de condução nervosa. Este artigo será submetido para publicação na Revista Diabetologia e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista (Anexo 3).

   O segundo artigo (**Artigo Original 2**) descreve também resultados obtidos da pesquisa do doutoramento, utilizando ratos com diabetes experimental submetidos ao treinamento físico. O objetivo deste artigo foi relatar os efeitos que o treinamento aeróbico de moderada intensidade pode exercer sobre a quantidade de fibras mielínicas, a área transversal do nervo isquiático, a densidade das fibras, o tamanho das fibras mielínicas e a quantidade de vasos em cada um dos grupos estudados. Este artigo será submetido à publicação na revista Research European Journal of Endocrinology e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista (Anexo 4).

8. Considerações Finais

Referências

2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Estima-se que, em termos mundiais, cerca de 30 milhões de indivíduos apresentavam diabetes *mellitus* (DM) em 1985, passando para 135 milhões em 1995 e 240 milhões em 2005, com projeção de atingir 366 milhões em 2030, dos quais dois terços habitarão países em desenvolvimento, fazendo com que esta patologia seja considerada uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e um importante problema de Saúde Pública nos países desenvolvidos e, em especial, nos países em desenvolvimento (WILD et al, 2004).

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, assim a proposta da Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. No caso do DM tipo 1, forma presente em 5 a 10% dos casos, é o resultado de uma destruição das células beta pancreáticas com conseqüente deficiência na secreção de insulina. Na maioria dos casos essa destruição das células beta é mediada por auto-imunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo auto-imune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM tipo1 (DIRETRIZES, 2007).

Para o entendimento das características e repercussões do DM tipo 1, as pesquisas translacionais tem se mostrado um ferramenta bastante útil. A conexão de estudos e descobertas laboratoriais transformadas em ferramentas ou meios de tratamentos direcionados aos estudos clínicos é exemplo marcante onde a pesquisa básica não detém apenas o posto de novas descobertas através de modelos animais, mas também o de aperfeiçoar e promover conhecimentos futuramente aplicáveis aos pacientes e a saúde coletiva (AZEVEDO, 2009; OLIVEIRA, 2009).

Para este modelo de estudo, as drogas que melhor tem mostrado mimetizar um quadro de DM tipo 1 é a aloxana e a estreptozotocina. Tratam-se de agentes diabetogênicos químicos utilizados para indução do diabetes experimental que exercem efeito tóxico sobre as células beta-pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008). A destruição das células beta pancreáticas altera a ação da insulina promovendo quadro de hiperglicemia nestes animais.

Complicações a curto e a longo prazos surgem como conseqüência da alta concentração de glicose sanguínea, que podem evoluir culminando em seqüelas incapacitantes para as atividades de vida diária e laborais do paciente diabético, dentre as quais se destacam as complicações vasculares levando a hipertensão arterial, a retinopatia, a nefropatia, a neuropatia diabética e as amputações de extremidades inferiores (GROSSI, 1998; GAMBA et al, 2004; VIEIRA-SANTOS et al, 2008).

A neuropatia diabética é caracterizada segundo Grenne et al (1992) como um grupo de síndromes clínicas e subclínicas de etiologia, manifestação clínica e laboratoriais variadas, com dano difuso ou focal das fibras nervosas periféricas somáticas ou autonômicas, resultante do DM. Vários mecanismos foram propostos para a patogenia da neuropatia diabética, mas ainda não se chegou a um consenso. As suas causas podem ser divididas em dois grandes grupos (1) anormalidades de etiologia metabólica e (2) os que sugerem etiologia vascular. As duas hipóteses estão bem fundamentadas experimentalmente, no entanto, os detalhes de como cada uma aconteceria, permanecem sem claras evidências (HARATI, 2007).

A American Diabetes Association recomenda que indivíduos com DM tipo 1 se envolvam em exercício físico de acordo com seus desejos e objetivos. A influência do diabetes tipo 1 sobre o desempenho aeróbio é complexo (BALDI & HOFMAN, 2010). Trabalhos realizados nas últimas décadas demonstraram claramente que o exercício físico aumenta a captação de glicose pelo músculo esquelético (KENNEDY et al, 1999; LUCIANO et al, 2002). O exercício físico regular, juntamente com a insulinoterapia e o planejamento alimentar, tem sido considerado como uma das três principais abordagens no tratamento do DM tipo 1. O tratamento tem como objetivo aproximar as condições metabólicas do indivíduo com DM tipo 1 de um estado fisiológico normal, conseqüentemente prevenindo ou retardando as complicações crônicas do DM (De ANGELIS et al; 2006).

O músculo esquelético representa aproximadamente 40% da massa corporal total e exerce papel primordial no metabolismo da glicose (SMITH, MUSCAT; 2005). Estudos demonstraram que o exercício físico pode atuar por diferentes mecanismos, como por exemplo atenuação da atividade da JNK (*c-jun N-terminal kinase*) e IkK (*Ikappa kinase*), bloqueadores da ação da insulina, sendo assim uma importante ferramenta na melhora da sinalização da insulina em organismos com resistência à insulina (PAULI et al; 2009).

Assim este trabalho visa identificar qual o papel que o exercício físico de moderada intensidade, pode desempenhar organização estrutural e funcional do tecido nervoso periférico em ratos com diabetes experimental do tipo 1.

3. HIPÓTESES

O treinamento físico aeróbico de moderada intensidade em ratos com diabetes experimental do tipo 1 pode atenuar o processo degenerativo do nervo periférico em virtude do possível aumento da captação da glicose.

- Atenua o déficit da velocidade de condução do nervo caudal;
- Preserva o diâmetro da fibra nervosa e do axônio mielínico;
- Interfere no processo degenerativo da estrutura nervosa;
- Aumenta o número de capilares endoneurais do nervo isquiático

4. OBJETIVOS

a. Geral

- Avaliar a influência do exercício físico aeróbico moderado na organização estrutural e funcional do tecido nervoso periférico em ratos com diabetes experimental do tipo 1.

b. Específicos

- Avaliar a velocidade de condução nervosa do nervo caudal;
- Avaliar o diâmetro das fibras mielínicas;
- Avaliar o diâmetro axonal das fibras mielínicas;
- Avaliar a razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra nervosa;
- Mensurar a espessura da bainha de mielina;
- Quantificar o número de fibras mielínicas do nervo isquiático;
- Verificar a densidade de fibras mielínicas do nervo isquiático;
- Determinar a área de secção transversa do nervo isquiático;
- Avaliar o percentual de fibras mielínicas finas e grossas do nervo isquiático;
- Quantificar o número de vasos endoneurais do nervo isquiático.

5. REVISÃO DA LITERATURA

Repercussões morfológicas nas fibras nervosas de pacientes portadores de neuropatia periférica: uma revisão sistemática

[1 *] Juliana N. Maia , [3]Andréa Lemos [1]Celina C. de Carvalho;, [4]Otávio G. Lins; [5]Sílvia Regina Arruda de Moraes.
[1]Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, [3]Departamento de Fisioterapia, [4]Departamento Neuropsiquiatria, [5]Departamento de Anatomia; Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

*****Autor Correspondente: Endereço: Av. Rosa e Silva, 1205 / 202, Aflitos, CEP: 52050-020 Recife, Pernambuco, Brasil Telefone: 55-81-9999.9995
E-mail: julianannettomaia@hotmail.com

Número de palavras: 2237

Resumo

Objetivo: O propósito da presente revisão sistemática foi avaliar através do melhor nível de evidência disponível, as repercussões morfológicas na estrutura da fibra nervosa de pacientes diabéticos com neuropatia periférica. A busca eletrônica foi realizada utilizando as seguintes bases de dados MEDLINE/PUBMED e Lilacs/BIREME. Metodologia: A Seleção dos estudos foi realizada por dois revisores que selecionaram em primeiro lugar por títulos, em seguida, por resumos e, finalmente, os artigos completos. O Risco de viés dos estudos incluidos foi avaliado usando a escala AHRQ. Resultados: Todos os estudos incluídos foram do tipo observacional com grupo controle e apresentaram alto risco de viés na maioria dos itens avaliados. Ambos os estudos relataram uma diminuição na quantidade de fibras mielínicas e na sua densidade, no entanto devido ao comprometimento metodológico dos estudos, esses resultados devem ser avaliados com ressalva. Conclusões: Assim a incerteza deixada pelo viés na interpretação destes resultados nos mostra uma necessidade de pesquisas mais direcionadas e com melhor controle metodológico.

Palavras- chave: revisão sistemática, neuropatia diabética, diabetes, morfologia, humanos.

INTRODUÇÃO

A hiperglicemia crônica decorrente do distúrbio metabólico no diabetes *mellitus* (DM) pode desencadear o desenvolvimento da neuropatia periférica (1,2). Repercussões nesta estrutura nervosa são bastante recorrentes em portadores de DM (3). Torna-se

bastante difícil precisar sua incidência uma vez que várias são as formas de classificação utilizadas para defini-la (4). A neuropatia envolve um grande espectro de anormalidades onde existe comprometimento de componentes do sistema nervoso periférico e autonômico e podem ocorrer tanto no diabetes tipo 1 quanto no tipo 2, assim como em formas de diabetes adquiridas. Trata-se não uma entidade única simples, mas sim de um conjunto de síndromes com variadas manifestações clínicas ou subclínicas.

Por algum tempo pouca relevância foi dada a neuropatia periférica, uma vez que complicações como a perda da visão, alterações renais pareciam apresentar mais limitação na vida dos pacientes. Todavia estudos tornam evidentes as grandes limitações e repercussões clínicas e limitantes que a neuropatia periférica pode desencadear (5). Desta forma atualmente há um grande interesse científico em se entender como acontece a instalação desta repercussão bastante comum em pacientes diabéticos.

Sabe-se que a severidade neuropática dos portadores do DM, está diretamente relacionada a duração da doença e controle da mesma (6). Porém os mecanismos patogênicos pelos quais a neuropatia diabética produz lesão na estrutura nervosa, ainda permanecem inadequadamente compreendidos sem apresentar nenhum consenso na literatura [7,8,9]. Hipoteticamente tais mecanismos são divididos em dois grandes subgrupos: anomalias que sugerem uma etiologia metabólica e anomalias que sugerem uma etiologia vascular [10,11,12]. Na primeira os estudiosos defendem que a hiperglicemia resultaria em aumento da via do poliol com acúmulo de intracelular de sorbitol o que dificultaria a condução nervosa (13); na segunda haveria um dano neural específico na microcirculação (14).

A biópsia do nervo sural é valiosa no diagnóstico da síndrome da neuropatia periférica [15]. É usada para avaliar o tamanho da fibra e distribuição, a degeneração da mielina e axônios, e outras alterações do nervo no exame anátomo-patológico de rotina [16,17,18,19]. Entendendo as alterações que acontecem a nivel histológico, pode-se compreender melhor as apresentações clínicas desta patologia. Assim este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre as alterações morfológicas observadas nas fibras nervosas em nervos periféricos de pacientes portadores do diabetes *mellitus*.

METODOLOGIA

Foi realizada para esta revisão sistemática uma busca nas bases de dados da MEDLINE/PUBMED e Lilacs/BIREME, sem restrição de ano ou idioma. Através do *Medical Subject Headings* (MeSH) foram extraídos os seguintes descritores para seleção dos artigos: “Diabetes Mellitus”, Biopsy, “Peripheral nerves”, “Microscopy Electron”, “Diabetic Neuropathies”. Além disso, Também foi realizada busca de artigos, que poderiam ser selecionados para a pesquisa, a partir das referências bibliográficas dos artigos selecionados.

A busca foi realizada nas bases de dados eletrônicas por dois pesquisadores independentes (JNM e CCC) na frente do computador utilizando um protocolo pré-definido. Um terceiro avaliador (AL) foi consultado quando necessário como censor para definição da inclusão ou não dos artigos discordantes entre os pesquisadores. Por fim, foram realizadas as extrações dos dados para um formulário de acordo com os critérios avaliados dos estudos elegíveis.

Foram incluídos estudos observacionais envolvendo pacientes com diabetes tipo 1 ou tipo 2, homens e/ou mulheres, do tipo coorte, caso-controle e corte transversal com grupo controle que houvessem realizado a análise da fibra nervosa do nervo sural de pacientes portadores de neuropatia diabética, confirmada por exame clínico e/ou estudo eletrofisiológico.

Foram excluídos os estudos com pacientes portadores de radiculopatias, neuropatia autonômica e neuropatia proximal decorrente do diabetes mellitus e pacientes em tratamento medicamentoso, com exceção do uso de insulina.

O risco de viés dos estudos foi avaliado de forma independente por dois autores (JNM e AL), utilizando a escala "Modified Agency for Healthcare Research and Qualitly (AHRQ) para estudos observacionais [20]. A escala apresenta nove critérios: study question", "study population", "comparability of subjects for all observational studies", "exposure or intervention", "outcome measures", "statistical analysis", "results", "discussion", "funding or sponsorship". Esta escala apesar de possuir critério de pontuação, também pode ser utilizada apenas considerando-se a avaliação dos componentes individuais. Para isto foram considerados os seguintes critérios: adequado: quando preenchia de forma adequada e explícita o item específico da escala, inadequado: quando não preenchia de forma adequada e explícita o item específico da escala e não referido: quando o autor não citava o item específico da escala (21).

Quanto aos dados coletados de cada estudo foram extraídas informações com relação ao tipo de desenho do estudo, ano do estudo, tamanho da amostra, idade e gênero dos participantes, tipo do diabetes, tempo do diabetes, forma da confirmação da neuropatia diabética, estruturas avaliadas, modo de avaliação das estruturas, análise estatística, principais achados e conclusões. Considerou-se, como desfechos primários a quantidade de fibras mielínicas, espessura da bainha de mielina e o espaçamento ente os nodos de Ranvier, como desfecho secundário foram incluídos densidade das fibras mielínicas, a área e o diâmetro das fibras mielínicas, a razão "g" , número de fibras amielínicas.

RESULTADOS

Dos 379 artigos encontrados, 21 foram potencialmente elegíveis e selecionados para uma análise mais detalhada. Destes, apenas dois estudos observacionais com grupo controle [22,23] preencheram os critérios de inclusão da pesquisa (figura 1).

As características dos artigos selecionados estão apresentadas em ordem cronológica na tabela 1. Destes, um total de 93 indivíduos foram avaliados e agrupados em 52 indivíduos sadios, 04 indivíduos diabéticos sem neuropatia e 37 indivíduos diabéticos com neuropatia. Um dos estudos [22] estratificou a pesquisa na neuropatia, inicialmente foi diagnosticado através dos critérios estabelecidos pelo National Diabetes Data Group, em seguida avaliou-se a polineuropatia através dos seguintes testes Neuropathy Symptom Score, Neurologic Disability Score, Computer Assisted Sensory Examination e nerve conduction. O outro estudo [23] estabeleceu como critério para presença da neuropatia aqueles pacientes que apresentassem amputação de membro inferior, decorrente do diabetes.

Quanto à avaliação do risco de viés dos estudos selecionados, os dois estudos esclareceram o objetivo da pesquisa, a forma de diagnóstico da neuropatia diabética e as

análises estatísticas escolhidas também foram adequadas, porém não realizaram comparações múltiplas. Nenhum estudo referiu o cálculo amostral e os critérios de inclusão e exclusão não foram explicitados. A caracterização da amostra também não foi plenamente esclarecida: um estudo [22] não relatou o tempo do diabetes enquanto o outro estudo [23] não estabeleceu o gênero dos participantes. Além disso, não foi possível identificar se havia controle glicêmico nos pacientes diabéticos. Outro ponto importante não contemplado foi a avaliação clínica do grupo controle quanto à presença de neuropatias, tendo sido considerado apenas o relato do paciente. Nenhum dos estudos mostrou uma análise dos fatores de confundimento e apenas um estudo [22] relatou cegamento na análise dos resultados. A forma como foi avaliada a estrutura do nervo sural só foi adequadamente descrita em um dos estudos [23] (Tabela 2).

Em relação aos desfechos estabelecidos, os dois estudos encontraram diminuição da quantidade de fibras mielínicas, no entanto nenhum avaliou as fibras amielínicas. A forma utilizada para avaliação das lâminas foi distinta em cada um dos estudos. O primeiro [22] informa apenas que utilizaram um "Sistema de imagem para morfometria nervosa", o outro [23] relata que para contagem das fibras utilizaram um aumento de 40x no microscópio.

Quanto a avaliação da densidade das fibras mielínicas, ambos os estudos demonstraram diminuição nos pacientes diabéticos quando comparados ao grupo controle. No entanto os métodos de avaliação foram diferentes. O estudo de Dyck et al [22] utilizou para análise o coeficiente de variação e o índice de dispersão. Enquanto que Hill & Williams [23] utilizaram para contagem das fibras mielínicas, uma lente objetiva de 40x e contaram todos os campos do fascículo (tabela 3).

A densidade do tamanho de fibras mielínicas foi relatada apenas por um dos [22]. Os pesquisadores comparam os percentuais e coeficiente de variação das fibras pequenas (<6,5µm) e fibras grandes (>6,5µm) entre os indivíduos saudáveis e neuropatas com diabetes tipo 1 e portadores do diabetes tipo 2. Apesar do percentual dos grupos serem muito próximos (fibras pequenas: 63%, 60%, 63%, respectivamente; fibras grandes: 37%, 40%, 37%, respectivamente) o coeficiente de variação apresentou uma maior variação, no entanto eles não relatam terem sido significativa (fibras pequenas: 10%, 26%, 25%, respectivamente; fibras grandes: 17%, 40%, 42%, respectivamente).

Os outros desfechos propostos: quantidade de fibras amielínicas, área das fibras mielínicas, espessura da bainha de mielina, razão "g", espaçamento entre os nodos de Ranvier, número de fibras amielínicas para responder a pergunta da presente revisão, não foram avaliados pelos estudos selecionados.

DISCUSSÃO

O objetivo desta revisão sistemática foi avaliar as repercussões morfológicas das fibras nervosas dos pacientes diabéticos com neuropatia periférica. Os artigos selecionados descreveram diminuição da quantidade de fibras mielínicas nos pacientes diabéticos bem como na densidade destas fibras [22,23]. No entanto esses resultados devem ser visto com ressalva uma vez que os trabalhos incluídos foram provenientes de estudos observacionais com baixo controle metodológico. Estudos observacionais, do tipo incluído, produzem "instantâneos" da situação da saúde da população [24] não permitindo saber o tempo de exposição de uma causa para gerar um efeito [23]. Além disso, existiram viéses em itens importantes que podem interferir diretamente na fidedignidade e veracidade dos resultados.

O estudo mais antigo selecionado por esta revisão [22] não informa, na caracterização de sua amostra, quanto tempo de instalação do diabetes os pacientes apresentavam. Nenhum dos estudos relata se, e como os pacientes realizavam controle

glicêmico. A duração do diabetes e o grau de controle metabólico são os dois principais preditores do desenvolvimento de neuropatia e determinante de sua gravidade [25]. Uma adequada intervenção medicamentosa se faz necessária, a fim de manter o controle glicêmico, prevenindo desta forma possíveis complicações crônicas [6]. Um inadequado controle glicêmico aumenta o risco de neuropatia. Atualmente tem se observado a importância do controle glicêmico para a redução de complicações microvasculares e conseqüente melhora da qualidade de vida [4,25,27].

Desta forma as repercussões encontradas pelos autores não permite identificar quais pacientes, portadores de neuropatia periférica por diabetes, poderá apresentar as alterações descritas.

Para avaliação da neuropatia um dos estudos [22] utiliza avaliações clínicas para determinar o diagnóstico. A literatura descreve outras várias ferramnetas para triar o portador de neuropatia diabética e entre elas encontram-se os questionários que acabam sendo os mais utilizados pela facilidade de aplicação. No entanto o teste considerado padrão ouro para este diagnóstico é o exame da velocidade de condução nervosa [13], sendo assim um estudo selecionado [22] apresentou um boa forma para avaliação dos participantes de sua pesquisa.

O outro estudo [23] investigou a estrutura nervosa de pacientes submetidos à amputação decorrente de diabetes, uma vez que a amputação é uma conduta de alta prevalência nas complicaçãoes e más evoluções nas extremidades inferiores desses pacientes [28], mas não houve uma confirmação diagnóstica através de um exame mais fidedigno como a velocidade de condução nervosa.

Um cuidado importante que deve ser definido é a confirmação de que os participantes do grupo sadio/controle sejam avaliados da mesma forma que os pacientes do grupo diabético, para que fique claro a possibilidade de comparação entre os grupos. Nenhum dos estudos relata ter realizado exames para excluir a possibilidade de uma neuropatia periférica dos participantes do grupo controle.

A escolha do nervo utilizado pelos estudos (sural) faz-se adequada pelo fato das manifestações clínicas das polineuropatias distais simétricas diferirem dependendo do tipo de fibras nervosas mais envolvidas. Predominantemente as fibras das extremidades inferiores apresentam sintomas característicos [4,29]. Apesar de um estudo [23] estabelecer bem essa contagem o outro empregar uma metodologia que necessita de melhores esclarecimentos.

A metodologia empregada para avaliação das variáveis propostas por um dos estudos [22] não foram bem esclarecida. Os autores não deixam claro como foi realizada, se na contagem das fibras mielínicas utilizou-se todos os campos ou de parte deles, e qual a forma de microscopia foi utilizada. A microscopia óptica, por exemplo, é da ordem de 0,2 micrômetros e permite um aumento de 4, 10, 40 e até 100 vezes, caso tenha sido utilizado a microscopia eletrônica ela pode ampliar em até 150.000 vezes [30]. Supondo que tenha se escolhido cinco campos para contagem, com a ordem de grandeza da microscopia eletrônica menos fibras apareceriam comparadas a quantidade disponível em uma microscopia óptica.

Devido ao tipo do desenho do estudo não houve como os autores realizarem comparações múltiplas e desenvolverem *follow-up* da amostra. A vantagem da realização de estudos com *follow-up* seria conhecer a sequência temporal do efeito da doença, investigar o processo ao longo do tempo e refletir a sequência dos fatos [31].

CONCLUSÃO

A presente revisão sugere que existe uma diminuição do número e da densidade das fibras mielínicas nos pacientes diabéticos com neuropatia periférica quando comparados a indivíduos sadios. No entanto a veracidade desses resultados deve ser interpretada com cautela uma vez que os estudos selecionados apresentaram um alto risco de vies metodologico.

É necessário que sejam realizados pesquisas com um delineamento de estudo mais elaborado para estabelecer uma possível relação de causa e efeito como um estudo longitudinal ou um caso-controle. Além disso, é necessário haver um melhor controle nos critérios de elegibilidade e que se avalie outros desfechos importantes como: que avalie área das fibras mielínicas, diâmetro das fibras mielínicas, espessura da bainha de mielina, razão "g", espaçamento entre os nodos de Ranvier e estudo das fibras amielínicas. Também é necessário que haja um rígido controle diagnóstico no grupo controle em relação à exclusão de neuropatias, e que possa ser estabelecido o tempo de diabetes e controle glicêmico dos pacientes diabéticos. Uma descrição da forma de avaliação das estruturas também deveria ser incluída para que não haja falha na interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS

1. Boulton AJ. (2008) The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis. Diabetes Metab Res Rev 24 Suppl 1:S3-6.
2. Gershater MA, Löndahl M, Nyberg P, Larsson J, Thörne J, Eneroth M, et al. (2009) Complexity of factors related to outcome of neuropathic and neuroischaemic/ischaemic diabetic foot ulcers: a cohort study. Diabetologia. 52(3):398-407
3. Comi, G. & Corbo, neuropatias metabólicas M (1998). Curr. Opin. Neurol., 11 (5) :523-9
4. Vinik, AI & Mehrabyan, A. (2004) Diabetic neuropathies.Med Clin N AM 88:947-990
5. Obregon O, Brito S, Rojas E, Contreras R, Vecchionacce H, Lares M. (2006) Tratamiento de la neuropatía diabética periférica con calcitonina. AVFT [revista en la Internet]. 2006 Dic [citado 2013 Jul 25] ; 25(2): 85-91. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642006000200009&lng=es.
6. Bortoletto, MSS, Viude, DF, Haddad, MCL, Karino, ME. (2010) Caracterização dos portadores de diabetes submetidos à amputação de membros inferiores em Londrina, estado do Paraná. Acta Scientiarum Health Sciences**,** 32 (2):.205-213.

