

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

ULTRAESTRUTURA DE NERVOS NO DIABETE
EXPERIMENTAL EM RATOS: COMPARAÇÃO ENTRE UM
NERVO ESPINAL (NERVO ISQUIÁTICO) E UM NERVO
CRANIANO (NERVO VESTÍBULO-COCLEAR)

CARLOS AUGUSTO CARVALHO DE VASCONCELOS

RECIFE
2010

CARLOS AUGUSTO CARVALHO DE VASCONCELOS

**ULTRAESTRUTURA DE NERVOS NO DIABETE
EXPERIMENTAL EM RATOS: COMPARAÇÃO ENTRE UM
NERVO ESPINAL (NERVO ISQUIÁTICO) E UM NERVO
CRANIANO (NERVO VESTÍBULO-COCLEAR)**

RECIFE/PE

2010

CARLOS AUGUSTO CARVALHO DE VASCONCELOS



**ULTRAESTRUTURA DE NERVOS NO DIABETE
EXPERIMENTAL EM RATOS: COMPARAÇÃO ENTRE UM
NERVO ESPINAL (NERVO ISQUIÁTICO) E UM NERVO
CRANIANO (NERVO VESTÍBULO-COCLEAR)**

*ULTRASTRUCTURE OF PERIPHERAL NERVES IN EXPERIMENTAL DIABETES
IN RATS: COMPARISON BETWEEN A SPINAL NERVE (SCIATIC NERVE) AND A
CRANIAL NERVE (VESTIBULOCOCHLEAR NERVE)*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento
do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Co-Orientador: Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan

**RECIFE/PE
2010**

Vasconcelos, Carlos Augusto Carvalho de
Ultraestrutura de nervos no diabetes experimental em
ratos: comparação entre um nervo espinal (nervo
isquiático) e um nervo craniano (nervo vestibulo-coclear) /
Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos. – Recife : O
Autor, 2010.

126 folhas; il., fig., tab., gráf., quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento, 2010.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Neuropatia diabética. 2. Nervos periféricos -
Morfologia. 3. Nervo vestibulo-coclear. 4. Nervo
isquiático. I. Título.

616.85
616.744

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-030

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DO
DOUTORANDO CARLOS AUGUSTO CARVALHO DE VASCONCELOS**

No dia 25 de fevereiro de 2010, às 9h, no Auditório Murilo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os Professores: Kenneth Charles Moore, Doutor Professor da The University of Iowa; Valéria Paula Sassoli Fazan, Doutora Professora do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Universidade de São Paulo; Otávio Gomes Lins, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco; Luiz Ataíde Júnior, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco e Marcelo Moraes Valença, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüiram o Doutorando CARLOS AUGUSTO CARVALHO DE VASCONCELOS, sobre a sua Tese intitulada **"ULTRAESTRUTURA DE NERVOS NO DIABETE EXPERIMENTAL EM RATOS: COMPARAÇÃO ENTRE UM NERVO ESPINAL (NERVO ISQUIÁTICO) E UM NERVO CRANIANO (NERVO VESTÍBULO-COCLEAR)**, orientado pelo Professor Marcelo Moraes Valença. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do Doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Prof. Dr. Kenneth Charles Moore

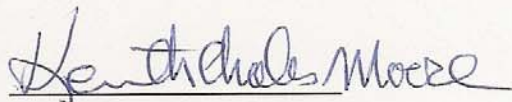
Profª. Drª. Valéria Paula Sassoli Fazan

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

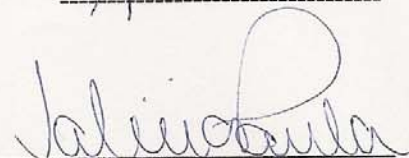
Prof. Dr. Luiz Ataíde Júnior

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

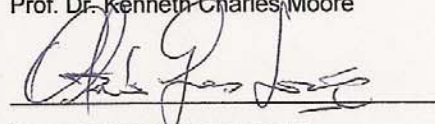
approved
aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado



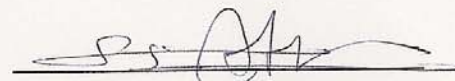
Prof. Dr. Kenneth Charles Moore



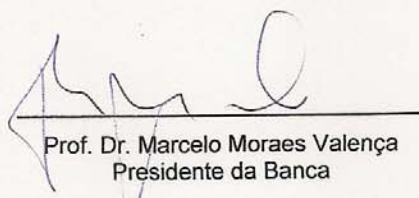
Profª. Drª. Valéria Paula Sassoli Fazan



Prof. Dr. Otávio Gomes Lins



Prof. Dr. Luiz Ataíde Júnior



Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença
Presidente da Banca

Dedico primeiramente a Deus onipotente por estar sempre comigo iluminando a minha alma e consciência, sempre trazendo paz ao meu coração, mesmo nos momentos menos fáceis.

“Os tempos bons passam, mas os ruins também...”

Aos meus queridos pais

Carlos Augusto Alencar de Vasconcelos (in memoriam) e Luzia do Espírito Santo Pereira de Carvalho pelo amor, dedicação e perseveranças. "A vida, como a fizeres, estará, contigo em qualquer parte" *Chico Xavier*. Saudade eterna, pai!

Aos meus amados filhos

Thiago (in memoriam), Diogo Augusto e Carlos Vasconcelos (Carlinhos), por serem meu baluarte e a razão incondicional da minha subsistência. A minha companheira Maria Surama. Aos meus irmãos Fabiano, Henrique e Ricardo pela união e os belos sorrisos

A minha única e legítima sogra Ester Neves, Judith Ralinho (in memoriam) e Maria Betânia pela amizade, conselhos, momentos agradáveis, elevados presságios e grandes apoios

Ao meu oráculo Aluísio Ralinho, 91 anos de lutas, pela lealdade, veracidade e honestidade. Um dos responsáveis pelo meu retorno ao Recife. São “muitos janeiros” meu amigo

A intrépida Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan pela leal cumplicidade, competência, brilhantes idéias e pela oportunidade única de conhecer e vivenciar a Universidade de Iowa

Ao brilhante e impávido neurocirurgião Dr. Marcelo Moraes Valença pela amizade e orientações na ciência e na vida, obrigado por tudo. E ao inflexível Professor Emérito Dr. Wilson Farias da Silva (in memoriam) pela amizade, exemplos e a competência elevada

Ao Prof. Dr. Othon Bastos pela confiança, amizade e apoios, é um privilégio conviver com um homem dessa elevada estirpe e sapiência, uma verdadeira “enciclopédia ambulante”

Ao Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes pela amizade, experiências, indispensáveis apoios e competência. A Dra. Naide Regueira Teodósio, Dom Hélder Câmara e León Cintra (in memoriam), pela amizade, conselhos, exemplos de vida e realizações. Figuras nobres e impolutas. “O homem enérgico e que é bem sucedido é o que consegue transformar em realidades as fantasias do desejo” Dr. Sigmund Freud

Ao Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira pela amizade sincera, conselhos e oportunidades. E aos Drs. Luiz Alves e Fábio Brayner pela amizade, auxílios e apoios no LIKA e CPqAM

Aos Profs. Drs. Everton Sougey, Gilson Edmar e Thadeu Pinheiro pela simpatia, confiança, amizade e elevada destreza, bem como os apoios indispensáveis. Todo meu respeito

Ao excelentíssimo Dr. Kenneth Charles Moore pelo carisma, amizade e a brilhante oportunidade de estagiar na The University of Iowa (Central Microscopy Research Facilities), bem como todo o povo norte-americano de caráter inabalável e bom senso. “Yes, this is America, we can”...President Barack Obama...“A America é amiga e aliada de toda nação que cultiva a paz e a honestidade”

A todo povo brasileiro de coração puro, trabalhador, colosso e varonil

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento/UFPE e o Departamento de Neuropsiquiatria/UFPE pela augusta eminência

A todos que fazem o sublime Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, Drs. José Luiz de Lima Filho e Elizabeth Chaves pela confiança e oportunidades, em especial ao Lab. de Microscopia Eletrônica e seus técnicos e funcionários que por inúmeras vezes foram as minhas mãos, toda minha amizade, gratidão e respeito a Sérgio Silva Santos, Rafael Padilha e Raimundo Pimentel (CPqAM/FIOCRUZ). Aos colegas Marília, Adriana, Esmeralda, Lânia, Dyana, Franklin, Fernando, Juliana, Juvenal, Marcela e Guilherme

A Solange, Fátima, Juarez, Neci, Fernanda e Sônia pela amizade e apoios administrativos. “Feliz de quem entende que é preciso mudar muito pra ser sempre o mesmo” Dom Hélder

A todos que fazem a Editora Universitária/UFPE, Profa. Maria José Luna, Valter Rocha, Gilberto José, Marcos André, Rosenildo Souza, Adilson e demais amigos por todos os apoios imprescindíveis

A todos os professores e técnicos do Dept. de Nutrição - LAFINNT/UFPE pela amizade e apoios, em especial: Rubem, Maria do Carmo, Maria Surama, Juliana Borba, Ana Paula, Raquel Costa-Cruz/CAV, Tânia Stamford, Mônica Osório, Edigleide Barreto, Débora Pessoa, Emília Aureliano, Raul, Edeones França, Sr. José Paulino, Ana França, Manoel e Everaldo. “Podemos-nos defender de um ataque, mas somos indefesos a um elogio” Dr. Freud

Ao Deputado Federal Marco Aurélio Ubiali (Franca/SP) neurocirurgião caridoso, amigo implacável de ideais irrefutáveis, agora com uma missão nobre e altruísta

A todos do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental/LNAE, Dept. de Neurologia e Serviço de Doenças Neuromusculares da FMRP/HC-USP, pela amizade e tudo que aprendi, em especial: Aos Drs. Amilton Antunes Barreira, Wilson Marques Júnior e Claudia Sobreira. A Maria Cristina Lopes Schiavoni e Antonio Renato Meirelles e Silva, bem como todos os funcionários pela e amizade sincera, cumplicidade e boas lembranças

Aos Drs. Cícero Fernando Lins e Túlio Sérgio Grasseschi Bueno, pela amizade, conselhos vitais, cumplicidade e grandes defesas. “A gratidão é a memória do coração” Antístenes

A Carlos Alberto Alencar de Vasconcelos, Diana Carla Carvalho de Vasconcelos, José Carlos e Célia Torres, Carlos Alberto e Diana, Ivaldo Jr., Célio Freire, Carvalhosa, Petrúcio, René Duque, Carlos Falcão, Fábio Magno, Celso e Daisy, Monteiro, João e Teresa, Talma Soriano, Tereza Matos, José Paulo (Lulu), Dr. Carlos Tomaz/UNB, Dr. Osvaldo Nascimento/UFF, Dr. Euclides Maurício/UNCISAL, Moisés/LIKA, Dr. Luiz Bezerra de Carvalho/LIKA, Dra. Fátima Aragão, Dr. Eduardo Fontana, Dr. Andore Asano, Everaldo e Gal, Emanuel Augusto, Edmilson e Eliana, Aroldo Resende, Vinícius e Vera, Ademar, Gil, Valdir Pitaler, Zezinho da Rosa, Oswaldo Zampollo e Teresinha, Elpídio e Helena, Patrícia Ignácio, José Lenine, Wilson, Wellington Gither e toda família Gither, pela convivência e influências diretas ou indiretas na minha vida. Ao humorista e amigo João Cláudio Moreno e a todos de boa fé que de alguma forma colaboraram de longe para realização deste trabalho. Ao amigo sincero e conterrâneo Prof. Geraldo Carvalho Martins, um sublime escritor e poeta sensível

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro

RESUMO

O nervo isquiático (nervo espinal) é constituído por fibras mielínicas aferentes somáticas e eferentes somáticas e autonômicas. Distribui-se extensamente aos membros inferiores e é comumente afetado pelas neuropatias, principalmente a diabética. O nervo vestibulo-coclear (VIII nervo craniano) é um nervo aferente puramente sensitivo, constituído por prolongamentos de neurônios bipolares localizados no gânglio espiral (de Corti). Muito tem sido descrito na literatura a respeito das alterações morfológicas e morfométricas nos nervos espinais, tanto em pacientes diabéticos quanto em modelos experimentais da doença. Entretanto, uma comparação entre essas alterações e as eventuais lesões observadas em nervos cranianos ainda não foi realizada. Mais ainda, é amplamente descrito na literatura que pacientes diabéticos apresentam distúrbios da audição. Apesar das alterações histológicas das estruturas da orelha interna de pacientes e em modelos experimentais, uma avaliação histológica do nervo vestibulo-coclear ainda não foi descrita. No presente estudo, foram descritas alterações ultraestruturais na comparação entre um nervo espinal e um craniano, em ratos com diabetes crônico induzido experimentalmente. Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* (n=12), mantidos com dieta padrão do biotério, ao longo do experimento. Animais com 42 dias de idade (n=6), em jejum por 24 horas, foram injetados 60 mg/kg de STZ em dose única, via i.p. Animais controles (n=6) receberam igual volume da solução tampão citrato, pH de 4.5. Após 10 semanas da inoculação da droga os animais adultos foram perfundidos sistemicamente com solução Karnowsky. Em seguida, os nervos isquiáticos e vestibulo-cocleares de ambos os lados foram retirados, processados com técnicas histológicas de rotina para inclusão em resina epóxi e observados ao microscópio eletrônico de transmissão. Nossos resultados mostraram a presença de fibras mielínicas grandes com sinais de atrofia e degeneração axonal tanto no nervo isquiático quanto no nervo vestibulo-coclear. Algumas fibras mielínicas de pequeno diâmetro dos nervos isquiáticos mostraram sinais de degeneração da bainha de mielina, caracterizando, para esse nervo, uma neuropatia tipo mista. Em ambos os nervos, células de Schwann com citoplasma edemaciado estavam presentes. Nossos achados sugerem que o diabetes crônico induzido pela STZ em ratos, provocou alterações das fibras mielínicas e das células de Schwann, compatíveis com os sinais e sintomas clássicos da neuropatia diabética. As alterações observadas no nervo espinal são comparáveis às observadas no nervo craniano. Alterações morfológicas ultraestruturais do nervo vestibulo-coclear no diabetes experimental em ratos estão sendo descritas pela primeira vez na literatura e podem corroborar para o melhor entendimento das alterações da audição encontradas em pacientes diabéticos.

Palavras Chave: Neuropatia diabética; Morfologia de nervos periféricos; Nervo craniano e espinal; Nervo vestibulo-coclear; Nervo isquiático; Ratos.

ABSTRACT

The sciatic nerve (spinal nerve) is composed of somatic afferent fibers as well as somatic and autonomic efferent ones. It is widely distributed to the lower limbs and is commonly affected in neuropathies, especially the diabetic neuropathy. The vestibulocochlear nerve (VIII cranial nerve) is a special sensory afferent nerve, consisting of fibers from bipolar neurons located at the spiral ganglion (Corti ganglion). Abundant information in the literature is available about morphological and morphometric alterations in spinal nerves not only in diabetic patients but also in experimental models of the disease. Nevertheless, a comparison between these alterations and the possible lesions in cranial nerves in diabetes has not been assessed. Also, it is widely described in the literature that diabetic patients present hearing impairment. Despite the histological alterations of the internal hear structures in these patients as in experimental models of diabetes, to the best of our knowledge, an histological evaluation of the vestibulocochlear nerve has not been performed. In the present study, ultrastructural alterations were described and compared between a spinal nerve and a cranial nerve in rats with chronic induced diabetes. Male *Wistar* rats (n = 12), fed with standard diet from the animal care facility at 42 days of age were used. Induced diabetic animals (n=6) were fasted for 24 hours and injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ – 60 mg/kg) in a single dose. Control animals (n=6) received vehicle without STZ. Ten weeks after STZ injection the animals were perfused intracardially with Karnowsky solution. Sciatic and vestibulocochlear nerves were dissected bilaterally and histologically processed for epoxy resin embedding. Samples were observed by transmission electron microscopy. Our results showed large myelinated fibers with morphological signs of axonal atrophy in both sciatic and vestibulocochlear nerves. Some small myelinated fibers in the sciatic nerves showed signs of myelin sheath degeneration demonstrating the variable nature of the disease. In both sciatic and vestibulocochlear nerves, swollen Schwann cells were present. Our observations suggest that chronic STZ-induced diabetes in rats caused alterations in the myelinated fibers and Schwann cells, compatible to the classic diabetes signs and symptoms. Also, alterations observed in the peripheral spinal nerve were comparable to those present in the cranial nerve. Morphological alterations of the vestibulocochlear nerve in diabetes is was described for the first time and such information corroborate to a better understanding of changes in hearing observed in diabetic patients.

Key words: Diabetic neuropathy; Morphology of peripheral nerves; Cranial and spinal nerve; Vestibulocochlear nerve; Sciatic nerve; Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. ax - axônio
2. CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
3. DBR – Dieta Básica Regional
4. EMS – Electron Microscopy Sciences - Hatfield, PA/USA
5. i.p. – Via intraperitoneal
6. Índice G – relação entre o diâmetro mínimo do axônio e a fibra mielínica
7. LAFINNT – Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
8. M – Molar
9. MET – Microscopia eletrônica de transmissão
10. ML – Microscopia de luz
11. SNP – Sistema nervoso periférico
12. STZ – Estreptozotocina
13. UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Diabetes experimental e o sistema nervoso periférico	15
1.2. O nervo vestibulo-coclear no diabetes	15
1.3. O nervo isquiático no diabetes	16
1.4. Apresentação da tese.....	17
 OBJETIVOS	 19
JUSTIFICATIVA.	20
HIPÓTESE	21
 2. REVISÃO DA LITERATURA.....	 22
2.1. Artigo de revisão.....	23
2.2. Artigo original	33
 3. METODOLOGIA.....	 41
3.1.– Animais.....	42
3.2. Grupos.....	42
3.3. Diabetes <i>mellitus</i> experimental.....	42
3.4. Protocolo cirúrgico e histológico.....	42
3.5. Artigo de revisão metodológico original	45
 4. RESULTADOS	 53
4.1. Análise descritivas e morfológicas	54
4.2. Artigo original de revisão internacional	56
4.3. Artigo original internacional.....	90
 5. CONCLUSÕES.....	 104
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE.....	110
ANEXOS	119

“Crê no direito como o melhor instrumento para o humano convívio;
Crê na justiça como o objetivo normal do direito;
Crê na paz como o substitutivo piedoso da justiça;
Acima de tudo, crê na liberdade,
Sem a qual não há direito, nem justiça, nem paz.”

*“Believe in the law as the best instrument for human living;
Believe in justice as the objective standard of law;
Believe in peace as the godly substitute of justice;
Above all, believe in freedom,
Without which there is no law, no justice, no peace.”*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Setor de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/Brasil and The Central Microscopy Research Facility - The University of Iowa, Iowa City/USA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes experimental e o sistema nervoso periférico

O *diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica complexa com repercussões graves, que pode acometer qualquer parte do organismo, particularmente os sistemas nervoso, renal, cardio-circulatório e olhos (Kennedy e Zochodne, 2002; Fazan et al., 2009). O mecanismo fisiopatogênico da neuropatia periférica diabética ainda não está completamente estabelecido, porém a hiperglicemia, fenômenos isquêmicos, estresse oxidativo, bem como apoptose das células de Schwann, todos participam, de uma forma ou de outra, no processo de dano neuronal. Experimentalmente, neuropatia diabética aguda ou crônica pode ser reproduzida em laboratório, como no DM induzido por drogas, para citar o exemplo do uso da estreptozotocina (STZ) (Wang et al., 2005). São várias as alterações axonais e celulares observadas em nervos periféricos no diabetes experimental (Eckersley et al., 2001). O *diabetes mellitus* é um problema de saúde pública global, cuja prevalência é de 3-8%. Por outro lado, alguns estimam que 275 milhões de pessoas em todo mundo apresentam perda auditiva significativa, e em um substancial número destes indivíduos associada ao DM [<http://www.who.int/pbd/deafness/en/>] (Kesser e Lalwani, 2009). Assim, alterações funcionais são encontradas no sistema vestibulo-coclear em pacientes diabéticos, não só por acometer o sistema nervoso periférico, como também tecidos não neurais.

1.2. O nervo vestibulo-coclear no diabetes

Os médicos gregos no quinto século antes de Cristo foram os primeiros a terem contato e especulações sobre a membrana timpânica e a orelha média, considerando esses locais como responsáveis pela nossa audição, porém entre 131 a 201 depois de Cristo, Galeno descreveu o nervo auditivo, sugerindo sua origem na orelha média. De 1500 até os dias atuais foram feitas várias descobertas, e muito tem sido obtido com os avanços das técnicas de microscopia, desde 1851 pioneiramente por Alfonso Corti, seguido por Retzius, em 1892, que descreveu as células auditivas e suas inervações com as fibras do nervo auditivo. A orelha humana, em particular a cóclea e o nervo vestibulo-coclear, é um aparato muito sofisticado e uma obra-prima da natureza (Merchant e Rosowski, 2003).