7. Greene, DA, Sima, AAF, Stevens, MJ, Feldman, EL, Lattimers, A. (1992) Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. Diabetes Care 15:.1902-1925.

8. Ross, MA. (1993) Neuropathies associated with diabetes. Med Clin North Am 77:.111-124.

9. Afzaal, S, Sing, M, Saleem, I.(2002) Aetiopathogenesis and management of neuropahy. J. Assoc. Physicians Índia 50 (5):.707-11.

10. Ishii, DN. (1995) Implications of insulin-like growth factors in pathogenesis of diabetic neuropathy Brain Research Reviews, 20:.47-67

11. Giugliano, D, Ciriello, A, Paolisso, G. (1996) Oxidative stress and diabetic vadculart complications. Diabetes Care 18:. 21-19

12. Fazan, VPS, Vasconcelos, CAC, Valença, MM, Nessler, R, Moore, KC. (2010) Diabetic Peripheral Neuropathies: A Morphometric Overview. Int. J. Morphol 28 (1):.51-64.

13. Malone JI, Lowitt S, Korthals JK, Salem A, Miranda C. (1996) The effect of hyperglycemia on nerve conduction and structure is age dependent. American Diabetes Association. 45(2): 209-15

14. Rundless RW (1945) Diabetic neuropathy. General review with report of 125 cases. Medicine 24: 111

15. Dyck PJ, Thomas PK (1993) Peripheral neuropathy. In Pathology of the Peripheral Nervous System. 3rd ed. Dyck PJ, Giannini C, Lais A, Eds. Philadelphia, Saunders p. 514-595.

16. Sundkvist, G, Dahlin, B, Nilsson, H, Eriksson, KF, Lindgarde, F, Rosén, I, Lattimer, SA, Sima, AAF, Sullivan, K, Greene, DA. (2000) Sorbitol and myo-inositol levels and morphology of sural nerve in relation to peripheral nerve function and clinical neuropathy in men with diabetic, impaired, and normal glucose tolerance. Diabetic Medicine 2000, 17:.259-268.

17. Malik RA, Tesfaye S, Newrick PG, Walker D, Rajbhandari SM, Siddique I, Sharma AK, Boulton AJ, King RH, Thomas PK, Ward JD. (2005) Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. Diabetologia, 48(3):.578-85.

18. Mizisin AP, Nelson RW, Sturges BK, Vernau KM, Lecouteur RA, Williams DC, Burgers ML, Shelton GD. (2007) Comparable myelinated nerve pathology in feline and human diabetes mellitus. Acta Neuropathol 113(4):.431-42.

19. Thrainsdottir S, Malik RA, Rosén I, Jakobsson F, Bakhtadze E, Petersson J, Sundkvist G, Dahlin LB. (2009) Sural nerve biopsy may predict future nerve dysfunction. Acta Neurol Scand. 120(1):.38-46.

20. West, S, King, V, Carey, TS, Lohr, NK, McKoy, N, Sutton, SF et al. (2002) Systems to rate the strength of scientific evidence. Evid Rep Technol Assess (Summ) 47:1-11.

21. Shamliyana, T, Kanea RL, Dickinson, S (2010) A systematic review of tools used to assess the quality of observational studies that examine incidence or prevalence and risk factors for diseases Journal of Clinical Epidemiology 20: 1061-1070

22. Dyck PJ, Lais, A, Karnes JL, O'Brien, P, Rizza, R. (1986) A fiber loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. Annals of Neurology 19 (5):.425-439.

23. Hill, RE, Williams, PE. (2004) Perineural cell basement membrane thickening and myelinated nerve fibre loss in diabetic and nondiabetic peripheral nerve. Journal of the Neurological Sciences 217:.157-163.

24. Sitta, EI, Arakawa, AM, Caldana, ML, Peres, SHCS. (2010) A contribuição de estudos transversais na área da linguagem com enfoque na afasia. Rev CEFAC 12 (6):.1059-1066.

25. Harati, Y. (2007) Diabetic neuropathies: unanswered questions. Neurol. Clin 25 (1):.303-17.

26. Boulton, AJM, Kirsner, RS, Vileikute, L. (2004) Neuropathy diabetic foot ulcers. N England J Med 351 (1):48-55

27. Bertolucci, MC, Aguiar LGK, Villea, NR, Bouskela, E. (2007) Alterações microcirculatórias no diabetes. Arg Bras Endocrinol Metab 51(2):204-211.

28. Milman, MHSA, Leme, CBM, Borelli, DT, Kater, FR, Bacilli, ECDC, Rocha, RCM, Senger, MH. (2001) Pé diabético: Avaliação da evolução e custo hospitalar de pacientes internados no conjunto de Sorocaba. Arq. Bras. Endocrinol Metabol 45 (5):.447-451

29. De Fronzo RA, Hendler R, Simonson D. (1982) Insulin resistance is a proeminent feature of insulin-dependent diabetes. Diabetes. 31:795-801.

30. Timm, LL. (2005) Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. Caderno La Salle XI 2 (1):.231-239.

31. Hochman, B, Nahas, FX, Oliveira Filho, RS, Ferreira, LM. (2005) Desenhos de pesquisa. Acta Cir Bras 20 (suppl.2):.2-9.

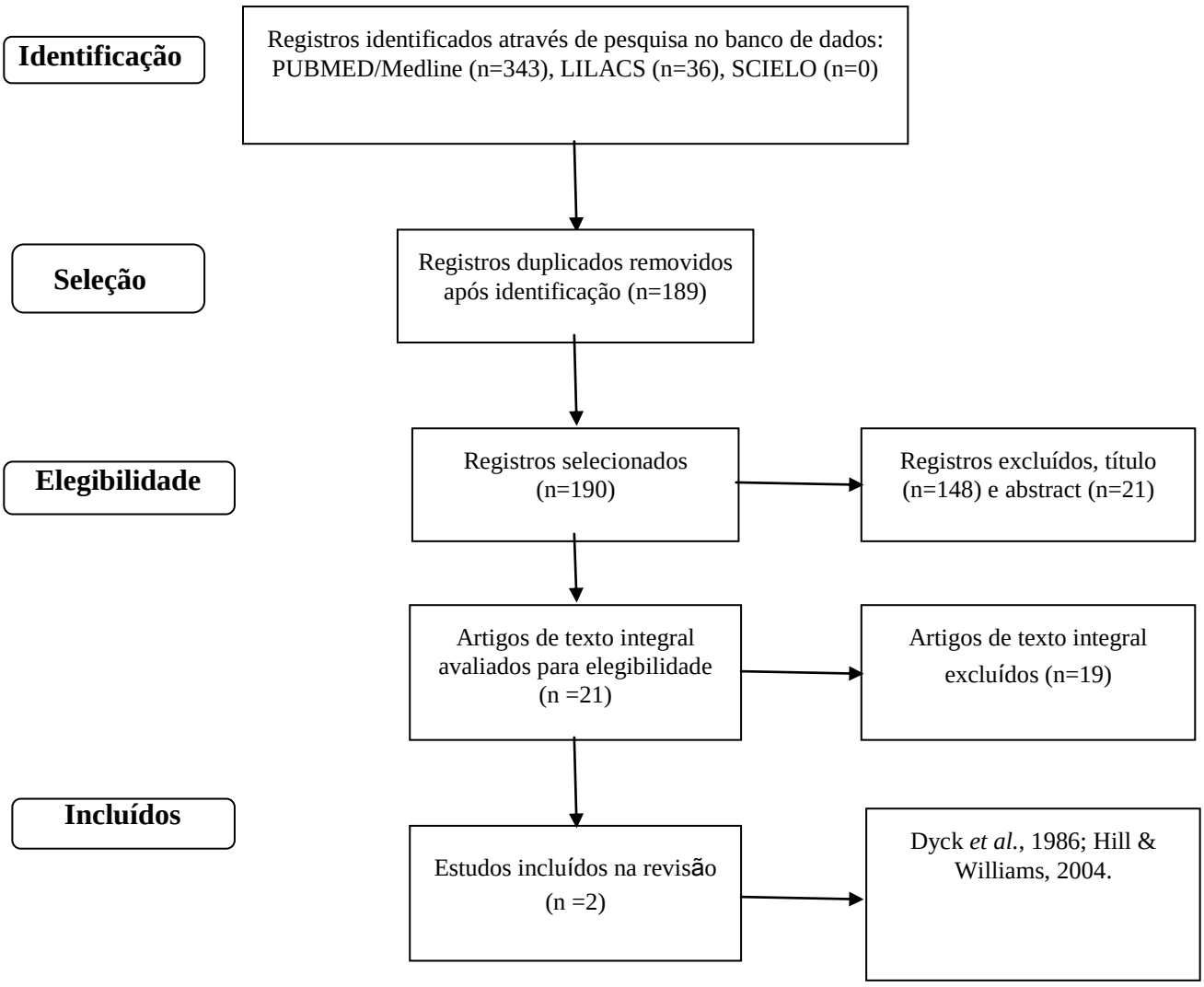

Figura 1. Busca e seleção dos estudos para a revisão sistemática de acordo com o PRISMA.

Tabela 1: Características dos estudos elegíveis para revisão em ordem cronológica

CRITERION	Dyck	Hill e Williams
1. Study Question		
1. Clearly focused and appropriate question	A	A
2. Study Population		
Description of study population	I	I
Sample size justification	NR	NR
3. Comparability of Subjects for All Observational Studies		
Specific inclusion/exclusion criteria for all groups	I	I
Criteria applied equally to all groups	I	I
Comparability of groups at baseline with regard to disease status and prognostic factors	I	I
Study groups comparable to non-participants with regard to confounding factors	I	I
Use of concurrent controls	I	I
Comparability of follow-up among groups at each assessment	*	*
4. Exposure or Intervention		
1. Clear definition of exposure	I	A
Measurement method standard, valid and reliable	A	A
Exposure measured equally in all study groups	I	I
5. Outcome measures		
Primary/secondary outcomes clearly defined	A	A
Outcomes assessed blind to exposure or intervention	A	NR
Method of outcome assessment standard, valid and reliable	A	A
Length of follow-up adequate for question	*	*
6. Statistical Analysis		
Statistical tests appropriate	A	A

Multiple comparisons taken into consideration	NR	NR
Modeling and multivariate techniques appropriate	NR	NR
Power calculation provided	NR	NR
Assessment of confounding factors	NR	NR
Dose-response assessment if appropriate	NR	NR
7. Results		
Measure of effect for outcomes and appropriate measure of precision	*	*
Adequacy of follow-up for each study group	*	*
8. Discussion		
Conclusions supported by results with possible biases and limitations taken into consideration	I	I
9. Funding or Sponsorship		
Type and sources of support for study	NR	NR
TOTAL SCORE		

Tabela 2. Resultado da aplicação da Escala Modified Agency for Healthcare Research and Qualitly (AHRQ) para estudos observacionais.

A: adequado; I: inadequado; NR: não referido
* Não se adequa ao desenho do estudo
** Não se adequa ao desfecho mensurado o qual foi um desfecho substitutivo.

Tabela 3: Características dos estudos elegíveis quanto às variáveis analisadas

Autor/ano	Estrutura avaliada	Tipo do corte	Tipo de análise	Forma de avaliação	Resultados
Dyck et al., 1986	Fascículo do nervo sural	Transversal Semifino (3/4µm)	• Avaliação neuropatológica • Área de perda de fibras • Distribuição dos tamanhos das fibras mielínicas • Área axonal de mielina	Sistema de imagem para morfometria nervosa	Perda primária de fibras Densidade de fibras mielínicas GC pacientes neuropatas p=0,00001 para o CV. Tamanho da fibras (CV) GC 10% de fibras pequenas e 17% de fibras grandes; GDT1 com neuropatia: pequenas 26%. Grandes 40%: GDT2: peq 25%, grandes 42% Área axonal sem diferença significativa
Hill; Williams, 2004	Nervo sural	Corte transversal	• Densidade de fibras nervosas mielinizadas	Para contagem das fibras: objetiva 40x contagem de todas as fibras do fascículo Densidade: Seescan Solitaire image analyser	Perda de fibras nervosas mielinizadas Densidade das fibras de mielinas/mm^2 GC: 5173,84±13,03 GD: 2022,12±22,4 P<0,001

* GC – grupo controle; CV – coeficiente de Variação, GDT1 – grupo diabetes tipo 1; GDT2 – grupo diabetes tipo 2; GD – grupo diabético

6. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Animais

Foram utilizados 40 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem *Wistar*, pesando em torno de 300 a 350g , adultos jovens com idade aproximada de 70 dias de vida. Os animais, oriundos da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia em gaiolas plásticas de propileno (49x34x16cm), com no máximo cinco animais por gaiola, em temperatura ambiente de 25±1°C, ciclo invertido de claro/escuro 12/12horas, água e ração (Purina) *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (anexo 1), estando de acordo com as normas internacionais estabelecida pelo National Intitute of Health Guide for care and use of Laboratory Animals (ofício n^0 59/08).

b. Grupos de Estudo

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo Controle Sedentário (CS) constituído de 10 animais sadios, não diabéticos, não submetido ao treino físico; Grupo Controle Treinado (CT) constituído por 10 animais sadios, não diabéticos, submetidos ao treinamento físico; Grupo Diabetes Sedentário (DS) constituído de 10 animais com diabetes experimental, sem qualquer tipo de tratamento, também não submetidos ao treinamento; Grupo Diabetes Treinado (DT) constituído por 10 animais com diabetes experimental, sem qualquer tipo de tratamento, submetidos ao treinamento físico. Os grupos de animais treinados foram submetidos a um protocolo de treinamento físico moderado (LEANDRO *et al.*, 2007). Os demais se limitaram a atividades dentro da própria gaiola.

c. Indução do Diabetes Experimental

O diabetes experimental, tipo 1, foi induzido através da administração intraperitoneal de solução de streptozotocina (Sigma Chemical Co, USA) após jejum alimentar de 12 horas. A streptozotocina (STZ) foi diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos receberam, da mesma forma, doses equivalentes de solução tampão citrato de sódio, e após

decorridos 30 minutos do tratamento os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO et al., 2002).

d. Verificação da glicemia e do peso

A verificação da glicose sanguínea foi realizada após o jejum de 12 horas, e 3 e 7 dias após a administração de STZ, através da ponta da cauda do animal para obtenção de uma gota de sangue que foi depositada em glicofita (AcuChek – Roche®) para leitura em glicosímetro específico (Glicosímetro AcuChek – Roche®) (SELAGZI et al, 2008). Apenas os animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dL foram incluídos no experimento (CARVALHO, CARVALHO, FERREIRA; 2003). Após a realização da confirmação do diabetes, semanalmente verificou-se a glicemia (após jejum de 12h), e o peso corpóreo (balança Filizola) em todos os grupos.

e. Protocolo de exercício físico

Uma semana após a indução do diabetes experimental, os animais do grupo DT e do grupo CT, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos ao treinamento físico moderado contínuo em tapete ergométrico (Esteira motorizada EP131 Insight) (Figura 1), enquanto os grupos não treinados permaneceram em suas respectivas gaiolas, estando sujeito apenas a manipulação. O protocolo de treino consistiu em 8 semanas, 5 dias por semana, com aumento gradual do tempo e velocidade chegando ao máximo de 60 minutos por dia (com as sessões de treino iniciadas 3 horas após o começo do ciclo escuro) com uma intensidade aproximada de 70% do VO_{2max} segundo o protocolo de Leandro *et al.* (2007) adaptado.

Figura 1 - Esteira motorizada EP131 Insight com seis baias individuais com altura de 170 mm, largura interna 97 mm, comprimento de 385 mm onde foi realizado o treinamento dos animais

O protocolo foi aplicado da seguinte forma: primeira semana (semana de adaptação) a velocidade foi de no máximo 5 m/mim com duração da sessão de exercício de 10 min/dia. Nas sete semanas seguintes foi acrescentado tempo e intensidade até atingir a velocidade máxima de 13 m/min e tempo máximo de 60 min. Cada sessão de treinamento, a partir da segunda semana, foi dividida em quatro estágios progressivos: (a) período de aquecimento (3 a 5 minutos); (b) zona de treinamento (14 a 30 minutos) com variação de velocidade, (c) período de esfriamento (3 a 5 minutos) (Tabela 1).

Um baixo estimulo elétrico (1.6 mA) emitidos ao toque da pata posterior dos animais em uma grade inoxidável na parede posterior da baia foi utilizado para encorajar a corrida

Tabela 1 - Descrição do protocolo de treinamento físico com a velocidade e a duração das sessões e a divisão das fases de treinamento.

Semanas	Velocidade		Duração (min)	
	km/h	m/min		
Inicial (adaptação)	0.1	2	2	10
	0.2	3	2	
	0.3	5	4	
	0.1	2	2	
Segunda semana	0.2	3	3	20
	0.3	5	4	
	0.4	7	10	
	0.2	3	3	
Terceira semana	0.3	5	3	30
	0.4	7	4	
	0.5	8	5	
	0.6	10	15	
	0.3	5	3	
Quarta semana	0.4	7	3	30
	0.5	8	4	
	0.6	10	5	
	0.7	12	15	
	0.4	7	3	
Quinta semana	0.4	7	3	40
	0.5	8	7	
	0.6	10	7	
	0.7	12	20	
	0.4	7	3	
Sexta semana	0.4	7	5	50
	0.5	8	7	
	0.6	10	8	
	0.7	12	25	
	0.4	7	5	
Sétima semana	0.5	8	5	50
	0.6	10	7	
	0.7	12	8	
	0.8	13	25	
	0.5	8	5	
Oitava semana	0.5	8	5	60
	0.6	10	8	
	0.7	12	12	
	0.8	13	30	
	0.5	8	5	

f. Estudo da velocidade de condução nervosa

O estudo da condução nervosa (VCN) foi realizado no Laboratório de Eletroneuromiografia do Hospital das Clínicas – UFPE. Nos animais do grupo controle esse registro foi realizado ao completarem 70 dias de vida e após 10 semanas da indução do diabetes mellitus. Nos animais dos grupos DS e DT o registro da VCN, foi realizado dois dias antes do processo da indução do diabetes experimental.

Para a verificação da velocidade de condução nervosa do nervo sensitivo foi utilizado um eletromiógrafo (Demetec centor – M4V) através do programa Racia-Alvar Centor M version v2.1, pelo software Altromed GmbH, version 2.81 (4 channels), 1999. Acoplado a este aparelho foi construída uma tábua plástica e a ela afixados 6 eletrodos do tipo "jacaré" posicionados em linha reta a cada três centímetros. Os dois eletrodos distais foram utilizados para estimulação, os dois proximais para registro e os dois centrais como terra (MAIA et al, 2011) (Figura 2A).

Após serem anestesiados, com uma solução de cloridrato de xilazina (Rompum – Bayer®) e quetamina (Ketalar®), por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (MASSONE, 1988) e após limpeza e desengorduramento da cauda do animal, este era posicionado ventralmente, de forma que sua cauda ficasse completamente livre, para ser posicionada entre os eletrodos.

A cauda era previamente aquecida, com uma lâmpada dicróica colocada a cerca de 10cm da cauda do animal, de forma a obter-se em média uma temperatura de 30 graus que era verificada através de um termômetro subdermal (Doc Thermo; modelo n. HD – 11; Comdek Industrial Corp.) colocado em terço médio da cauda.

Em seguida eram registrados e analisados os potenciais da cauda do animal através da técnica ortodrômica (figura 2B).

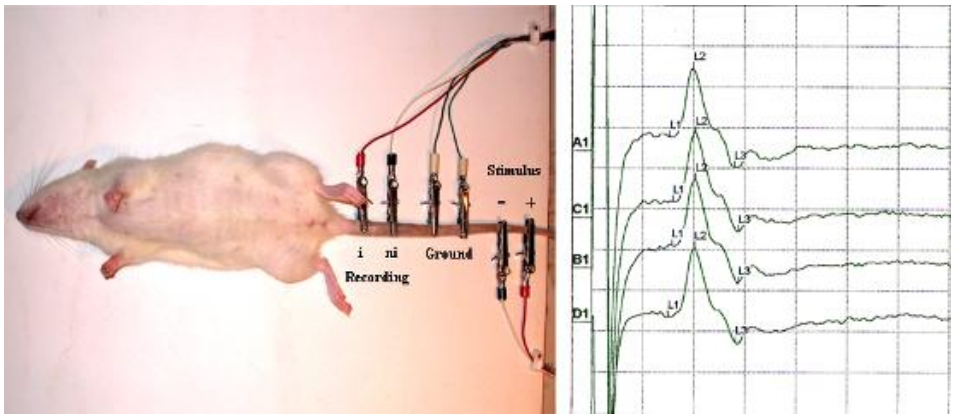

Figura 2. Demonstração do procedimento de avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos. Posicionamento dos eletrodos técnica ortodrômica e registros gráficos da Velocidade de Condução Nervosa do nervo caudal.

g. Coleta do Material e Processamento Histológico

Dez semanas pós indução, quatro animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, foram anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (Rompum® – Bayer) e quetamina (Ketalar®) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (MASSONE, 1988).

Após a anestesia (figura 3A), foi realizada tricotomia das regiões glútea e posterior da pata direita (figura 3B). Foi realizada uma incisão sobre os músculos glúteos e isquitibiais para exposição do nervo isquiático (figura 3C). Após a dissecação do nervo isquiático (figura 3D), uma pré-fixação (*in situ*) foi realizada com solução Karnowisky (solução de 2,5% de glutaldeído, 4% de paraformaldeído e 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH=7,4), através de gotejamento de 1 mL desta solução no nervo ciático *in situ*. O nervo foi seccionado transversalmente um centímetro anteriormente à bifurcação dos nervos tibial posterior e fibular comum e encaminhado para processamento histológico.

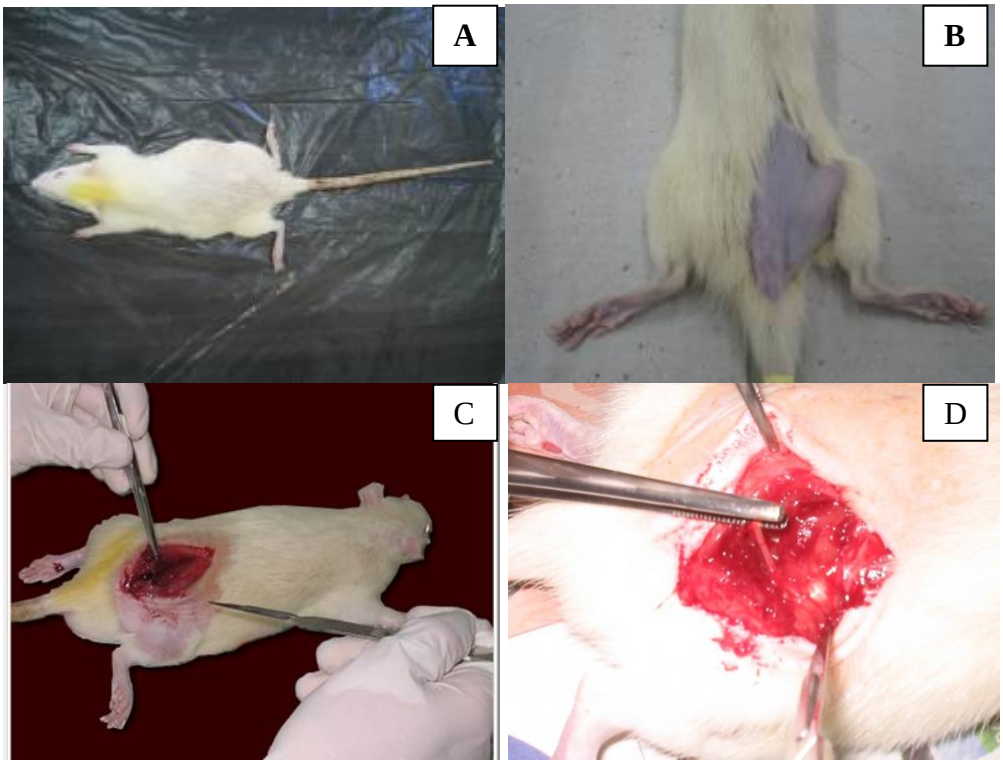

Figura 3. Procedimento para coleta do nervo ciático. Animal anestesiado (**A**); Tricotomia do local **(B)**; Rebatimento das musculaturas glútea e isquiotibiais **(C)**; Isolamento do nervo isquático **(D)**.

O processamento histológico dos cortes semi-finos, baseou-se no método de Chen *et al.* (2007). Os fragmentos nervosos foram fixados em solução Karnowisky por 24h a 4°C. Após este procedimento, foram lavados com solução aquosa de tampão cacodilato de sódio e pós-fixados com solução contendo 1% tetróxido de ósmio durante uma hora e trinta minutos, em temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado em concentrações crescentes de solução aquosa de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), sendo embebido em resina Epon 812 (Polysciences®). Para a realização dos cortes semi-finos (espessura de 0,5 µm) dos fragmentos de nervo isquiático emblocados, foi utilizado o ultramicrótomo (ULTRACUP, LEICA). Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina (1%), corante específico para estruturas ricas em lipídios, como a bainha de mielina.

h. Análise Histomorfométrica

A mensuração da área do nervo transversal do nervo isquiático, a quantificação e mensuração das fibras nervosas mielínicas e quantidade de vasos endoneurais foram

realizadas a partir de imagem gerada por um o microscópio de luz (Olympus – BX50), com objetiva de 10X, em seguida cada segmento com aumento de 40X, conectado a uma vídeo-câmera (Samsung – SHC-410 NAD) e o software_TV Tuner Application. Através das imagens capturadas, foi realizada a contagem do número de fibras mielínicas e vasos endoneurais utilizando o programa Mesurim Pro 08 (disponível gratuitamente na internet), na tela do computador, através da análise de todos os campos microscópicos obtidos a partir do corte semi-fino do fragmento de nervo isquiático (Figura 4 b). A contagem foi realizada por dois pesquisadores de forma independente e cega pois nas lâminas não havia identificação do grupo avaliado apenas uma numeração, gerada por um terceiro pesquisador, de 1 a 16.

Para mensuração da área foi utilizado o programa de análise de imagem Release 4.7.2 (Zeiss) em seguida se demarcou a circunferência interna do perineuro (Figura 4 a).

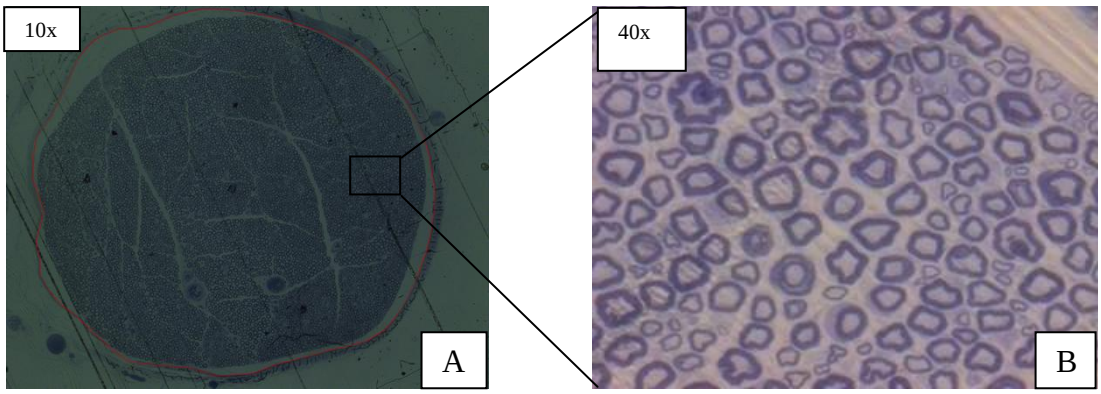

Figura 4. Fotomicrografia da secção transversa do nervo ciático utilizada para a análise histomorfométrica. Azul de toluidina, aumento de 10x (A) e 40x (B). A linha vermelha demarca a área se secção transversa do nervo isquiático (A).

Para análise do diâmetro das fibras mielínicas (DFM), diâmetro dos axônios mielínicos [DAM], espessura da bainha de mielina (EBM) e razão G (RZG = DAM/DFM), foram utilizados seis campos aleatórios, de cada animal, fotografadas com aumento de 40x em microscópio invertido Observer.Z1 (Zeiss MicroImaging GmbH), equipado com câmera acoplada (AxioCam MRm Zeiss).

Através do programa de análise de imagem Release 4.7.2 (Zeiss) foram realizadas as mensurações do DAM e DFM de cada animal, em cerca de 300 fibras aleatórias de cada animal (Fig 05). A EBM foram obtidos subtraindo-se o DFM do DAM, em seguida dividindo-se por 2. As mensurações da RZG foram agrupadas da seguinte forma: valores

acima de 0,7, bainha de mielina fina (submielinizadas); entre 0,6-0,7, normomielinizadas; e, aqueles abaixo de 0,6, bainha de mielina espessa (extramielinizada) (ANSSELIN; FINK; DAVEY, 1997). O cegamento das mensurações foi obtido a partir da não identificação dos grupos estudados, nas lâminas avaliadas. A partir da mensuração do DAM as fibras foram classificadas em finas (<6,5) e grossas (≥ 6,5) (DYCK et al, 1986).

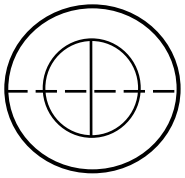

Figura 5. Representação esquemática de uma fibra nervosa e realização da mensuração do diâmetro da fibra mielínica e diâmetro do axônio mielínico.

– – – – Diâmetro da fibra mielínica

——— Diâmetro do axônio mielínico

i. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada a partir de uma análise de variância (ANOVA) em modelo fatorial 2x2 (diabetes: sim/não; exercício sim/não). Havendo interação significativa foi realizado o teste Post Hoc (Tukey HSD). O *p* crítico para todos os testes foi de 0,05. Os dados foram analisados através do programa estatístico STATISTICA for Windows versão 5.1 (StatSoft). Os valore também foram expressos em forma de média e desvio-padrão.

Para o número de fibras foi considerada o valor médio entre os números encontrados pelos dois pesquisadores.

7. RESULTADOS

a. ARTIGO ORIGINAL 1

Avaliação da morfometria e velocidade da condução nervosa em ratos diabéticos submetidos ao exercício físico.

Juliana Netto Maia[1]; Celina Cordeiro de Carvalho[1]; Rodrigo Ribeiro de Oliveira[2], Marcos Paulo Galdino Coutinho[4], Otávio Gomes Lins[3]. Silvia Regina Arruda de Moraes[4]
[1] Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, UFPE, Recife, PE, Brasil.
[2] Departamento de Fisioterapia, UFC, CE, Brasil.
[3]Departamento Neuropsiquiatria, UFPE, Recife, PE, Brasil
[4]Departamento de Anatomia, UFPE, PE, Brasil.

*Correspondência para o autor: Av. Rosa e Silva, 1205/302, Aflitos, Recife, PE, Brasi, 52050-020. Endereço eletrônico: julianannettomaia@hotmail.com

Contagem de palavras

RESUMO: 218

TEXTO: 9908

Hipótese: O exercício físico pode ajudar a controlar os níveis glicêmicos desta forma pode impedir ou diminuir os efeitos que a hiperglicemia contínua provoca na estrutura nervosa dos animais com neuropatia diabética. **Métodos:** Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, com 70 dias de idade, separados em 4 grupos: grupo controle sedentário (CS), grupo controle treinado (CT), grupo diabetes sedentário (DS) e grupo diabetes treinado (DT). Os animais foram induzidos ao diabetes através da injeção de estreptozotocina (60mg/Kg). O treinamento consistiu de exercício físico de moderada intensidade (70% do VO_{2max}) em esteira, por 8 semanas, 5x/semana, com aumento gradual da velocidade e tempo. Antes da indução e após o treinamento foi avaliada a velocidade de condução nervosa (VCN). Após o sacrifício foram avaliados: diâmetro do axônio mielínico (DAM), diâmetro da fibra mielínica (DFM), espessura da bainha de mielina (EBM), a razão "g" (RZG), VCN. **Resultados:** Tanto o DAM como DFM foram significativamente menor nos animais com diabetes (p=0,0226, p=0,0110, respectivamente), não foi encontrada diferença significativa entre a EBM entre os grupos. A RZG do DS apresentou classificação para fibras extramielinizadas, enquanto os demais grupos apresentaram-se normomielinizadas. A VCN dos DT foi mais próxima aos valores dos grupos controles quando comparadas ao DS (p=0,0004). **Conclusões:** O exercício físico pode ajudar na manutenção da estrutura nervosa dos animais com neuropatia diabética experimental.

Palavras-Chave: neuropatia diabética, ratos, velocidade de condução nervosa, estreptozotocina, nervo ciático, exercício físico.

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma das maiores causa de desenvolvimento da neuropatia periférica, e esta pode ser definida como sinais ou sintomas de disfunção do nervo periférico, em pessoas com diabetes após exclusão de outras causas para seu desenvolvimento. A neuropatia está presente em pelo menos 20% dos pacientes diabéticos adultos [1] e tem sido associada a uma série de alterações e fatores de risco não modificáveis, incluindo o grau de hiperglicemia e lipídico além de valores aumentados da pressão arterial [1, 2, 3].

O que leva ao aparecimento da neuropatia diabética ainda não foi completamente entendido e esclarecido [4]. Dentre as possíveis causas aventa-se que o aumento da glicemia sanguínea poderia provocar hiperatividade da via dos polióis, glicolização não enzimática das proteínas estruturais, comprometimento da ação de fatores tróficos e de crescimento nervoso, alterações vasculares e hipóxia endoneural, mecanismos imunológicos, estresse oxidativo, comprometimento do metabolismo dos lipídeos, e, estes fatores, isolados ou em conjunto, acabariam resultando no desenvolvimento da neuropatia diabética [5].

A neuropatia periférica pode ser confirmada através de registros da velocidade de condução nervosa (VCN), que morfologicamente pode ser relacionado à valores da razão G (RZG). A RZG refere-se ao valor da divisão entre o diâmetro do axônio mielínico e o diâmetro da fibra mielínica. A maioria dos axônios mielínicos deve apresentar RZG entre 0,6 – 0,7. Valores acima de 0,7 indicam bainha de mielina fina e valores abaixo de 0,6 bainhas extramielinizadas [1, 6]. Esta razão expressa a relação que se estabelece entre a célula de Schwann e o axônio no processo de regeneração funcional do nervo [7]

Atualmente o exercício físico é considerado como uma das bases para o tratamento do DM [8]. O exercício físico permite um melhor controle dos níveis glicêmicos através do aumento da captação da glicose pelos músculos esqueléticos que continua após o esforço, independente dos níveis de insulina, [8, 9, 10].

Baseado no fato que a hiperglicemia provoca alterações na estrutura nervosa e o exercício físico apresenta-se capaz de consumir parte desta glicemia como fonte energética, este trabalho teve como objetivo avaliar, através de parâmetros morfológicos e da aferição da VCN, o efeito do exercício físico aeróbio moderado na estrutura nervosa de ratos com diabetes experimental.

Metodologia

O trabalho foi realizado com 40 ratos *Wistar* que ao atingirem a idade de 70 dias e com peso inicial médio de 319,79 ± 21,99 g foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=10): Grupo Controle Sedentário (CS) constituído por animais sem diabetes, não submetido ao treinamento físico; Grupo Controle Treinado (CT) constituído por animais sem diabetes, submetidos ao treinamento físico; Grupo Diabetes Sedentário (DS) constituído por animais com diabetes, sem qualquer tipo de tratamento, também não submetidos ao treinamento físico; Grupo Diabetes Treinado (DT) constituído de animais com diabetes, sem qualquer tipo de tratamento, submetidos ao treinamento físico. Os grupos de animais treinados foram submetidos a um protocolo de exercício físico moderado, 70% do VO_2max [11] e os demais se limitaram a atividades dentro da própria gaiola.

Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia em gaiolas plásticas de propileno (49x34x16cm), com no máximo cinco animais por gaiola, em temperatura ambiente de 25±1°C, ciclo invertido de claro/escuro 12/12horas, água e ração (Purina) *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (n^o 59/08).

Indução do diabetes

O diabetes *mellitus* experimental foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de streptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas. A streptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal, medido cuidadosamente em balança digital de precisão (BS3000A). Os animais dos grupos controle receberam, da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos do tratamento os animais foram alimentados normalmente [12]. O diagnóstico do DM foi confirmado nos animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dL no terceiro e sétimo dia após a indução [13]. A glicemia foi dosada semanalmente, sempre no mesmo horário (6:00am) após jejum alimentar de 12h (Glicosímetro Accu-Chek Activ.), utilizando uma gota de sangue da ponta da cauda do animal.

Verificação da velocidade de condução nervosa

O registro da VCN foi obtido na cauda do animal, previamente anestesiado, utilizando a técnica ortodrômica segundo protocolo previamente descrito [14] dois dias antes da indução do diabetes experimental e ao final da 10ª semana após a indução.

Exercício físico

Uma semana após a indução do diabetes experimental, os animais dos grupos DT e CT, foram submetidos ao treinamento físico moderado contínuo em tapete ergométrico (Esteira motorizada EP131, Insight), enquanto os grupos não treinados permaneceram em suas respectivas gaiolas, sujeitos apenas a manipulação.

O protocolo de treino consistiu em 8 semanas, 5 dias por semana, com aumento gradual do tempo e velocidade chegando ao máximo de 60 minutos por dia (com as sessões de treino iniciadas 3 horas após o começo do ciclo escuro) com uma intensidade aproximada de 70% do VO_{2max} [11].

O protocolo foi aplicado da seguinte forma: Na primeira semana (semana de adaptação) a velocidade era de no máximo 5 m/mim com duração da sessão de exercício de 10 min/dia. Nas sete semanas seguintes foi acrescentado tempo e intensidade até atingir a velocidade máxima de 13 m/min e tempo máximo de 60 min. Cada sessão de treinamento, a partir da segunda semana, foi dividida em três estágios progressivos: (a) período de aquecimento (3 a 5 minutos); (b) zona de treinamento (14 a 30 minutos) com variação da velocidade, (c) zona de esfriamento período (3 a 5 minutos).

Um baixo estimulo elétrico (1,6 mA) emitidos ao toque da pata posterior dos animais em uma grade inoxidável na parede posterior da baia foi utilizado para encorajar a corrida.

Coleta do material

Dez semanas pós-indução do diabetes experimental quatro animais de cada grupo estudado (CS, CT, DS, DT) foram submetidos à coleta dos fragmentos do nervo isquiático. A retirada do fragmento de nervo foi realizada depois de anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (Rompum® – Bayer) e quetamina (Ketalar® – Parke Davis Warner Lambert) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso [15]. Os animais foram posicionados dorsalmente e após a tricotomia da região glútea direita foi realizado um corte médio-lateral de três centímetros para dissecação do

segmento do nervo ciático direito e em seguida seccionado transversalmente (10 mm). Após o procedimento de retirada do nervo, a eutanásia foi realizada com uma dosagem de inalação letal de éter sulfúrico.

Processamento histológico do material

Os fragmentos coletados foram fixados em glutaraldeído 2,5%, mais tampão cacodilato 0,1M pH – 7.2, pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, desidratado em acetona (50%, 70%, 90% e 100%), embebidos em resina Epon, realizado cortes semi-finos (0,5μm) em ultramicrótomo (ULTRACUP, LEICA) e corados com azul de toluidina (1%).

Análise histomorfometrica

Para análise do diâmetro das fibras mielínicas [DFM], diâmetro dos axônios mielínicos [DAM], espessura da bainha de mielina [EBM] e razão G (RZG = DAM/DFM), foram utilizados seis campos aleatórios, de cada animal, fotografadas com aumento de 40x em microscópio invertido Observer.Z1 (Zeiss MicroImaging GmbH), equipado com câmera acoplada (AxioCam MRm Zeiss).

Através do programa de análise de imagem Release 4.7.2 (Zeiss) foram realizadas as mensurações do DAM e DFM de em média 300 fibras aleatórias de cada animal. A EBM foi obtida subtraindo-se o DFM do DAM, em seguida dividindo-se por 2. As mensurações da RZG foram agrupadas da seguinte forma: valores acima de 0,7, bainha de mielina fina (submielinizadas); entre 0,6-0,7, normomielinizadas; e, aqueles abaixo de 0,6, bainha de mielina espessa (extramielinizada) [6]. O cegamento das mensurações foi obtido a partir na numeração das lâminas de 1 a 16 realizadas por um terceiro pesquisador, não envolvido na análise das mesmas.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada a partir de uma análise de variância (ANOVA) em modelo fatorial 2x2 (diabetes: sim/não; exercício sim/não). Havendo interação significativa foi realizado o teste Post Hoc (Tukey HSD). O *p* crítico para todos os testes foi de 0,05. Os dados foram analisados através do programa estatístico STATISTICA for Windows versão 5.1 (StatSoft).

Resultados

Dos 40 animais inicialmente selecionados, três animais foram à óbito aparentemente por causas naturais (1 CT; 2 DS). O peso dos animais diabéticos foi significativamente menor que o dos animais controle (p=0,0001). Houve também diferença significativa entre o peso dos animais dos grupos diabéticos, onde os animais treinados apresentaram peso menor que os sedentários (p=0,0001). Os níveis glicêmicos não apresentaram diferenças entre os animais diabéticos treinados e não treinados (tabela 1).

Tabela 1. Características dos grupos estudados, peso e glicemia apresentados em fora de valores médios e desvio-padrão.

Grupo	n	Peso (g) Média (DP)	Glicemia (mg/dL) Média (DP)
Controle sedentário	10	438 (43)	89 (9)
Controle treinado	9	432 (36)	86 (6)
Diabetes sedentário	8	308 (78) [a]	307 (136) [c]
Diabetes treinado	10	228 (27)[a, b]	309 (119) [c]

Peso: ANOVA - interação = 0,0313; TUKEY HSD – a (Controle Sedentário x Diabetes Sedentário): p = 0,0001; b (Diabetes Sedentário x Diabetes Treinado): p = 0,0001.
Glicemia: ANOVA – c (controle x diabetes): p<0,0001.

Na análise histomorfométrica observou-se um aumento do DFM (0=0,0226), assim como do DAM (p=0,0110) (figura 1) nos animais submetidos ao exercício físico comparando aos que não realizaram.

A EBM não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados. A média da RZG foi menor que 0,6 no DS, sugerindo uma extramielinização (Tabela 2).

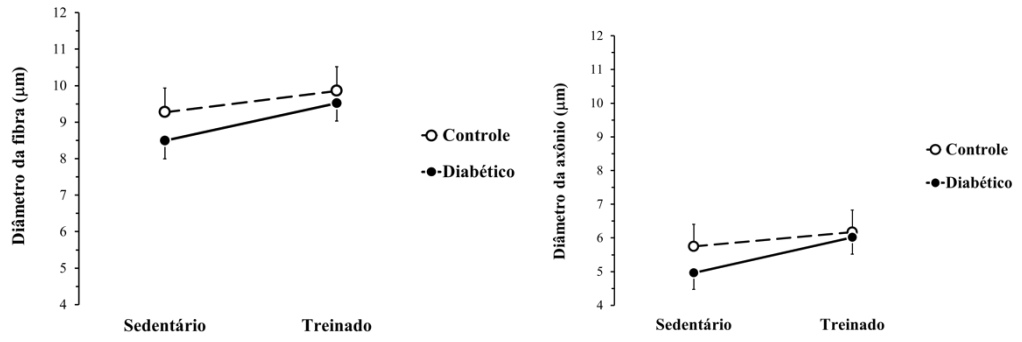

Figura 1. Representação dos valores médios do diâmetro da fibra mielinizada e do diâmetro do axônio mielinizado dos animais estudados.

Tabela 2. Dados morfométricos, diâmetro da fibra mielínica, diâmetro do axônio mielínico, espessura da bainha de mielina, razão G, obtidos do estudo do nervo isquiático dos animais estuaddos. Valores de média e desvio-padrão.

Grupo	Diâmetro da fibra mielínica (µm)	Diâmetro do axônio mielínico (µm)	Espessura da bainha de mielina (µm)	Razão G
Controle sedentário	9,27 (0,45)	5,75 (0,40)	1,76 (0,06)	0,61 (0,02)
Controle treinado	9,86 (0,87)[a]	6,17 (0,55)[b]	1,84 (0,17)	0,62 (0,01)
Diabetes sedentário	8,49 (0,29)	4,96 (0,32)	1,76 (0,13)	**0,58 (0,03)**
Diabetes treinado	9,52 (0,70)[a]	6,02 (0,63)[b]	1,75 (0,06)	0,62 (0,03)

Efeito principal ANOVA para o treino a: p= 0,0226; b: p= 0,0110.

Quando avaliada a VCN dos grupos estudados, pode-se perceber que os animais do grupo DS apresentaram valores significativamente mais baixos que os animais do grupo DT e que houve uma interação entre o exercício físico e o diabetes experimental (ANOVA: interação = 0,0124; TUKEY HSD p=0,0004) (figura 2).

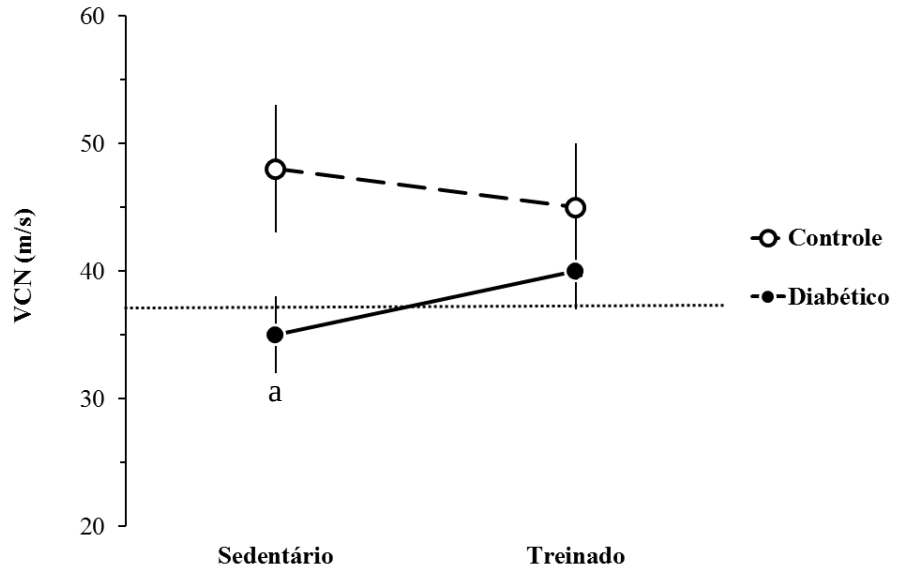

Figura 2. Valores da velocidade de condução nervosa obtidos a partir da cauda dos animais dos grupos estudados.

a: ANOVA: interação = 0,0124; TUKEY HSD p=0,0004.

Linha horizontal refere-se ao limite inferior de normalidade tomando como referência os ratos controle, (calculado média – 2DP).

Discussão

A neuropatia diabética é uma das complicações de maior morbimortalidade entre os portadores do diabetes mellitus [16]. Por acreditar-se que o exercício físico ajude a controlar os níveis glicêmicos destes indivíduos este pode ser um grande aliado para atenuação ou retardo dos efeitos da neuropatia diabética. Neste estudo pode-se perceber que os animais com diabetes que realizaram treinamento físico, apresentaram diâmetros da fibra mielínica, diâmetro dos axônios mielínicos maiores que o animais do grupo DS, valores de razão G dentro da normalidade e velocidade da condução nervosa mais próxima aos dos animais sadios.