Também chamado de nervo acústico ou auditivo, o VIII par craniano, um nervo puramente sensorial (e.g. aferente especial), é constituído por duas porções periféricas: (a) uma vestibular, relacionada ao equilíbrio, e (b) outra relaciona a transdução das ondas sonoras

oriundas do meio ambiente, que serão levadas ao sistema nervoso central para nosso entendimento e consciência (Vasconcelos, 2005; Kandler et al., 2009).

Pacientes com *diabetes mellitus* geralmente apresentam sintomas como tontura, zumbidos e hipoacusia. A hipoacusia é principalmente do tipo neurossensorial, que pode ser confundida ou ocorrer em paralelo com perda auditiva associada com avanço da idade (presbiacusia após os 40 anos de idade). A angiopatia e as neuropatias em decorrência do diabetes são devidas a vários fatores, entre eles destacamos a hiperglicemia, o estresse oxidativo e a falta de nutrientes (Friedman et al., 1975; Maia e Campos, 2005; Aladag et al., 2009). Anormalidades nas vias aferentes e eferentes auditivas em pacientes diabéticos são evidenciadas pela técnica não invasiva dos potenciais evocados auditivos do tronco cerebral, bastante utilizada em humanos e em modelos animais (Comi, 1997; Vasconcelos et al., 2008; Pessin et al., 2008).

Microangiopatias associada ao diabetes tipo I afeta a vasculatura da orelha interna e causa degeneração das estruturas, resultando em perda auditiva (Fukushima et al., 2005). No diabetes tipo II também ocorre microangiopatia coclear, degeneração da estria vascular e perda de células auditivas externas (Fukushima et al., 2006).

Achados histológicos em microscopia eletrônica demonstraram que ocorrem anormalidades na bainha de mielina da porção vestibular do VIII nervo craniano em ratos cronicamente diabéticos (Myers, 1998).

A neuropatia auditiva é uma desordem na audição na qual os potenciais evocados auditivos estão ausentes ou substancialmente anormais. Ratos diabéticos induzidos por STZ servem como modelo do DM do tipo I, porém, o modelo animal para o estudo do DM do tipo II ainda não foi plenamente desenvolvido (Hong e Kang, 2008).

1.3. O nervo isquiático no diabete

Foram encontradas alterações no calibre axonal proximal e distal, no número de neurofilamentos e microtúbulos em nervos isquiáticos de ratos diabéticos induzidos pela STZ (65 mg/kg, i.p.), resultando num baixo transporte axonal desse nervo, prejudicando sua função (Medori et al., 1988). A associação entre hiperglicemia e as alterações na permeabilidade da barreira hemato-neuronal no nervo isquiático de ratos são observadas após 7 dias do diabetes experimental, induzido por STZ, evidenciando as primeiras alterações perivasculares, como no exemplo da presença de mastócitos vistos na microscopia eletrônica

(Kalichman et al., 1995). O DM induzido pelo tratamento com STZ acomete o nervo isquiático como outros nervos periféricos (Sugimura et al., 1980; Kale et al., 2003; Jeronimo et al. 2005; Rodrigues Filho e Fazan, 2006; Fazan et al., 2009; Serafin et al., 2010).

O nervo isquiático (um nervo espinal) é constituído por fibras mielínicas aferentes somáticas e eferentes somáticas, bem como por fibras autonômicas. Distribui-se extensamente aos membros inferiores e é comumente afetado pelas neuropatias, principalmente a diabética. O nervo vestibulo-coclear (VIII nervo craniano) é um nervo aferente puramente sensorial, constituído por prolongamentos de neurônios bipolares localizados no gânglio espiral (de Corti).

Muito tem sido descrito na literatura a respeito das alterações morfológicas e morfométricas nos nervos espinais, tanto em pacientes diabéticos quanto em modelos experimentais da doença. Entretanto, uma comparação entre essas alterações e as eventuais lesões observadas em nervos cranianos ainda não foi realizada. Mais ainda, é amplamente descrito na literatura que pacientes diabéticos apresentam distúrbios de audição. Apesar das alterações histológicas das estruturas da orelha interna de pacientes e em modelos experimentais, uma avaliação histológica do nervo vestibulococlear ainda não foi descrita. No presente estudo, foram descritas alterações ultraestruturais na comparação entre um nervo espinal (i.e. nervo isquiático) e um craniano (i.e. nervo vestibulo-coclear), em ratos com diabetes crônico induzido experimentalmente.

1.4. Apresentação da tese

O tema da tese foi proposto porque a neuropatia diabética periférica é a principal causa de complicações em pacientes diabéticos, afetando vários nervos periféricos, dentre eles, o nervo isquiático (o maior nervo do corpo humano) e o nervo vestibulo-coclear.

Conforme as normas e orientações do Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento/UFPE, a tese será apresentada na forma de coletânea de artigos.

No primeiro artigo, intitulado “Neuropatia diabética, desnutrição e sistema nervoso”, publicado na Revista Neurobiologia v. 72, p. 129-136, 2009, uma revisão sobre neuropatia diabética e a influencia nutricional na regeneração do nervo periférico foi realizada.

No segundo artigo original, intitulado “Efeitos das variações de polaridades nos potenciais evocados auditivos de ratos durante o desenvolvimento”, publicado na Revista

Neurobiologia v. 71 (3), p. 67-73, 2008, abordamos uma avaliação das vias auditivas de ratos jovens saudáveis em diferentes idades pela técnica não-invasiva dos potenciais evocados do tronco cerebral, ferramenta neurofisiológica chave para o estudo do sistema nervoso auditivo periférico e central em animais e humanos.

No terceiro artigo, intitulado “Protocolo histológico de preparação de nervos para microscopia eletrônica de transmissão”, publicado na Revista Neurobiologia v. 72, p. 175-181, 2009, abordamos os aspectos metodológicos utilizados na preparação do nervo periférico para a microscopia, em especial a eletrônica de transmissão para observarmos pequenas alterações não vistas em pequenos aumentos como na utilização da microscopia de luz. Esse artigo possui alguns resultados originais demonstrados nas eletromicrografias.

No quarto artigo, intitulado “Diabetic peripheral neuropathies: a morphometric overview”, aceito para publicação no International Journal of Morphology, v. 27 (4), 2009, *in press*, realizamos uma revisão original e atualizada sobre neuropatia diabética periférica e seus efeitos em nervos, contendo resultados originais da pesquisa em estudo.

O quinto artigo original, intitulado “Light and Transmission Electron Microscopy Studies of the Vestibulocochlear Nerve in Chronic Diabetic Rats”, submetido ao Neuroscience Letters, aborda a ultraestrutura normal e patológica do nervo vestibulo-coclear frente ao diabetes experimental crônico induzido pela STZ.

OBJETIVOS

GERAL: Verificar as alterações ultraestruturais dos nervos vestibulo-coclear e isquiáticos de ratos adultos controles e diabéticos crônicos, bem como aspectos descritivos numa comparação entre ambos os nervos, no referente:

ESPECÍFICOS: Alterações ultraestruturais em decorrência da associação crônica do diabetes em um nervo espinal e outro craniano, comparando-os:

À morfologia das fibras mielínicas e amielínicas; À topografia axonal e mielínica.

À morfologia dos vasos sangüíneos e as possíveis alterações encontradas dentro da área do VIII nervo craniano e do nervo isquiático, bem como alterações morfológicas das células de Schwann e organelas dos espaços intraxonais e endoneurais.

JUSTIFICATIVA

Muito tem sido descrito na literatura a respeito das alterações morfológicas e morfométricas nos nervos espinais, tanto em pacientes diabéticos quanto em modelos experimentais da doença. Entretanto, uma comparação entre essas alterações e as eventuais lesões observadas em nervos cranianos ainda não foi realizada. Mais ainda, é amplamente descrito na literatura que pacientes diabéticos apresentam distúrbios de audição. Apesar das alterações histológicas das estruturas da orelha interna de pacientes e em modelos experimentais, uma avaliação histológica do nervo vestibulo-coclear ainda não foi descrita. Ratos foram submetidos ao diabetes experimental induzido pela STZ cronicamente, comparando um nervo espinal e outro craniano. Essa poderia ser uma causa de agressões, degenerações, atrofia, desmielinizações variáveis, polineurites e polineuropatias do sistema nervoso periférico afetando as funções neurofisiológicas desses nervos.

HIPÓTESE

Alterações morfológicas são encontradas nos nervos vestibulo-coclear e isquiático no modelo experimental do *diabetes mellitus* crônico do tipo I com o tratamento pela STZ no rato.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – ARTIGO DE REVISÃO

Neuropatia Diabética, Desnutrição e Sistema Nervoso

Diabetic Neuropathy, Malnutrition and Nervous System

Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos^{1‡*}, Valéria Paula Sassoli Fazan^{2†}, Marcelo Moraes Valença¹

RESUMO

O diabetes é um problema de saúde pública atual, diversos órgãos e tecidos são acometidos por essa síndrome silenciosa que afeta milhões de pessoas todos os anos. Na sua abrangência patológica, ela acomete também os nervos periféricos, causando vários danos morfo-funcionais. Mais recentemente, ficou evidente a associação entre diabetes e problemas nutricionais, sendo comum a associação entre ambos.

PALAVRAS-CHAVE: Neuropatia periférica, diabetes, desnutrição, sistema nervoso.

ABSTRACT

The diabetes is a current public health problem, several organs and tissues are attacked by this silent syndrome that affects millions of people every year. As part of its pathological characteristics, it attacks the peripheral nerves, causing a variety of morphological injuries associated with neurological symptoms. The association of diabetes and nutritional problems has increased in the recent years and both conditions are usually associated in diabetic patients.

KEY WORDS: Peripheral neuropathy, diabetes, malnutrition, nervous system.

¹Departamento de Neuropsiquiatria, Divisão de Neurologia e Neurocirurgia. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brasil.

[‡]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, Setor de Microscopia Eletrônica. *E-mail: cacv@ufpe.br

²Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3.900, 14.049-900, Ribeirão Preto SP, Brasil.

[†]Central Microscopy Research Facility, The University of Iowa, 85 Eckstein Medical Research Building, Iowa City, IA, 52241, USA.

1.1 - O Nervo periférico

Os nervos periféricos são constituídos por prolongamentos das células nervosas, e por tecidos especiais de sustentação. A unidade funcional do nervo periférico é a fibra nervosa, que é constituída por um prolongamento do corpo celular (axônio ou dendrito), envoltos pelas células de Schwann, recobertos ou não pela bainha de mielina (Varejão, 2003; Sherman; Brophy, 2005).

O nervo isquiático (*Nervus ischiadicus*) é um nervo misto formado por fibras aferentes somáticas, eferentes motoras e autonômicas. É o maior nervo do corpo humano, innervando a musculatura e a pele da perna. No homem ele emerge da margem inferior do glúteo máximo, abaixo da fáscia profunda, passando profundamente à cabeça longa do biceps femoral, tomando o trajeto descendente, dividindo-se nos seus dois ramos principais: os nervos tibial e fibular (Matejczik; Benetfin; Hulin I Jr, 2001).

O coto proximal de um nervo seccionado sofre um processo retrógrado de redução no diâmetro das fibras e suas bainhas de mielina, que pode estender-se proximalmente por alguns milímetros, dependendo da gravidade da lesão. Após a secção, o segmento da fibra nervosa distal à lesão separa-se do restante do neurônio interrompendo o fluxo axoplasmático e, como consequência, há a fragmentação das fibras nervosas. As células de Schwann proliferam-se e assumem o papel de macrófagos e fagocitam os restos do material degenerado. Esse processo é chamado de degeneração Walleriana. As células de Schwann proliferam também em direção ao local da lesão, na tentativa de unirem-se com as células provenientes do coto proximal, para restabelecer a continuidade da fibra. O processo de regeneração axonal

também é bastante complexo e envolve o crescimento do axônio de acordo com sinais provenientes do corpo celular e do local da lesão (Kang; Tian; Thompson, 2003; Varejão, 2003; Sherman; Brophy, 2005).

Outros mecanismos de lesão, que não a secção completa do nervo, afetam o SNP, sendo os fatores mecânicos, metabólicos e infecciosos os principais. Entre os fatores mecânicos, a compressão ou lesão por esmagamento e a distensão são os mais comuns. Entre os fatores metabólicos, diabetes, desnutrição e hipóxia podem ser citados.

O nervo isquiático é um bom modelo para estudos de neuropatias periféricas e degeneração/regeneração, porque é o maior nervo do corpo em mamíferos, sendo freqüentemente acometido por diversas lesões traumáticas.

1.2 – Diabetes mellitus: um breve histórico e conceitos

O *diabetes mellitus* já era conhecida antes da era cristã. No papiro de Ebers descoberto no Egito, correspondente ao século XV a.C., já se descrevem sintomas que parecem corresponder à diabetes. Foi Areteu da Capadócia quem, no século II da era cristã, deu a esta afecção o nome de diabetes, que em grego significa sifão, referindo-se ao seu sintoma mais chamativo que é a eliminação exagerada de água pelo rim, expressando que a água entrava e saía do organismo do diabético sem fixar-se nele (Wikipédia, 2005).

No século II, Galeno de Pérgamo (*Claudius Galenus*, 129–201, da era cristã) também se referiu à diabetes. Nos séculos posteriores não se encontram nos escritos médicos referências a esta enfermidade até que, no século XI, Avicena (*Abu Ali al-Husayn Abdallah ibn Sina*, 980-1037, da era cristã) fala com clara precisão desta afecção em seu famoso Cânon da Medicina (*Al-Quānun fi Ft-Tibb*). Após um

longo intervalo, foi Thomas Willis (1621-1675) quem, por volta de 1650, fez descrições magistrais sobre a diabetes, ficando desde então reconhecida por sua sintomatologia como entidade clínica. Foi ele quem, referindo-se ao sabor doce da urina, lhe deu o nome de diabetes mellitus (sabor de mel), já que os médicos gregos também tinham observado uma forte atração das formigas pela urina de seus pacientes diabéticos (Messina; Messina; Setchell, 2002). Em 1776, Dopson de Liverpool identificou a presença de glicose na urina. A primeira observação feita por necropsia em um diabético foi realizada por Cawley e publicada no *London Medical Journal* em 1788. Em 1796 o inglês John Rollo conseguiu melhorias notáveis com um regime rico em proteínas e gorduras e limitado em hidratos de carbono. Os primeiros trabalhos experimentais relacionados com o metabolismo dos glicídios foram realizados pelo fisiologista francês Claude Bernard (1813-1878), o qual descreveu, em 1848, a função do glicogênio hepático e provocou a excreção de glicose na urina excitando os centros bulbares. Na metade do século XIX, o grande clínico francês Apollinaire Bouchardat (1806-1886) assinalou a importância da obesidade e da vida sedentária na origem da diabetes e traçou as normas para o tratamento dietético, baseando-a na restrição dos glicídios e no baixo valor calórico da dieta. Os trabalhos clínicos e anatômico-patológicos adquiriram grande importância em fins do século XIX, tendo culminado em experiências de pancreatectomia em cães, realizadas por Mering e Mikowski em 1889. A busca do suposto hormônio produzido pelas ilhotas de Langerhans, células do pâncreas descritas em 1869 por Paul Langerhans (1847-1888), iniciou-se de imediato, o qual foi conseguido pelos jovens canadenses Frederick Banting e Charles Best, que conseguiram, em 1921, isolar a insulina e demonstrar seu

efeito hipoglicêmico. Esta descoberta significou uma das maiores conquistas médicas do século XX, porque transformou as expectativas e a vida dos diabéticos e ampliou horizontes no campo experimental e biológico para o estudo da diabetes e do metabolismo dos glicídios (Wikipédia, 2005). Posteriormente, o transplante de pâncreas passou a ser considerado uma alternativa viável à insulina para o tratamento da *diabetes mellitus* do tipo 1. O primeiro transplante de pâncreas com essa finalidade foi realizado em 1966, na universidade de Manitoba/Canadá. Uma linha mais recente de pesquisa médica tem buscado fazer o transplante apenas das ilhotas de Langerhans. O procedimento é simples, tem poucas complicações e exige uma hospitalização de curta duração. O grande problema é a obtenção das células, que são originárias de cadáveres. São necessários em média três doadores para se conseguir um número razoável de células. O primeiro transplante de ilhotas de Langerhans para curar diabetes do tipo 1 ocorreu no Brasil em 2004, feito pela equipe do Dr. F. G. Eliaschewitz do Hospital Albert Einstein em São Paulo (Eliaschewitz et al., 2004).

Diabetes mellitus é um grupo de enfermidades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, um aumento dos níveis de glicose no sangue, resultado de defeitos na secreção de insulina, em sua ação ou ambos. Trata-se de uma complexa síndrome e não uma doença, pois representa uma somatória de vários sinais e sintomas clínicos de várias doenças, na qual coexiste um transtorno global do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Existem múltiplos fatores implicados em sua patogênese. Calcula-se uma prevalência estimada na população adulta ao redor de 9% para o ano de 2025 (WHO, 1999). Um estudo recente mostrou que nativos do Alaska/USA possuem menores chances de desenvolver diabetes em relação aos

nativos americanos, pelo fato de possuírem uma dieta rica em óleos e carne de salmão. O elevado consumo de peixes, seis vezes maior do que os nativos americanos e uma atividade física diária moderada, leva essa população a menores riscos de intolerância a glicose. Porém com a mudança do estilo de vida nas últimas décadas, estes fatores preventivos estão diminuindo com uma elevada ingestão de carboidratos, obesidade e conseqüentemente o aumento na prevalência do diabetes (Naylor et al., 2003). Fica clara a associação entre fatores nutricionais e o risco de desenvolvimento de complicações metabólicas, tais como intolerância à glicose e diabetes.

O pâncreas é um órgão retro-peritoneal que possui duas funções distintas: uma exócrina, produtora de suco pancreático e outra endócrina, constituída por aglomerações (*clusters*) de células especiais chamadas ilhotas de Langerhans, constituídas por células α e β . As células alfa são produtoras de glucagon, hormônio antagônico à insulina, que visa manter a glicemia constante, ou seja, quando a glicemia cai, mais glucagon é secretado visando restabelecer o nível de glicose na circulação. As células β , são produtoras de insulina, hormônio responsável pela regulação da glicemia. Para que as células das diversas partes do corpo humano possam realizar o processo de respiração aeróbica, utilizando glicose como fonte de energia, é necessário que a glicose esteja presente na célula. Portanto, as células possuem receptores de insulina, que quando acionados "abrem" a membrana celular para a entrada da glicose presente na circulação sangüínea. Uma falha na produção de insulina resulta em altos níveis de glicose no sangue, já que a mesma não é devidamente dirigida ao interior das células. O pâncreas também possui células deltas (δ), produtoras de somatostatina, tendo o principal papel de

estender o período de tempo durante o qual os nutrientes da alimentação são assimilados ao sangue. Ao mesmo tempo, a somatostatina, ao deprimir a secreção de insulina e de glucagon, diminui a utilização dos nutrientes absorvidos pelos tecidos, impedindo assim a rápida exaustão do alimento, desta maneira tornando-o disponível por um período maior de tempo (Wikipédia, 2005).

O pâncreas possui também células PP, produtoras de polipeptídeos pancreáticos. A fadiga crônica de todas essas células leva ao aparecimento do diabetes no pâncreas (WHO, 1999). As ilhotas pancreáticas também podem sofrer alterações morfofuncionais decorrentes de vários fatores, dentre os quais, fármacos que produzem radicais livres como a estreptozotocina (STZ) (Walker et al., 1999; Kullin et al., 2000; Biessels et al., 2005). O uso experimental da STZ é amplamente conhecido por induzir e manter o modelo de neuropatia diabética sensorial em ratos (Calcutt, 2004).

Pacientes diabéticos têm maior propensão em desenvolver hipertensão, arteriosclerose, doenças oculares, doenças renais, e devem principalmente estar atento a feridas não cicatrizantes em extremidades do corpo, como os pés, pernas e as mãos, que podem levar à amputação do membro, bem como o aparecimento de várias desordens nutricionais, metabólicas, infecciosas e as mais diversas polineurites e polineuropatias autonômicas e periféricas, sistêmicas ou localizadas, comprometendo todo o organismo (Watkins; Thomas, 1998; WHO, 1999; N`Guyen Thi et al., 2005).

Pelo menos quatro tipos de diabetes mellitus são identificados: a) *Diabetes mellitus* tipo 1; b) *Diabetes mellitus* tipo 2; c) Outros tipos de *Diabetes mellitus* (tipo 3) e d) *Diabetes gestacional*.