Apesar destas diferenças estruturais entre os animais diabéticos sedentários e treinados, não foi observada diferença nos registros glicêmicos destes animais. Estudos demonstram que o exercício físico dinâmico em diabéticos do tipo 1 melhora a sensibilidade à insulina, mas normalmente não induz melhora do controle glicêmico [17, 18]. Em 1984, Zinman et al [17] demonstraram que o exercício físico não modificou a glicemia, a hemoglobina glicosilada ou a reposição de insulina em indivíduos com diabetes mellitus do tipo 1.

O fato dos animais não fazerem uso de insulina durante a pesquisa pode também justificar o fato dos níveis glicêmicos não terem obtido queda significativa entre os animais treinados e não treinados. É sabido que no diabetes tipo 1 há déficit na produção da insulina assim, desencadeia o quadro de hiperglicemia. Conforme descrito no estudo de Eriksson et al [19], o efeito do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina tem sido demonstrado de 12 a 48 horas após a sessão de exercício. Como a avaliação da glicemia do nosso estudo, ocorria cerca de 15h após o exercício, e estes animais não estavam em uso de insulina, a queda dos valores glicêmicos possivelmente não foi registrada.

Apesar da melhora do controle glicêmico não ser um achado universal em portadores de diabetes mellitus do tipo 1 treinados, a redução da resistência à insulina, também presente no diabetes mellitus do tipo 1, induzida pelo exercício físico dinâmico, pode promover outros efeitos benéficos, incluindo melhora cardiovascular e do perfil lipídico [20, 21]. Tais efeitos podem potencialmente reduzir a morbidade e a mortalidade nessa população. Neste estudo podemos perceber que os animais com diabetes experimental submetidos ao exercício físico tanto demonstraram uma menor queda tanto da VCN como também a estrutura da fibra mielínica, tornando-se mais parecidas com a

estrutura observada nos animais dos grupos controle. Benefício que pode ser somado aos dados verificados pelos trabalhos anteriormente citados [20, 21].

Segundo Grenne et al [22], o marco estrutural da neuropatia diabética pode ser considerado a atrofia axonal e a perda de fibras mielinizadas. Esta última pode nos remeter a pensar que a razão G dos pacientes neuropatas seriam >0,7, ou seja, fibras submielinizadas, dado não encontrado neste estudo, onde as fibras no grupo DS tenderam a apresentar-se abaixo de 0,6 refletindo um espessamento da bainha de mielina. Este achado corrobora os descritos por Bosboom et al [23] que em seu estudo sobre o diagnóstico de desmielinização do nervo sural na polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, também identificou fibras mielínicas com razão G sugerindo espessamento.

Tal achado pode ser justificado pelo fato de uma redução do diâmetro do axônio preceder o processo desmielinizante [24]. Como foi observado neste estudo, uma vez que, não houve diferença da EBM entre os grupos estudados. No entanto, houve diminuição do DAM e do DFM nos animais que não treinaram.

Sabatelli et al [25] descreveram que ocorre um edema da mielina, prévio, nos processos de desmielinização. Uma ligação de anticorpos ou outros fatores humorais à mielina, pode resultar em alteração da permeabilidade da membrana, com subseqüente edema intracelular das células de Schwann. Somando a isto, a sugestão de perda de fibras de grande calibre encontrada neste estudo, pode-se entender as quedas encontradas nas avaliações da VCN dos animais diabéticos. Achado também descrito em outros estudos [26, 27, 28].

A partir deste trabalho pode-se perceber que a desmielinização que se espera nos quadros de neuropatias periféricas nos animais diabéticos inicia-se com um processo de atrofia axonal. A indicação de perda de fibras grossas, resultante da observação dos animais treinados apresentarem maior DFM leva a uma queda da VCN dos animais com diabetes, sugerindo instalação de uma neuropatia diabética. Dessa forma, a prática do treinamento físico parece ter efeito benéfico trazendo para os animais treinados parâmetros morfométricos e velocidade de condução nervosa mais próximos aos dos animais controle treinado.

Referências

1. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al (2005) Diabetic Neuropathies. Diabetes Care 28:956-962

2. Vinik AI, Mehrabyan A (2004) Diabetic neuropathies. Med Clin N Am 88: 947–999

3. Kärvestedt L, Mårtensson E, Grill V, Elofsson S, Von Wendt G, Hamsten A et al (2011) The prevalence of peripheral neuropathy in a population-based study of patients with type 2 diabetes in Sweden. Journal of Diabetes and Its Complications 25: 97–106.

4. Afzaal S, Sing M, Saleem I (2002) Aetiopathogenesis and management of neuropahy. J. Assoc. Physicians Índia 50: 707-711.

5. Fregonesi CEPT, Faria CRG, Molinari SM, Neto MHM (2004) Etiopatogenia da neuropatia diabética. Arq Ciênc Saúde Unipar 8: 147-156

6. Ansselin AD, Fink T, Davey DF (1997) Peripheral nerve regeneration through nerve guides seedes with Schwann cells. Neuropathol Appl Neurobiol 23: 387-398

7. WAXMAM, S. G. Structure-function relations in nerves and nerve injuries. In: Nerve repair and regeneration: its clinical and experimental basis. Eds. D. L. Jewett, H. R. McCarroll, Jr., St. Louis, Mosby, p.186-198, 1980.

8. Pauli JR, Cintra DE, Souza CT, Ropelle ER (2009) Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. Arq Bras Endocrinol Metab. 53: 399-408.

9. Hanson P (1993) Pathophysiology of chronic diseases and exercise training. In: American College of Sports Medicine. ACSM's resource manual for guidelines for exercise testing and prescription. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; pp. 187-96.

10. Michaliszyn SF, Faulkner MS (2010) Physical Activity and Sedentary Behavior in Adolescents With Type 1 Diabetes. Research in Nursing & Health 33: 441–449

11. Leandro CA, Levada A, Hirabana, SM, Manhães-de-Castro, R, De-Castro CB, Curi R, et al (2007) A program of Moderate Physical Training for Wistar Rats Based on Maximal Oxygen Consumption. The Journal of Strength & Conditioning Research 21: 751-756.

12. Dall'ago P, Silva VOK, De Angelis KLD, Irigoyen MC, Fazan JR, Salgado HC (2002) Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. Braz J Med Biol Res 35: 843-849

13. Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM (2003) Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. Acta Cir Bras 18 Special Edition

14. Maia JN, Carvalho CC, Galvão MH, Silva AL, Mendes AC, Moraes SR, et al (2010) Eletrophysiological study of the caudal nerve on developing rats. Acta Cir Bras 25: 144-147

15. MASSONE F (1988) Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas. Rio de Janeiro: Guanabara

16. Queiroz PC, Aguiar DC, Pinheiro RP, Moraes CC, Pimentel IRS, Ferraz CLH, et al (2011) Prevalência das complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes mellitus e síndrome metabólica. Rev. Soc. Bras. Clín. Méd 9: 254-258

17. Zinman B, Zunica-Guajarno S, Kelly D (1984) Comparison of the acute and long term effects of exercise on glucose control in type 1 diabetes. Diabetes Care 7:515-519

18. Raile K, Kapellen T, Schweiger A, Hunkert F, Nietzschmann U, Dost A, et al. (1999) Physical activity and competitive sports in children and adolescents with type 1 diabetes. Diabetes Care 22:1904-1905.

19. Eriksson J, Taimela S, Koivisto VA (1997) Exercise and the metabolic syndrome. Diabetologia 40:125-135.

20. Schneider SH, Morgado A (1995) Effects of fitness and physical training on carbohydrate metabolism and associated cardiovascular risk factors in patients with diabetes. Diabetes Care 3:378-407.

21. De Fronzo RA, Hendler R, Simonson D (1982) Insulin resistance is a proeminent feature of insulin-dependent diabetes. Diabetes 31:795-801.

22. Grenne DA, Sima AAF, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimers A (1992) Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. Diabetic Care 15: 1902-1925

23. Bosboom WMJ, Van Den Berg LH, Franssen H, Giesbergen PCLM, Flach HZ, Van Putten AM, et al (2001) Diagnostic value of sural nerve demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Brain 124: 2427-2438.

24. Prineas JW, McLeod JG (1976) Chronic relapsing polyneuritis. J Neurol Sci 27: 427-458.

25. Sabatelli M, Mignogna T, Lippi G, Porcu C, Tonali P (1996) Intramyelinic edema in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Clin Neuropathol 15: 17-21.

26. Brussee V, Cunningham A, Zochodne DW (2004) Direct insulin signaling of reverses diabetic neuropathy. Diabetes 53:1824-1830.

27. Kennedy JM, Zochodne DW (2005) Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery: Is there irreparable damage? Diabetes 54:830-837.

28. Carvalho CC, Maia JN, Lins OG, Moraes SR (2011) Sensory nerve conduction in the caudal nerves of rats with diabetes. Acta Cir Bras 26: 121-124

b. **ARTIGO ORIGINAL 2**

AVALIAÇÃO DAS FIBRAS MIELÍNICAS E VASOS ENDONEURAIS DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL SUBMETIDOS A TREINAMENTO FÍSICO

Juliana N, Maia[1]; Celina C.Carvalho[1]; Kamilla Dinah Santos de Lira[2]; Karyne Albino Novaes[4], Gabriel Nunes de Mesquita[4], Otávio G. Lins[3]; Silvia Regina Arruda de Moraes[4].
[1] Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, UFPE, Recife, PE, Brasil
[2] Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, UFPE, Recife, PE, Brasil.
[3]Departamento de Neuropsiquiatria, UFPE, Recife, PE, Brasil.
[4]Departamento de Anatomia, UFPE, Recife, PE, Brasil
*Correspondência para o autor: Av. Rosa e Silva, 1205/302, Aflitos, Recife, PE, Brasi, 52050-020. Endereço eletrônico: juliananettomaia@hotmail.com (JN Maia)

Resumo

Objetivo: o exercício físico utiliza glicemia como fonte energética podendo melhorar o controle glicêmico dos animais diabéticos e assim diminuir os danos da hiperglicemia na estrutura nervosa. Design: O objetivo deste estudo avaliar as repercussões que o exercício físico pode promover na estrutura nervosa de ratos com neuropatia periférica decorrente do diabetes experimental. Metodologia: Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, com 70 dias de idade, divididos em 4 grupos: grupo controle sedentário (CS), grupo controle treinado (CT), grupo diabetes sedentário (DS) e grupo diabetes treinado (DT). Indução do diabetes através da injeção de estreptozotocina (60mg/Kg). O exercício físico consistiu de treino em esteira, por 8 semanas, 5x por semana, com aumento gradual da velocidade e tempo. Após o sacrifício foram avaliados: número e densidade de fibras mielínicas, área de secção transversa do nervo isquiático, percentual de fibras grossas e quantidade de vasos endoneurais. Resultados: Pode-se perceber que os animais diabéticos apresentam um menor número de fibras mielínicas e menor área, e a densidade das fibras mielínicas, não houve diferença significativa assim como na quantidade de vasos, mesmo os animais do grupo DS apresentando quantidade visivelmente menor. O percentual de fibras grossas foi maior nos grupos submetidos ao treinamento físico. Conclusão: Apesar do treinamento não manter o número de fibras e a área do nervo, parâmetros importantes para função do nervo são mais preservado como o número de vasos e de fibras grossas.
Palavras- Chave: ratos, diabetes, exercício físico, nervo

Introdução

Pesquisas tem demonstrado que a neuropatia diabética é uma complicação multifacetada de ambos os tipos de diabetes I e II, e envolve um espectro de alterações estruturais e funcionais nos nervos periféricos (1) promovendo desordens precoces da função do nervo em decorrência da degeneração axonal, desmielinização paranodal, perda de fibras mielinizada e alterações na densidade das fibras (2, 3, 4).

Autores estudam que a neuropatia se desenvolva por uma teoria vascular, que demonstram uma microangiopatia da *vasa nervorum,* e defendem que este achado seria o fator desencadeante para a neuropatia diabética, uma vez que o nervo seria submetido a uma isquemia, já que o espessamento da membrana basal dificultaria o intercâmbio metabólico no tecido nervoso (5).

A busca por um controle das alterações que a hiperglicemia acarreta sistemicamente nos portadores de diabetes envolve um bom hábito de vida com alimentação balanceada, controle dos níveis de colesterol, o não tabagismo ou alcoolismo e a implementação de exercício físico na rotina destes pacientes (6) O treinamento físico tem sido conhecido por ser eficaz em pacientes com diabetes tipo 2, aumentando a sensibilidade à insulina, mas não há conhecimento suficiente sobre a forma como o mesmo agiria no diabetes tipo tipo 1 (7). Alguns autores sugerem que a prática de exercício físico possa minimizar as repercussões que os altos níveis glicêmicos desencadeiam na estrutura do nervo dos pacientes portadores de neuropatia diabética (8, 9, 10).

Estudos com animais de experimentação tem ajudado na compreensão das repercussões morfológicas da estrutura nervosa em pacientes com neuropatia diabética (11, 12, 13). Assim este trabalho teve como objetivo avaliar as fibras mielínicas e vasos endoneurais de ratos com neuropatia periférica decorrente do diabetes experimental submetidos ao treinamento físico.

Métodos

O trabalho foi realizado com 40 ratos *Wistar* que ao atingirem a idade de 70 dias e com peso inicial médio de 319,79 ± 21,99 g foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo Controle Sedentário (CS) constituído por 10 animais sem diabetes, não submetido ao exercício físico; Grupo Controle Treinado (CT) constituído por 10 animais sem diabetes, submetidos ao exercício físico; Grupo Diabetes Sedentário (DS) constituído por 10 animais com diabetes, sem qualquer tipo de tratamento, também não

submetidos ao exercício; Grupo Diabetes Treinado (DT) constituído de 10 animais com diabetes, sem qualquer tipo de tratamento, submetidos ao exercício físico. Os grupos de animais treinados foram submetidos a um protocolo de exercício físico moderado (14) e os demais se limitaram a atividades dentro da própria gaiola.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco

Indução do diabetes

O diabetes mellitus foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de streptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas. A streptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal, medido cuidadosamente em balança digital de precisão (BS3000A). Os animais dos grupos controle receberam, da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos do tratamento os animais foram alimentados normalmente (15). O diagnóstico do DM foi confirmado nos animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dL no terceiro e sétimo dia após a injeção (16). A glicemia foi dosada semanalmente, sempre no mesmo horário (6:00am) após jejum alimentar de 12h (Glicosímetro Accu-Chek Activ.), utilizando uma gota de sangue da ponta da cauda do animal.

Exercício Físico

Uma semana após a indução do diabetes experimental, os animais dos grupos diabético treinado (DT) e controle treinado (CT), foram submetidos ao treinamento físico moderado contínuo em tapete ergométrico (Esteira motorizada EP131, Insight), enquanto os grupos não treinados permaneceram em suas respectivas gaiolas, sujeitos apenas a manipulação.

O protocolo de treino consistiu em 8 semanas, 5 dias por semana, com aumento gradual do tempo e velocidade chegando ao máximo de 60 minutos por dia (com as sessões de treino iniciadas 3 horas após o começo do ciclo escuro) com uma intensidade aproximada de 70% do VO_{2max} [10].

O protocolo foi aplicado da seguinte forma: Na primeira semana (semana de adaptação) a velocidade era de no máximo 5 m/mim com duração da sessão de exercício de 10 min/dia. Nas sete semanas seguintes foi acrescentado tempo e intensidade até atingir

a velocidade máxima de 13 m/min e tempo máximo de 60 min. Cada sessão de treinamento, a partir da segunda semana, foi dividida em três estágios progressivos: (a) período de aquecimento (3 a 5 minutos); (b) zona de treinamento (14 a 30 minutos) com variação da velocidade, (c) zona de esfriamento período (3 a 5 minutos).

Um baixo estimulo elétrico (1,6 mA) emitidos ao toque da pata posterior dos animais em uma grade inoxidável na parede posterior da baia foi utilizado para encorajar a corrida.

Eutanásia e coleta de material

Dez semanas pós-indução do diabetes experimental quatro animais de cada um dos grupos estudados (CS, CT, DS, DT) foi submetido à retirada de fragmentos do nervo ciático. A retirada do fragmento de nervo foi realizada depois de anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (Rompum® – Bayer) e quetamina (Ketalar® – Parke Davis Warner Lambert) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (17). Os animais foram posicionados dorsalmente e após a tricotomia da região glútea direita foi realizado um corte médio-lateral de três centímetros para dissecação do segmento do nervo ciático direito e em seguida seccionado transversalmente (10 mm). Após o procedimento de retirada do nervo, a eutanásia foi realizada com uma dosagem de inalação letal de éter sulfúrico.

Processamento histológico do material

Os materiais coletados foram fixados em glutaraldeído 2,5%, mais tampão cacodilato 0,1M pH – 7.2, pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, desidratado em acetona (50%, 70%, 90% e 100%), embebidos em resina Epon, realizado cortes semi-finos (0,5μm) em ultramicrótomo (ULTRACUP, LEICA) e corados com azul de toluidina (1%).

Análise histomorfométrica

A quantificação das fibras nervosas mielínicas e quantidade de vasos endoneurais foram realizadas a partir de imagem gerada por um o microscópio de luz (Olympus – BX50), com objetiva de 10X, em seguida cada fragmento com aumento de 40X,, conectado a uma vídeo-câmera (Samsung – SHC-410 NAD) e o software_TV Tuner Application. Através das imagens capturadas, foi realizada a contagem do número de fibras mielínicas e vasos endoneurais utilizando o programa Mesurim Pro 08 (disponível

gratuitamente na internet) através da análise de todos os campos microscópicos obtidos a partir do corte semi-fino do fragmento de nervo isquiático. A contagem foi realizada por dois pesquisadores de forma independente, e nas lâminas não havia identificação do grupo avaliado apenas uma numeração, gerada por um terceiro pesquisador, de 1 a 16.

Para mensuração da área foi utilizado o programa de análise de imagem Release 4.7.2 (Zeiss) em seguida se demarcou a circunferência interna do perineuro. A densidade foi obtida pela divisão entre número de fibras e área de secção transversa do nervo isquiático. Em seguida as fibras foram classificada em finas (<6,5µm), e grossas (≥6,5µm) (3).

Para análise do diâmetro das fibras mielínicas (DFM), diâmetro dos axônios mielínicos [DAM], espessura da bainha de mielina (EBM) e razão G (RZG = DAM/DFM), foram utilizados seis campos aleatórios, de cada animal, fotografadas com aumento de 40x em microscópio invertido Observer.Z1 (Zeiss MicroImaging GmbH), equipado com câmera acoplada (AxioCam MRm Zeiss).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada a partir de uma análise de variância (ANOVA) em modelo fatorial 2x2 (diabetes: sim/não; exercício sim/não). Havendo interação significativa foi realizado o teste Post Hoc (Tukey HSD). O *p* crítico para todos os testes foi de 0,05. Os dados foram analisados através do programa estatístico STATISTICA for Windows versão 5.1 (StatSoft).

Resultados

Neste estudo foi observada uma diminuição da área transversal do nervo isquiático assim como uma diminuição das fibras mielínicas nos animais diabéticos, quando comparados os animais dos grupos DS com DT. A densidade das fibras mielínicas não apresentou diferença entre os grupos estudados A quantidade de vasos endoneurais foi menor no grupo dos animais DS, no entanto, não foi observado resultado significativo (tabela 1).

Tabela 1. Dados morfométricos abtidos do estudo do nervo ciático. Valores apresentados em médias e desvio-padrão do número total de fibras, área transversal do nervo ciático (mm^2), densidade das fibras mielínicas (F/mm^2) e número de vasos endoneurais.

Grupo	n	Número total de fibras	Área (mm^2)	Densidade (F/mm^2)	Número de Vasos endoneurais
CS	04	7874 (1225)	0,6813 (0,1021)	11556 (621)	32 (9)
CT	04	6081 (1310)	0,5690 (0,6567)	10880 (3164)	36 (9)
DS	04	5122 (452) *	0,4308 (0,3552) **	11952 (1468)	17 (3)
DT	04	4769 (1534) *	0,4716 (0,1774) **	10452 (1710)	32 (14)

Número total de fibras: * ANOVA: p=0,005

Área: ** ANOVA p<0,007

No entanto pode-se perceber no efeito principal do ANOVA significância para treinamento físico (p=0,006) e para o fator diabetes (p=0,04), em relação ao percentual de fibras grossas, ou seja, tanto nos animais do grupo CT como nos animais do grupo DT, a quantidade de fibras grossas foi maior quando comparados ao seus respectivos grupos sedentários. Ressalta-se que no grupo DT o percentual de fibras grossas demonstra valores próximos ao dos animais do grupo CT (fig 1).

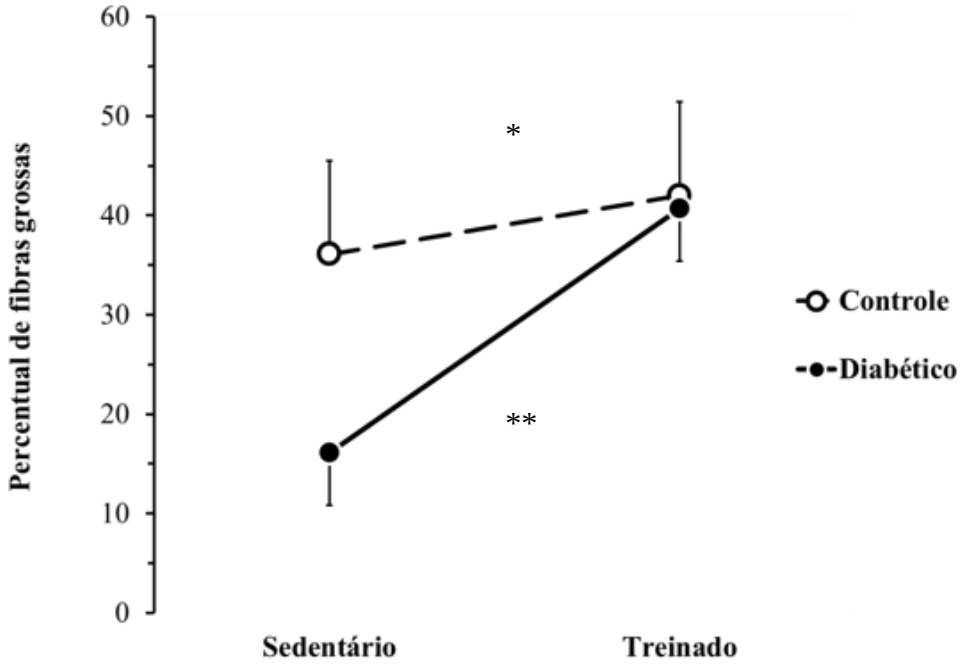

Fig 1. Representação dos percentuais de fibras grossas dos grupos estudados.
ANOVA efeito principal: * p= 0,006; ** p=0,04

Discussão

Neste estudo observou-se que há uma diminuição como um todo, na área de secção transversa e no número de fibras mielínicas da estrutura nervosa dos animais com diabetes experimental. No entanto o exercício físico parece ajudar na manutenção das fibras grossas, além de manter a quantidade de vasos endoneurais nos animais diabéticos, mais próximo ao dos grupos controle

Achados na diminuição das fibras nervosas e da área de secção transversa foram descritos já há algum tempo na literatura. Jakobsen (11) identificou nos ratos uma diminuição do nervo fibular no tamanho das fibras mielinizadas e uma redução na área do corte transversal das fibras mielínicas. Perda de fibras mielinizadas, degeneração axonal e desmielinização segmentar também são relatadas como características presentes na histopatologia da neuropatia diabética (18).

Segundo Fregonesi et al (19) um dos fatores desencadeantes para a neuropatia periférica é o comprometimento da ação de fatores tróficos e de crescimento nervoso, onde eles apontam estudos que descrevem que para o crescimento normal, manutenção e regeneração do sistema nervoso periférico é necessário o transporte retrógrado, para o

corpo celular, dos fatores de crescimento neuronais. A hiperglicemia característica dos portadores de diabetes *mellitus* pode tanto diminuir a síntese de fatores de crescimento em neurônios ou células de Schwann, quanto romper o transporte retrógrado para o corpo celular neuronal (20). Alterando assim, a manutenção da sua estrutura nervosa.

Balducci et al (21) acompanharam um grupo de pacientes portadores de diabetes *mellitus* sem sinais de neuropatia. Um grupo realizou exercícios e outro não. Ao final de quatro anos os autores concluíram que o exercício físico pode mudar a história da instalação da neuropatia diabética. Neste trabalho podemos perceber que dois parâmetros bastante importante para preservação das fibras nervosas: a vascularização e a condução do impulso nervoso nas fibras grossas foram melhor preservados nos animais que praticaram exercício físico.

Nas teorias existentes a para etiopatogenia da neuropatia periféria autores apontam para a possibilidade de haver uma alteração na vascularização endoneural. Alterações microvasculares, principalmente da *vasa nervorum*, tais como espessamento e duplicação da membrana basal, e proliferação do epitélio vascular, com conseqüente obstrução do lúmen vascular, provocariam secundariamente lesão multifocal do nervo devido à hipóxia (5, 19). Pesquisas sugerem que o óxido nítrico (NO) pode ser a ponte de ligação entre as hipóteses metabólica e vascular na patogênese da neuropatia diabética, uma vez que defeitos metabólicos podem levar a uma diminuição na síntese de óxido nítrico no endotélio vascular ou no gânglio simpático, conduzindo para a diminuição do fluxo sanguíneo neural (22).

Nas complicações microvasculares do diabetes, o estresse oxidativo afeta a função das células endoteliais e a reatividade vascular, contribuindo para o comprometimento do fluxo sanguíneo e da oxigenação periférica do nervo (23).

A manutenção da vascularização nos animais com diabetes, submetidos ao treinamento físico, pode ser justificada pelo fato de alguns autores identificarem que o exercício pode melhorar a perfusão anormal e a viscosidade do plasma, além de facilitar o fornecimento de oxigênio (24, 25). Sabe-se, que o treinamento físico expõe os vasos à episódios repetidos de hiperemia. A tensão elevada de cisalhamento a partir do aumento do fluxo sanguíneo, decorrente da vasodiltação provocada pelo exercício aeróbico, aumenta a expressão vascular da síntese do óxido nítrico, aumentando a sua liberação (26, 27).

Além disso, o desenvolvimento de terapias para prevenir a ação da geração de radicais livres pode influenciar a progressão da neuropatia. O exercício moderado pode ser

benéfico para a diabetes, devido à redução da produção de radicais livres e de glicose no sangue, e ao aumento do fluxo sanguíneo periférico (9).

Em relação a perda de fibras finas, estas tendem a ser afetadas inicialmente por causa de sua extensão, uma vez que a sua primeira sinapse ocorre na medula e a tendência no diabetes *mellitus*, para a estrutura nervosa, é o "morrer para trás" (28). A perda de fibras finas também foi relatada por outros autores (29, 30).

Este estudo demonstrou que o exercício físico pode ajudar a manter uma melhor estrutura do nervo uma vez que as fibras grossas foram mantidas e a quantidade de vasos dos animais DT se manteve mais próxima as obtidas nos animais CS.

REFERÊNCIAS

1. Pittenger G & Vinik A. Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Experimental Diabesity Research* 2003 **4** 271–285

2. Sugimoto K, Murakawa Y & Sima AAF. Diabetic neuropathy—a continuing enigma. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2000 **16** 408–433

3. Dyck PJ, Lais, A, Karnes JL, O'Brien, P & Rizza, R. fiber loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. *Annals of Neurology* 1986 **19** 425-439.

4. Hill, RE & Williams, PE. Perineural cell basement membrane thickening and myelinated nerve fibre loss in diabetic and nondiabetic peripheral nerve. *Journal of the Neurological Sciences* 2004 **21**7157-163.

5. Harati, Y. Diabetic neuropathies: unanswered questions. *Neurol. Clin* 2007 **25** 303-17

6. Tesfaye S, Harris ND, Wilson RM & Ward JD. Exercise-induced conduction velocity increment: a marker of impaired peripheral nerve blood flow in diabetic neuropathy *Diabetologia* 1992 **35** 155-159

7. Coskun O, Ocakcı A, Bayraktaroglu T& Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Tohoku J Exp Med* 2004 **203** 145-154.

8. Snow LM, Sanchez OA, McLoon LK, Serfass RC & Thompson LV. Effects of endurance exercise on myosim heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *Am J Phys Med Rehabil* 2005 **84** 770-778

9. Selagzi H, Buyukakilli B, Cimen B, Yilmaz N & Erdogan, S. Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest*. 2008 **31** 971-978.

10. Heidarianpour A, Hajizadeh S, Khoshbaten A, Niaki AG, Bigdili MR & Pourkhalili K. Effects of chronic exercise on endothelial dysfunction and insulin signaling of cutaneous microvascular in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007 **14** 746-752

11. Jakobsen, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. I. A study of cross sectioned nerves. *Diabetologia*. 1976 **12** 539-546.

12. Jakobsen, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres. *Diabetologia*. 1976 **12** 547-553.

13. Wright A & Nukada H. Sciatic nerve morphology and morphometry in mature rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol* 1994 **88** 571-578

14. Leandro CA. Levada, Hirabana SM, Manhães-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R & Pithon-Curi TC. A program of Moderate Physical Training for Wistar Rats Based on Maximal Oxygen Consumption. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 2007 **21** 751-756.

15. Dall'Ago P, Silva VOK, De Angelis, KLD, Irigoyen, MC, Fazan JR & Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2002 **35** 843-849

16. Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM (2003) Experimental model of induction of *diabetes mellitus* in rats. *Acta Cir Bras* **18** Special Edition

17. Massone, F. Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988.

18. Singleton JR & Smith AG. Therapy insight: neurological complications of prediabetes. *Nat Clin Pract Neurol* 2006 **2** 276 – 282

19. Fregonesi CEPT, Faria CRG, Molinari SM & Neto MHM. Etiopatogenia da neuropatia diabética. *Arq Ciênc Saúde Unipar* 2004 **8** 147-156.

20. Stevens MJ, Feldman EL & Greene DA. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabetic Medicine* 1995 **12** 566-579

21. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F & Falluca F. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications* 2006 **20** 216-223.

22. Sima AAF, Sugimoto, K. Experimental diabetic neuropathy: an updata. *Diabetologia* 1999 **42** 773-788

23. Stevens MJ. Nitric oxide as a potential bridge between the metabolic and vascular hypotheses of diabetic neuropathy. *Diabetic Medicine* 1995 **12** 292-295

24. Terjung RL, Mathien GM, Erney TP & Ogilvie RW. Peripheral adaptations to low blood flow in muscle during exercise. *The American Journal of Cardiology* 1988 **62** 15E–19E

25. Fuchsjager-Mayrl G, Pleiner J, Wiesinger GF, Sieder AE, Quittan M, Nuhr MJ, Francesconi C, Seit HP, Francesconi M, Schmetterer L, & Wolzt, M. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002 **25** 1795–1801

26. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G & Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *Journal of Clinical Investigation* 2000 **105** 1631–1639.

27. Maiorana A, O'Driscoll G, Goodman C, Taylor R & Green D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2002 **56** 115–123.

28. Vinik AI & Mehrabyan A. Diabetic neuropathies. *Med. Clin. N. Am* 2004 **88** 947-999

29. Malone JI, Lowitt S, Korthals JK, Salem A & Miranda C. The effect of hyperglycemia on nerve conduction and structure is age dependent. *American Diabetes Association* 1996 **45** 209-215

30. Said G. Diabetic neuropathy - a review. *Nat Clin Pract Neurol* 2007 **3** 331 – 340

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que a prática de exercício físico é fundamental para uma boa qualidade de vida e prevenção de uma série de patologias dentre elas o diabetes. O diabetes é tido hoje como um problema de saúde pública, onde a qualidade e perspectivas dos seus portadores fica bastante comprometida.

Este trabalho teve como objetivo avaliar quais benefícios o treinamento físico poderia trazer para portadores de uma das complicações mais temidas do diabetes - a neuropatia periférica. Existe pouca evidência científica, ainda, sobre as repercussões que a neuropatia diabética provoca na estrutura nervosa em humanos. Desta forma as pesquisas translacionais são excelentes para identificar as repercussões de determinadas patologias cujo estudo em humanos seria bastante limitado.

A partir deste estudo identificamos que os ratos portadores da neuropatia diabética pode ter uma série de benefícios na manutenção/preservação da estrutura nervosa destes animais.

Pode-se perceber através deste estudo que a VCN (um dos primeiros sinais relatados na literatura em animais com neuropatia diabética) dos animais com diabetes submetidos ao treinamento aeróbico moderado apresentou valores próximos aos dos animais dos grupos controle. Os parâmetros avaliados nesta pesquisa podem fornecer uma base para o entendimento desta manutenção. Sabe-se que este parâmetro está diretamente relacionado às fibras presentes para condução do impulso.

Apesar dos animais com diabetes que realizaram treinamento físico apresentarem, assim como os animais com diabetes sedentários, um menor número de fibras mielínicas e uma menor área de secção transversa do nervo isquiático, esta perda parece ter ocorrido mais nas fibras finas, naquele grupo. Isto porque há nos animais do grupo DT, um percentual de fibras grossas próximo ao encontrado nos animais do grupo CT. Assim como uma preservação do diâmetro axonal, que diferente dos animais do grupo DS, que apresentaram uma atrofia, retratada através dos valores da razão “g” e diâmetro do axônio, os animais do grupo DT apresentaram estes mesmo valores próximos aos dos animais dos grupos controle.

A teoria vascular defende que as alterações na estrutura nervosa seja decorrente de uma queda do número dos vasos endoneurais. Uma vez que nos animais do grupo DT, existiu uma tendência a preservação destes vasos, e assim a manutenção de um suprimento sanguíneo, esta hipótese poderia nos fazer entender o porque de os animais do grupo DT conseguirem preservar melhor suas estruturas.

Um fato para ressaltarmos é a nomenclatura utilizada para a classificação dos parâmetros da razão “g”: submielinizadas, normomielinizadas, extramielinizadas. Esta classificação nos remete a pensar exclusivamente na estrutura da bainha de mielina. No entanto pode-se observar neste estudo que não houve diferença da espessura da bainha de mielina entre os grupos estudados, porém os animais com diabetes, não submetidos ao treinamento físico, apresentaram valores de razão “g” na classificação extramielinizada. Analisando estes dados identificamos que o ocorrido nos animais se apresentaram nesta classificação, na verdade demostraram uma atrofia no diâmetro do axônio mielínico e não um espessamento da bainha de mielina. Desta forma registramos um cuidado para uma interpretação mais cuidadosa dos valores e classificação dos registros da razão “g”.

As causas da neuropatia diabética podem ser divididas em dois grandes grupos: causa metabólica e causa vascular. Neste trabalho não avaliamos os fatores que fazem parte da causa metabólica, desta forma deixamos a sugestão para que trabalhos futuros agreguem esta avaliação, no intuito de tentar elucidar cada vez mais os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento a neuropatia diabética.

REFERÊNCIAS

AFZAAL, S.; SING, M.; SALEEM, I. Aetiopathogenesis and management of neuropahy. *J. Assoc. Physicians Índia*, v. 50, n. 5, p. 707-711, 2002.

ANSSELIN, A. D; FINK, T.; DAVEY, D. F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seedes with Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 23, p. 387-398, 1997.

AZEVEDO, V.F. Medicina translacional: qual a importância para a prática reumatológica? *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 49, n. 1, p.81-83, 2009.

BALDI, J.C.; HOFMAN, P.L. Does careful glycemic control improve aerobic capacity in subjects with type 1 diabetes? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v.38, n. 4, out, 2010.

BALDUCCI, S.; IACOBELLIS, G.; PARISI, L.; DI BIASE, N.; CALANDRIELLO, E.; LEONETTI, F.; FALLUCA, F. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications*, v. 20, p. 216-223, 2006.

BERTOLUCCI, M. C.; AGUIAR, L. G. K.; VILLELA, N. R.; BOUSKELA, E. Alterações microcirculatórias no diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*, vol. 51, n. 2, p. 204-211, 2007.

BORTOLETTO, M. S. S.; VIUDE, D. F.; HADDAD, M. C. L.;, KARINO, M. E. Caracterização dos portadores de diabetes submetidos à amputação de membros inferiores em Londrina, estado do Paraná. *Acta Scientiarum Health Sciences*, v. 32, n. 2, p. 205-213, 2010.

BOSBOOM, W. M. J.; VAN DEN BERG, L. H.; FRANSSEN, H.; GIESBERGEN, P. C. L. M.; FLACH, H. Z.; VAN PUTTEN, A. M,; VELDMAN, H.; WOKKE, J. H. J. Diagnostic value of sural nerve demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain*, v. 124, n. 12, p. 2427-2438, 2001

BOULTON, A. J. M.; VINIK, A. I.; AREZZO, J. C.; BRIL, V.; FELDMAN, E. L.; FREEMAN, R.; MALIK, R. A.; MASER, R. E.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, D. Diabetic Neuropathies. *Diabetes Care*, v. 28, n. 4, abr, 2005.

BOULTON, A. J. M.; KIRSNER, R. S.; VILEIKUTE, L. Neuropathy diabetic foot ulcers. *N Engl J Med*, v. 351, n. 1, p. 48-55, 2004.

BRUSSEE, V.; CUNNINGHAM, A.; ZOCHODNE, D. W. Direct insulin signaling of reverses diabetic neuropathy. *Diabetes*, v. 53, p. 1824-1830, 2004.

CARVALHO, E.N.; CARVALHO, N.A.S.; FERREIRA, L.M. Experimental model of induction of *diabetes mellitus* in rats. *Acta Cir Bras*, v. 18, Special Edition, 2003.

CARVALHO, C. C.; MAIA, J. N.; LINS, O. G.; MORAES, S. R. Sensory nerve conduction in the caudal nerves of rats with diabetes.: *Acta Cir Bras*, v. 16, n. 2, p. 121-124, 2011.

CHEN, C.J.; OU, Y.C.; LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; CHEN, S.Y.; WU, C.W.; WANG, C.C.; WANG, W.Y.; HUANG, Y.S.; HSU, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology*, v. 204, p. 443–453, 2007.

COSKUN, O.; OCAKC, A.; BAYRAKTAROGLU, T.; KANTER, M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Tohoku J Exp Med* , v. 203, p. 145-154, 2004.

DALL'AGO, P.; SILVA, V.O.K.; DE ANGELIS, K.L.D.; IRIGOYEN, M.C.; FAZAN, J.R.; SALGADO, H.C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 35, p. 843-849, 2002.

De FRONZO, R. A.; HENDLER, R.; SIMONSON, D. Insulin resistance is a proeminent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, v. 31, p. 795-801, 1982.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D.Y.; FLORES, L.J.F.; RODRIGUES, B.; MELO, K.F.S.; SCHAAN, B.D.; IRIGOYEN, M.C. Efeitos fisiológicos do treinamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 50, p. 1005-1013, 2006.

Diabetes Control, Complications Trial Group. The effects of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, v. 329, p. 977-986, 1993.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e acompanhamento do diabetes Mellitus. 2007

DYCK, P. J.; LAIS, A.; KARNES, J. L.; O'BRIEN, P.; RIZZA, R. Fiber loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. *Annals of Neurology*, v. 19, p. 425-439, 1986.

DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. Peripheral neuropathy. In Pathology of the Peripheral Nervous System. 3rd ed. Dyck PJ, Giannini C, Lais A, Eds. Philadelphia, Saunders, p. 514-595, 1993.

DYCK, P. J.; ZIMMERMAN, B. R.; VILEN, T. H.; MINNERATH, S. R.; KARNES, J. L.; YAO, J. K.; PODUSLO, J.F. Nerve glucose, fructose, sorbitol, myoinositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med*, v. 319, p. 542-548, 1988.

ERIKSSON, J.; TAIMELA, S.; KOIVISTO, V. A. Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia*, v. 40, p. 125-135, 1997.

FAZAN, V. P. S.; VASCONCELOS, C. A. C.; VALENÇA, M. M.; NESSLER, R.; MOORE, K. C. Diabetic Peripheral Neuropathies: A Morphometric Overview. *Int. J. Morphol*, v. 28, n. 1, p. 51-64, 2010.

FREGONESI, C.E.P.T.; FARIA, C.R.G.; MOLINARI, S.M.; NETO, M.H.M. Etiopatogenia da neuropatia diabética. *Arq Ciênc Saúde Unipar*, v. 8, n. 2, p. 147-156, 2004.

FUCHSJAGER-MAYRL, G.; PLEINER, J.; WIESINGER, G. F.; SIEDER, A. E.; QUITTAN, M.; NUHR, M. J.; FRANCESCONI, C.; SEIT, H. P.; FRANCESCONI, M.; SCHMETTERER, L.; WOLZT, M. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*,v. 25, p. 1795-1801, 2002.

FUKAI, T.; SIEGFRIED, M. R.; USHIO-FUKAI, M.; CHENG, Y.; KOJDA, G.; HARRISON, D. G. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *Journal of Clinical Investigation*, v. 105, p. 1631-1639, 2000.

GAMBA, M.A.; GOTLIEB, S.L.D.; BERGAMASCHI, D.P.; VIANNA, L.A.C. Amputações de extremidades inferiores por diabetes mellitus: estudo caso-controle. *Rev Saúde Pública*, v. 38, n. 3, p. 399-404, 2004.

GIUGLIANO, D.; CIRIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vadculart complications. *Diabetes Care*, v. 18, p. 19-21, 1996.

GREENE, D. A.; SIMA, A. A. F.; STEVENS, M. J.; FELDMAN, E. L.; LATTIMERS, A. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care*, v. 15, p. 1902-1925, 1992.

GROSSI, S.A.A. Prevenção de úlceras nos membros inferiores em pacientes com diabetes mellitus. *Rev. Esc. Enf. USP*, v. 32, n. 4, p. 377-385, dez, 1998.

HANSON P. Pathophysiology of chronic diseases and exercise training. In: American College of Sports Medicine. ACSM's resource manual for guidelines for exercise testing and prescription. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 187-96, 1993

HARATI, Y. Diabetic neuropathies: unanswered questions. *Neurol. Clin*, v. 25, n. 1, p. 303-317, 2007.

HEIDARIANPOUR, A.; HAJIZADEH, S.; KHOSHBATEN, A.; NIAKI, A. G.; BIGDILI, M. R.; POURKHALILI, K. Effects of chronic exercise on endothelial dysfunction and insulin signaling of cutaneous microvascular in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, v. 14, p. 746-752, 2007.

HILL, R. E.; WILLIAMS, P. E. Perineural cell basement membrane thickening and myelinated nerve fibre loss in diabetic and nondiabetic peripheral nerve. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 21, n. 7, p. 157-163, 2004.

HOCHMAN, B.; NAHAS, F. X.; OLIVEIRA FILHO, R. S.; FERREIRA, L. M. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras*, v. 20, suppl, 2, p. 2-9, 2005.

ISHII, D. N. Implications of insulin-like growth factors in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Brain Research Reviews*, v. 20, p. 47-67, 1995.

JAKOBSEN, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. I. A study of cross sectioned nerves. *Diabetologia*, v. 12, p. 539-546, 1976.

JAKOBSEN, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres. *Diabetologia*, v. 12, p. 547-553, 1976.

KALICHMAN, M. W.; POWELL, H. C.; MIZISIN, A. P. Reactive, degenerative, and proliferative Schwann cell responses in experimental galactose and human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol*, v. 95, n.1, p. 47-56, 1998.

KÄRVESTEDT, L.; MÅRTENSSON, E.; GRILL, V.; ELOFSSON, S.; VON WENDT, G.; HAMSTEN, A.; BRISMAR, K. The prevalence of peripheral neuropathy in a population-based study of patients with type 2 diabetes in Sweden. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v. 25, p. 97-106, 2011.

KENNEDY, J.W.; HIRSHMAN, M.F.; GERVINO, E.V.; OCEL, J.V. FORSE, R.A., HOENING, S.J.; ARONSON, D.; GOODYEAR, L.J.; HORTON, E.S. Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 48, n.5, p. 1192-1197, 1999.

KENNEDY, J. M.; ZOCHODNE, D. W. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery: Is there irreparable damage? *Diabetes*, v. 54, p. 830-837, 2005.

LEANDRO, C. A.; LEVADA, A.; HIRABANA, S. M.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; DE-CASTRO, C. B.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. A program of Moderate Physical Training for Wistar Rats Based on Maximal Oxygen Consumption. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, v. 21, p. 751-756, 2007.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216-26, 2008.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E.M.; CARVALHO, C.R; CARVALHEIRA, J.B.; PERES, S.B. REIS, M.A.; SAAD, M.J.; BOSCHERO, A.C.; VELLOSO, L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol*, v. 147, n.1, p. 149-157, 2002.

MAIA, J. N.; CARVALHO, C. C.; GALVÃO, M. H.; SILVA, A. L.; MENDES, A. C.; MORAES, S. R.; LINS, O. G. Eletrophysiological study of the caudal nerve on developing rats.: *Acta Cir Bras*, v. 25, n. 2, p. 144-147, 2010.

MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; GOODMAN, C.; TAYLOR, R.; GREEN, D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 56, p. 115-123, 2002.

MALIK, R. A.; TESFAYE, S.; NEWRICK, P. G.; WALKER, D.; RAJBHANDARI, S. M.; SIDDIQUE, I.; SHARMA, A. K.; BOULTON, A. J.; KING, R. H.; THOMAS, P. K.; WARD, J. D. Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. *Diabetologia*, v. 48, n.3, p. 578-585, 2005.

MALONE, J. I.; LOWITT, S.; KORTHALS, J. K.; SALEM, A.; MIRANDA, C. The Effect of Hyperglycemia on Nerve Conduction and Structure Is Age Dependent. *American Diabetes Association*, v. 45, p. 209-215, 1996.

MASSONE, F. Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988.

MICHALISZYN, S. F.; FAULKNER, M. S. Physical Activity and Sedentary Behavior in Adolescents With Type 1 Diabetes. *Research in Nursing & Health*, v. 33, p. 441-449, 2010.

MILMAN, M. H. S. A.; LEME, C. B. M.; BORELLI, D. T.; KATER, F. R.; BACILLI, E. C. D. C.; ROCHA, R. C. M.; SENGER, M. H. Pé diabético: Avaliação da evolução e custo hospitalar de pacientes internados no conjunto de Sorocaba. *Arq. Bras. Endocrinol Metabol*, v. 45, n. 5, p. 447-451, 2001.

MIZISIN, A. P.; NELSON, R. W.; STURGES, B. K.; VERNAU, K. M.; LECOUTEUR, R. A.; WILLIAMS, D. C.; BURGERS, M. L.; SHELTON, G. D. Comparable myelinated nerve pathology in feline and human diabetes mellitus. *Acta Neuropathol*, v. 113, n.4, p. 431-442, 2007.

OLIVEIRA, L.V.F Da bancada ao leito: a partir de um diagnóstico preciso para o tratamento adequado. O uso crescente da pesquisa translacional. *ConScientiae Saúde*, v. 8, n. 4, p. 545-547, 2009.

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; ROPELLE, E. R. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab*. V. 53, n. 4, p. 399-408, 2009.

PITTENGER, G.; VINIK, A. Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Experimental Diabesity Research*, v. 4, p. 271-285, 2003.

PRINEAS, J. W.; MCLEOD, J. G. Chronic relapsing polyneuritis. *J Neurol Sci*, v. 27, p. 427-458, 1976.