O *diabetes mellitus* tipo 1, normalmente se inicia na infância ou adolescência, e se caracteriza por um

déficit de insulina, devido à destruição das células beta do pâncreas por processos auto-imunes ou idiopáticos. Somente cerca de um a cada 20 diabéticos tem diabetes tipo 1, a qual se apresenta mais freqüentemente entre em jovens e crianças. Este tipo de diabetes se conhecia como diabetes mellitus insulino-dependente ou diabetes infantil, termos não usados na nomenclatura atual. Nesses casos, o corpo produz pouca ou nenhuma insulina. Os portadores usualmente devem receber injeções diárias de insulina. A quantidade de injeções diárias é variável em função do tratamento escolhido e também em função da quantidade de insulina produzida pelo pâncreas. A insulina sintética pode ser de ação lenta ou rápida: a de ação lenta é ministrada ao acordar e ao dormir; a de ação rápida é indicada logo após grandes refeições. O controle rigoroso da dieta é vital para o diabético tipo 1, devendo o mesmo evitar carboidratos simples, bem como grandes variações de ingestão calórica. O diabético com dieta descompensada pode ter surtos de hipoglicemia ou hiperglicemia, que se não tratados a tempo podem trazer seqüelas ou até mesmo levar à morte (WHO, 1999).

O Diabetes mellitus tipo 2, possui mecanismo fisiopatológico complexo e não completamente elucidado. Parece haver uma diminuição na resposta à insulina dos receptores de glicose presentes no tecido periférico, levando ao fenômeno de resistência à insulina. As células beta do pâncreas aumentam a produção de insulina e, ao longo dos anos, a resistência à insulina acaba por levar as células beta à exaustão. Desenvolve-se freqüentemente em etapas adultas da vida e é muito freqüente a associação com a obesidade; antigamente denominada diabetes do adulto, diabetes relacionada com a obesidade, diabetes não insulino-dependente, termos não usados atualmente. Outros tipos de diabetes,

também chamados diabete tipo 3, representam menos que 5% de todos os casos diagnosticados. Esses ainda podem ser sub-divididos em: Tipo 3A: defeito genético nas células β ; Tipo 3B: resistência à insulina determinada geneticamente; Tipo 3C: doenças no pâncreas; Tipo 3D: causada por defeitos hormonais; e Tipo 3E: causada por compostos químicos ou fármacos.

O Diabetes gestacional: Ao redor de 2-5% de todas as gestações. Entre 20 e 50% destas mulheres desenvolvem diabetes tipo 2 após o término da gravidez (WHO, 1999).

Antes pensava-se que o fator que predisponha à enfermidade era um consumo alto de carboidratos de rápida absorção. Posteriormente descobriram que não havia possibilidades de se contrair *diabetes mellitus* com o consumo de carboidratos de assimilação lenta. Recentemente descobriu-se que os fatores mais importantes são o excesso de peso e a falta de exercício, principalmente para o diabetes tipo 2. A atividade física melhora a administração das reservas de açúcares do corpo. As reservas de glicogênio aumentam e se distribuem melhor quando o corpo está em forma, já que os lipídios se queimam com mais facilidade, reservando os carboidratos para esforços mais intensos (Wikipédia, 2005).

1.3 – Desnutrição, Sistema Nervoso e Dieta Básica Regional (DBR)

O fator ambiental mais importante para o desenvolvimento morfo-funcional do organismo vivo é uma nutrição equilibrada que satisfaça as necessidades do organismo, influenciando todos os fenômenos que ocorrem nos seres vivos (Morgane et al., 1993).

Em países do terceiro mundo não é raro se encontrar desnutrição em seres humanos, que é usualmente de natureza crônica, ocorrendo geralmente antes do

nascimento e continuando até a vida adulta (Resnick et al., 1979). A desnutrição calórico-protéica é a principal carência nutricional, ocasionando elevados índices de morbi-mortalidade infantil em todo o mundo (FAO/OMS, 1976; Chaves, 1985; Fundo das Nações Unidas Para a Infância, 1995).

Dependendo do grau, a desnutrição pode causar alterações irreversíveis, principalmente se ocorrer no período crítico de desenvolvimento ou de maior vulnerabilidade neural, que no homem vai do terceiro trimestre da gestação até o segundo ano de vida (Dobbing; Smart, 1974; Forbes et al., 1977; Allen, 1995).

Nos primeiros períodos do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), os processos fundamentais de aumento da quantidade (hiperplasia) e tamanho das células (hipertrofia), bem como o revestimento dos axônios com mielina (mielinização) ocorrem em grande velocidade. Como esse período compreende a fase de amamentação, requer uma nutrição adequada da mãe (Morgane et al., 1993).

A desnutrição exerce grandes influências e danos durante o período do crescimento rápido do cérebro, interferindo no começo dos processos de neurogênese, migração celular e diferenciação. Avaliações quantitativas têm mostrado relações distorcidas entre os neurônios e as células da glia, com pobre formação dos circuitos neuronais, com alterações regressivas incluindo morte celular e axonal e redução dendrítica, resultando em padrões modificados da organização do cérebro (Morgane et al., 1993; Morgane; Mokler; Galler, 2002).

Segundo o Dr. M. Winick (1989), o crescimento do cérebro passa por três fases ou períodos: *Emбриogênico* (vai da concepção, até o funcionamento da placenta, aproximadamente com seis

semanas de gestação), *Fetal* (começa com o funcionamento da placenta até o nascimento) e o *Pós-natal* (após o nascimento). Em consequência de uma desnutrição materna, o cérebro da criança pode apresentar tamanho reduzido, e conter um menor número de células, o que explicaria a redução da circunferência craniana ao nascer. A desnutrição entre outras consequências ocasiona diversas alterações morfo-funcionais no SNC e periférico (Winick, 1989; Morgane et al., 1993).

O modelo experimental de desnutrição pela dieta básica regional (DBR) foi descrito com base nas pesquisas relacionadas ao consumo desta dieta multideficiente pela população mais pobre da zona da mata sul do estado de Pernambuco (Teodósio et al., 1990). A DBR contém 8% de proteínas, sendo grande parte de origem vegetal, 0,8% de lipídios e 69% de glicídios. É constituída de FEIJÃO MULATINHO (*Phaseolus vulgaris*), FARINHA DE MANDIOCA (*Manioc esculenta*), BATATA DOCE (*Ipomoea batatas*) e CHARQUE (Carne bovina salgada e prensada). Estes alimentos são cozidos, secados em estufa (60 - 70 C), moídos (exceto a farinha de mandioca), misturados de acordo com proporções encontradas em inquéritos alimentares, peletizados e secados em estufa (60 - 70 C), e é utilizada como modelo experimental de desnutrição humana na experimentação com modelos animais (Vasconcelos et al., 2004).

Embora os efeitos da desnutrição no desenvolvimento do SNC e nos processos patológicos que o envolvem estejam bem explorados (Morgane et al., 1993; Morgane; Mokler; Galler, 2002; Vasconcelos et al., 2004) pouco se sabe sobre o comportamento do SNP normal ou submetidos à lesões experimentais na ausência de suprimento alimentar adequado.

1.4 – Regeneração do nervo periférico

A regeneração é um processo necessário e vitalmente importante para o processo de reparo do nervo danificado, seja no retardo da mielinização ou na regeneração axonal. Augustus Waller (1850) contribuiu decisivamente para o desenvolvimento da neurobiologia celular ao demonstrar que quando um nervo periférico sofre uma lesão grave, as fibras nervosas do segmento distal degeneram, enquanto que as do segmento proximal à lesão sobrevivem. Quando as fibras nervosas são danificadas, seja por esmagamento, secção, isquemia ou no decorrer de um processo inflamatório, de forma a causar interrupção da integridade do axônio, surge um fenômeno degenerativo nas fibras distais à lesão, denominado degeneração Walleriana. Após a lesão axonal também surgem alterações do tipo degenerativo no segmento proximal, com a consequente reação do corpo celular (Varejão, 2003). O primeiro pré-requisito para a regeneração axonal é a sobrevivência do neurônio após a lesão. Esta sobrevivência vai depender de vários fatores, incluindo: O tipo de neurônio, a idade, e a proximidade da lesão com o corpo celular. De uma forma geral, os neurônios motores dos nervos espinais são menos susceptíveis à morte celular que os dos nervos cranianos ou sensitivos; os neurônios de animais adultos são menos susceptíveis do que os neurônios imaturos dos neonatos; quanto mais afastadas do corpo celular ocorrerem as lesões, maior será a probabilidade de sobrevivência do neurônio (Varejão, 2003). Cerca de 3 horas após a lesão, no coto proximal do nervo surgem os cones de crescimento, que não dependem do corpo celular, mas sim do material presente no axônio que estão em trânsito no citoesqueleto. O brotamento dos axônios ocorrem fundamentalmente nos nodos de Ranvier, localizados até uma distância de 6 mm proximal a lesão, denominada de “zona

germinativa” por Cajal em 1928. É importante salientar que o material fornecido pelo corpo celular via transporte axonal é vital para o alongamento axonal, já que os axônios em regeneração são incapazes de sintetizar a quantidade de proteína necessária para o novo citoesqueleto em formação (Varejão, 2003). A remielinização dos axônios em regeneração é iniciada com o contato entre o axolema e as células de Schwann das bandas de Büngner, e a sua extensão de remielinização é determinada pelas dimensões do axônio. Fatores de crescimento, neurotróficos e moleculares estão envolvidos no processo (Varejão, 2003).

1.5 - Perspectivas

Tendo em vista a associação clínica evidente entre *diabetes mellitus* e problemas nutricionais, há uma necessidade de se explorar as alterações do SNC e SNP em modelos experimentais que possa reproduzir essas associações, na busca de um melhor entendimento da fisiopatologia das lesões que afetam os pacientes portadores dessas doenças. Alteração dos nervos sensitivos e/ou motores no modelo de desnutrição pela DRB não estão completamente exploradas pela literatura. A associação desse modelo experimental com o diabetes induzido pela SZT poderá auxiliar na elucidação dos mecanismos de interação entre a deficiência nutricional e as possíveis agressões inflamatórias, localizadas ou difusas no SNP, causadas pelo diabetes experimental em nervos de ratos. Para tanto, a utilização de técnicas modernas de morfometria e a análise ultraestrutural do SNP serão ferramentas básicas na realização de tais investigações. Além disso, análise funcional deve ser realizada e, com o conjunto dos dados obtidos, futuras investigações com técnicas de regeneração nervosa poderão ser melhor interpretadas.

2 – Referências Bibliográficas

1. Allen LH. Malnutrition and human function: A comparison of conclusions from the INCAP and nutrition CRSP studies. *J Nutr* 1995, 125:1119-1126.
2. Biessels GJ, ter Laak MP, Kamal A, Gispen WH. Effects of the Ca²⁺ antagonist nimodipine on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res* 2005, 21,1035:86-93.
3. Bittar RSM, Sanchez TG, Santoro PP, Medeiros IRT. O metabolismo do ouvido interno. *Arq Otorrinolaringol* 1998, 2:39-44.
4. Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Methods Mol Med* 2004, 99:55-65.
5. Chaves N. Nutrição Básica e Aplicada. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro/RJ, 2ª edição, 1985.
6. Dobbing JB, Smart JL. Vulnerability of developing brain and behavior. *Brit Med Bull* 1974, 30:164-168.
7. Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojudice FH, Labriola L, et al. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc* 2004, 36:1117-8.
8. FAO/OMS. Organización Panamericana de la salud - Terminología sobre alimentos y nutrición; definición de términos y expresiones de uso corriente. Washington, 12-16, 1976.
9. Forbes WB, Stern WC, Tracy CS, Resnick O, Morgane PJ. Effects of chronic malnutrition on experimentally induced seizures in rats. *Exp Neurol* 1978, 62:475-481.
10. Fundo das Nações Unidas Para a Infância - Situação mundial da infância. Brasília, UNICEF, 1995.
11. Kang H, Tian, L, Thompson, W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol* 2003, 32:975-985.
12. Kennedy JM, Zochodne, DW. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 2000, 123:2118-2129.
13. Kullin M, Li Z, Hansen JB, Björk E, Sandler S, Karlsson FA. K(ATP) channel openers protect rat islets against the toxic effect of streptozotocin. *Diabetes* 2000, 49:1131-6.
14. Matejcik, V, Benetin, J, Hulin, I Jr. Our experience with surgical treatment of ischial nerve injuries. *Bratisl Lek Listy* 2001, 102: 462-6.
15. Messina M, Messina V, Setchell K. Soja e Diabetes. In: Documentos 176/Embrapa Soja, Londrina/PR, 2002.
16. Miric D, Bumbasirevic M, Radulovic N, Lesic A. External fixation of war injuries of the proximal femur. *Acta Chir Iugosl* 2005, 52:101-105.
17. Morgane PJ, Austin-Lafrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, et al.. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993, 17:91-128.
18. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002, 26:471-483.
19. Naylor JL, Schraer CD, Mayer AM, Lanier AP, Treat CA, Murphy NJ. Diabetes among Alaska natives: A review. *Int J Circumpolar Health* 2003, 62:4,363-387.
20. N`Guyen Thi N, Pariest J, Attali JR, Valensi P. High prevalence and severity of cardiac autonomic neuropathy in Vietnamese diabetic

- patients. *Diabet Med* 2005, 22:1072-1078.
21. Nichols CM, Myckatyn, TM, Rickman, SR, Fox IK, Hadlock, T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: A comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Biobehav Brain Res* 2005, 163:143-158.
 22. Resnick O, Miller M, Forbes W, Hall R, Kemper T, Bronzino J, et al. Developmental protein malnutrition; influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1979, 3:233-246.
 23. Sherman, D, Brophy, PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005, 6:683-90.
 24. Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RAC. "A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition". *Arch Latioam Nutr* 1990, 40:533-547.
 25. Varejão ASP. Regeneração do nervo periférico: recuperação funcional num modelo experi-mental. Tese de Doutorado. Área: Neurociências da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2003.
 26. Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res* 2004, 26:186-194.
 27. Vasconcelos CAC, Barreira AA. Síndrome de Landry-Guillain-Barré-Strohl, neurite alérgica experimental e o comprometimento do VIII par de nervo craniano. *Neurobiologia* 2003, 66:37-42.
 28. Vasconcelos CAC, Oliveira JAF, Oliveira LA, Guedes RCA. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. *Nutr Neurosci* 2004, 7:163-170.
 29. Vasconcelos CAC. Aspectos descritivos e quantitativos da anatomia macroscópica e microscópica do nervo vestibulo-coclear de cobaias. Dissertação de Mestrado. Área de concentração: Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2005.
 30. Walker D, Carrington A, Cannan SA, Sawicki D, Sredy J, Boulton AJM, et al. Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozotocin diabetic rat. *J Anat* 1999, 195:419-427.
 31. Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London [Biol Sci]* 1850, 140:423-429.
 32. Watkins PK, Thomas PK. Diabetes mellitus and the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998, 65:620-632.
 33. Wikipedia. http://pt.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus. Acessado em: 21 de outubro de 2005.
 34. Winick M. - Early nutrition and brain development. In: Lebenthal E. - Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy. 2ª ed. New York. Reven Press, Ltda. 1989.
 35. World Health Organization/WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Geneva, Part 1:1-59, 1999.

2.2 – ARTIGO ORIGINAL

Efeitos das variações de polaridades nos potenciais evocados auditivos de ratos durante o desenvolvimento

Effects of stimulus polarity on the auditory evoked potentials of the rats during development

Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos¹, Luiz Marcellino de Oliveira^{2*}, Renata Alessandra Evangelista³, José Fernando Colafêmima^{4*}

RESUMO

Foram estudados os efeitos dos estímulos de polaridades (condensação (+), rarefação (-) e alternados) nos potenciais evocados auditivos (BERA) de ratos durante o período de lactação e pós-lactação com o objetivo de detectar possíveis alterações eletrofisiológicas durante o período crítico de desenvolvimento do sistema auditivo do rato. Os dados observados mostram que há um aumento das latências das ondas em decorrência da faixa etária em todos os grupos, sugerindo um desenvolvimento progressivo da cito-arquitetura tonotópica normal das vias e integrações sinápticas auditivas centrais e periféricas. Conclui-se que as respostas de curtas latências produzidas pelos "clicks" positivos, negativos e alternados em todos os grupos utilizados não produziram diferenças significativas sobre o BERA de ratos em crescimento e desenvolvimento normal.

PALAVRAS-CHAVE: Potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (BERA); Polaridade; Sistema auditivo, Lactação e Pós-lactação; Idade; Ratos.

¹Presente endereço: Departamento de Neuropsiquiatria. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE. Setor de Microscopia Eletrônica.

²Departamento de Psicologia e Educação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Laboratório de Nutrição e Comportamento.

³Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP.

⁴*Professor Cirurgião do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Hospital das Clínicas - 12º andar - Av. dos Bandeirantes, 3.900, Monte Alegre - 14.049-901 - Ribeirão Preto/SP. *Autor Correspondente.

† Este artigo é dedicado a memória do Professor Doutor Luiz Marcellino de Oliveira, acima de tudo um grande amigo que nos deixou repentinamente em 8 de maio deste ano.

ABSTRACT

The effects of stimulus polarity (condensation, rarefaction, or alternating polarity clicks) on the brainstem auditory evoked potentials (BAEPs) in the period of lactation and post-lactation were studied with objective of detect possible electrophysiological changes during of the critical period of development of the auditory system of young rats. The results showed an increase in latency of waves due to age in all groups, suggesting a progressive development of normal tonotopic architecture of the central and peripheral auditory nervous system. Concluded that the responses of short latencies produced by positive, negative and alternating "clicks" in all groups used do not produce significant differences on the BAEPs of the rats with normal growth and development.

KEYWORDS: Brainstem Auditory Evoked Potentials (BAEPs); Polarity; Auditory system; Lactation and Post-lactation; Age; Rats.

INTRODUÇÃO

O sentido da audição é essencial na vida humana. Juntas, a audição e a fala constituem os meios de comunicação mais importantes entre as pessoas, formando a base das interações sociais complexas. Não é de estranhar, pois, que a perda da audição possa produzir sérios distúrbios do comportamento (Schmidt, R.F. 1980).

Os Potenciais Evocados (PEs) são respostas elétricas do sistema nervoso em decorrência de uma estimulação motora ou sensorial, importante na clínica otoneurológica, e pode envolver o sistema visual, auditivo e somato-sensorial. Consistem em seqüências de ondas com padrões específicos de latências, amplitudes e polaridade. Os estudos em ratos dos Potenciais Evocados Auditivos (PEAs), produzidos geralmente estímulos acústicos de curtas latências (10 msec), podem ser úteis para analisar a sincronização neural das vias auditivas centrais e periféricas nos grupos de neurônios do nervo auditivo (onda I), núcleos cocleares (onda II), complexo olivar superior (onda III) e colículo inferior

(onda IV) e suas integrações sinápticas (Shaw, N.A. 1988). Dentre os diagnósticos e avaliações do sistema nervoso em humanos, os potenciais evocados são relevantes e excelentes indicadores na monitorização cirúrgica, no coma, tumores e lesões, desordens tóxicas e metabólicas, acidente vascular cerebral (AVC), infecções, perda e diminuição da audição, enxaqueca, esclerose múltipla entre outros sinais e sintomas clínicos (Chiappa, 1997).

Em 1988, N.A. Shaw em Auckland/NZ, também demonstrou no rato a capacidade de vários fatores alterarem os padrões dos PEAs, entre eles: Os efeitos das drogas, a temperatura, atividades epiléticas, o sono, o etanol, a idade e envelhecimento, os modelos experimentais de doenças otoneurológicas, bem como o papel da mielinização e a influência severa da desnutrição, já que a maturação do SNC do rato é pós-natal ele é considerado um modelo experimental ideal para demonstrar as alterações no formato das ondas e diminuição das latências na resposta auditiva do tronco cerebral como avaliação neurofisiológica do sistema nervoso.

Fatores bem definidos podem modificar os valores das latências, amplitudes e a morfologia, devidos a taxa de estimulação positiva ou negativa, filtros, intensidades e o local de colocação do eletrodo de referência (Shaw, N.A. 1988; Chiappa, 1997).

Variações de fase influenciando os BAEPs são conhecidas desde as pesquisas de Kiang et al., 1965; Goblick; Pfeiffer, 1969, Salomon; Elberling, 1971; Coste, R.L; Pfingst, B.E. 1996, demonstrando que os estímulos de rarefação (negativos) causam picos de ondas precoces modificando a característica da forma da onda, como também foram encontrados valores de latências menores para ondas I (Kevanishvili; Aphonchenko, 1981), bem como para ondas I e V (Ornitz; Walter, 1975). Sand; Sulg (1984) demonstraram que são devidos a picos precoces que aparecem como ondas cortadas após estímulo de condensação. Estímulos de polaridades alternadas são utilizados para evitar problemas com as estimulações e anular os potenciais microfônicos cocleares, evidenciando com maior nitidez a onda I (Tackmann; Vogel, 1987).