QUEIROZ, P. C.; AGUIAR, D. C.; PINHEIRO, R. P.; MORAES, C. C.; PIMENTEL, I. R. S.; FERRAZ, C. L. H.; FERRAZ, T. M. B. L. Prevalência das complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes mellitus e síndrome metabólica. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd*, v. 9, n. 4, jul.-ago. 2011.

RAILE, K.; KAPELLEN, T.; SCHWEIGER, A.; HUNKERT, F.; NIETZSCHMANN, U.; DOST, A.; KIESS, W. Physical activity and competitive sports in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, v. 22, n. 11, p. 1904-1905, 1999.

ROSS, M. A. Neuropathies associated with diabetes. *Med Clin North Am*, v. 77, p. 111-124, 1993.

SABATELLI, M.; MIGNOGNA, T.; LIPPI, G.; PORCU, C.; TONALI, P. Intramyelinic edema in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Clin Neuropathol*, v. 15, p. 17-21, 1996.

SAID, G. Diabetic neuropathy - a review *Nat Clin Pract Neurol*, v. 3, p. 331 – 340, 2007

SCHNEIDER, S. H.; MORGADO, A. Effects of fitness and physical training on carbohydrate metabolism and associated cardiovascular risk factors in patients with diabetes. *Diabetes Care*. V. 3, p. 378-407, 1995.

SELAGZI, H.; BUYUKAKILLI, B.; CIMEN, B.; YILMAZ, N.; ERDOGAN, S. Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest*. V. 31, p. 971-978, 2008.

SHAMLIYANA, T.; KANEA, R. L.; DICKINSON, S. A systematic review of tools used to assess the quality of observational studies that examine incidence or prevalence and risk factors for diseases. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 20, p. 1061-1070, 2010.

SIMA, A. A. F.; SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: an updata. *Diabetologia*, v. 42, p. 773-788, 1999.

SINGLETON, J. R.; SMITH, A. G. Therapy insight: neurological complications of prediabetes. *Nat Clin Pract Neurol*,v. 2, p. 276 – 282, 2006.

SITTA, E. I.; ARAKAWA, A. M.; CALDANA, M. L.; PERES, S. H. C. S. A contribuição de estudos transversais na área da linguagem com enfoque na afasia. *Rev CEFAC*, v. 12, n. 6, p. 1059-1066, 2010.

SMITH, A.G.; MUSCAT**,** G.E. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 37, n. 10, p. 2047-2063, 2005.

SNOW, L. M.; SANCHEZ, O. A.; MCLOON, L. K.; SERFASS, R. C.; THOMPSON, L. V. Effects of endurance exercise on myosim heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *Am J Phys Med Rehabil*, v. 84, p. 770-778, 2005.

STEVENS, M. J.; FELDMAN, E. L.; GREENE, D. A. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabetic Medicine*, v. 12, p. 566-579, 1995.

STEVENS, M. J. Nitric oxide as a potential bridge between the metabolic and vascular hypotheses of diabetic neuropathy. *Diabetic Medicine*, v. 12, p. 292-295, 1995.

SUGIMOTO K, MURAKAWA Y & SIMA AAF. Diabetic neuropathy—a continuing enigma. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v. 16, p. 408-433, 2000.

SUNDKVIST, G.; DAHLIN, L.B.; NILSSON, H.; ERIKSSON, K.F.; LINDGÄRDE, F.; ROSÉN, I; LATTIMER, S.A.; SIMA, A.A.; SULLIVAN, K.; GREENE, D.A. Sorbitol and myo-inositol levels and morphology of sural nerve in relation to peripheral nerve function and clinical neuropathy in men with diabetic, impaired, and normal glucose tolerance. *Diabetic Med*, v. 17, p. 259-268, 2000.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pâncreas. *Physiol. Res*, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TERJUNG, R. L.; MATHIEN, G. M.; ERNEY, T. P.; OGILVIE ,R. W. Peripheral adaptations to low blood flow in muscle during exercise. *The American Journal of*

Cardiology, v. 62, p. 15E–19E, 1988.

TESFAYE, S.; HARRIS, N. D.; WILSON, R. M.; WARD, J.D. Exercise-induced conduction velocity increment: a marker of impaired peripheral nerve blood flow in diabetic neuropathy. *Diabetologia*, p. 155-159, 1992.

THOMAS, P. K.; FRAHER, J. P.; O'LEARY, D.; MORAN, M. A.; COLE, M.; KING, R. H. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. 2. Effect of streptozotocin-induced diabetes. *Acta. Neuropathol*, v. 79, p. 375-386, 1990.

THRAINSDOTTIR, S.; MALIK, R. A.; ROSÉN, I.; JAKOBSSON, F.; BAKHTADZE, E.; PETERSSON, J.; SUNDKVIST, G.; DAHLIN L. B. Sural nerve biopsy may predict future nerve dysfunction. *Acta Neurol Scand*, v. 120, n. 1, p. 38-46, 2009.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. *Caderno La Salle* XI, v. 2, n.1, p. 231-239, 2005.

UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type II diabetes. *Lancet*, v. 352, p. 837–853, 1998.

VIERA-SANTOS, I.C.R.; SOUZA, W.V.; CARVALHO, E.F.; MEDEIROS, M.C.W.C.; NÓBREGA, M.G.L.; LIMA, P.M.S. Prevalência de pé diabético e fatores associados nas unidades de saúde da família da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, em 2005. *Cad. Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2861-2870, dez, 2008.

VINIK, A. I.; MEHRABYAN, A. Diabetic neuropathies. *Med. Clin. N. Am*, v. 88, p. 947-999, 2004.

WEST, S.; KING, V.; CAREY, T. S.; LOHR, N. K.; MCKOY, N.; SUTTON, S. F.; et al. Systems to rate the strength of scientific evidence. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, v. 47, p. 1-11, 2002.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of Diabetes -Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v. 27, p. 1047–1053, 2004.

WRIGHT, A.; NUKADA, H. Sciatic nerve morphology and morphometry in mature rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol,* v. 88, p. 571-578, 1994.

ZINMAN, B.; ZUNICA-GUAJARNO, S.; KELLY, D. Comparison of the acute and long term effects of exercise on glucose control in type 1 diabetes. *Diabetes Care,* v. 7, p. 515-519, 1984.

ANEXOS

ANEXO A

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

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, 17 de setembro de 2008

Oficio nº 59/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profª. Silvia Regina Arruda de Moraes**
Departamento de Anatomia– CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.011686 / 2008 - 41

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado ***"Avaliação do Treinamento de Endurance em Ratos com Diabetes Experimental".***

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 CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,

Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA
UFPE

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;
Animais: Ratos Wistar ; Machos ; com 60 dias de vida;Número de animais previsto no protocolo: 40

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B

Normas para publicação da revista: Diabetes/metabolism research and reviews

Author Guidelines

Diabetes/Metabolism Research and Reviews is an online-only journal publishing high quality original research and reviews in the fields of diabetes, endocrinology, metabolism and obesity. Original papers describing clinical studies, translational and basic research related to diabetes, obesity, metabolism, or closely related metabolic disorders are welcome, as are articles concerned with treatment and management issues related to patient care. Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with Ethical Policies of the journal, and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review. It is highly recommended you read this policy and complete any necessary documentation prior to your submission.

*This journal employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published work*s

Editorial Policies and Procedures Acceptance of papers is based on the originality of the observation or investigation, the quality of the work described, the clarity of presentation, and the relevance to our readership. When submitting a manuscript it is with the understanding that the manuscript (or its essential substance) has not been published other than as an abstract in any language or format and has not been submitted elsewhere for print or electronic publication consideration. The journal operates a stringent peer review process. All manuscripts will be reviewed by the Editors, members of the Editorial Board, or other expert reviewers. At the discretion of the Editors, the manuscript may be returned immediately without full review, if deemed not competitive or outside the realm of interests of the majority of the readership of the Journal. The decision (reject, invite revision, accept) letter will be conveyed through the Journal's ScholarOne Manuscripts system, coming directly from the Editor who has assumed responsibility for the manuscript's review. Editorial decisions are based not just on technical merit of the work, but also on other factors such as the priority for publication and the relevance to the Journal's general readership. All papers are judged in relation to other submissions currently under consideration. Rebuttals to rejected manuscripts are strongly discouraged and requests for resubmission of rejected manuscripts are generally not granted.

Publication ethics *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* is a member of the Committee on Publication Ethics and subscribes to its recommendations (Committee on Publication Ethics [COPE]: guidelines on good publication practice, www.publicationethics.org.uk). Best Practice Guidelines on Publication Ethics are also available from http://www.blackwellpublishing.com/publicationethics/ (Graf C, Wager E, Bowman A, *et al., Int J Clin Pract* 2007; 61 [suppl 152]: 126). The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds. All authors are responsible for adhering to guidelines on good publication practice. No paper can be published in the Journal

unless it meets all of these requirements.

Reviews

Reviews are typically invited, but authors are welcome to contact the Editorial office with proposals for potential reviews. There is no set word limit for reviews and there is no need for the abstract to be structured.

Manuscript style

Manuscripts should be prepared in 12-point type in one of the standard fonts: Times, Helvetica, or Courier are preferred. It is not necessary to double line space your manuscript. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be prepared and uploaded as separate figure files.

The language of the journal is English. If you are not a native English speaker, we strongly recommend that you have your manuscript professionally edited before submission. Authors should note that the journal is unable to accept a manuscript unless the reviewers and Editors agree that the quality of the grammar, spelling, and punctuation are adequate and that there is full clarity of meaning throughout, with no ambiguity. As part of our Author Services, Wiley-Blackwell suggests a number of English language editing companies that authors can contact to arrange to have their manuscript edited.

Key points to note:

- The **cover page** should include the full title, short title of up to 70 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)** .
- Authors may suggest appropriate **reviewers,** for consideration by the Editors.
- Please bear in mind the importance of the **title and abstract**; these will be read many more times than the full paper, and are used by readers to decide if they will read the full paper or not. It is worth taking time to make the title and abstract as informative and accurate as possible. For advice on writing titles and abstracts please visit our Author Services site.
- Enter an **abstract** of up to 250 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work. Divide the abstract into four short paragraphs labelled Background, Methods, Results, Conclusions.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.
- Manuscripts should be structured into **headed sections** as follows: Title, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References. Other subsection headings within the main headings may be used but should be limited.
- **Abbreviations** are not encouraged except for units of measurement and universally recognized abbreviations (e.g. DNA). When an abbreviation appears in the text for the first time, it should be placed in parentheses after the words for which it stands. We strongly discourage the use of non-standard abbreviations, as they are not helpful to readers.

- **Compound and drug names.** Generic names should be used for all compounds. Trade names may be used in parentheses after the generic name. Sources of unusual materials and chemicals, and the manufacturer and model of equipment used should be indicated.

The Editor reserves the right to alter manuscripts whenever necessary to make them conform to the stylistic and bibliographical conventions of the Journal.

References

References should be cited in the text by number within square brackets and listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text. All references must be complete and accurate. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. Where possible the DOI for the reference should be included at the end of the reference. Online citations should include date of access. Use Medline abbreviations for journal names. They can be found at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals. References should be listed in the following style:

Sjoholm A, Nystrom T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; **22(1)**: 4-10.

Boulton AJM, Cavanagh PR, Rayman G. *The Foot in Diabetes 4th Edn*. John Wiley & Sons: Chichester, 2006; 1- 449.

Illustrations

Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, with the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

Tables should be part of the the main document and should be placed after the references. If the table is created in excel the file should be uploaded separately.

Please note that since this journal is published online-only, there are no charges for colour figures.

Manuscript Submission

Diabetes/Metabolism Research and Reviews operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles and track their progress online. Please read the remainder of these instructions to authors and then click http://mc.manuscriptcentral.com/dmrr to navigate to the site. **All papers must be submitted via the online system.** IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or

authored for the journal in the past year you will have an account.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .rtf, .ppt, .xls. Figures may be provided in .tiff or .eps format. **Please note:** This journal does not accept Microsoft Word 2007 documents at this time. Please use Word's "Save As" option to save your document as a .doc file type. If you try to upload a Word 2007 document in ScholarOne Manuscripts you will be prompted to save .docx files as **.doc** files.

Editable source files for all parts of your manuscript must be uploaded. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files. Any supplementary material, such as large raw data files, must be uploaded as separate files and designated as "Supplementary Material for Review". Revised manuscript submissions should include a point by point letter specifying how the author has responded to the reviewers' and editors' comments.

For all **submission enquiries** please contact the DMRR Editorial Office: Brenda Dionisi, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews,* Dept Endocrinology & Diabetes, University Campus Bio-Medico, Via Alvaro del Portillo 21, 00128 Rome, Italy. Tel: 39 06 22541 9184/9160. Fax: 39 06 22541 456. E-mail: b.dionisi@unicampus.it

Copyright and Permissions

Authors **must** sign, scan and upload to the online system:

- a Copyright Transfer Agreement with original signature(s) - the authors must sign a Copyright Transfer Agreement, transferring copyright in the article from the author to the publisher, and submit it with the article presented for publication, without this we are unable to publish the contribution, and
- permission grants - if the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from online or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley Permission Request Form.

The Copyright Transfer Form and the Permissions Form should be uploaded with the designation “Supplementary Material Not for Review” when you submit of your article. If you do not have access to a scanner, further instructions will be given to you after acceptance of the manuscript.

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work that is not being submitted or considered for publication elsewhere at the same time. Submitted material will not be returned to the author, unless specifically requested.

Post Acceptance

Proofs

For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the submitting author prior to publication. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of a delay to publication.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many benefits the service offers.

Author Services

If your manuscript has been accepted for publication, explore our suite of tools and services for authors and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tools

Accepted Articles

Peer reviewed articles that have been accepted for publication in *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* are now rapidly published online before being copy-edited and typeset. The articles are published on the Accepted Articles page of the journal website, as PDFs, with a *DOI (digital object identifier), so they can be cited. Subsequently, the full copy-edited and typeset articles will appear in an online issue, after proofing by the authors.

Readers should note that the versions of articles published within Accepted Articles should not be considered the version of record. Wiley-Blackwell cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these articles.

*The Digital Object Identifier (DOI) is an identification system for intellectual property in the digital environment. Developed by the International DOI Foundation on behalf of the publishing industry, its goals are to provide a framework for managing intellectual content, link customers with publishers, facilitate electronic commerce, and enable automated copyright management.

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Please complete the payment form as soon as possible after your article is accepted.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated

in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Note to NIH and HHMI Grantees

Wiley-Blackwell has agreed to automatically send the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders or HHMI fundees to PubMed Central. The accepted version will be made publicly available 12 months after publication for NIH grant-holders and 6 months after publication for HHMI fundees. Further information on these services is available here.

Authority and Responsibility

The intellectual content of the paper is the responsibility of the authors. The Editors and the Publisher accept no responsibility for opinions and statements of authors. While every effort will be made by the Editor and Publisher to avoid inaccurate and misleading data, they accept no liability whatsoever for the consequences of wrong information. The authors agree to keep the Editors and Publisher fully and effectually indemnified against any liability or claims that may arise out of the publication of inaccurate and/or misleading data.

ANEXO C

Normas pra publicação da revista: Diabetologia

General information

Diabetologia publishes reports of clinical and experimental work on all aspects of diabetes research and related subjects, provided they have scientific merit and represent an important advance in knowledge. The Editor-in-Chief will consider papers from any country whether or not the author(s) is a member of the EASD. Manuscripts must be written in English (according to the Concise Oxford Dictionary). There are no page charges. A word count must be provided both for Abstracts (a maximum of 250 words) and the main text (exclusive of references, tables and figure legends). Diabetologia expects authors of accepted manuscripts to keep original data available for a minimum of 5 years.

Exclusivity

Diabetologia does not publish material that has been printed previously or is under consideration for publication elsewhere. When submitting an article authors are asked whether the manuscript is under consideration elsewhere. Authors should acknowledge in the manuscript all financial support for the work and other personal connections and to disclose any conflicts of interest that might bias their work.

Redundant publication

In their covering letter authors should notify the Editor of any potentially overlapping papers in preparation, submission or published. Failure to disclose such information is considered grounds for **automatic rejection**. Where the author has any doubt as to the significance of any overlap, copies of papers should be included with the submitted manuscript to allow the Editor to make an informed decision.

Salami slicing

Data should not be sliced to the size of the smallest publishable unit but must be a complete documentation of a study.

Papers rejected by other journals

There is no obligation to state that a manuscript has previously been submitted to another journal, but credit will be given to authors who include referees' reports and their own responses to these. Referees who have already seen a paper will not be sympathetic if they find that their previous comments have been ignored.

Clinical trials

In line with requirements of the International Committee of Medical Journal Editors (http://www.icmje.org/publishing_10register.html, http://www.icmje.org/faq_clinical.html), Diabetologia requires authors to have registered their trial in a registry at the time of conception. The registry must:

- be accessible to the public at no charge;
- be open to all prospective registrants and managed by a not-for-profit organisation;
- be a mechanism to ensure the validity of the registration data;
- be electronically searchable.

Acceptable trial registries include:

- Australian New Zealand Clinical Trials Registry (www.actr.org.au)

- ClinicalTrials.gov (www.clinicaltrials.gov)
- International Standard Randomised Controlled Trial Number Register (http://isrctn.org)
- UMIN Clinical Trials Registry (www.umin.ac.jp/ctr/index.htm)
- Nederlands Trial Register (www.trialregister.nl/)
- or any registries accepted by WHO as primary registers (see http://www.who.int/ictrp/network/primary/en/index.html)

Organisation of full-length papers
In this section:

- a) Title page
- b) Abstract
- c) Introduction
- d) Methods
- e) Footnotes
- f) Results
- g) Discussion
- h) Acknowledgements
- i) Funding
- j) Duality of interest
- k) Contribution statement
- l) References - including Endnote style template
- m) Tables
- n) Figures
- o) Legends for figures

a) Title page
This page should state: (1) title of paper (including animal species if appropriate); (2) authors' names (initials and surname only – no qualifications); (3) institution(s) of origin; (4) corresponding author plus his/her address, telephone and fax numbers and e-mail address; (5) word count (both of Abstract and main text).

b) Abstract
The Abstract should be no more than 250 words. Abstracts are to be structured into four paragraphs as follows: (1) Aims/hypothesis; (2) Methods; (3) Results; (4) Conclusions/interpretation. The Abstract should not contain unexplained abbreviations. For **clinical trials**, the trial registry number should be included at the end of the Abstract. For **randomised control trials (RCTs)**, abstracts should include the checklist items set out in the CONSORT guidelines (see http://www.consort-statement.org/index.aspx?o=1190) **Keywords**. Up to ten keywords (suitable for Index Medicus listing) should be provided at the end of the Abstract. **Abbreviations**. Excluding Diabetologia's standard abbreviations, please define abbreviations used throughout the manuscript, in alphabetical order, after the keywords.

c) Introduction
The Introduction should contain a clear statement of the aim and novelty of the study. It should include neither results nor conclusions.

d) Methods

Sufficient information should be given to permit repetition of the experimental work.

Randomised control trials Authors should follow the CONSORT statement (see http://www.consort-statement.org/index.aspx?o=1011) and also include a patient flow diagram.

Description of patients The terms type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus should normally be used. Detailed descriptions should be provided of the patients' clinical characteristics upon which the classification was made. Note: diabetic should not be used as a noun, i.e. use 'diabetic patients' not 'diabetics'. Relative body weight should be expressed in terms of body mass index, i.e. (weight in kg)/(height in metres)^2 (not % ideal body weight).

Informed consent and ethics committee approval A paper describing experimental work in humans must (1) indicate that informed consent has been obtained from patients where appropriate, (2) include a statement that the responsible ethics committee (institutional review board) has given approval, and/or indicate that the reported investigations have been carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki as revised in 2000. Do not use patients' names, initials or hospital numbers, especially in illustrative material. Uniform requirements should be followed for ethical standards [http://www.wma.net/en/20activities/10ethics/index.html].

Experimental animals Age, sex, source and, where appropriate, the genetic background of the animals used should be given. The Editorial Board will pay particular attention to the ethical aspects of animal experimentation. Reports of animal experiments must state that the 'Principles of laboratory animal care' (NIH publication no. 85–23, revised 1985; http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm) were followed, as well as specific national laws where applicable. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The authors will be held responsible for false statements or for failure to fulfil the above-mentioned requirements. Animals should be described as being killed rather than sacrificed.

Abbreviations A list of accepted abbreviations to be used without definition is available here. Please use other abbreviations only when necessary and define them in a separate list given after the keywords. Abbreviations should not normally appear in the title or Abstract. Endocrine pancreatic cells should be designated as beta cells (not ß cells or b cells), alpha cells, delta cells or PP cells.

Equipment Manufacturer, city, state (if applicable) and country must be given.

Chemical substances must be properly identified. Except for standard laboratory chemicals, the source of supply must be given. Drugs must be identified by the generic or official name wherever possible. Proprietary names should be avoided.

Genes Italic characters should be used for gene symbols including genotypes, alleles etc. For further details see the guidelines recommended by the Human Gene Nomenclature Committee, (http://www.genenames.org) or by the Jackson Laboratory, (http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml).

Radioisotopes Isotopically labelled chemicals should be identified by the atomic number

and symbol of the isotope and its location in the molecule. The specific activity of the starting material should be given in terms of becquerels (Bq: disintegrations/second) per molar weight.

Bioassays and radioimmunoassays An appropriate measure of the precision in terms of standard deviation (SD), standard error of the mean (SEM), coefficient of variation or 95% confidence intervals should be given. Reference to the original technique should be included.

Buffers and incubation media Compositions of incubation media should be described, or a reference supplied, together with the pH. Concentrations of solutions should be described in molar terms (mol/l and subunits thereof), equivalents or percentage weight/volume or weight/weight. Mass concentration should be expressed as g/l (or subunits thereof – mg/l or µg/l). It should always be made clear whether concentrations in a mixture are final concentrations or those of solutions added. In the case of insulin, mU/l is acceptable.

Units of measurement. Units should conform to the SI convention, except for blood pressure (which should be expressed in mmHg) and haemoglobin (g/l). Gas or pressure values should be given as mmHg with kPa in parentheses or vice versa. Where molecular weight is known, the amount of a substance should be expressed in mol or appropriate subunit (mmol etc.). Energy should be expressed in kJ. NB: The solidus may be used in a unit but not more than once (e.g. mmol/l is acceptable, but ml/min/kg is not acceptable and should be replaced with ml min^{-1} kg^{-1}).

Statistical analyses Describe statistical methods in sufficient detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Computer software packages that are used for anything other than widely known standard statistical procedures should be identified by name or acronym and by author or organisation of origin. Reference for statistical methods should preferably be to standard works (with pages stated) rather than to papers in which designs or methods were originally reported. When variability is expressed in terms of the SEM or SD, the number of observations (n) must also be given. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Both the sample size and statistical significance should be predefined; p values should be given.

Common errors (1) Using one-tailed instead of two-tailed tests; (2) inappropriate use of parametric analyses; and (3) lack of p correction when using multiple comparisons. If necessary, professional statistical advice will be sought by the Editor-in-Chief.

e) Footnotes
Footnotes should not be used.

f) Results
The Results should be stated concisely without discussion and should not normally contain any references. The same data should not be presented in figures and tables. Do not repeat all the data that are set out in the tables or figures in the text; emphasise or summarise only important observations.

g) Discussion

The Discussion should deal with the interpretation of the results and not recapitulate them. We encourage authors to write their Discussion in a structured way, as follows:

- statement of principal findings;
- strengths and weaknesses of the study;
- strengths and weaknesses in relation to other studies;
- discussion of important differences in results; meaning of the study;
- unanswered questions and future research.

h) Acknowledgements
Acknowledgements should be as brief as possible. Any grant support that requires acknowledgement should be mentioned. The names of funding organisations should be written in full. Any editorial assistance should be acknowledged.

i) Funding
Please include a separate Funding section after your Acknowledgements which details your sources of funding

j) Duality of interest
Authors are responsible for recognising and disclosing conflicts of interest that might bias their work. They should acknowledge in the manuscript all financial support for the work and other personal connections.

k) Contribution statement
The ICMJE uniform requirements for manuscripts submitted to medical journals state that authorship credit should be based on:

2. substantial contributions to conception and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data
3. drafting the article or revising it critically for important intellectual content
4. final approval of the version to be published.