Estímulos de polaridade alternadas podem evidenciar um grande número de patologias não observadas nas outras polaridades (Tackmann; Vogel. 1987).

As pesquisas atuais são de grande relevância para a prevenção de danos e melhor compreensão do sistema nervoso central, já que o sistema auditivo está envolvido com funções complexas bem diversificadas, importantes para o ser humano (Chiappa, 1997). Os trabalhos envolvendo os potenciais evocados auditivos do tronco cerebral e de acordo com as referências aqui citadas, investigou-se a avaliação eletrofisiológica dos efeitos das variações de polaridades

de condensação (+), rarefação (-) e alternadas sobre as latências das ondas I, II, III, IV em ratos da linhagem Wistar no período de lactação entre 14 e 18 dias e pós-lactação de 22, 32 e 42 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 100 filhotes de rato da linhagem Wistar - Lactação-Grupo 1 (14 dias de idade-n=20), Grupo 2 (18 dias-n=20) - Pós-lactação-Grupo 3 (22 dias-n=20), Grupo 4 (32 dias-n=20) e Grupo 5 (42 dias-n=20). No dia do nascimento os filhotes foram retirados ao acaso e colocados com uma rata mãe em uma gaiola de lactação, reduzindo assim possíveis interferências genéticas na formação dos grupos experimentais.

Foram utilizadas gaiolas de acrílico (40 x 30 x 20cm), com túnel para adaptação do comedouro de aço inoxidável e água em bebedouro de plástico, piso coberto por serragem e tampa de aço inoxidável.

Foi utilizado um microcomputador da ATI NAUTILUS® e 3 eletrodos em 2 canais para o registro dos PEAs do tronco cerebral, nas estimulações sonora foram utilizados fones ipsi e contralateralmente, do tipo TDH-39. Foram avaliados os potenciais com taxa de estimulação de 10 pps, utilizando-se polaridades positiva (condensação), negativa (rarefação) e alternada.

No período de lactação e pós-lactação todos os animais receberam dieta isocalórica. e água *ad libitum*.

Os animais foram avaliados eletrofisiologicamente pelo BAEPs no período de lactação entre 14 e 18 dias de idade, enquanto na fase de pós-lactação esta avaliação foi realizada em grupos independentes nos dias 22, 32 e 42 de idade. Cada animal foi previamente

anestesiado com injeção intraperitoneal (ip) e/ou sub-cutânea (sc) de pentobarbital (Nembutal), utilizando a dosagem de 30 mg/kg de peso corporal.

Os registros dos PEAs foram realizados numa sala isolada elétrica e acusticamente. Os pêlos da região do vértex do crânio e das orelhas foram raspados e a região limpada para melhor contato dos eletrodos e diminuição da oleosidade.

Os eletrodos para registro dos PEAs foram dispostos na região do vértex do crânio (Cz) positivo, pavilhão auditivo esquerdo (A1) e pavilhão auditivo direito (A2).

As estimulações sonoras foram realizadas com "clicks" de condensação, rarefação e alternados com 0,1 ms de duração, taxa de frequência de 10 pps e com intensidades decrescentes de 80, 70 e 60 dB. Taxa de estimulação de com cerca de 200 promediações. As curvas do PEAs foram captados e analisados pelo sistema computadorizado, que forneceu através de suas promediações os registros das latências e amplitudes das ondas I, II, III e IV. As amplitudes não foram incluídas.

RESULTADOS

No grupo de ratos de 14 dias de idade os dados demonstraram que não houve diferenças significativas nas latências das ondas de I a IV, o mesmo tendo ocorrido no grupo de ratos com 18 dias de idade, bem como no grupo pós-lactação de 22 dias de idade. **Figura 1.**

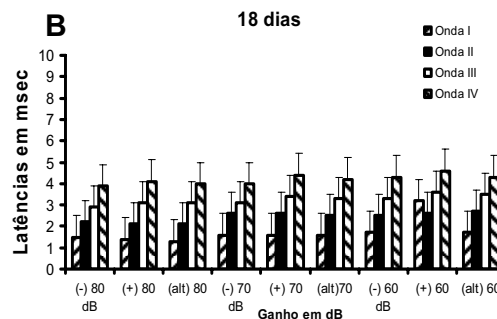
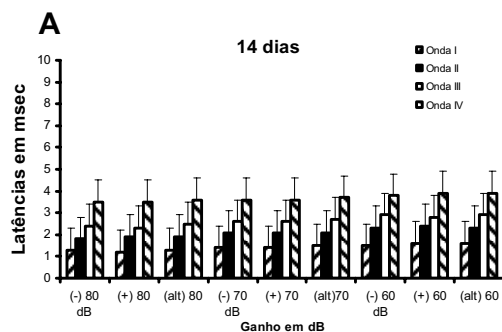
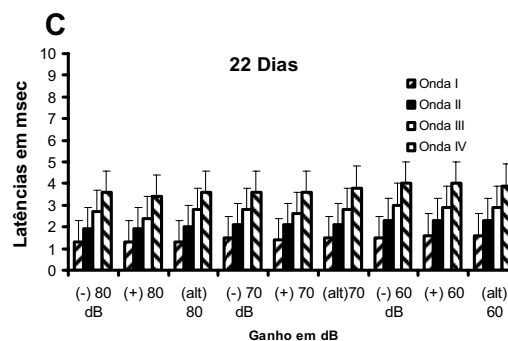


Figura 1. Efeitos dos clicks positivos, negativos e alternados na resposta auditiva do tronco cerebral de ratos durante a lactação com 14 (A) e 18 (B) dias de idade. Os estímulos foram apresentados em ordem decrescente de intensidades de 80, 70 e 60 dB. A promediação dos estímulos acústicos de curtas latências (10 msec) avaliaram a trajetória das ondas I, II, III, IV e suas integrações sinápticas (Média $\pm$ DP – ANOVA, $p \leq 0,001$).

Nos grupos de ratos de 22, 32 e 42 dias a única alteração perceptível não significativa foi o igual aumento das latências com estímulos empregados nas três polaridades em todas as intensidades, entre os grupos, nos estímulos das ondas II e III (respectivamente nos núcleos cocleares e no complexo olivar superior). **Figura 2.** Não foram observadas diferenças significativas das ondas de la IV, quando são comparados os animais de 14 (grupo 1); 18 (grupo 2) e 22 (grupo 3) dias de idade. **Figuras 1 e 2.**



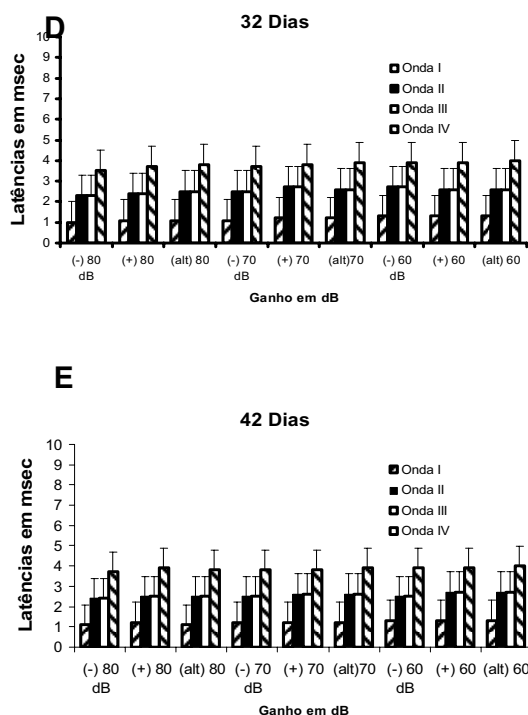


Figura 2. Efeitos dos clicks positivos, negativos e alternados na resposta auditiva do tronco cerebral de ratos durante a pós-lactação com 22 (C), 32 (D) e 42 (E) dias de idade. Os estímulos foram apresentados em ordem decrescente de intensidades de 80, 70 e 60 dB. A promediação dos estímulos acústicos de curtas latências (10 msec) avaliaram a trajetória das ondas I, II, III, IV e suas integrações sinápticas sinápticas (Média $\pm$ DP - ANOVA, $p \leq 0,001$).

Na utilização dos clicks alternados ocorreram o desaparecimento do potencial microfônico e uma melhor nitidez da onda I, bem como um discreto aumento de latência das ondas não significativos nos testes estatísticos.

Os dados também mostram alterações visíveis morfométricas em todas as ondas nas diferentes faixas etárias e com as variações de polaridades em todos os grupos.

Foram comparados os cinco níveis de idade (14, 18, 22, 32 e 42) para todas as

variáveis (80, 70 e 60 dB), em todas as ondas (I, II, III e IV). Foi utilizado o conceito de grupos homogêneos, ou seja, se duas idades distintas não se encontram em nenhum grupo ao mesmo tempo, elas são significativamente diferentes. Os dados também foram analisados pela média $\pm$ sd, e análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças não foram consideradas significantes quando $P \leq 0,001$.

DISCUSSÃO

Foi mostrado com eficácia a capacidade dos clicks positivos, e negativos aumentarem as latências das ondas em pacientes com esclerose múltipla (Tackmann; Vogel, 1987).

Pelo menos nos mamíferos o crescimento em espessura da membrana basilar não parece interferir com a representação tonotópica durante o desenvolvimento. No nascimento os fatores de desenvolvimento podem interferir com a organização tonotópica coclear como um todo (Geal-Dor et al., 1993; Romand, R. 1997), bem como a modificação ontogenética das frequências nos neurônios do núcleo olivar superior com o progresso da maturação (Sanes, 1989; Salas M, et al., 1994). São necessários vários meses para o desenvolvimento dos colículos superiores (Withighthon et al., 1990) e conseqüentemente a formação de mecanismos mais complexos chamados de computação neural (Knudsen et al., 1987).

Os dados mostram que, com o aumento da faixa etária dos ratos em todos os grupos tendem a aumentar os valores das latências das ondas em decorrência da idade (N.A. Shaw, 1988). Em neonatos os potenciais evocados auditivos estabelecem valores de referência na avaliação auditiva e no prognóstico neurológico, bem como no

diagnóstico de crianças com disfunção auditiva (Guilhoto et al., 2003).

A representação de frequências na função coclear e suas subseqüentes mudanças durante a ontogênese são responsáveis pelas modificações da cito-arquitetura do sistema auditivo central (Romand, 1997; Xu, J. 1997).

O desenvolvimento e integração do sistema nervoso central e periférico auditivo do rato neste período de vulnerabilidade neural é de grande importância, porque ele é um animal de hábitos noturnos com capacidade de comunicação ultrassônica desempenhando uma sensibilidade auditiva com um audiograma bem definido para a espécie (N.A. Shaw, 1988). Pode ocorrer um "aperfeiçoamento" da capacidade auditiva com a maturação do sistema nervoso, já que os processos de hiperplasia e hipertrofia e integrações sinápticas são de maiores intensidades no período pós-natal, influenciando assim as alterações nas latências e amplitudes das ondas com o aumento progressivo da faixa etária (Saintonge et al., 1986; Shaw, N.A. 1988; Polli-Lopes et al., 1999). Os mecanismos de desenvolvimento e regeneração das células ciliadas internas são bastante complexos, envolvendo desde íons até expressão gênica (Kros, 2007).

CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que conforme a polaridade (+, - e alternadas) os estímulos do fone podem gerar deflexões na membrana da orelha interna, que induzem a atividades elétricas nos transdutores cocleares, ocasionando respostas diferentes conforme o estímulo empregado. Para as respostas de curtas latências os *clicks* de condensação, rarefação e alternados

nos grupos de animais utilizados produziram discretas diferenças não significativas, nos potenciais evocados auditivos do tronco cerebral. É um procedimento não invasivo e indispensável no auxílio da avaliação otoneurológica, tanto nos modelos animais, bem como no homem. Num futuro não tão distante o manuseio de células tronco na cóclea poderá nos trazer certos benefícios à saúde auditiva.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq pelo apoio financeiro. Vasconcelos, C.A.C. foi bolsista de aperfeiçoamento/CNPq no período de março de 1997 a abril de 1999 do Dr. Luiz Marcellino e expressa aqui o seu imenso pesar, respeito e gratidão por tudo que ele fez. Deixa saudades de familiares, parentes e amigos, porém sua memória viva estará sempre presente.

REFERÊNCIAS

1. Schmidt RF. Fisiologia Sensorial, EPU/Springer, 1980, 219-248, EDUSP, São Paulo.
2. Shaw NA. The auditory evoked potential in the rat - a review. Prog Neurobiol 1988, 31:19-45.
3. Chiappa KH. Evoked Potentials in Clinical Medicine. Lippincott-Raven Publishers 3 ed., 1997, 157-249.
4. Kiang NYS, Watanabe T, Thomas, EC, Clark LF. *Discharge Patterns of Single Fibers in the Cat's Auditory Nerve*. MIT Res., Monogr. N.35, 1965, Cambridge, MA: MIT Technology Press.

5. Goblick TJ Jr, Pfeiffer RR. Time-domain measurements of cochlear nonlinearities using combination click stimuli. *J Acoust Soc Am* 1969, 46:924-38.
6. Salomon G, Elberling C. Cochlear nerve potentials recorded from the ear canal in man. *Acta Otolaryngol* 1971, 71:319-25.
7. Coste RL, Pfingst BE. Stimulus features affecting psychophysical detection thresholds for electrical stimulation of the cochlea. III. Pulse polarity. *J Acoust Soc Am*. 1996, 99:3099-108.
8. Kevanishvili Z, Aphonchenko V. Click polarity inversion effects upon the human brainstem auditory evoked potential. *Scand Audiol* 1981, 10:141-7.
9. Ornitz EM, Walter DO. The effect of sound pressure waveform on human brain stem auditory evoked responses. *Brain Res* 1975, 92:490-8.
10. Sand T, Sulg I. The influence of click phase and rate upon latencies and latency distributions of the normal brainstem auditory evoked potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1984, 57:561-70.
11. Tackmann W, Vogel P. Brainstem auditory evoked potentials evoked by clicks of different polarity in multiple sclerosis patients. *Eur Neurol* 1987, 26:193-8.
12. Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H. Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hearing Res* 1993, 69:236-42.
13. Romand R. Modification of tonotopic representation in the auditory system during development. *Prog Neurobiol* 1997, 51:1-17.
14. Sanes DH, Merickel M, Rubel EW. Evidence for an alteration of the tonotopic map in the gerbil cochlea during development. *J Comp Neurol*. 1989, 279:436-44.
15. Salas M, Torrero C, Regalado M, Martínez-Gómez M, Pacheco P. Dendritic arbor alterations in the medial superior olivary neurons of neonatally underfed rats. *Acta Anat (Basel)* 1994, 151:180-7.
16. Withington-Wray DJ, Binns KE, Keating MJ. The developmental emergence of a map of auditory space in the superior colliculus of the guinea pig. *Brain Res Dev Brain Res* 1990, 51:225-36.
17. Knudsen EI, du Lac S, Esterly SD. Computational maps in the brain. *Annu Rev Neurosci* 1987, 10:41-65.
18. Xu J, Shepherd RK, Millard RE, Clark GM. Chronic electrical stimulation of the auditory nerve at high stimulus rates: a physiological and histopathological study. *Hearing Res* 1997, 105: 1-29.
19. Polli-Lopes AC, Casaletti Rosa L, Beleboni RO, Pereira RNR, Vasconcelos CAC, Moreira JE. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. *Medicina, Ribeirão Preto* 1999, 32:167-188.
20. Saintonge J, Lavoie A, Lachapelle J, Côté R. Brain maturity in regard to the auditory brainstem response in small-for-date neonates. *Brain Dev* 1986, 8:1-5.
21. Guilhoto LM, Quintal VS, da Costa MT. Brainstem auditory evoked response in normal term neonates. *Arq Neuropsiquiatr* 2003, 61:906-8.
22. Kros, CJ. How to build an inner hair cell: Challenges for regeneration. *Hearing Res* 2007, 227: 3-10.

3. METODOLOGIA

3.1 - ANIMAIS

Foram utilizados 12 ratos machos da linhagem Wistar, totalizando em média 48 nervos isquiáticos e vestibulo-cocleares esquerdo e direito. Os animais foram provenientes do biotério do Departamento de Nutrição/UFPE.

3.2 - GRUPOS

Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo **C** – Controle, dieta padrão do biotério (n=6, 24 nervos).

Grupo **D** – Diabético, dieta padrão do biotério (n=6, 24 nervos).

3.3 - DIABETES MELITTUS EXPERIMENTAL

Nos animais com 42 dias de idade, em jejum de 24 horas, foram injetados 60 mg/kg de estreptozotocina (STZ - Sigma[®] - USA) em dose única, via intraperitoneal (Grupo **D**).

Nos animais controles com 42 dias de idade, em jejum de 24 horas, foram injetados 60mg/kg de solução tampão citrato, pH de 4,5, por ser veículo da droga, em dose única, via intraperitoneal (Grupos **C**).

Uma semana após a inoculação da STZ foi feito monitoramento da glicemia sanguínea, e os animais com glicemia acima de 150 mg/dl em jejum prévio de 12 horas foram considerados diabéticos. Da mesma forma os animais controles foram monitorados, sempre apresentavam glicemia abaixo de 90 mg/dl.

Após 78 dias do tratamento com STZ, os animais adultos com 120 dias de idade foram sacrificados para realização da dissecação microcirúrgica para retiradas dos nervos.

3.4 - PROTOCOLO CIRÚRGICO E HISTOLÓGICO

Os animais adultos diabéticos e controles com cerca de 120 dias de idade (n=12) e 78 dias após a inoculação da STZ (n=6), devidamente separados em gaiolas e marcados nas orelhas, foram previamente anestesiados com éter e perfundidos intravascularmente com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4,0% (solução Karnowsky) em tampão cacodilato a

0,1 M. Seus nervos isquiáticos direito e esquerdo, e vestibulo-cocleares direito e esquerdo foram dissecados e retirados através de microcirurgia, num total de 48 nervos esquerdos e direitos. Durante a realização da cirurgia foi utilizada a solução fixadora Karnowsky diretamente nos nervos para melhorar a perfusão, ou seja, “*in situ*”. Logo depois foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato a 0,1 M, o mesmo da solução fixadora. Posteriormente os nervos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato a 0,1 M por 2 horas, por o ósmio ser fotossensível os tubos de Ependorffs foram enrolados em papel alumínio. Em seguida foi realizada novamente 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato a 0,1 M, após a terceira lavagem os nervos foram lavados com água destilada, para não ficar nenhum resíduo de tampão cacodilato, pois este pode juntar-se o acetato de uranila e formar precipitados em cada fragmento. Para contrastação foi utilizado acetato de uranila a 5% por 1 hora em recipiente fechado na capela escura, enrolado em papel alumínio, por também ser fotossensível. Logo após foi contrastado com citrato de chumbo por 5 minutos, posteriormente foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos cada em água destilada. Para desidratação do material foi utilizada acetona nas seguintes proporções: acetona 50% por 20 minutos, acetona a 70% duas trocas de 20 minutos cada ou optar por deixar “*over night*”, ou seja, toda noite, depois acetona a 90% por 20 minutos e finalmente acetona 100% em 3 trocas de 15 minutos cada.

Para a infiltração foi utilizada resina plástica EPON 812[®] - EMS/USA, durante 3 dias, na proporção de:

RESINA	ACETONA
1	3
1	2
1	1
2	1
Pura	-
Emblocar	-

Posteriormente os nervos foram devidamente emblocados nos moldes plásticos, marcados e levados a estufa para polimerização durante 72 horas a 60⁰ Celsius. Os fragmentos foram dispostos nos blocos do sentido proximal para o distal. Os blocos foram aparados para a realização dos cortes em navalha de vidro, onde foram obtidos os cortes seriados semifinos

(0,38 a 5 μm de espessura) através de microtomia e corados com azul de toluidina, colocados em lâminas e lamínulas para observação na microscopia de luz (LEICA[®] AND CARL ZEISS[®] MICROSCOPES, GERMANY). Para realização da ultramicrotomia os cortes foram cerca de 50 a 60 nm de espessura em navalha de diamante e colocados em grades específicas para as avaliações morfológicas descritivas na microscopia eletrônica de transmissão (JEOL[®] – JEM – 100 CXII ELECTRON MICROSCOPE, JAPAN). As medidas dos parâmetros discriminados foram obtidas através de aplicativos específicos para as devidas avaliações.

3.5 – ARTIGO DE REVISÃO METODOLÓGICO ORIGINAL

Protocolo Histológico de Preparação de Nervos para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Histologic Protocol for Preparation of Peripheral Nerves for Transmission Electron Microscopy

Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos^{1‡*}, Valéria Paula Sassoli Fazan^{2†}, Kenneth Charles Moore[‡], Marcelo Moraes Valença¹

RESUMO

A microscopia eletrônica de transmissão é ferramenta útil na realização de investigações de nervos, humanos, tanto em condições normais, quanto na presença de neuropatias. Modelos experimentais de neuropatias têm sido cada vez mais úteis na elucidação dos processos fisiopatológicos que acometem os nervos comprometidos e, assim, a utilização da microscopia eletrônica de transmissão tem apresentado papel fundamental no entendimento desses processos. A utilização de modelos animais se faz necessária pois tentamos reproduzir em laboratório a forma mais original desses achados clínicos. Dessa forma, é de extrema importância a obtenção de material biológico o mais íntegro e intacto possível, sem perder suas características originais. A presente revisão demonstra uma das metodologias possíveis para a obtenção de material biológico, particularmente de nervos, com eficácia e bom uso da microscopia eletrônica para os estudos dos modelos experimentais de neuropatias.

PALAVRAS-CHAVE: Nervos sensitivos e motores, processamento histológico, sistema nervoso periférico, microscopia eletrônica de transmissão.

¹Departamento de Neuropsiquiatria, Divisão de Neurologia e Neurocirurgia. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brasil.

[‡]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, Setor de Microscopia Eletrônica. *E-mail: cacv@ufpe.br

²Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3.900, 14.049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

[†]Central Microscopy Research Facility, The University of Iowa, 85 Eckstein Medical Research Building, Iowa City, IA, 52241, USA.

ABSTRACT

The transmission electron microscopy is a valuable tool for the investigation of peripheral nerves either under normal conditions or in the presence of peripheral neuropathies. Experimental models of neuropathies are useful in the elucidation of the physiopathological steps of the diseases and transmission electron microscopy techniques play an important role in this process. The use of experimental models is mandatory once there is a need for reproducing in the laboratory the clinical findings in their most original form possible. Thus, the obtainment of a well preserved and intact biological material is crucial. The present review discuss one of the possible methods for the obtainment of a biological material of good quality, particularly nerves, to be investigated under transmission electron microscopy in order to study experimental models of peripheral neuropathies.

KEY WORDS: Sensitive and motor peripheral nerves, histological processing, peripheral nervous system, transmission electron microscopy.

1. INTRODUÇÃO

A divisão do sistema nervoso humano é baseada na sua topografia: o sistema nervoso central (cérebro e medula espinal, o chamado neuro-eixo) e o sistema nervoso periférico (12 pares de nervos cranianos, 31 pares de nervos espinais ou raquidianos, plexos autonômicos, gânglios e as terminações nervosas livres). Atualmente o sistema nervoso entérico foi incluído nessa classificação, chamado de um "pequeno cérebro", contendo uma quantidade de neurônios igual a da medula espinhal (Bear et al., 2008). O sistema nervoso do rato é semelhante ao humano, uma diferença macroscópica é que enquanto a medula espinal humana se estende até o início da região lombar, a do rato quase alcança o sacro. Em termos de comparação, a medula espinal do rato é proporcionalmente mais extensa que a humana. A origem de todos os nervos cranianos do rato se dá em nível da medula oblonga ou bulbo, o que facilita sua identificação e coleta, sendo o rato, portanto, um excelente modelo experimental para investigação de

neuropatias (Varejão et al, 2004; Jerônimo et al., 2005; Vasconcelos et al., 2009).

As características marcantes, principais e mais importantes para a manipulação histológica adequada dos tecidos em diferentes espécimes animais é a reprodução, em condições experimentais, do mesmo padrão em que se encontram os tecidos biológicos "in vivo", ou seja, na forma natural. Para isso a manipulação do tecido que se pretende estudar deve ser cuidadosa, com a tentativa de se controlar variáveis como o pH e a osmolaridade, evitando desnaturação, autólise tecidual ou até mesmo lesão macroscópica (Souza, 2007).

2. ESPÉCIMES E DISSECAÇÃO

Alguns animais de laboratório mais usados em experimentação e em modelos experimentais de neuropatias são: Camundongos (*Mus musculus*); Ratos (*Rattus norvegicus*); Cobaias (*Cavia porcellus*) e Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). A tabela abaixo classifica os mesmos.

ANIMAL	CAMUNDONGO	RATO	COBAIA	COELHO
FILO	<i>Chordata</i>	<i>Chordata</i>	<i>Chordata</i>	<i>Chordata</i>
SUB-FILO	<i>Vertebrata</i>	<i>Vertebrata</i>	<i>Vertebrata</i>	<i>Vertebrata</i>
CLASSE	<i>Mammalia</i>	<i>Mammalia</i>	<i>Mammalia</i>	<i>Mammalia</i>
ORDEM	<i>Rodentia</i>	<i>Rodentia</i>	<i>Rodentia</i>	<i>Lagomorpha</i>
FAMÍLIA	<i>Muridae</i>	<i>Muridae</i>	<i>Caviidae</i>	<i>Ochotonidae</i>
GÊNERO	<i>Mus</i>	<i>Rattus</i>	<i>Cavia</i>	<i>Oryctolagus</i>
ESPÉCIE	<i>Musculus</i>	<i>Norvegicus</i>	<i>Porcellus</i>	<i>Cuniculus</i>

São mamíferos de pequeno e médio porte, de fácil criação e manutenção em biotérios, com gestação geralmente rápida. Assim, podemos trabalhar com variáveis controladas, tais como tamanho da ninhada, gerações de filhotes, sexo, peso e idade. A dissecação para retirada dos fragmentos teciduais que se deseja estudar é geralmente cirúrgica, e deve se tomar extremo cuidado para não esmagar ou prensar o tecido a ser estudado, danificando assim a estrutura celular da amostra. O tecido nervoso é muito frágil quanto ao manuseio (Varejão 2003) e por isso, o desejável é que o mesmo seja fixado “*in locu*”, antes da sua dissecação e remoção do animal.

3. FIXAÇÃO

A fixação tem por objetivo a preservação das estruturas celulares, bem como a proteção das lesões decorrentes dos processos subsequentes do processamento histológico. Os fixadores podem ser físicos ou químicos. A fixação química é o procedimento de escolha para o preparo do tecido nervoso periférico. É o processo pelo qual é usada uma solução fixadora, através da perfusão intravascular ou da imersão do tecido “*in situ*”, ou após retirada rápida do animal, para tentar preservar o tecido na forma mais real possível “*in vivo*”, bem como a sua estrutura morfológica macro e microscópica, estabilizando e coagulando, camadas lipídicas, membranas e formando ligações intra e intermoleculares estáveis. A fixação física pode ser obtida submetendo-se a amostra a um

congelamento rápido com nitrogênio líquido (criofixação). Esta é comumente utilizada para reações imunohistoquímicas no sistema nervoso central. No caso de nervos periféricos, as soluções fixadoras são mais eficientes. São elas:

3.1 ALDEÍDO GLUTÁRICO (GLUTARALDEÍDO)

É a substância fixadora mais utilizada, preserva a cromatina, firma as ligações das pontes cruzadas das proteínas e não inibe a atividade enzimática nos tecidos, sendo utilizado em técnicas imuno-histoquímicas. É usado na concentração de 2,5%, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,2 M. Apresenta custo elevado, porém para fixar nervo por imersão é excelente, como no caso do nervo auditivo do rato ou cobaia (Vasconcelos, 2005) ou de nervos muito pequenos (Fazan et. al., 1997, Fazan et al., 2001; Fazan et. al., 2002).

3.2 TETRÓXIDO DE ÓSMIO (ÁCIDO ÓSMICO OU ÁCIDO PERÓSMICO)

Em microscopia eletrônica de transmissão é usado como um pós-fixador, encontrado na forma de cristais ou solução aquosa, altamente volátil e tóxico. Fixa e estabiliza extraordinariamente gorduras e fosfolípidos das membranas, formando um éster insolúvel. Oxida rapidamente e torna o material escuro devido às ligações com átomos de carbonos, não precipita proteínas. A penetração tecidual é pequena, daí a importância de se obter fragmentos bem seccionados e pequenos. Evidencia bem

as mitocôndrias, membranas lipoprotéicas e principalmente a bainha de mielina dos nervos. Para o manuseio desta substância é obrigatório o uso de capela de exaustão e escuridão (Souza, 2007).

3.3 PARAFORMALDEÍDO (TRIOXIMETILENO) 4%

É um pó solúvel em água ligeiramente alcalino. Muito utilizado na microscopia de luz. Menos eficiente nas ligações das pontes cruzadas, porém possui uma fixação adequada às amostras. Podem ocorrer variações de pH na solução. Quando misturado ao glutaraldeído a 2,5% é formada a Solução de Karnowsky, muito utilizada para fixar nervo por perfusão intravascular e diminuir o custo do procedimento.

3.4 ACETATO DE URANILA

Em microscopia eletrônica de transmissão, o acetato de uranila é utilizado como meio de contraste, não exatamente um corante. Esta substância se fixa aos radicais fosfatos de vários tipos de moléculas, prende-se também aos grupos carboxilas e aminas livres, ela facilmente se precipita. O tratamento com uranila induz intensa extração de glicogênio citoplasmático. Outra solução bastante usada é o corante de Reynold's (citrato de chumbo), para aumentar o contraste das membranas à microscopia eletrônica de transmissão.

4. SOLUÇÕES TAMPÃO

Em microscopia eletrônica de transmissão é fundamental a manutenção e o controle do pH das soluções fixadoras. A eficiência do sistema tampão varia com o pH e a interferência ou não de outros fatores, como solubilidade, penetração tecidual, resistência à oxidação. Os diferentes sistemas tampões são utilizados para manter o controle de um determinado pH nas soluções fixadoras, etapas de lavagem do material, reações, entre outras (Souza, 2007). Principais são:

4.1 TAMPÃO CACODILATO DE SÓDIO

Seu pH de tamponamento encontra-se na faixa de pH de 6,4 a 7,4. Possui grande vantagem sobre os demais com relação à fixação de materiais biológicos pois permite a estocagem do material nessa solução por longos períodos de tempo, sem deteriorar.

4.2 TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO

É o mais fisiológico porque é encontrado nas células na forma de fosfatos inorgânicos e éster de fosfato. Não é tóxico e o pH desse tampão apresenta pouca variação em diferentes temperaturas.

4.3 TAMPÃO TRIS

Muito usados em técnicas citoquímicas, apresentam-se em duas formas: TRIS-Maleato e o TRIS-HCl. Abaixo do pH 7,5 possuem uma diminuída capacidade de tamponamento.

4.4 TAMPÃO ZWITERIÔNICOS

São aminas ou aminoácidos N-substituídos que funcionam como tampão para os íons hidrogênio dentro de um pH entre 6,15-8,35. Bom para cultura de células e pouco usado em microscopia eletrônica de transmissão pela apresentação de densidade citoplasmática bastante acentuada.

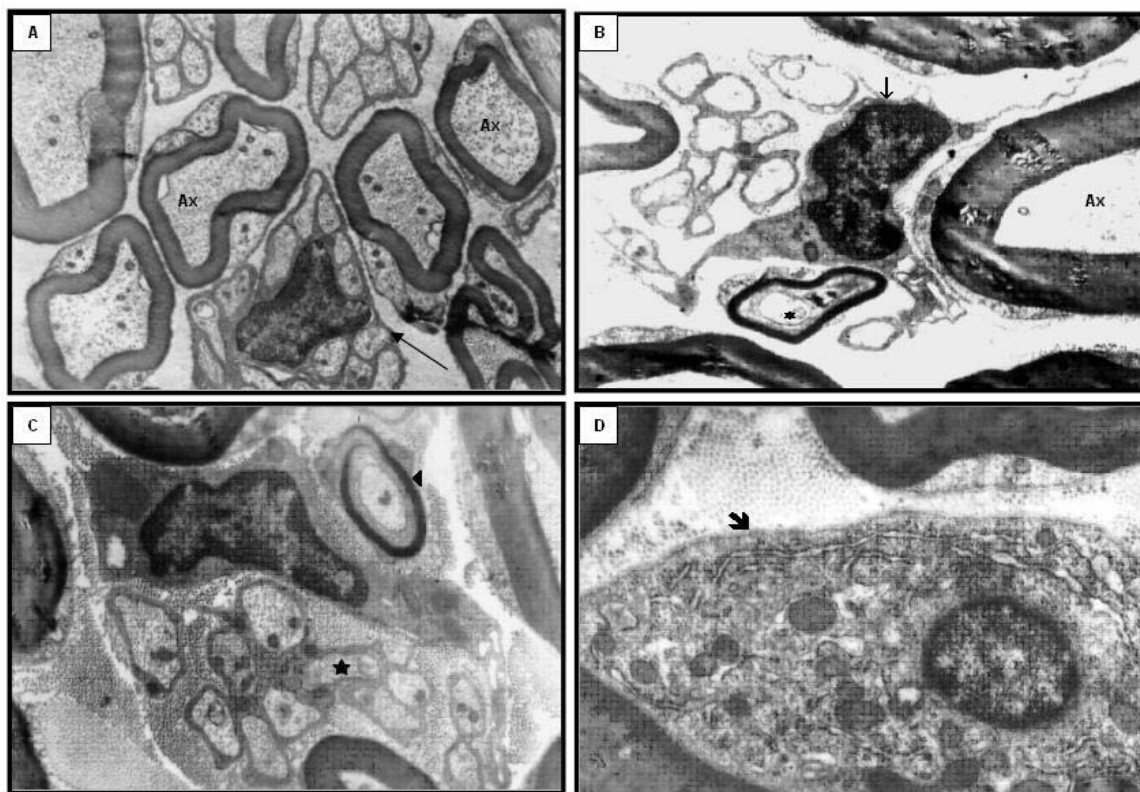
5. DESIDRATAÇÃO, INCLUSÃO, ULTRA-MICROTOMIA E CONTRASTAÇÃO

Uma das técnicas de desidratação pode ser realizada com acetona 50% por 20 minutos, seguida de acetona 70% por mais 20 minutos. O material pode ficar "over night" nessa solução ou o procedimento pode seguir com acetona 90% por 20 minutos e terminar com acetona 100% em 3 trocas de 15 minutos cada. Pode ser também usado etanol, dependendo do tipo de resina que

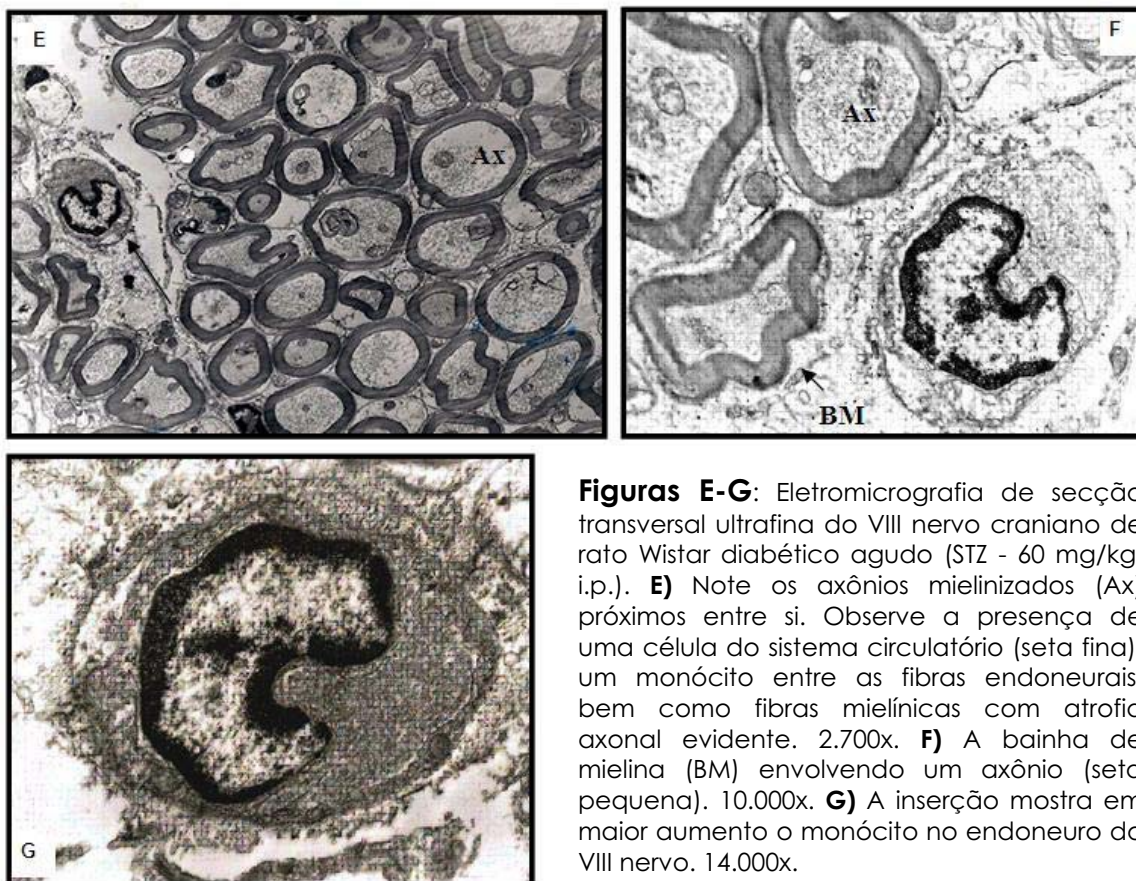
será utilizada para o procedimento de inclusão. A infiltração ou inclusão/emblocamento pode ser feita com EPON 812® - EMS/USA. Na microtomia, os cortes transversais semifinos dos nervos são realizados com navalhas de vidro, numa espessura que pode variar de 0,5 a 1,0 μm . O material obtido é corado com azul de toluidina a 1% e, montados entre lâmina e lamínula, pode ser observado em microscopia de luz. Para a ultramicrotomia, os cortes ultrafinos são

realizados numa espessura entre 50 e 80 nm e são montados em grades de cobre, para observação na microscopia eletrônica de transmissão. Esses cortes são contrastados com acetato de uranila a 5% por 1 hora, envolto por papel alumínio, pois a solução é fotossensível. Em seguida, utiliza-se a solução de citrato de chumbo por 5 minutos, lavando, em seguida, em água destilada 3 vezes por 10 minutos.

6. ELETROMICROGRAFIAS



Figuras A-D: Eletromicrografias de secções transversais ultrafinas do nervo isquiático de ratos Wistar controles e diabéticos agudos (STZ - 60 mg/kg, i.p.). A) Note os axônios mielinizados (Ax) no grupo controle. Observe a presença de fibras amielínicas com sua célula de Schwann e núcleo bem evidente (seta fina). 8.000x. B) No grupo diabético um macrófago não ativado (seta pequena) emite seus pseudópodes entre as fibras mielínicas. Note a presença de um vacúolo no axoplasma de uma fibra mielínica fina (asterisco). 8.000x. C) A imagem mostra desmielinização de uma fibra mielínica fina (cabeça de seta) e um possível espessamento da membrana basal das fibras amielínicas (estrela) no grupo diabético. Note a presença do macrófago entre as fibras nervosas. 10.000x. D) Célula de Schwann (seta curta) com seu núcleo proeminente e muitas organelas citoplasmáticas no grupo diabético (citoplasma da célula de Schwann reativo). 14.000x.



Figuras E-G: Eletromicrografia de secção transversal ultrafina do VIII nervo craniano de rato Wistar diabético agudo (STZ - 60 mg/kg, i.p.). **E)** Note os axônios mielinizados (Ax) próximos entre si. Observe a presença de uma célula do sistema circulatório (seta fina), um monócito entre as fibras endoneurais, bem como fibras mielínicas com atrofia axonal evidente. 2.700x. **F)** A bainha de mielina (BM) envolvendo um axônio (seta pequena). 10.000x. **G)** A inserção mostra em maior aumento o monócito no endoneuro do VIII nervo. 14.000x.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os procedimentos aqui descritos são utilizados de rotina no preparo de nervos para avaliação em nível de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando resultados satisfatórios. As estruturas endoneurais se apresentam preservadas de maneira que pode-se observar as estruturas de interesse em alta resolução.

8. AGRADECIMENTOS

Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - CAPES e ao Conselho Nacional
de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico - CNPq.