All three conditions must be met by all authors. Participation solely in the acquisition of funding or data or general supervision of the research group does not constitute authorship.

Please include a statement listing each author's contribution. Please ensure that this is discussed with your co-authors and agreement is reached prior to manuscript submission. Post-acceptance changes to the author list will not be permitted.

l) References
References to the literature should be credited to the original findings and be in numerical order in the text, the number being given in square brackets on the line, and should be typed and numbered in the same order at the end of the manuscript. There must be only one reference per number. Reference may only be made to Abstracts published in the current or preceding year.

Reference list In accordance with Springer publishing policy, all references should be in the ELSE-Ciba style. The following formats should be used:

Articles in journals Names of up to six authors with initials (seven authors or more should be abbreviated to et al. after the third author’s name); (year); title of paper in full;

abbreviated name of journal (according to Index Medicus see http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html); volume number; first and last page numbers, e.g.: Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP (2002) A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic ß cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 99:12363–12368

Whole book Names of all authors with initials; (year); title of book; edition; name and city of publisher, e.g.: Ekoé JM, Zimmet P, Williams R (2001) The epidemiology of diabetes mellitus. An international perspective. Wiley, Chichester

Chapter from a book Names of all authors with initials; (year); chapter title; In: editors' names with initials (eds); title of book; volume number; name and city of publisher; pp first and last page numbers, e.g.: Hopper JL (2000) Why 'common environmental effects' are so uncommon in the literature. In: Spector TD, Snieder H, MacGregor AJ (eds) Advances in twin and sib-pair analysis. Oxford University Press, London, pp 151–165

Letters to the Editor As for articles in journals: e.g.: t'Hart LM, Dekker JM, Heine RJ, Maassen JA (2003) Lack of association between gene variants in the ALMSI gene and Type 2 diabetes mellitus. Diabetologia 46:1023–1024

Abstracts As for articles in journals, with (Abstract) after the page numbers: e.g. Khalifah RG, Chen Y, Price DL, Booth AA (2002) Mechanism of inhibition of advanced glycation endproducts by Pyridorin™, a novel therapeutic for diabetic complications. Diabetologia 45 [Suppl 2]: A1222 (Abstract)

Website Authors; (year); title; URL; date accessed, e.g.: Regional Office for the Western Pacific of the World Health Organization, International Association for the Study of Obesity and the International Obesity Task Force (2000) The Asia-Pacific perspective: Redefining obesity and its treatment. Available from http://www.obesityasiapacific.com, accessed 10 October 2003

Papers quoted as 'in press' Authors should provide an electronic version of any manuscripts cited as 'in press' when they submit their manuscript to Diabetologia. If an accepted paper contains references to a manuscript 'in press', written evidence that the manuscript has been accepted will be requested. Numbered references to personal communications, unpublished data and manuscripts either 'in preparation' or 'submitted for publication' are unacceptable. If essential, such references may be incorporated in parentheses in the appropriate place in the text, but written consent to publication must be provided.

The references are the responsibility of the authors. They must be written correctly and be rechecked by the authors in the proofs. References to abstracts (only current and preceding year), letters to the editor, congress proceedings, and non-peer-reviewed publications should be kept to a minimum.

EndNote style template:
A Diabetologia style template is available for EndNote. It can be downloaded from http://www.endnote.com/support/enstyles.asp. Save the file in the appropriate folder in your EndNote program directory, usually: Windows—C:\Program Files\EndNote or Mac OS X—Harddrive:Applications:Endnote. The style template

will be available when you select 'Output Styles' in the Edit menu.

m) Tables
Use the table function of your word processing program, not spreadsheets, to create tables. Tables should be numbered with Arabic numerals. Each table should have a short informative heading which is self-explanatory without reference to the text. Footnotes should be kept to a minimum. Describe the method used in the text of the Methods section and not in a footnote. Only conditions specific to the particular experiment can be stated. The units in which the results are expressed should be given in parentheses at the head of each column and not repeated on each line of the table. Avoid abbreviations. Superscripts ‘a’, ‘b’, ‘c’ should be used for footnotes (not asterisks or any other symbols). See a recent issue of the journal for examples. Large amounts of additional information can be submitted for publication electronically as supplementary material.

n) Figures
Graphs and diagrams: See a current issue of Diabetologia for style and layout – wherever possible omit headings, keys to symbols and statistics (which should be included in the legend). Line drawings and graphs should be of professional standard. Freehand or typewritten lettering and numbering are unacceptable. Ruled lines, curves and symbols must be sufficiently bold to withstand reduction to one column width (8.6 cm). Curves should not be drawn beyond the experimental points, nor should experimental points extend beyond the scales of the axes. For scatter diagrams, solid symbols are preferred.

Halftone images: Whenever possible, prints should be cropped to be one column width (8.6 cm) or be capable of being reduced to such size. If grouping into plates is desired, the layout should be indicated as a diagram. Numbers, letters and symbols must be large enough to be read easily after reduction (final size 2 mm or larger for lettering and numbering). Magnification should be indicated in the legend and where appropriate by an internal reference marker on the photograph itself (as a horizontal line at least 1 mm thick after reduction). If photographs of patients are used, either the subject should not be identifiable, or the picture must be accompanied by written permission to use the figure.

Forest plots: Forest plots should include the name of study or first author's name followed by et al (give names of both authors if there are only two authors); year of publication (optional); and the reference citation number [in square brackets]. Click here for an example. Please provide forest plots as Powerpoint or Word files in which the text is editable. If this is not possible please supply them as tif or jpeg files with a resolution of 1000 dpi.

Diabetologia offers its authors free use of colour where this is essential for understanding.

Please note that if your manuscript is accepted for publication you will be asked to provide figures as TIF, GIF or JPEG files. Scanned line drawings should be digitised with a resolution of 1000 dpi. For digital halftones and colour images, 300 dpi is usually

sufficient. Colour illustrations should be stored as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.

If the figure has previously been published, please see our section on Permissions.

o) Legends for figures
Legends should be short, self-explanatory and contain enough information to identify the figures and enable them to stand as a separate entity from the text. Legends, however, should not describe methodological detail. Keys to symbols and the statistical analysis should be included in the legend, not in the figure.

Approved abbreviations and units of expression for use without definition.

Types of artic
Original articles
A maximum of 4000 words in the main text (i.e. excluding abstract, references, tables and figure legends) plus up to 50 references.

Short communications
A maximum of 1500 words in the main text (i.e. excluding abstract, references and legends) plus up to ten references and normally no more than two illustrations (tables or figures or one of each). Otherwise in the same format as full-length original papers (see above).

Reviews
Full reviews: a maximum of 5000 words in the main text (i.e. excluding abstract, references and legends) plus up to 100 references. Mini reviews: a maximum of 3000 words in the main text plus up to 50 references. Reviews are usually invited, although unsolicited reviews may be considered for publication. Authors hoping to submit an unsolicited review should first consult the Editor-in-Chief at diabetologia-j@bristol.ac.uk. Proposals should include an abstract or detailed summary and a full outline of the review, along with a full author list with titles, affiliations and areas of expertise; please state which sections of the review each author will be responsible for.

There is no need to contact the Editor-in-Chief before submitting a Systematic Review; please upload at http://mc.manuscriptcentral.com/diabetologia in the usual way.

Meta-analyses
A maximum of 4000 words in the main text (i.e. excluding abstract, references and legends) with unlimited references.

There is no need to contact the Editor-in-Chief before submitting a meta-analysis; please upload at http://mc.manuscriptcentral.com/diabetologia in the usual way.

For debate
A maximum of 3000 words in the main text (i.e. excluding abstract, references and legends) plus up to 50 references and two illustrations (tables or figures or one of each). These will normally be solicited by the Editor-in-Chief although unsolicited articles will be considered.

Letters to the Editor
A maximum of 1000 words, plus 8 references and normally no more than one table or one figure. Letters will be considered for publication in the Correspondence section and are the forum for either: (1) Correspondence – comments with critical assessment of papers recently published in Diabetologia which, at the Editor-in-Chief's discretion, will be sent to the authors of the original paper for comment and both letter and reply published together; or (2) Research Letters – observations providing concise and important new information.

Electronic Supplementary Material (ESM)

Additional information (e.g. gene sequences) can be submitted for publication electronically as supplementary material provided that it is not essential for a basic understanding of the main paper. You should include references to the supplementary material at appropriate places in your article; these will become hyperlinks to the ESM in the electronic version of article.

ESM can be used in conjunction with full-length papers and short communications.

ESM will be peer-reviewed but will not undergo any copyediting and will be published online exactly as supplied by the author.

Supplements

Diabetologia does not publish supplements other than the Abstract volume of the annual EASD meeting.

Revised manuscripts

If you are asked to revise your manuscript you will be expected to provide a covering letter that responds in detail to each point raised by reviewers or editors, and to highlight new material in the text using a different colour (do not use the 'track changes' mode of Word). If a manuscript returned to the authors for revision is not returned to the Editorial Office within the stipulated time-period (usually 4 weeks), it may be treated as a new manuscript.

When you submit your revised manuscript please fax a completed author signed statement to +44(0)845 0582542

Resubmitted manuscripts
If your manuscript was rejected with an invitation to resubmit as a new paper, there is no time limit for submitting your new manuscript as extensive reworking/new experiments may be required. This is in contrast to papers that are returned for revision (see above). If you choose to resubmit your manuscript, you will be expected to include a response to the referees' comments in a covering letter; this could be a point-by-point list or you may find that a more general summary is appropriate if the paper has been rewritten. It would be helpful if you highlight in colour all new material in your paper - please do not use the 'track changes' function of Word for this. Please be aware that we might ask new referees to review your resubmitted manuscript.

When you resubmit your manuscript please fax a completed author signed statement to

+44(0)845 0582542

An electronic proof (URL) is sent to the corresponding author. Only typographical errors should be corrected. The corrected proof should be returned within 48 h. Failure to comply with this deadline will delay publication. Any changes to the text or figures are liable to be charged to the author. Please ensure that proofs are checked carefully - by several authors if possible. Once the paper is published online mistakes can only be corrected by issuing an erratum.

Errata

Mistakes in a published article can only be corrected by publishing an erratum. If you notice a mistake in your article please contact the Editorial Office (diabetologia-j@bristol.ac.uk)

Offprints

Authors will receive an electronic offprint (pdf) free of charge. Authors will have the opportunity to purchase additional printed offprints.**Permissions**

Verbatim material or figures/tables taken from other published sources must be accompanied by a written statement from the author of the original material, and from the publishers if they hold the copyright, giving permission to Diabetologia for reproduction in print and electronic formats. Please note that, for many journals, permission is required for publication of an adapted figure/table. It is the responsibility of the submitting author to investigate whether permission is needed and to pay any fees associated with obtaining permission.

Copyright
Authors transfer the copyright to their article to Springer effective if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive and unlimited rights to reproduce and distribute the article in any form of reproduction (printing, electronic media or any other form); it also covers translation rights for all languages and countries. For authors from the United States the copyright is transferred to the extent transferable. A Copyright Transfer Form will be sent to the corresponding author along with proofs of the paper.

Springer operates an Open Choice programme whereby authors can choose to make their article available with full open access following payment of an article processing fee.

ANEXO D

Normas para publicação da revista: European Journal of Endocrinology

Scope

European Journal of Endocrinology is the official journal of the European Society of Endocrinology. Its predecessor journal is Acta Endocrinologica.
The journal publishes original clinical and translational research papers and reviews in paediatric and adult endocrinology. Case reports will only be considered if they represent exceptional insights or advances in clinical endocrinology.
Equal consideration is given to all manuscripts in English from any country.

Ethics

All authors must abide by the standards outlined in the journal's ethical guidelines. In particular, please note the need to avoid duplicate submission, plagiarism and self-plagiarism.
BioScientifica is a member of CrossCheck (powered by iThenticate). CrossCheck is a multi-publisher initiative to screen published and submitted content for originality. Manuscript submissions will be screened against the CrossCheck database.
The iThenticate system is also available to researchers, enabling authors to verify originality prior to submission. Please note that screening is not a requirement for submission, but may assist authors to avoid plagiarism/self-plagiarism. Originality of the manuscript submitted is the author's responsibility.
It will be assumed that submitted manuscripts carry the approval of all the authors.
Any changes to the authorship of the manuscript during the peer review process require the complete agreement of all authors in writing, as per the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines.

Open Access and archiving in online repositories

Please note the journal's policy on self archiving. Acceptance of this policy is a condition of publication.
The journal also offers an Open Access option.

Copyright

Articles are considered on the understanding that, if they are accepted for publication, the entire copyright shall pass to the European Society of Endocrinology. All authors are asked to sign a copyright agreement (PDF, 47 KB) to this effect. To facilitate the processing of your manuscript please submit the completed form with your article. Digital signatures are not accepted.

Permissions

It is your responsibility to clear all copyright permissions for any work reproduced in your article and to pay any permissions fees.
If a figure/table is adapted or reproduced from a previously published work, please include wording to this effect and a citation to the original work in the figure legend. Please forward permission from the copyright holder (usually the publisher) to the editorial office

with your submission.
For information on how to request permission to reproduce any part of an article published in European Journal of Endocrinology see the journal's permissions and commercial reprints page.

Article types

Clinical studies, reviews and commentaries are considered. The journal will also consider case reports of exceptional quality.
Correspondence related to published work is published at the discretion of the Editorial Board. Letters should not exceed one printed page, including references, one table or one figure. Authors of the work being discussed will ordinarily be allowed to reply.
The Editor-in-Chief reserves the right to invite commentaries or critiques on articles accepted for publication.

Reviews

The European Journal of Endocrinology publishes review articles which present a balanced perspective on timely issues within the field of clinical endocrinology. Review articles are normally by invitation and undergo peer review by experts in the field. Authors intending to submit unsolicited reviews should send an outline of the proposed article to the Editorial Office via the feedback form.

Submission

Submit online using the ScholarOne Manuscripts system.
Papers must be written in clear, concise English. Where English is not the first language of the authors, the journal requests that the paper is checked by a native English speaker prior to submission.
If accepted, your article will be included in the Accepted Preprint service. Please ensure that the details entered in ScholarOne Manuscripts match those in the manuscript itself, as the Accepted Preprint is generated from ScholarOne Manuscripts. In particular, ensure that affiliations are included and that the order, spelling and middle initials of authors are entered as you want them to appear online, as the Accepted Preprint will be indexed in PubMed until the final typeset version is published.
Please prepare the content of your article as described below.
Include a covering letter containing the following:

- A statement as follows: "The author(s) hereby confirms that neither the manuscript nor any part of it, except for abstracts of less than 400 words, has been published or is being considered for publication elsewhere. By signing this letter each of us acknowledges that he or she participated sufficiently in the work to take public responsibility for its content."
- A statement that the work will not be submitted for publication elsewhere until the editorial board has decided whether to publish the article
- A brief explanation of the subject of the article. For original research articles, state the novelty of the findings and why they represent a meaningful advance in the field. For case reports, state how the article represents exceptional insights or advances in the clinical endocrinology

Articles quoted as 'in press' that are not available online as part of the Accepted Preprint service or a similar scheme must be provided as supplementary files for reviewing purposes.

Give the names of up to five reviewers with email addresses. One of these scientists may be asked to referee the article.
Authors should keep copies of everything submitted.

Charges to authors

European Journal of Endocrinology is committed to keeping costs to authors to a minimum. Consequently, there are:

- No submission fees
- No charges for online-only colour figures
-

Page charges

There is a charge of 350 EUR per printed page in excess of:

- 6 pages for research articles (a six-page article is approximately 4500 words, although allowance must be made for tables and figures)
- 10 pages for review articles

Additional charges would only be incurred if you are publishing colour figures in print, publishing supplementary data, making your article Open Access or purchasing offprints.

Preparation of manuscripts

General

Manuscripts should be concise and clear. We recommend a maximum of 10 figures and 60 references.
Manuscripts should be divided into the following sections:

- Title page, Abstract (maximum 250 words), Introduction, Materials and methods or Subjects and methods, Results, Discussion, Declaration of interest, Funding, Author contributions, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables, Figures.
- The arrangement of material for other types of article is at the discretion of the authors, but this should in general conform with the requirements for original research papers.
- Please format your manuscript as follows:

5. Use double line spacing throughout (including reference list and figure legends).
6. Number all pages, and number the lines continuously throughout the entire manuscript down the left-hand side of each page.
7. When preparing a revised manuscript, please highlight the changes to your manuscript within the document by using the highlighter function or coloured text.
8. Manuscripts can be written in either UK or US English. As a guideline, follow the Shorter Oxford English Dictionary for UK English or Merriam-Webster's New Collegiate Dictionary for US English.
9. Define all abbreviations when first mentioned.

For further advice on manuscript preparation see the Guidelines published by the European Association of Science Editors.

Gene and protein nomenclature

Wherever possible, manuscripts must be prepared in accordance with approved gene nomenclature. If a more widely used symbol exists it can be used if the authors prefer, provided that the accepted symbol is stated when the gene/protein is first used.

In gene and protein symbols, substitute Greek letters with the corresponding roman letter, e.g. TGFBR2 not TGFβR2.

Avoid hyphens unless they are part of the approved symbol, e.g. IGF1 not IGF-1.

Use arabic rather than roman numerals, e.g. BMPR2 not BMPRII.

Follow species-specific formatting standards as follows:

Mice and rats

Gene symbols should be in italics with only the first letter capitalised. Protein designations should be the same as the gene symbols except that all letters should be capitalised and in roman (i.e. not italicised). For example:

Gene/RNA/DNA: Sox2
Protein: SOX2

Use symbols approved by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and the Rat Genome and Nomenclature Committee, which can be queried at the MGI website.

Humans, non-human primates and domestic species

Gene symbols should be in italics with all letters capitalised; protein designations should be the same as the gene symbols but not italicised. For example:

Gene/RNA/DNA: SOX2
Protein: SOX2

Use symbols approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

Title page

Include a separate title page with:

Title (maximum 20 words). Titles should be as short as possible while still informing the reader about the article content and engaging their interest

Authors' names and full addresses. The place where the work was carried out should be listed first. Use superscript numbers after authors' names to indicate their affiliations

Corresponding author's postal and email address

Short title (maximum 46 characters, including spaces)

A mimimum of four keywords describing the manuscript

The word count of the full article

Abstract

The abstract (maximum length 250 words) should be divided using the headings Objective (giving the context of the study), Design, Methods, Results and Conclusions.

All abbreviations should be defined. Avoid references.

Introduction

The introduction should set the study in context by briefly reviewing relevant knowledge of the subject; follow this with a concise statement of the objectives of the study.

Materials and methods

Provide sufficient information for other workers to repeat the study. If well-established methods are used give a reference to the technique and provide full details of any modifications.

Include the source of chemicals, reagents and hormones and give the manufacturer's name and location (town, country) in parentheses.

Give the generic name, dose and route of administration for drugs.

Specify the composition of buffers, solutions and culture media.

Use SI symbols, give concentrations in mol l^{-1} and define the term % as w/v or v/v for all solutions. For international units use iu (U should be used for enzyme activity).

Specify the type of equipment (microscopes/objective lenses, cameras, detectors) used to obtain images.

Specify any image acquisition software used, and give a description of specialized techniques requiring large amounts of processing, such as confocal, deconvolution, 3D reconstructions, or surface and volume rendering.

Human genotype–phenotype association studies

Until recently almost all genotype–phenotype observations were done using candidate gene approaches. The sequencing of the human genome and the comprehensive mapping of haplotypes of human SNPs have revolutionized gene association studies, which can now be conducted through genome-wide approaches. Unfortunately, many of the reported genotype–phenotype associations are questionable, and have not been replicated. European Jounal of Endocrinology recognizes that genotype–phenotype association studies, performed by either genome-wide or candidate gene approaches, are of potential interest as a first step in the discovery process, although subsequent validation will be needed to confirm or refute the observation. However, these initial association reports must be methodologically sound. To ensure this European Jounal of Endocrinology has adopted the recommendations made by the NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies (Nature 447 (7145) 655-660), and authors should adhere to these criteria as listed below.

These criteria are intended for studies of genotype–phenotype associations assessed by genome-wide or candidate-gene approaches:

Statistical analyses demonstrating the level of statistical significance of a finding should be published or at least available so that others can attempt to reproduce the reported results

Explicit information should be provided about the study's power to detect a range of effects

The study should be epidemiologically sound, with careful accounting for potential biases in selection of subjects, characterization of phenotypes, comparability of environmental exposures (when possible) and underlying population structure in cases and controls

Phenotypes should be assessed according to standard definitions provided in the report

Associations should be consistent (within the range of expected statistical fluctuation) and reported for the same phenotypes across study subgroups or across similar phenotypes in the entire study group

Significance should not depend on altering the quality control methods beyond standard approaches that could change inclusion or exclusion of large numbers of samples or loci

Measures to assess the quality of genotype data should include results of known study sample duplicates or publicly available samples

The results for concordance between duplicate samples (if applicable) as well as completion and call rates per SNP and per subject should be disclosed, along with rates of missing data

A subset of notable SNPs should be evaluated with a second technology that verifies the same result with excellent concordance, because no technology is error-free

Associations with nearby SNPs in strong linkage disequilibrium with the putatively associated SNP should be reported (and should be similar)

The results of replication studies of previous findings should be reported even if the results are not significant

Testing for differences in underlying population structure in case and control groups should be performed and reported

Appropriate correction for multiple comparisons across all statistical tests examined should be reported. Comparison to genome-wide thresholds should be described. Similarly, for bayesian approaches, the choice of prior probabilities should be described

Genomic data

Manuscripts will be considered that utilize genomic approaches for purposes beyond cataloguing, and provide unique insights into regulatory networks, mechanisms, or demonstrations of biological function.
Filtered raw data should be submitted as supplementary data in a tab-delimited format using spreadsheets such as Microsoft Excel. In presenting DNA microarray data it is essential to clearly identify the platform, describe the filtering criteria used to evaluate the raw data, and provide complete references for the statistical methods used to analyse the data. In addition to submitting supplementary data, we recommend that authors submit the same data to the Gene Expression Omnibus (GEO), launched by the National Institute of Biotechnology Information, under the auspices of the National Library of Medicine and NIH, to support the public dissemination of gene expression data.

Clinical trials

Papers reporting clinical trials will only be considered if the trials have been pre-registered according to the guidelines set out in The Lancet 364 (9438) 911-912.
Authors should also refer to the CONSORT 2010 Statement, and in particular the checklist

within it, when preparing manuscripts detailing clinical trials.

Human subjects

Include a statement that consent has been obtained from each patient or subject after full explanation of the purpose and nature of all procedures used.
It must be stated that the investigation was approved by the local ethical committee, functioning according to the 3rd edition of the Guidelines on the Practice of Ethical Committees in Medical Research issued by the Royal College of Physicians of London (11 St Andrew's Place, London NW1 4LE, UK; Tel: +44 (0) 207 935 1174; Fax: +44 (0) 207 7486 4514; Email: publications@cplondon.ac.uk; Web: www.rcplondon.ac.uk). Copies of the MRC recommendations can be obtained from the Medical Research Council, 20 Park Crescent, London W1B 1AL, UK (Tel: +44 (0) 20 7636 5422; Fax: +44 (0) 20 7636 6179) or at www.mrc.ac.uk

Patient confidentiality

Where possible, identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the internet as well as in print after publication. Informed consent should be obtained if there is any doubt that anonymity can be maintained.
Authors are required to sign a warranty that they have obtained written consent from all patients where anonymity cannot be guaranteed.