9. REFERÊNCIAS

- Bear, MF; Connors, BW; Paradiso, MA. Neurociências - Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre, 2008: Ed. ArtMed, 896p, 3ª Edição.
- Fazan, VP; Salgado, HC; Barreira AA. A descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats. Hypertension. 1997 Sep;30(3 Pt 2):693-8.
- Fazan, VP; Ma, X; Chapleau, MW; Barreira, AA. Qualitative and quantitative morphology of renal nerves in C57BL/6J mice. Anat Rec. 2002 Dec 1;268(4):399-404.

- Jerônimo, A; Jerônimo, CA; Rodrigues Filho, AO; Sanada, LS; Fazan, VP. Microscopic anatomy of the sural nerve in the postnatal developing rat: a longitudinal and lateral symmetry study. *J Anat.* 2005 Jan;206(1):93-9.
- Salgado, HC; Fazan Júnior, R; Fazan, VP; Da Silva, VJ; Barreira, AA. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Jun;940:20-7.
- Souza, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microdiálise/SBMM, Rio de Janeiro, 2007, 1:1-357.
- Varejão, ASP. Regeneração do nervo periférico: recuperação funcional num modelo experimental. Tese de Doutorado. Área: Neuro-ciências da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2003, 302p.
- Varejão, ASP; Melo-Pinto, P; Meek, MF; Filipe, VM; Bulas-Cruz, J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res* 2004, 26; 186-194.
- Vasconcelos, CAC; Barreira, AA. Síndrome de Landry-Guillain-Barré-Strohl, neurite alérgica experimental e o comprometimento do VIII par de nervo craniano. *Neurobiologia* 2003, 66: 37-42.
- Vasconcelos, CAC. Aspectos descritivos e quantitativos da anatomia macroscópica e microscópica do nervo vestibulo-coclear de cobaias. Dissertação de Mestrado. Área de concentração: Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2005.
- Vasconcelos, CAC, Fazan VPS, Valença MM. Neuropatia Diabética, Desnutrição e Sistema Nervoso. *Neurobiologia* 2009, 72:129-136.

4. RESULTADOS

4.1 – ANÁLISES DESCRITIVAS E MORFOLÓGICAS

Foi investigado neste estudo o efeito crônico do diabetes experimental induzido pelo tratamento com STZ em ratos aos 42 dias de idade. Os animais foram sacrificados aos 120 dias de idade. O período de atuação da droga foi de 78 dias, cerca de dez semanas. Nós consideramos como um efeito hiperglicêmico crônico ou diabetes experimental crônico, já que o efeito agudo é menos demorado e possui características morfológicas evidentes. Esse efeito crônico é confirmado pelos achados e alterações morfológicas encontrados nas fotomicrografias e eletromicrografias dos nervos vestibulo-cocleares e isquiáticos de ratos.

Foi observado no biotério que os ratos diabéticos urinavam exageradamente (poliúria), comiam bastante (polifagia), bem como defecavam exageradamente e bebiam muita água “uma sede voraz” (polidipsia). Praticamente tinha que limpar as gaiolas plásticas todos os dias, diferentemente dos animais controles. Dois artigos originais foram submetidos a revistas internacionais, o primeiro no *International Journal of Morphology* mostra uma visão geral e atualizada das neuropatias diabéticas periféricas, bem como resultados originais da ultraestrutura de nervos, incluindo o nervo isquiático de rato diabético. O segundo artigo original submetido ao *Neuroscience Letters* mostra os efeitos ultraestruturais do nervo vestibulo-coclear de ratos diabéticos crônicos induzidos pela STZ.

4.2 – ARTIGO ORIGINAL DE REVISÃO INTERNACIONAL

Diabetic peripheral neuropathies: A morphometric overview.

Valéria Paula Sassoli Fazan^{1,2}, Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos^{1,3,4}, Marcelo Moraes Valença⁴, Randy Nessler¹, Kenneth Charles Moore¹.

¹Central Microscopy Research Facility, The University of Iowa, 85 Eckstein Medical Research Building, Iowa City, IA, 52241, USA.

²Department of Surgery and Anatomy, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

³Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Electron Microscopy Section, and

⁴Department of Neuropsychiatry, Division of Neurology and Neurosurgery, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil.

Corresponding author and reprint request: Valéria Paula Sassoli Fazan, M.D., Ph.D., Assistant Professor, Department of Surgery and Anatomy, School of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900. Phone: + 55 16 3602-2501. FAX: + 55 16 3633-0017. E-mail: vpsfazan@yahoo.com.br or vpsfazan@gmail.com

Abstract:

Diabetes is now considered one of the main threats to human health in the 21st century and many researchers are dedicated to investigate the physiopathology of the disease, with further insights on the managements of its major complications. Since understanding the pathophysiology of the major complications of diabetes and their underlying processes is mandatory, experimental models of the disease may be useful as they allow the recognition of the early mechanisms involved in the long-term complications of diabetes. Peripheral nerve involvement is highly frequent in diabetes mellitus and it has been documented that one third of diabetic patients have peripheral neuropathy. The true prevalence is not known and reports vary from 10% to 90% in diabetic patients, depending on the criteria and methods used to define neuropathy. In this review, the most common experimental models of diabetes are presented and the pathological findings on major peripheral nerves are discussed. Also, the insights brought by morphometry to the diabetic neuropathy research are highlighted.

Key Words: Diabetes, Experimental models, Neuropathy, Morphometry

Epidemiological and Public Health Problems Associated to Diabetes

Diabetes mellitus, coupled with cardiovascular disorders, are the most challenging public health problems worldwide. Diabetes is now considered one of the main threats to human health in the 21st century (Zimmet et al., 2001). Its epidemiology is changing basically due to changes in human behavior and life style, which resulted in a dramatic increase in the incidence of diabetes in the last decade, especially in South America, Africa and East Asia (of 44, 50 and 57 % respectively) (Zimmet et al., 2001). There are two well known types of diabetes. Type 1 diabetes, formerly labeled “juvenile-onset diabetes” is due to an autoimmune-mediated destruction of pancreatic beta-cells resulting in insulin deficiency. Its pathogenesis involves environmental triggers that may activate autoimmune mechanisms in genetically susceptible individuals. Predisposition is mediated by a number of genes that interact in a complex manner with each other and the environment (Zimmet et al., 2001). Type 2 diabetes formerly labeled “maturity-onset diabetes” is characterized by insulin resistance or an abnormal secretion of insulin. This is a multifactorial disease and there can be a relationship with other metabolic disorders such as impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose (Zimmet et al., 2001). These two types of diabetes do not carry with them any implications of the age of onset of either condition (Williams & Airey, 2002). Most diabetic epidemic reports deal with type 2 diabetes because the type 1 frequency is low relatively to type 2, which accounts for over 90% of cases globally (Zimmet et al., 2001).

In accordance to the latest International Diabetes Federation (IDF) publication (Diabetes Atlas, third edition, 2006), it is clear that the incidence and prevalence of diabetes are increasing at an alarming rate both in developed and in developing countries but the largest proportional and absolute increase will occur in developing countries, particularly India and China. In 2003, world diabetes prevalence in adults (20 – 79 years) was 5.1% in a population of 3.8 billion. The highest prevalence of diabetes in the adult population is in North America (7.9%), Europe (7.8%) and South America’s prevalence is 5.6%. The number of deaths attributed to diabetes in adults is above 300,000 males in Europe, East-Asia and Western Pacific and above 400,000 females in the same regions.

There is a clear connection between type 2 diabetes and population weight gain. Childhood obesity is a relatively recent phenomenon and it poses a critical threat to health. Overweight and obesity affects one in 10 children worldwide, but the rate is double in Europe and three times as great across the Americas. The emergence of type 2 diabetes in childhood

is a serious development. In the USA, up to 45% of children with newly diagnosed diabetes have type 2 diabetes and most are overweight or obese at diagnosis.

In recent years, it is clear that the major problem of diabetes is not treating the acute life-threatening hyperglycaemia but the prevention, treatment and rehabilitation of the long-term complications of diabetes. In this regard, understanding the pathophysiology of the major complications of diabetes and their underlying processes is critical. Thus, experimental models of the disease will allow the recognition of the early mechanisms involved in the long-term complications of the disease.

The complications of diabetes may be classified into those from atherosclerosis (cardiovascular, cerebrovascular and peripheral vascular) and from other mechanisms. Retinopathy, nephropathy and neuropathy occur in both types of diabetes (Dyck & Giannini, 1996). Neuropathy is a common complication of diabetes that accounts for a significant high morbidity. Sensory loss of the lower limbs may cause foot ulceration that can lead to lower extremity amputation. Indeed, it has been reported that 20% of all hospital admissions among diabetic patients in the USA are for foot problems and the rate of lower limb amputation is 15 times higher in diabetic than in non-diabetic patients (Schratzberger et al., 2001).

Diabetic Neuropathy

Peripheral nerve involvement is highly frequent in diabetes mellitus and it has been documented that one third of diabetic patients have peripheral neuropathy (Comi & Corbo, 1998). The true prevalence is not known and reports vary from 10% to 90% in diabetic patients depending on the criteria and methods used to define neuropathy (Vinik & Mehrabyan, 2004). The close correlation between hyperglycaemia and the development of a clinically detectable neuropathy has been well documented in many studies and risk factors for the neuropathy development have been suggested such as high cholesterol levels, smoking, hypertension, male sex, older age and poor glycaemic control (Comi & Corbo, 1998; Harati, 2007). Diabetic neuropathy is an heterogeneous disorder (Harati, 1987; Comi & Corbo, 1998; Vinik et al., 2000) with high morbidity and can be classified as a number of different syndromes ranging from sub-clinical to clinical manifestations, depending on the classes of fibers involved (Vinik & Mehrabyan, 2004). It is the most common form of neuropathy in developed countries (Vinik et al., 2000) and at least 50% of diabetic patients develop one or several forms of diabetic neuropathies within 25 years after diagnosis (Harati,

1987). Diabetic neuropathy encompasses a wide range of abnormalities affecting proximal and distal peripheral sensory as well as motor nerves and the autonomic nervous system (Vinik et al., 2000). Distal symmetric sensory or sensorimotor polyneuropathy with a variable degree of autonomic involvement is the most common type of diabetic neuropathy (Comi & Corbo, 1998; Vinik & Mehrabyan, 2004).

Clinical manifestations of the symmetric distal polyneuropathies differ depending on the nerve fiber type most involved. In predominantly small-fiber type neuropathy, pain and paresthesias, most commonly in the lower extremities, are characteristic symptoms. Nevertheless, it is an electrophysiologically silent condition. Recently, there is evidence that this condition may be accompanied by loss of cutaneous nerve fibers that stain positive for the neuronal antigen PGP 9.5 (Vinik & Mehrabyan, 2004). Autonomic dysfunction is more prevalent in this form of neuropathy.

In the predominantly large-fiber type symmetric polyneuropathies, loss of ankle reflexes, decreased position and vibratory senses and sensory ataxia are present (Harati, 1987). Large-fiber neuropathies may involve sensory or motor nerves. These tend to be the neuropathies of signs rather than symptoms because large fibers subserve motor function, vibration perception, position sense and cold thermal perception. Unlike the small fibers, these are the myelinated, fast conducting fibers that begin in the toes and have their first synapse in the medulla. They tend to be affected first because of their length and the tendency in diabetes for nerves to “die back” (Vinik & Mehrabyan, 2004). Although sensory disturbances predominate in diabetic polyneuropathy, distal muscle weakness in the lower limbs may be present, usually in advanced cases, and is believed to be related to the neurogenic atrophy caused by motor axon degeneration (Comi & Corbo, 1998).

Progression of diabetic neuropathy is related to glycaemic control in both type 1 and type 2 diabetes (Vinik et al., 2000; Vinik & Mehrabyan, 2004). Retrospective and prospective studies have suggested a relationship between hyperglycemia and the development and severity of diabetic neuropathy (Vinik & Mehrabyan, 2004). The duration of diabetes and degree of metabolic control are the two major predictors of the development of neuropathy and determinant of its severity (Harati, 2007). Despite the differences in causation of both types of diabetes, it has traditionally been assumed that the neuropathy of types 1 and 2 diabetes is the consequence of hyperglycemia and the same pathogenetic factors (Harati, 2007).

Diabetic autonomic neuropathy is among the least recognized and understood complications of diabetes despite its significant negative impact on survival and quality of life (Vinik et al., 2003). Little is known about the epidemiology of the autonomic neuropathy in

the different types of diabetes (Comi & Corbo, 1998) and much remains to be learned about the natural course of diabetic autonomic neuropathy (Vinik et al., 2000). Dysfunction of the autonomic nervous system is seen in approximately 20 to 40% of diabetics and it is not simply an “all or none” phenomenon (Harati, 1987). Diabetic autonomic neuropathy typically occurs as a system-wide disorder affecting all parts of the autonomic nervous system. Indeed, because the vagus nerve (the longest of the autonomic nerves) accounts for ~75% of all parasympathetic activity, and diabetic neuropathy manifests first in longer nerves, the symptoms of even early autonomic neuropathy are widespread (Vinik et al., 2003).

Despite recent information about pathogenetic mechanisms for many of the long term complications of diabetes, the exact pathogenesis of diabetic neuropathy remains unknown. Several hypotheses have been proposed to explain pathogenesis of diabetic polyneuropathy, but the real cause is not well understood. Different mechanisms for the pathogenesis have been described but none has achieved general acceptance. They are divided into two major subgroups: abnormalities that suggest a metabolic etiology and abnormalities that suggest a vascular etiology. Table 1 summarizes the hypothesis implicated in the pathogenesis of diabetic neuropathy. For most, there is strong experimental support but the details of each mechanism and their possible interrelationships remain unanswered (Harati, 2007). It seems that the formation of advanced glycation end products may be an unifying bridge between the two major hypothesis since it explains many of the diabetic complications (Harati, 2007). In terms of peripheral neuropathy, the protein glycation cascade suggested by Harati (Harati, 2007) may lead either to demyelination or axonal atrophy. In the first case, glycation of the myelin proteins would account for myelin destruction and consequent demyelination. On the other hand, glycation of collagen and laminin could lead to a reduction in nerve growth factor, leading to axonal atrophy. It is possible that interactions between several direct and indirect metabolic consequences of insulin deficiency, hyperglycemia, as well as genetic and environmental factors are required for the emergence of diabetic neuropathies (Harati, 1987).

Four main reasons for studying the pathological alterations of the diabetic neuropathy were clearly pointed out by Dyck & Giannini (1996): 1) to characterize the interstitial pathologic alterations of nerve that cannot be inferred from clinical or electrophysiological studies; 2) to infer mechanisms and causes; 3) to correlate morphometric abnormalities with change in clinical impairment and nerve conduction, quantitative sensory testing and quantitative autonomic testing abnormalities; and 4) to correlate neuropathological findings with metabolic derangements.

Experimental Models of Diabetes

Experimental models of diabetes can be divided into two main categories: genetic (spontaneous) and induced syndromes. Many different mammalian species can be used as experimental models of diabetes including monkeys, cats, sheep, rabbits, dogs, pigs, hamsters, guinea pigs, rats and mice. Nevertheless, due to their relatively small size, reduced cost, easy to breed in and maintenance in animal care facilities, rats are the most common animals used in the experimental diabetes investigations. However, the use of mouse models to advance knowledge of physiology, pathology and development is exploding in all areas (Fazan et al., 2002), mainly due to the availability of genetically manipulated mice. Thus, mice are being introduced as another rodent model for experimental neuropathies studies.

Alloxan and streptozotocin (STZ) are the most prominent diabetogenic chemicals used to induce experimental diabetes in animals (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008). Since both are cytotoxic to pancreatic beta-cells, their use to introduce experimental diabetes in rats is convenient and simple.

Diabetic-inducing property of alloxan was first identified in 1943 (Dunn & McLetchie, 1943) as a result of the observed specific necrosis of pancreatic beta-cells (Dunn et al., 1943). Alloxan diabetes (state of experimental diabetes resulting in insulinopenia after the alloxan injection) was then successfully induced in rabbits (Bailey & Bailey, 1943), rats (Dunn & McLetchie, 1943; Gomori & Goldner, 1943), dogs (Lukens, 1948) and other species such as cats, sheep, monkeys, pigs and mouse (Lazarow, 1947; Lukens, 1948). Guinea pigs have shown to be resistant (Johnson, 1950). Subsequent decades witnessed a rise in journal articles reports and reviews about alloxan and its diabetogenic properties (Lazarow, 1949; Rerup, 1970; Rossini et al., 1975; Mordes & Rossini, 1981; Kurahashi et al., 1993; Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008). Alloxan is a hydrophilic and unstable substance with a molecular shape resembling glucose. Its half-life at neutral pH and 37 °C is about 1.5 min (Lenzen & Munday, 1991) but when a diabetogenic dose is used, its time of decomposition is sufficient to allow pancreas penetration in amounts that are deleterious (Szkudelski, 2001). Rapid uptake by insulin-secreting cells has been proposed to be one of the important features determining alloxan diabetogenicity. Alloxan exerts its diabetogenic action when administrated intravenously, intraperitoneally or subcutaneously. The dose required for diabetes induction depends on the animal species, route of administration and animal nutritional status, age and gender (Gold et al., 1981). The most frequently used intravenous dose used to induce diabetes

in rats is 65mg/kg (Gruppuso et al., 1990, Boylan et al., 1992) but the effective dose for intraperitoneally or subcutaneously injections must be 2 to 3 times higher (Szkudelski, 2001). Fasted animals are more susceptible to alloxan (Katsumata et al., 1992; Szkudelski et al., 1998) but high blood glucose levels provide partial resistance (Bansal et al., 1980; Szkudelski et al., 1998). Several investigations suggested that the selectivity of alloxan action is not quite satisfactory and alloxan uptake occurs in liver and other tissues (Malaisse et al., 1982; Tiedge et al., 1997).

The diabetogenic property of STZ was observed 20 years later than alloxan (Rakieten et al., 1963) and since then, it has been the agent of choice for the induction of diabetes mellitus in animals (Arison et al., 1967; Lenzen, 2008). STZ is more efficient and specific to the pancreatic beta-cells than alloxan (Rakieten et al., 1963). STZ is synthesized by *Streptomyces achromogenes* and is used to induce both insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus (Szkudelski, 2001). As with alloxan, its beta-cell specificity is mainly the result of selective cellular uptake and accumulation. The range of the STZ dose is not as narrow as in the case of alloxan and the frequently used single intravenous injection of 40 to 60 mg/kg in adult rats is enough to induce an insulin-dependent diabetes mellitus state (Ganda et al., 1976; Rodrigues Filho & Fazan, 2006). If given in multiple low doses, predominantly in the mouse, an induction of an insulin-dependent diabetes mellitus state is achieved by activation of immune mechanisms (Szkudelski, 2001). Due to its chemical properties, particularly greater stability, STZ is the agent of choice for reproducible induction of a diabetic metabolic state in experimental animals (Lenzen, 2008).

Injections of alloxan and STZ induce the same blood glucose, plasma insulin responses and morphological features of pancreatic beta-cells destruction characteristics of necrotic cell death (Lenzen, 2008). When using these chemically induced models of experimental diabetes, one should take into account that this mechanism is clearly at a variance with that which underlies autoimmune type 1 diabetes in humans and rodent models where beta-cell demise is the result of apoptotic cell death (Lenzen, 2008).

The understanding of changes in beta-cells of the pancreas as well as in the whole organism after alloxan or STZ treatment is essential for using these compounds as diabetogenic agents. For a complete review of alloxan and streptozotocin mechanisms of action, refer to Szkudelski, 2001 and Lenzen, 2008.

Some of the most well characterized spontaneous models of experimental diabetes are the Chinese hamster, the BB/W rat, the *db* mouse, the guinea pig and the *Macaca nigra* models.

The Chinese hamster was first described in 1959 (Meier & Yerganian, 1959) and after selective inbreeding, several diabetic lines have been produced. Diabetes in this model is hereditary and characterized by hyperphagia, polydipsia, glycosuria, hyperglycemia and decreased longevity (Sims & Landau, 1967; Gerritsen & Dulin, 1967; Gerritsen et al., 1974; Gerritsen & Blanks, 1974). The hamsters are not obese. After population studies of various diabetic sub-groups, it was proposed that four autosomal recessive genes are involved in inheritance of diabetes in this model (Butler, 1962; Gerritsen et al., 1974).

The spontaneous diabetic BB/Wistar rat was first recognized in 1974 and it is considered a model of type 1 diabetes with a current incidence of diabetes of approximately 40% (Bell & Hye, 1983). The diabetic animals are lean, hyperglycemic, hypoinsulinemic and have significant polyuria and glycosuria. Males and females are affected equally. Onset of diabetes is abrupt, early and progressive with ketoacidosis developing in 60 to 80% of the diabetic animals (Tannenbaum et al., 1981; Nakhouda et al., 1977; Nakhouda et al., 1978). The hyperglycemia is caused by an immune-mediated destruction of insulin producing cells (Harati, 2007). Genetic examination of diabetes in the BB/W rat indicates transmission via a single autosomal recessive gene with 50% phenotypic expression when homozygous for diabetes (Bell & Hye, 1983).

The *db* mouse (C57BL/KsJdb) was first reported in 1966 (Hummel et al., 1966) and it presents a syndrome similar to type 2 diabetes in humans characterized by obesity, infertility, hyperphagia and marked hyperglycemia (Hummel et al., 1966; Bray & York, 1979; Coleman & Hummel, 1967; Coleman, 1978; Herberg & Coleman, 1977). Obesity precedes the onset of hyperglycemia. Diabetes in the *db* mouse is hereditary and due to a single gene mutation located on chromosome 4 (Bell & Hye, 1983). Homozygous animals are all obese, diabetic and infertile (Coleman, 1982). In contrast to the Chinese hamster and BB/W rat, *db* mice present early hyperinsulinemia that drops to normal levels with aging.

Spontaneous diabetes in the guinea pig is a model of type 1 diabetes, initially reported in 1973 (Munger & Lang, 1973). They present glycosuria and hyperglycemia that affect 50% of animals in their breeding colony. Only 10% of animals develop ketoacidosis and insulin treatment is not required (Bell & Hye, 1983). A viral infection is thought to be the etiological agent but none was isolated (Munger & Lang, 1973).

The etiology of the *Macaca nigra* diabetes is uncertain but resembles type 2 diabetes in humans. This is a useful animal model of diabetes particularly because it is the species most closely related to humans that any other diabetic animal (Bell & Hye, 1983).

Other models of spontaneous diabetes are available but have been much less explored and their availability is limited. For example, the non-obese diabetic mouse (NOD-mouse) becomes insulin dependent because of a marked insulinitis (Makino et al., 1980) but spontaneous diabetes develops over a time which may range from 12 to 30 weeks of age and animals with the same duration of diabetes may differ significantly in age (Schmidt et al., 2003). This could introduce bias in the interpretation of morphological findings particularly for the nervous system. The leptin-deficient mouse (ob/ob-mouse) is a model of type 2 diabetes with mild hyperglycemia, insulin resistance and early obesity (Drel et al., 2006). The obese and hyperglycemic BBZ rats serve as a model of type 2 diabetes, with insulin resistance and a slowly progressive nerve conduction deficit (Harati, 2007). For a review of the animal models of diabetes mellitus refer to Mordes & Rossini, 1981; Bell & Hye, 1983; Tarui et al., 1987 and Sharma & Thomas, 1999.

Experimental Diabetic Neuropathy in Rats: Morphometry Insights

It has long been known that many different experimental models of diabetes are associated with abnormal nerve conduction. This is true for alloxan (Eliasson 1964; Eliasson, 1965; Preston, 1967; Eliasson, 1969; Sharma & Thomas, 1974) or STZ (Sharma & Thomas, 1974; Greene et al., 1975; Fukama et al., 1978; Jeffreys et al., 1978; Jakobsen, 1979; Sugimura et al., 1980; Weis et al., 1995) experimental diabetes. The main point that needs to be clarified is whether morphological alterations observed in the nerves and their fibers are responsible for conduction velocity impairment in experimental diabetes. This is still a controversial issue. Alterations in the peripheral nervous system of genetic or induced experimental models of diabetes have been extensively investigated and findings of relative importance and interest have been described. Nevertheless, morphological alterations totally comparable to those that occur in the human diabetic neuropathy are not completely reproducible (Sharma & Thomas, 1999). Despite the concern that the relevance of the animals findings may be questionable, it is expected that alterations observed in experimental models, especially in the early or acute cases, will be useful for a better understanding of the neuropathy development mechanisms (Sharma & Thomas, 1999). Controversy exists as to the morphological and morphometric changes in experimental diabetic neuropathy because the findings depend mostly on the experimental model *per se*, the age of the animals used on the induced models, the time-frame investigated, the nutritional state of the animals, and others.

Of all diabetic neuropathy experimental models, the rat peripheral nervous system is most commonly investigated in the literature. There is information about the neuropathy in genetic models and the alloxan model. However, the largest amount of data has been produced in the STZ-injected rat which will be primarily discussed.

In the early 70's, Sharma & Thomas (1974) investigated the morphology of the sural, tibial fibular and abdominal vagus nerves in rats rendered diabetic with STZ injection for up to 49 weeks of survival time. The authors first investigated sciatic and tibial nerves conduction velocity before performing histological examination of the nerves. As expected, conduction velocities were smaller accordingly to the high blood glucose levels in all ages studied. Histological examination of the nerves included light and transmission electron microscopy and also measurements of myelinated fiber numbers, density, size and distribution. The results were very disappointing since no differences between controls and diabetic animals were found for each of the morphological parameters. Teased fiber preparation showed no evidence of demyelination or axonal breakdown. No alterations in the unmyelinated fibers were evident by transmission electron microscopy. Later, Jakobsen (1976a) identified in rats a reduction in the fibular nerve myelinated fiber size as early as 4 weeks after STZ injection, with no reduction in fiber number. A reduction in the myelin area was also observed with the small fibers being more affected than large ones. A study of isolated myelinated fibers (Jakobsen, 1976b) showed no signs of demyelination. The structural abnormality of the axon was demonstrated a few weeks after the STZ injection and was prevented by insulin treatment (Jakobsen, 1979). The author concluded that axonal abnormality resulted from the metabolic derangement and not from the long-term diabetic changes of intraneural vessels (Jakobsen & Sidenius, 1980). A decrease in axonal transport of structural proteins was demonstrated 4 weeks after STZ injection (Jakobsen & Sidenius, 1980). Afterwards, many literature reports confirmed these findings. Britland et al. (1985) and Bhoyrul et al. (1988) showed a reduction of the myelinated axonal area in the sciatic and tibial nerves of SZT-diabetic rats while Sharma et al. (1985), McCallum et al. (1986) and Sugimura et al. (1980) showed a reduction of the axonal caliber in the tibial and sural nerves of STZ-diabetic rats. The investigation of distal (plantar) nerves confirmed the axonal atrophy (Brown et al., 1980; Sharma et al., 1981; Chokroverty et al., 1988; Thomas et al., 1990) present in this experimental model of diabetic neuropathy. These findings added the information of a “dying back” neuropathy with breakdown of myelinated fibers in the most distal nerves with preservation of the fibers in more proximal ones (Brown et al., 1980). Studies of the fibers size in BB/W rats have also demonstrated reduction of axonal caliber mainly in the distal

segments of the nerves (Yagihashi & Sima, 1985; Yagihashi & Sima, 1986; Medori et al., 1988; Harati, 2007), in accordance with the findings on the STZ model.

Most of these investigations were performed in limb nerves (motor and/or sensory) while trunk nerves are much less explored. More recently, we have investigated somatic and autonomic nerves of the trunk in the STZ-model of diabetic neuropathy. Limb nerves are more susceptible to external traumas or injuries especially when a long-term investigation is necessary. Thus, a possible association between the external injury and the induced diabetic neuropathy might introduce a bias in the interpretation of results. We demonstrated in the aortic depressor nerve of rats with acute STZ-diabetes, morphological signs of axonal atrophy of the myelinated fibers as early as 15 days after the injection (Salgado et al., 2001) which was also confirmed for chronic animals (Figure 1). A detailed morphometric investigation confirmed this morphological evidence (Fazan et al., 2006). Blood vessels were not investigated since most aortic depressor nerves do not have an endoneural vessel (Fazan et al., 1997; Fazan et al., 2001). We also investigated the phrenic nerve (Rodrigues Filho & Fazan, 2006), the renal nerve (Sato et al., 2004) and the vagus nerve (Sato et al., 2006) of rats with chronic STZ-diabetes.

For the phrenic nerves, we demonstrated, using light microscopy morphometry, an axonal atrophy mainly on the large myelinated fibers. Transmission electron microscopy studies showed that the small myelinated fibers of phrenic nerves are severely affected in this experimental model and their alterations are closely related to the vascular damage present in these nerves (Figure 2). It is well established that diabetic patients present basement membrane thickening, endothelial hyperplasia and luminal collapse of the endoneural vessels (Malik et al., 2005) and our observations in the STZ-model are in accordance to these findings in humans. Also, it has been suggested that small fibers are more susceptible to ischemia (Parry & Brown, 1982) and the alterations we observed in the endoneural vessels in the STZ-induced diabetic neuropathy are severe enough to cause endoneural ischemia. Unmyelinated fibers are also injured but to a lesser extent (Figure 2).

Harati (2007) stated that the structural microvascular abnormalities seen in diabetic neuropathy are late in occurrence being that the earliest adverse effects are generally metabolic and result from direct exposure of the nerves to glucose. The initial metabolic phase is then progressively replaced by a structural phase. Our observations in the aortic depressor nerves are in accordance with this hypothesis since the acute (15 days after STZ) finding was an axonal atrophy of the myelinated fibers, compatible to observations on the sciatic nerve of these animals (unpublished data) (Figure 3), and the chronic (12 weeks after STZ) findings

pointed towards a Schwann cell injury, since the myelination degree was being affected (Fazan et al., 2006) (Figure 1). For the phrenic nerves, the axonal atrophy was evident in the large myelinated fibers while the small ones were severely injured in close relation to the damaged endoneural vessels.

Several groups of investigators have described segmental demyelination and axonal degeneration in nerves of rats with chronic experimental diabetes (Hildebrand et al., 1968; Preston, 1967; Sahgal et al., 1972; Powell et al., 1977; Yagihashi et al., 1979) but most used alloxan to induce diabetes. Several authors who investigated STZ-diabetes described segmental demyelination and remyelination as well as abnormalities of the paranodal myelin at a similar rate as for the control animals (Sharma & Thomas, 1974; Sharma et al., 1981), suggesting these alterations to be more related aging (Jeronimo et al., 2008). Thomas et al. (1990) described a reduction of the myelin thickness mainly on the small myelinated fibers of the tibial nerves in chronic STZ-diabetic rats especially if the induction of diabetes was at early stages of life. At later stages, the axon size was consistently reduced in diabetic animals compared to controls. In our observations, chronic STZ-diabetes was able to cause demyelination, especially on the small fibers either on the aortic depressor nerve (Figure 1B), or the phrenic nerve (Figure 2Bb). However, these observations were not as important as the axonal atrophy present in these nerves. Also, in the acute animals, no signs of demyelination were present in any of the nerves we have already investigated with STZ-diabetes.

Human diabetic polyneuropathy was described in the late XVIII century and is the most common chronic complication of diabetes that remains the least understood (Andriambeloson et al., 2006). Despite the diversity of the reported clinical features, it seems that its morphological hallmark is the degeneration of the peripheral nerves. In fact, several reports on human nerve biopsies of diabetic patients demonstrate an axonal loss, greatest in distal nerves, in a multifocal way (Dyck et al., 1986; Behse et al., 1977; Dyck & Giannini, 1996) that appear to be more severe in small fibers (Brown et al., 1976; Said et al., 1983). Unfortunately, these observations are not similar to most described alterations observed in experimental models of diabetes. Few experimental studies have described reduction in the number of myelinated and/or unmyelinated fibers but interestingly, most investigated autonomic nerves. Still, reports on the autonomic nervous system involvement in animal models of diabetes are rare. Yagihashi & Sima (1985) demonstrated a decreased number of the unmyelinated fibers in the mesenteric nerves of BB rats after 8 months duration of diabetes. We investigated by light microscopy and morphometry the renal nerves in STZ-model of chronic diabetes and demonstrated a decrease in the small myelinated fibers number

in diabetic animals (Sato et al., 2004) (Figure 4). Later, we described a reduction in the small myelinated fiber number in the cervical vagus nerve in the same model (Sato et al., 2006), which was also demonstrated by morphometry (Figure 5). Interestingly, we have been using the same experimental model of STZ-diabetes for a long time and had the opportunity to investigate several different nerves with intriguing findings. In somatic nerves with large myelinated fibers, axonal atrophy is the prominent alteration. On the contrary, in autonomic nerves, since there is a predominance of small myelinated and unmyelinated fibers, it seems that the main findings point towards a fiber loss. These differences between nerve alterations certainly help to explain the wide variety of signs and symptoms found in diabetic patients. Also, depending on which nerve first is most affected, patients might have predominantly sensory/motor or autonomic symptoms which is one of the most remarkable clinical characteristics of human diabetes.

Concluding Remarks

Morphometry is a method used not only in clinical laboratory routine but also for research purposes in order to collect data, and analyze results in the most objective and precise manner. It also allows for establishing a relationship between different anatomical structures with respective functions (Fazan, 2008). Particularly for nerves, this technique is of great value as it reveals minimal morphological differences between form and function. Histologic associated with morphometric analysis is used to characterize pathological modifications at the cellular level. This is crucial for a more accurate and sensitive diagnosis of peripheral nerve diseases (Fricker et al., 2008). Three levels of analysis are generally used (Fricker et al., 2008): (1) a global analysis of the myelination state by using teased fibers, (2) a quantitative morphometric study on semi-thin sections to quantify changes in the fiber caliber and on the myelin/fiber ratio and (3) an electron-microscopic approach to investigate ultrastructural changes and to quantify and measure unmyelinated fibers.

Morphometry has been widely used in the investigations of human diabetic neuropathy and in experimental models of the disease, providing valuable new insights into the pathology and pathophysiology of the disease. Nerve morphometry in the STZ-model of diabetes was performed by several authors, in an attempt to duplicate and then interpret the changes that occur in early human diabetes. Thus, nerve morphometry has been a powerful tool on the investigation of the diabetic neuropathy, not only in humans, but also in experimental models.

Acknowledgements

The authors thank the excellent technical support of Mr. Antônio Renato Meirelles e Silva and Ms. Maria Cristina Lopes Schiavoni, Experimental Neurology Laboratory, Ms. Maria Tereza Maglia, Electron Microscopy Laboratory, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Mr. Sérgio Santos and Mr. Rafael Padilha, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco and Mr. Raimundo Pimentel, FIOCRUZ, Recife, Brazil. The authors are also thankful to staff at Central Microscopy Research Facility, University of Iowa, IA, USA for the training and support during the use the JEM-1230 (JEOL) digital transmission electron microscope. CACV was a visiting scholar at the Central Microscopy Research Facility at the University of Iowa, while the study was carried out and also a recipient of a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors appreciated the strong support from Drs. JL Lima Filho, JRM Oliveira, LC Alves, F Brayner and RCA Guedes. Grant sponsor: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo); Grant numbers: 04/09139-2, 04-01390-8, 06/03200-7 and 06/06362-8; Grant sponsor: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia); Grant numbers: 303802/2006-5 and 202079/2007-4.

References

- Andriambeloson, E.; Baillet, C.; Vitte, P. A.; Garotta, G.; Dreano, M. & Callizot, N. Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology*, 26:32-42, 2006.
- Arison, R. N.; Ciaccio, E. I.; Glitzer, M. S.; Cassaro, J. A. & Pruss, M. P. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes*, 16:51–56, 1967.
- Bailey, C. C. & Bailey, O. T. Production of Diabetes Mellitus in Rabbits with Aloxan: Preliminary Report. *JAMA*, 122:1165, 1943.
- Bansal, R.; Ahmad, N. & Kidwai, J. R. Alloxan-glucose interaction: effect on incorporation of ¹⁴C-leucine into pancreatic islets of rat. *Acta. Diabetol. Lat.*, 17(2):135-43, 1980.
- Behse, F.; Buchthal, F. & Carlsen, F. Nerve biopsy and conduction studies in diabetic neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 40:1072-82, 1977.
- Bell, R. H. Jr. & Hye, R. J. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J. Surg. Res.*, 35(5):433-60, 1983.
- Bhojru, S.; Sharma, A. K.; Stribling, D.; Mirrlees, D. D.; Peterson, R. G.; Farber, M. O. & Thomas, P. K. Ultrastructural observations on myelinated fibres in experimental diabetes: effect of the aldose reductase inhibitor ponalrestat given alone or in conjunction with insulin therapy. *J. Neurol. Sci.*, 85(2):131-47, 1988.
- Boylan, J. M.; Brautigan, D. L.; Madden, J.; Raven, T.; Ellis, L. & Gruppuso, P. A. Differential regulation of multiple hepatic protein tyrosine phosphatases in alloxan diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, 90(1):174-9, 1992.
- Bray, G. A. & York, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.*, 59(3):719-809, 1979.

Brown, M. J.; Pleasure, D. E. & Asbury, A. K. Microdissection of peripheral nerve: collagen and lipid distribution with morphological correlation. *J. Neurol. Sci.*, 29:361-9, 1976.

Britland, S. T.; Sharma, A. K. Duguid, I. G. & Thomas, P. K. Ultrastructural observations on myelinated fibres in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats: effect of insulin treatment. *Life Support Syst.*, 3 Suppl 1:524-9, 1985.

Brown, M. J.; Sumner, A. J.; Greene, D. A.; Diamond, S. M. & Asbury A. K. Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. *Ann. Neurol.*, 8:168-78, 1980.

Butler, L. The inheritance of diabetes in the Chinese hamster. *Diabetologia*, 3:124, 1962.

Chokroverty, S.; Seiden, D.; Navidad, P. & Cody, R. Distal axonopathy in streptozotocin diabetes in rats. *Experientia*, 44:444-6, 1988.

Coleman, D. L. & Hummel, K. P. Studies with the mutation, diabetes, in the mouse. *Diabetologia*, 3(2):238-48, 1967.

Coleman, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 14(3):141-8, 1978.

Coleman, D. L. Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes*, 31:1-6, 1982.

Comi, G. & Corbo, M. Metabolic neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, 11(5):523-9, 1998.

Diabetes Atlas. 3rd Edition. International Diabetes Federation (IDF), 19th World Congress on Diabetes in Cape Town, South Africa (<http://www.idf.org/>), (<http://www.eatlas.idf.org/>), 2006.

Drel, V. R.; Mashtalir, N.; Ilnytska, O.; Shin, J.; Li, F.; Lyzogubov, V. V. & Obrosova, I. G. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 55(12):3335-43, 2006.

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. *Ann. Neurol.*, 19:425-39, 1986.

Dyck, P. J. & Giannini, C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(12):1181-93, 1996.

Dunn, J. S. & McLetchie, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet*, 245:384-387, 1943.

Dunn, J. S.; Sheehan, H. L. & McLetchie, N. G. B. Necrosis of islets of langerhans produced experimentally. *Lancet*, 244:484-487, 1943.

Eliasson, S. G. Nerve conduction changes in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.*, 43:2353-8, 1964.

Eliasson, S. G. Regenerative processes in experimental diabetic neuropathy. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 90:35-7, 1965.

Eliasson, S. G. Properties of isolated nerve fibres from alloxanized rats. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 32(6):525-9, 1969.

Fazan, V. P.; Salgado H. C. & Barreira, A. A. A descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats. *Hypertension*, 30:693-8, 1997.

Fazan, V. P.; Salgado H. C. & Barreira, A. A. Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 280:H1560-4, 2001.

Fazan, V. P. S.; Ma, X.; Chapleau, M. W. & Barreira, A. A. Qualitative and quantitative morphology of renal nerves in C57BL/6J mice. *Anat. Rec.*, 268(4):399-404, 2002.

Fazan, V. P. S.; Salgado, H. C. & Barreira, A. A. Aortic depressor nerve myelinated fibers in acute and chronic experimental diabetes. *Am. J. Hypertens.*, 19:153-160, 2006.

Fazan, V. P. S. Peripheral Nerve Morphometry. *Neurobiologia (Recife)*, 71:99-110, 2008.

Fricker, B.; Muller, A. & René, F. Evaluation tools and animal models of peripheral neuropathies. *Neurodegener. Dis.*, 5:72-108, 2008.

Fukama, M.; Carpentier, J-L.; Orci, L.; Greene, D. A. & Winegrad, A. I. An alteration in internodal myelin membrane structure in large sciatic nerve fibres in rats with acute streptozotocin diabetes and impaired nerve conduction velocity. *Diabetologia*, 15:65, 1978.

Ganda, O. P.; Rossini, A. A. & Like, A. A. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*, 25(7):595-603, 1976.

Gerritsen, G. C. & Dulin, W. E. Characterization of diabetes in the Chinese hamster. *Diabetologia*, 3(2):74-84, 1967.

Gerritsen, G. C.; Johnson, M. A.; Soret, M. G. & Schultz, J. R. Epidemiology of Chinese hamsters and preliminary evidence for genetic heterogeneity of diabetes. *Diabetologia*, 10 Suppl:581-8, 1974.