Statistical analysis

It is the author's responsibility to document that the results are reproducible and that the differences found are not due to random variation. No absolute rules can be applied but, in general, quantitative data should be from no fewer than three replicate experiments. Appropriate statistical methods should be used to test the significance of differences in results. The term 'significant' should not be used unless statistical analysis was performed, and the probability value used to identify significance (e.g. $P < 0.05$) should be specified.
When several t-tests are employed, authors should be aware that nominal probability levels no longer apply. Accordingly, the multiple t-test, multiple range test, or similar techniques to permit simultaneous comparisons should be employed. Also, in lieu of using several t-tests, it is often more appropriate to utilize an analysis of variance (ANOVA) to permit pooling of data, increase the number of degrees of freedom, and improve reliability of results. Authors should use appropriate nonparametric tests when the data depart substantially from a normal distribution.
In presenting results of linear regression analyses, it is desirable to show 95% confidence limits.
When data points are fitted with lines, specify the method used for fitting (graphical, least squares, computer program). If differences in slopes and/or axis intercepts are claimed for plotted lines, these should be supported by statistical analysis.
Give sufficient details of the experimental design and analysis so that the reader can assess their adequacy and validity for testing the hypotheses of interest.

In particular:

Describe the numbers of experimental units used and the way in which they have been allocated to treatments.

Justify the omission of any observations from the analysis.

Describe methods of analysis precisely and state any necessary assumptions, as these may affect the conclusions that can be drawn from the experiment.

Your article may be sent to the Statistical Advisor for comments.

Declaration of interest, Funding and Acknowledgements

Declaration of interest

Actual or perceived conflicts of interest for all authors must be declared in full.
Please either (a) declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported; or (b) fully declare any financial or other potential conflict of interest.
Conflicts of interest include, but are not limited to:

Employment and consultancies
Grants, fees and honoraria
Ownership of stock or shares
Royalties
Patents (pending and actual)
Board membership

Funding

Please detail all of the sources of funding relevant to the research reported in the following format:

This work was supported by the Medical Research Council (grant numbers xxxx, yyyy); the Wellcome Trust (grant number xxxx); and Tommy's Baby charity (grant number xxxx).

Where research has not been funded please state the following:

This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

Author contribution statement (optional)

Please include a statement specifying the contribution of each co-author.

Acknowledgements

Please be as brief as possible.

References

All references cited in the text must be included in the reference list and vice versa. However, if a reference consists of only a web address do not include it in the reference list but cite it in the text, giving the date the page was accessed.

Unpublished work

Any unpublished work (personal communications, manuscripts in preparation and manuscripts submitted but not yet accepted for publication) must be referred to in the text and not listed in the references.
Give the full list of authors, including their initials, and the date. For example:
(A Stone, J Brown & M R Smith 2010, unpublished observations)

(J Brown 2011, personal communication)
Articles accepted for publication but not yet published may be listed as 'in press' in the reference list, using the current year as the publication year. If an 'in press' article is included in the Accepted Preprint service or a similar scheme, then the Digital Object Identifier (DOI) should be included; otherwise, provide a copy of the article as a supplementary file for reviewing purposes. Details of how to cite such articles can be found here.

In the text

Cite references in the text in numerical order.

In the reference list

List references in the order they are cited in the text.
List all authors.
Reference in the following format:

1. Inkster S, Yue W & Brodie A. Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1995 80 1941–1947.
2. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, Casagrande S, Tedeschini G, Benedetti A & Chatterjee VK. Primary amenorrhea and infertility due to a mutation in the β-subunit of follicle-stimulating hormone. Nature Genetics 5 83–86.
3. Royer P. Hormonal regulation of calcium metabolism: biology and pathology. In Pediatric Endocrinology , edn 2, ch. 6, pp 477–543. Eds J-C Job & M Pierson. New York: John Wiley & Sons, 1981.

EndNote

An EndNote style for European Journal of Endocrinology is available. To download the style,

2. RIGHT-CLICK to select this link: European Journal of Endocrinology EndNote style (.zip file, 1.3 KB)
3. Choose 'Save Target As' or 'Save Link As' from the drop-down menu
4. Save the file to your computer and unzip it to extract the .ens file
5. Copy the .ens file into the 'Style' folder within the EndNote program folder (usually found on the computer hard (C:) drive). If using a shared copy of EndNote over a network, the network administrator may need to do this

Tables

Tables should be concise. Tables too large for print publication should be submitted as supplementary data.

Number tables in the order they are cited in the text.

Include a title – a single sentence at the head of the table.

Use footnotes to provide any additional explanatory material, cross-referenced to the column entries.

Give a short heading for each column.

Do not use internal horizontal or vertical lines, colour or shading.

Explain all abbreviations used in the table in the footnotes.

Figures

Colour figures will be published online at no charge to the author. Publication of colour figures in the print version will incur a charge that must be paid by credit card before publication. Please see the colour charges form for details.

Number figures in the order they are cited in the text.

Include legends to all figures, giving the figure number, keys to any symbols used, the names of any statistical tests used and the probability levels used for comparisons.

Ensure that figures can be read clearly when reduced in size for publication. The width of a single column in the journal is 82 mm and we will attempt to size figures appropriately to avoid page charges.

Label figure sections as A, B etc in the top left-hand corner.

Use Arial or a similar sans-serif font for text labels.

Do not enclose figures in boxes.

Indicate magnification by a scale bar in the bottom right-hand corner of the image and give the measurement in the legend.

Use the preferred symbols of closed and open circles, squares and triangles and avoid the use of shading and stripes.

Use Courier or a similar non-proportional font for amino acid, DNA, RNA and PCR primer sequences and highlight sections of homology between sequences with grey shading.

File types and resolution

European Journal of Endocrinology is committed to publishing high quality figures.
EPS or TIFF files are preferred. Files should be exported in Illustrator compatible format. Avoid using PowerPoint or Word files for figures.
Additional information regarding the submission of figures can be found here.
Line images/graphs

File types: EPS, TIFF, high-resolution PDF, AI (Adobe Illustrator)

Resolution at final published size: 1200 dpi

Half-tone (greyscale) images

File types: TIFF, high-resolution PDF, JPEG

Resolution at final published size: 600 dpi

Colour images

File types: TIFF, high-resolution PDF, JPEG. EPS or AI files can be used for graphical data and illustrations that don't include photographs

Resolution at final published size: 300 dpi

Colour format: CMYK (not RGB)

Image acquisition and manipulation

No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The groupings of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g. using dividing lines) and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or colour balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend. Adjustments should be applied to the entire image. Threshold manipulation, expansion or contraction of signal ranges and the altering of high signals should be avoided.

This policy is adopted from The Journal of Cell Biology.

Microscopy

Microscope images should be made available to referees in images that are at least 300 dpi at the size which they will be published. 'Pseudo-colouring' and nonlinear adjustment (for example 'gamma changes') are only allowed if unavoidable and must be disclosed.

Supplementary data

Supplementary data too large for print publication or exceeding the bounds of the manuscript may be submitted for online publication.
Supplementary data files intended for online publication should be submitted online via ScholarOne Manuscripts as ‘Supplemental File for Review’, and referred to as supplementary data in the text:
(Supplementary Table 1)
(Supplementary Figures 1 and 2)
Supplementary information will be reviewed as part of the manuscript, evaluated for its importance and relevance and, if accepted, will be referenced in the text of the article, directing readers to the website.
There is a charge to the author of 100 GBP for the first file and 20 GBP for each subsequent file. Each figure, table, movie, etc. will be treated as a separate file. When submitting a manuscript with supplementary data please include a completed supplementary data form (PDF, 43 KB).

Offprints

A free PDF will be emailed to the corresponding author. Offprints can be ordered on the form accompanying the proof.

Supplements

European Journal of Endocrinology considers selected supplements which are subject to the same rigorous peer review as all papers submitted to the journal. Further information on this can be found here.

The organizer(s) or authors(s) of the meeting will be responsible for the full costs of the supplement. For further information, please contact the Editorial Office

ANEXO E

Normas para elaboração da tese do Programa de Pós Graduação em Neuropsquiatria e Ciências do Comportamento.

NORMAS DA APRESENTAÇÃO[1]

ESTRUTURA	ORDEM DOS ELEMENTOS
1 Pré-textuais Elementos que antecedem o texto com informações que ajudam na identificação e utilização do trabalho.	1.1 Capa 1.2 Lombada 1.3 Folha de rosto 1.4 Errata (opcional, se for o caso) 1.5 Folha de aprovação 1.6 Dedicatória(s) 1.7 Agradecimento(s) 1.8 Epígrafe (opcional) 1.9 Resumo na língua vernácula 1.10 Resumo em língua estrangeira 1.11 Lista de ilustrações 1.12 Lista de tabelas 1.13 Lista de abreviaturas e siglas 1.14 Lista de símbolos 1.15 Sumário
2 Textuais	2.1 Apresentação 2.2 Revisão da literatura (ou artigo de revisão) 2.3 Métodos 2.4 Resultados - Artigo (s) original (ais) 2.5 Considerações finais
3 Pós-textuais Elementos que complementam o trabalho	3.1 Referências 3.2 Apêndice (s) 3.3 Anexo (s)

1 <u>Pré-textuais</u>

1.1 Capa

Proteção externa do trabalho e sobre a qual se imprimem as informações indispensáveis à sua identificação

a) Anverso (frente)
Cor: Verde escura;

[2]Adaptadas segundo as recomendações da ABNT NBR 14724, 2005
(**NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005).

Consistência: capa dura
Formatação do texto: letras douradas, escrito em maiúsculas, fonte "Times New Roman", tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.
Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrando; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou Dissertação; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

b) Contracapa

Anverso (Frente)
Cor: branca;
Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte "Times New Roman", tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.
Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrando; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou da Dissertação, sendo permitida ilustração; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

Observação**: As capas verdes e sólidas serão somente exigidas quando da entrega dos volumes definitivos, após aprovação das respectivas bancas examinadoras e das respectivas correções exigidas.**

1.2 Lombada

Parte da capa do trabalho que reúne as margens internas das folhas, sejam elas costuradas, grampeadas, coladas ou mantidas juntas de outra maneira.
De baixo para cima da lombada devem estar escritos: o ano, o título da Tese ou da Dissertação, o nome utilizado pelo doutorando ou mestrando nos indexadores científicos.

1.3 Folha de Rosto

Anverso (frente)
Cor: branca;
Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte "Times New Roman".
Conteúdo do texto: os elementos devem figurar na seguinte ordem:
a) nome do doutorando ou mestrando (na parte alta fonte "Times New Roman", tamanho 16, alinhamento centralizado);
b) título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte "Times New Roman", tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
c) natureza, nome da instituição e objetivo, explícito pelo seguinte texto: "Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor ou Mestre em Nutrição" (na parte média inferior, fonte "Times New Roman", tamanho 14, espaço simples entre linhas, devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita);

d) o nome do orientador e se houver, do co-orientador (logo abaixo do item c, separados por dois espaços simples, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento à esquerda);
e) local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
f) ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado).

Verso
Descrever a ficha catalográfica, segundo as normas da Biblioteca Central da UFPE.

1.4 Errata

Esta folha deve conter o título (Errata), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional que deve ser inserido logo após a folha de rosto, constituído pela referência do trabalho e pelo texto da errata e disposto da seguinte maneira:

EXEMPLO ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
32	3	publicação	publicação

1.5 Folha de Aprovação

Elemento obrigatório, colocado logo após a folha de rosto, escrito no anverso da folha (cor branca), não deve conter o título (folha de aprovação) nem o indicativo numérico, sendo descrito em letras pretas, maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”, constituído pelos seguintes elementos:
a) nome do doutorando ou mestrando (na parte alta fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
b) título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
c) data de aprovação da Tese ou Dissertação, exemplo: Tese aprovada em: 27 de março de 2008 (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
d) nome, titulação e assinatura de todos os componentes da banca examinadora e instituições a que pertencem (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
e) local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
f) ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado).

Observação: A data de aprovação e assinaturas dos membros componentes da banca examinadora será colocada após a aprovação do trabalho.

1.6 Dedicatória (s)

Elemento opcional, colocado após a folha de aprovação, onde o autor presta homenagem ou dedica seu trabalho. Esta folha não deve conter o título (dedicatória) nem o indicativo numérico.

1.7 Agradecimento (s)

Esta folha deve conter o título (Agradecimento ou Agradecimentos), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional, colocado após a dedicatória, onde o autor faz agradecimentos dirigidos àqueles que contribuíram de maneira relevante à elaboração do trabalho.

1.8 Epígrafe

Elemento opcional, colocado após os agradecimentos. Folha onde o autor apresenta uma citação, seguida de indicação de autoria, relacionada com a matéria tratada no corpo do trabalho. Esta folha não deve conter o título (epígrafe) nem o indicativo numérico. Podem também constar epígrafes nas folhas de abertura das seções primárias.

Observação: o conjunto dos itens relacionados à dedicatória (s), agradecimento (s) e epígrafe deve conter no máximo cinco páginas.

1.9 Resumo na língua vernácula

Esta folha deve conter o título (Resumo), sem indicativo numérico, centralizado, conforme a ABNT NBR 6024, sendo elemento obrigatório, escrito em português, em parágrafo único, de forma concisa e objetiva dos pontos relevantes, fornecendo a essência do estudo. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas, seguido, logo abaixo, das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores. Estes descritores devem ser integrantes da lista de "Descritores em Ciências da Saúde", elaborada pela BIREME e disponível nas bibliotecas médicas ou na Internet (http://decs.bvs.br). Todas as palavras-chave necessitam serem separadas entre si e finalizadas por ponto.

1.10 Resumo na língua estrangeira - Abstract

Esta folha deve conter o título (Abstract), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento obrigatório, escrito em inglês, com as mesmas características do resumo na língua vernácula. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas. Deve ser seguido das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores, na língua.

1.11 Lista de ilustrações

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, acompanhado do respectivo número da página. Quando necessário, recomenda-se a elaboração de lista própria para cada tipo de ilustração (desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas,

plantas, quadros, retratos e outros). Esta folha deve conter o título (Lista de ilustrações), sem indicativo numérico, centralizado.

1.12 Lista de tabelas

Elemento opcional, elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, devidamente numeradas, acompanhado do respectivo número da página. Esta folha deve conter o título (Lista de tabelas), sem indicativo numérico, centralizado.

1.13 Lista de abreviaturas e siglas

Elemento opcional, que consiste na relação alfabética das abreviaturas e siglas utilizadas no texto, seguidas das palavras ou expressões correspondentes grafadas por extenso. Esta folha deve conter o título (Lista de abreviaturas e siglas), sem indicativo numérico, centralizado.
A abreviatura é a redução gráfica de um nome ou de uma seqüência de nomes, resultando em um outro único nome conciso com o mesmo significado.
É necessário que, antes da primeira aparição no texto de uma abreviação ou sigla, se coloque por extenso o nome ou seqüência de nomes que a originou, colocando o nome abreviado entre parênteses. Em seguida, deve-se usar sempre a sigla ou abreviação. Deve-se evitar, todavia, a utilização de siglas ou abreviaturas nos títulos.

1.14 Lista de símbolos

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com o devido significado. Esta folha deve conter o título (Lista de símbolos), sem indicativo numérico, centralizado.

1.15 Sumário

Esta folha deve conter o título (Sumário), sem indicativo numérico, centralizado e os elementos pré-textuais não devem figurar neste item.
O sumário é a enumeração das principais divisões, seções e outras partes do trabalho, na mesma ordem e grafia em que a matéria nele se sucede, deve ser localizado como o último elemento pré-textual, considerado elemento obrigatório, cujas partes são acompanhadas do(s) respectivo(s) número(s) da(s) página(s).
Exemplo:
12 Aspectos Clínicos da Amebíase..... 45

2 <u>Textuais</u> – Modelo de Tese ou Dissertação com Inclusão de Artigos

2.1 Apresentação

Texto preliminar no início do manuscrito que servirá de preparação aos estudos. Deve conter a caracterização e a relevância do problema (argumentos que estabelecem a

legitimidade do estudo científico), a hipótese/pergunta condutora da pesquisa (proposição que visa a fornecer uma explicação verossímil para um conjunto de evidencias e que deve estar submetida ao controle da experiência), os objetivos da tese ou da dissertação (finalidades que devem ser atingidas), os métodos adequados para testar as hipóteses. Os objetivos devem ser claramente descritos, com frases curtas e concisas, e as informações sobre os artigos, relacionando com os objetivos e referência ao periódico que será/foi submetido.

Observação: neste item, havendo citação de autores no texto seguir as normas vigentes da ABNT NBR 10520 (Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação).

2.2 Revisão da Literatura (estudo quantitativo) / Referencial Teórico (estudo qualitativo)

A revisão da literatura é um levantamento que focaliza os principais tópicos dos temas a serem abordados. Esta revisão deverá dar subsídios para as hipóteses levantadas pelo autor.

O referencial teórico ancora, explica ou compreende o objeto do estudo sendo construído a partir de uma teoria ou por construtos: "idéias e termos categoriais, princípios condutores, opiniões influentes ou conceitos essenciais adotados, em uma teoria ou área de estudo" (Carvalho, 2003, p.424)[2]. Desta forma esta construção deve articular ao objeto do estudo com alguma teoria ou alguns construtos vindos de uma revisão de literatura.

A revisão da literatura ou o referencial teórico pode ser um capítulo da dissertação ou da tese ou ser um artigo de revisão sobre o tema da tese, submetido ou publicado em revista indexada pelo doutorando ou mestrando, como autor principal. Neste caso, o artigo inserido deve seguir as normas da revista, onde foi publicado ou submetido. Se for o caso, a comprovação da submissão deverá ser incluída no item: anexos.

Neste capítulo deve seguir as normas vigentes da ABNT: referências (Conjunto padronizado de elementos descritivos retirados de um documento, que permite sua identificação individual **- NBR 6023) e apresentação de citações (**Menção, no texto, de uma informação extraída de outra fonte **- NBR 10520). Em caso do artigo de revisão ser submetido ou publicado, seguir as normas de instruções aos autores da revista.**

2.3 Métodos (estudo quantitativo) / Caminho Metodológico (estudo qualitativo)

---

[2] CARVALHO, Vilma de. Sobre construtos epistemológicos nas ciências: uma contribuição para a enfermagem. **Rev. Latino-Am. Enfermagem** , Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, 2003 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692003000400003&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 18 Mar 2008.

Detalhar o necessário para que o leitor possa reproduzir o estudo, criticar e analisar as soluções encontradas pelo mestrando ou doutorando frente aos problemas surgidos na execução do projeto. A análise dos dados deve ser escrita de modo a permitir a avaliação crítica das opções feitas.

Neste item, quando se tratar de estudo qualitativo a expressão "Métodos" pode ser substituída pelas expressões: "Caminho Metodológico", "Percurso Metodológico", entre outras.

2.4 Resultados – Artigos Originais

Neste capítulo deverão ser colocados os artigos originais resultantes do trabalho de Tese ou de Dissertação, tendo como autor principal o aluno da Pós-Graduação. Estes trabalhos deverão ser submetidos ou publicados em revistas científicas indexadas (formatados de acordo com as normas do periódico que foi/será submetido pelo doutorando ou mestrando como autor principal). No caso do doutorando, a comprovação da submissão dos artigos deverá ser incluída no item: anexos.

2.5 Considerações Finais

Neste capítulo deve-se expor as conseqüências das observações realizadas. É o momento de emitir eventuais generalizações. Não deve ser repetições dos resultados, mas sim uma boa síntese deles. Constitui-se de respostas às indagações feitas, isto é, às enunciadas na introdução e detalhadas nos objetivos. O autor deverá se posicionar frente ao problema estudado e poderá incluir recomendações, inclusive discutir novas hipóteses e conseqüentemente novos estudos e experimentos.

3 Pós-textuais

3.1 Referências

Conjunto padronizado de elementos descritivos, retirados de um documento, que permite sua identificação individual. Esta folha, elemento obrigatório, deve conter o título (Referências), sem indicativo numérico, centralizado. As referências são alinhadas à esquerda, devendo seguir as normas da ABNT NBR 6023, exceto as dos capítulos que foram enviados para publicação.

Neste item são citadas **apenas** as referências da introdução, dos métodos/procedimento metodológico e da revisão bibliográfica (quando não for um artigo que será submetido a uma Revista indexada). As referências dos artigos estão contempladas nos próprios artigos, conforme as normas de "instruções aos autores".

3.2 Apêndice

Textos ou documentos elaborados pelo autor da dissertação/tese com a finalidade de complementar sua argumentação, sem prejuízo da unidade nuclear do trabalho. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (**Apêndice**), sem indicativo numérico, centralizado.
O (s) apêndice (s) é identificado por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos apêndices, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.
Exemplo:
APÊNDICE A – Avaliação numérica de células inflamatórias totais aos quatro dias de evolução
APÊNDICE B – Avaliação de células musculares presentes nas caudas em regeneração

3.3 Anexos

Texto ou documento não elaborado pelo autor e que serve de fundamentação, comprovação ou ilustração. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (Anexo), sem indicativo numérico, centralizado.
O (s) anexo (s) são identificados por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos anexos, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.
Exemplo:

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
ANEXO B – Documentação de encaminhamento do artigo ao periódico

III REGRAS GERAIS DE FORMATAÇÃO

4 Formato

Os textos devem ser apresentados em papel branco, formato A4 (21 cm x 29,7 cm), digitados na frente das folhas, com exceção da folha de rosto cujo verso deve conter a ficha catalográfica, impressos em cor preta, podendo utilizar outras cores somente para as ilustrações.
O projeto gráfico é de responsabilidade do autor do trabalho.
Recomenda-se, para digitação, o texto na cor preta, sendo que as gravuras podem ser cores livres. A fonte Times New Roman, tamanho 12 para todo o texto, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, paginação e legendas das ilustrações e das tabelas que devem ser digitadas em tamanho menor e uniforme.
No caso de citações de outros autores, com mais de três linhas, um recuo de 4 cm da margem esquerda do texto deve ser observado.
O alinhamento para o texto é justificado.

5 Margem

As folhas devem apresentar margem esquerda e superior de 3 cm; direita e inferior de 2 cm.

6 Espacejamento

Todo o texto deve ser digitado ou datilografado com espaço 1,5, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, referências, legendas das ilustrações e das tabelas, ficha catalográfica, natureza do trabalho, objetivo, nome da instituição a que é submetida e área de concentração, que devem ser digitados ou datilografados em espaço simples. As referências, ao final do trabalho, devem ser separadas entre si por dois espaços simples.
Os títulos das seções devem começar na parte superior da mancha e ser separados do texto que os sucede por dois espaços 1,5, entrelinhas. Da mesma forma, os títulos das subseções devem ser separados do texto que os precede e que os sucede por dois espaços 1,5.
Na folha de rosto e na folha de aprovação, a natureza do trabalho, o objetivo, o nome da instituição a que é submetido e a área de concentração devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita.

7 Notas de rodapé

As notas devem ser digitadas ou datilografadas dentro das margens, ficando separadas do texto por um espaço simples de entrelinhas e por filete de 3 cm, a partir da margem esquerda.

8 Indicativos de seção

O indicativo numérico de uma seção precede seu título, alinhado à esquerda, separado por um espaço de caractere.

9 Paginação

Todas as folhas do trabalho, a partir da folha de rosto, devem ser contadas seqüencialmente, mas não numeradas.
A numeração é colocada, a partir da primeira folha da parte textual, em algarismos arábicos, no canto superior direito da folha, a 2 cm da borda superior, ficando o último algarismo a 2 cm da borda direita da folha. Havendo apêndice e anexo, as suas folhas devem ser numeradas de maneira contínua e sua paginação deve dar seguimento à do texto principal.

10 Numeração progressiva

Para evidenciar a sistematização do conteúdo do trabalho, deve-se adotar a numeração progressiva para as seções do texto. Os títulos das seções primárias, por serem as principais divisões de um texto, devem iniciar em folha distinta. Destacam-se gradativamente os títulos das seções, utilizando-se os recursos de negrito, itálico ou grifo e redondo, caixa alta ou versal, e outro, no sumário e de forma idêntica, no texto.