Gerritsen, G. C. & Blanks, M. C. Characterization of Chinese hamsters by metabolic balance, glucose tolerance and insulin secretion. *Diabetologia*, 10 Suppl:493-9, 1974.

Gold, G.; Reaven, G. M. & Reaven, E. P. Effect of age on proinsulin and insulin secretory patterns in isolated rat islets. *Diabetes*, 30(1):77-82, 1981.

Gomori, G. & Goldner, M. G. Production of diabetes mellitus in rats with alloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54:287, 1943.

Greene, D.A.; De Jesus, P. V. Jr. & Winegrad, A. I. Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J. Clin. Invest.*, 55(6):1326-36, 1975.

Gruppuso, P. A.; Mead, J. E. & Fausto, N. Transforming growth factor receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.*, 50(5):1464-9, 1990.

Harati, Y. Diabetic peripheral neuropathies. *Ann. Intern. Med.*, 107(4):546-59, 1987.

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

Herberg, L. & Coleman, D. L. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism.*, 26(1):59-99, 1977.

Hildebrand, J.; Joffroy, A.; Graff, G. & Coërs, C. Neuromuscular changes with alloxan hyperglycemia. Electrophysiological, biochemical, and histological study in rats. *Arch Neurol.*, 18:633-41, 1968.

Hummel, K. P.; Dickie, M. M. & Coleman, D. L. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 2;153(740):1127-8, 1966.

Jakobsen, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres. *Diabetologia*, 12(6):547-53, 1976a.

Jakobsen, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. I. A study of cross sectioned nerves. *Diabetologia*, 12(6): 12(6):539-46, 1976b.

Jakobsen, J. Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient diabetic rats. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 42:509-18, 1979.

Jakobsen J. & Sidenius, P. Decreased axonal transport of structural proteins in streptozotocin diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, 66:292-7, 1980.

Jeffreys, J. G.; Palmano, K. P.; Sharma, A. K. & Thomas P. K. Influence of dietary myoinositol on nerve conduction and inositol phospholipids in normal and diabetic rats. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 41:333-9, 1978.

Jeronimo, A.; Jeronimo, C. A. D.; Rodrigues Filho, O. A.; Sanada, L. S. & Fazan, V. P. S. A morphometric study on the longitudinal and lateral symmetry of the sural nerve in mature and aging female rats. *Brain Res.*, 1222:51-60, 2008.

Johnson, D. D. Alloxan administration in the guinea pig; a study of the regenerative phase in the islands of Langerhans. *Endocrinology*, 47(6):393-8, 1950.

Katsumata, K.; Katsumata, K. Jr. & Katsumata, Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm. Metab. Res.*, 24(11):508-10, 1992.

Kurahashi, M.; Masui, H.; Yoshimoto, S.; Wakabayashi, I. & Sakamoto, K. Effect of diethyldithiocarbamate on diabetogenic action of alloxan in rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 19(1):39-47, 1993.

Lazarow, A. Further studies of effect of sulfur compounds on production of diabetes with alloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 66:4-7, 1947.

Lazarow, A. Factors controlling the development and progression of diabetes. *Physiol. Rev.* 29(1):48-74, 1949.

Lenzen, S. & Munday, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability and a comparison products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem. Pharmacol.*, 42:1385-1291, 1991.

Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2):216-26, 2008.

Lukens, F. D. Alloxan diabetes. *Physiol. Rev.*, 28(3):304-30, 1948.

Malaisse, W. J.; Malaisse-Lagae, F.; Sener, A. & Pipeleers, D. G. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79(3):927-30, 1982.

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*, 48:578-85, 2005.

Makino, S.; Kunitomo, K.; Muraoka, Y.; Mizushima, Y.; Katagiri, K. & Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*, 29(1):1-13, 1980.

McCallum, K. N.; Sharma, A. K.; Blanchard, D.S.; Stribling, D.; Mirrlees, D. J.; Duguid, I. G. & Thomas, P. K. The effect of continuous subcutaneous insulin infusion therapy on morphological and biochemical abnormalities of peripheral nerves in experimental diabetes. *J Neurol Sci.*, 74(1):55-67, 1986.

Medori, R.; Jenich, H.; Autilio-Gambetti, L. & Gambetti, P. Experimental diabetic neuropathy: similar changes of slow axonal transport and axonal size in different animal models. *J. Neurosci.*, 8(5):1814-21, 1988.

Meier, H. & Yerganian, G. A. Spontaneous hereditary diabetes mellitus in Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). 1. Pathological findings. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 100(4):810-5, 1959.

Mordes, J. P. & Rossini, A. A. Animal models of diabetes. *Am. J. Med.*, 70(2):353-60, 1981.

Munger, B. L. & Lang C.M. Spontaneous diabetes mellitus in guinea pigs: the acute cytopathology of the islets of Langerhans. *Lab. Invest.*, 29(6):685-702, 1973.

Nakhouda, A. F.; Like, A. A.; Chappel, C. I.; Murray, F. T. & Marliss, E. B. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes*, 26(2):100-12, 1977.

Nakhouda, A. F.; Wei, C. N.; Like, A. A. & Marliss, E. B. The spontaneously diabetic Wistar rat (the "BB" rat): the significance of transient glycosuria. *Diabete Metab.*, 4(4):255-9, 1978.

Parry, G. J. & Brown, M. J. Selective fiber vulnerability in acute ischemic neuropathy. *Ann. Neurol.*, 11:147-54, 1982.

Powell, H.; Knox, D.; Lee, S.; Charters, A. C.; Orloff, M.; Garrett, R. & Lampert, P. Alloxan diabetic neuropathy: electron microscopic studies. *Neurology*, 27:60-6, 1977.

Preston, G. M. Peripheral neuropathy in the alloxan-diabetic rat. *J. Physiol.*, 189(2):49-50, 1967.

Rakieten, N.; Rakieten, M. L. & Nadkarni, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.*, 29:91-8, 1963.

Rerup, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.*, 22(4):485-518, 1970.

Rodrigues Filho, O. A. & Fazan, V. P. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. *J. Neurosci. Methods*, 151:131-8, 2006.

Rossini, A. A.; Arcangeli, M. A. & Cahill, G. F. Jr. Studies of alloxan toxicity on the beta cell. *Diabetes*, 24(5):516-22, 1975.

Sahgal, V. K.; Roy, S.; Ahuja, M. M. & Singh, N. Diabetic neuropathy. An experimental study in alloxanised rats, with special reference to insulin therapy. *Acta. Diabetol. Lat.*, 9:983-1006, 1972.

Salgado, H. C.; Fazan Jr.; Fazan, V. P. S.; Silva, V. J. D. & Barreira A. A. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. *Ann. NY Acad. Sci.*, 940:20-27, 2001.

Said, G.; Slama, G. & Selva, J. Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy. *Brain*, 106:791-807, 1983.

Sato, K. L.; Carmo, J. M. & Fazan, V. P. S. Morfologia do Nervo Renal no Diabete Experimental Crônico em Ratos. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 8:69-71, 2004.

Sato, K. L.; Migliaccio, V.; Carmo, J. M.; Oliveti, M. C. D. B. B.; Ferreira, R. S. & Fazan, V. P. S. Diabete como modelo de neuropatia autonômica. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 39:28-38, 2006.

Schmidt, R. E.; Dorsey, D. A.; Beaudet, L. N.; Frederick, K. E.; Parvin, C. A.; Plurad, S. B. & Levisetti, M.G. Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy. *Am. J. Pathol.*, 163(5):2077-91, 2003.

Sharma, A. K.; Bajada, S. & Thomas, P. K. Influence of streptozotocin-induced diabetes on myelinated nerve fibre maturation and on body growth in the rat. *Acta. Neuropathol.*, 53:257-65, 1981.

Sharma, A. K.; Duguid, I. G.; Blanchard, D. S. & Thomas, P. K. The effect of insulin treatment on myelinated nerve fibre maturation and integrity and on body growth in streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci.*, 67(3):285-97, 1985.

Sharma, A. K. & Thomas, P. K. Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. *J. Neurol. Sci.*, 23:1-15, 1974.

Sharma, A. K. & Thomas, P. K. Animal models: Pathology and Pathophysiology. *In: Diabetic Neuropathy*. Eds Dyck, P.J. & Thomas, P. K. 2nd edition, Philadelphia, WB Saunders Company, p. 237-252, 1999.

Sims, E. A. & Landau, B. R. Diabetes mellitus in the Chinese hamster. I. Metabolic and morphologic studies. *Diabetologia*, 3(2):115-23, 1967.

Sugimura, K.; Windebank, A. J.; Natarajan, V.; Lambert, E. H.; Schmid, H. H. & Dyck, P. J. Interstitial hyperosmolarity may cause axis cylinder shrinkage in streptozotocin diabetic nerve. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 39(6):710-21, 1980.

Szkudelski, T.; Kandulska, K. & Okulicz, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol. Res.*, 47(5):343-6, 1998.

Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 50(6):537-46, 2001.

Tannenbaum, G. S.; Colle, E.; Gurd, W. & Wanamaker L. Dynamic time-course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. I. Longitudinal profiles of plasma growth hormone, insulin, and glucose. *Endocrinology*, 109(6):1872-9, 1981.

Tarui, S.; Yamada, K. & Hanafusa, T. Animal models utilized in the research of diabetes mellitus--with special reference to insulinitis-associated diabetes. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 229:211-23, 1987.

Tiedge, M.; Lortz, S.; Drinkgern, J. & Lenzen, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46(11):1733-42, 1997.

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.*, 79:375-86, 1990.

Vinik, A. I.; Park, T. S.; Stansberry, K. B. & Pittenger, G. L. Diabetic neuropathies. *Diabetologia*, 43(8):957-73, 2000.

Vinik, A. I.; Maser, R. E.; Mitchell, B. D. & Freeman, R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*, 26(5):1553-79, 2003.

Vinik, A. I. & Mehrabyan, A. Diabetic neuropathies. *Med. Clin. N. Am.*, 88:947-999, 2004.

Zimmet, P.; Alberti, K. G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 13;414(6865):782-7, 2001.

Weis, J.; Dimpfel, W. & Schröder, J. M. Nerve conduction changes and fine structural alterations of extra- and intrafusal muscle and nerve fibers in streptozotocin diabetic rats. *Muscle Nerve*, 18(2):175-84, 1995.

Williams, R. & Airey, M. Epidemiology and public health consequences of diabetes. *Curr. Med. Res. Opin.*, 18(1):1-12, 2002.

Yagihashi, S.; Nishihira, M. & Baba, M. Morphometrical analysis of the peripheral nerve lesions in experimental diabetes rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, 129:139-49, 1979.

Yagihashi, S. & Sima A. A. Diabetic autonomic neuropathy. The distribution of structural changes in sympathetic nerves of the BB rat. *Am. J. Pathol.*, 121(1):138-47, 1985.

Yagihashi, S. & Sima A. A. Neuroaxonal and dendritic dystrophy in diabetic autonomic neuropathy. Classification and topographic distribution in the BB-rat. *Neuropathol. Exp. Neurol.*, 45(5):545-65, 1986.

Table 1: Most common abnormalities implicated in the pathogenesis of diabetic neuropathy according to the two major proposed sub-groups.

Vascular Etiology	Metabolic Etiology
Hyperglycemia	Hyperglycemia / Hypoinsulinemia
↑ Endoneural vascular resistance	Dyslipidaemia
↓ Nerve blood flow (endoneural hypoxia)	↑ Aldose reductase activity (↑ polyols, ↓ myo-inositol)
Endothelial dysfunction (↓ prostacyclin and nitric oxide, ↑ endothelin)	↓ Nerve sodium-potassium ATP-ase
Advanced glycation of vessel wall	↓ Rate of synthesis and transport of intra- axonal proteins
Basement membrane thickening	↑ Glycogen accumulation
Endothelial cell swelling and pericyte degeneration	↑ Monoenzymatic peripheral nerve protein glycosylation
Closed (collapsed) capillaries	↓ Incorporation into myelin of glycolipids and aminoacids
Occlusive platelet thrombi	Abnormal inositol lipid metabolism
Epineural vessel atherosclerosis	↓ Nerve L-carnitine level
↑ Oxygen free radicals activity	↑ Protein kinase C activity

FIGURAS

Figure 1:

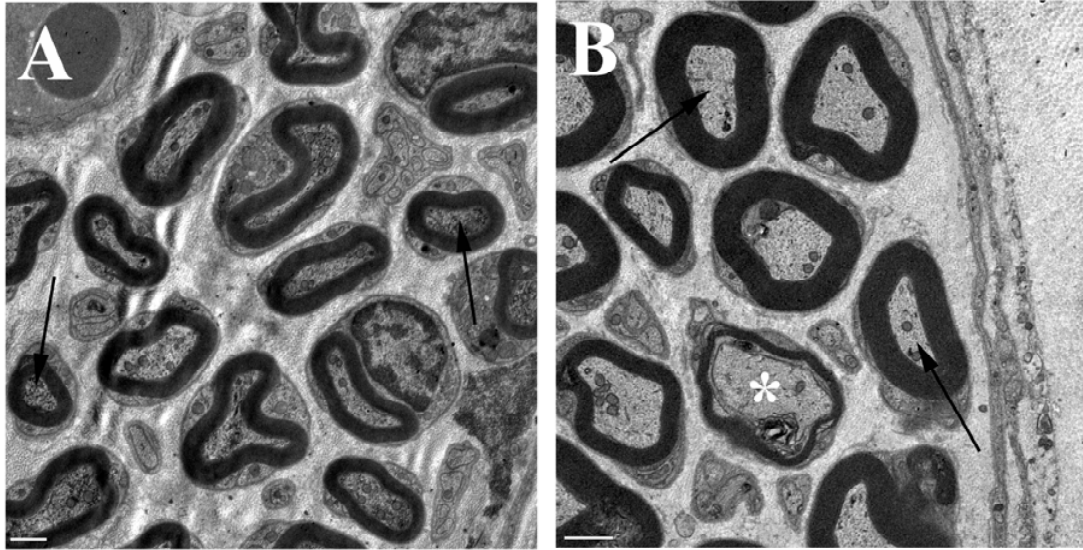


Figure 1: Representative electron-micrographs of the aortic depressor nerve of chronic STZ-induced diabetic rats showing axonal atrophy (arrows). Note in “B” the presence of an image suggestive of demyelination (*). Scale bar = 1 μ m.

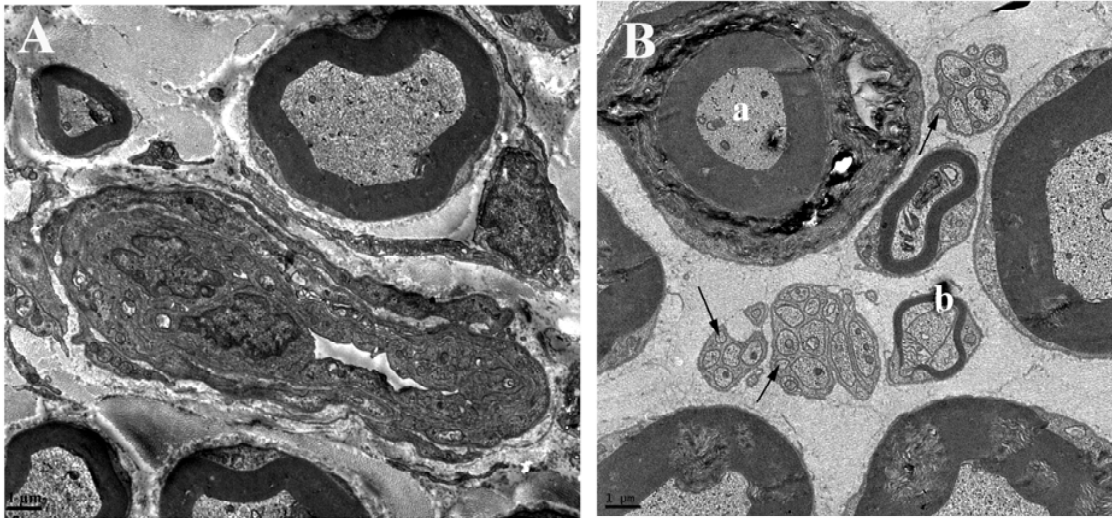
Figure 2:

Figure 2: Representative electron-micrographs of the phrenic nerve of chronic STZ-induced diabetic rats. “A” shows a collapsed endoneurial vessel with thickening of the wall. “B” shows a large myelinated fiber (a) with loose myelin sheath and signs of axonal atrophy. Note also, the presence of a small myelinated fiber (b) with a very thin and loose myelin sheath, suggestive of remyelination. Arrowheads point to micro-axons which were very common on the unmyelinated fibers. Scale bar = 1 μ m

Figure 3:

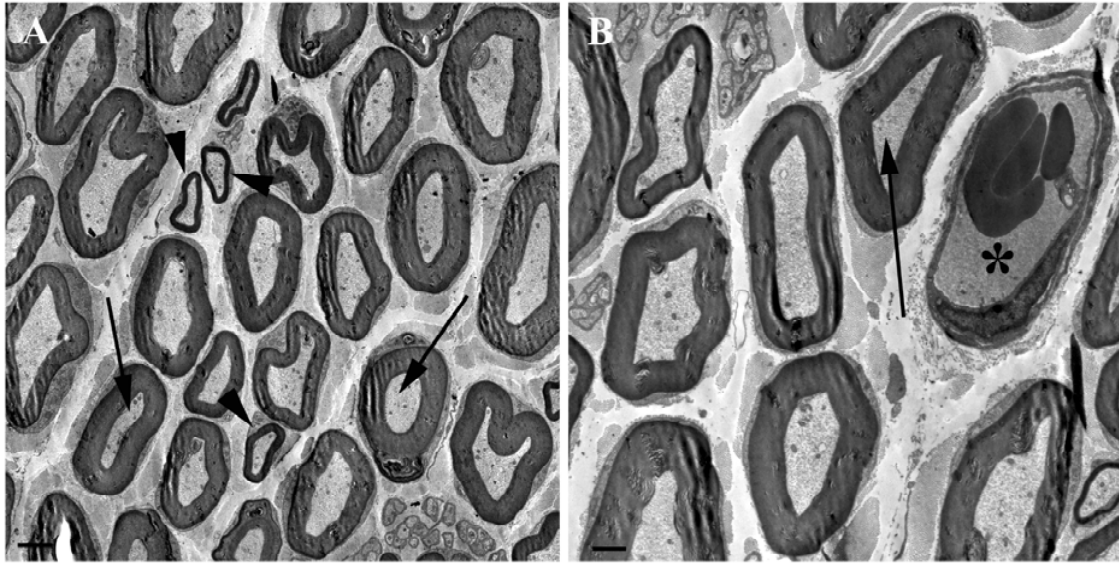


Figure 3: Representative electron-micrographs of the sciatic nerve of acute STZ-induced diabetic rats. Arrows show axonal atrophy of large myelinated fibers while the small myelinated ones (arrowheads) are normal. In “B”, a normal blood vessel is shown (*). Scale bar = $2\mu\text{m}$ and = $1\mu\text{m}$ in A and B, respectively.

Figure 4:

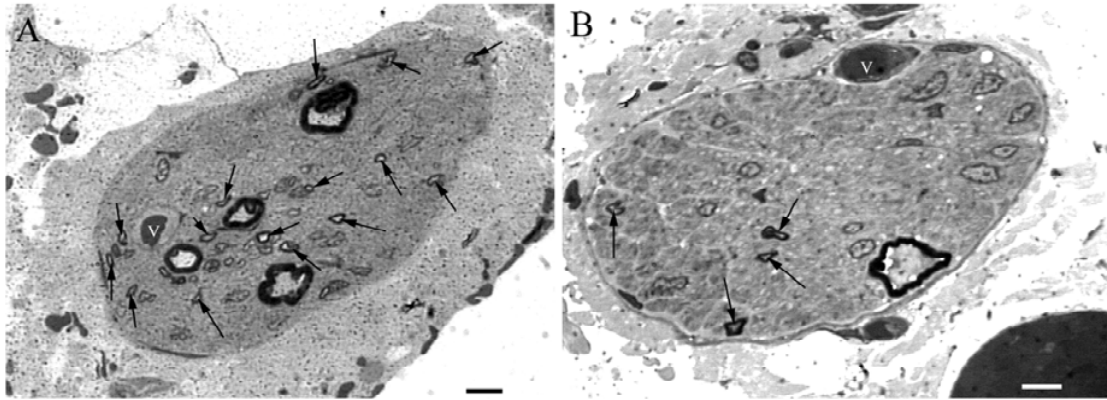


Figure 4: Renal nerves semi-thin cross sections of control (A) and chronic STZ-diabetic (B) animals. Note the larger number of small myelinated fibers (arrows) in the control nerve compared to the diabetic one. Toluidine blue staining, scale bar = 20 μ m.

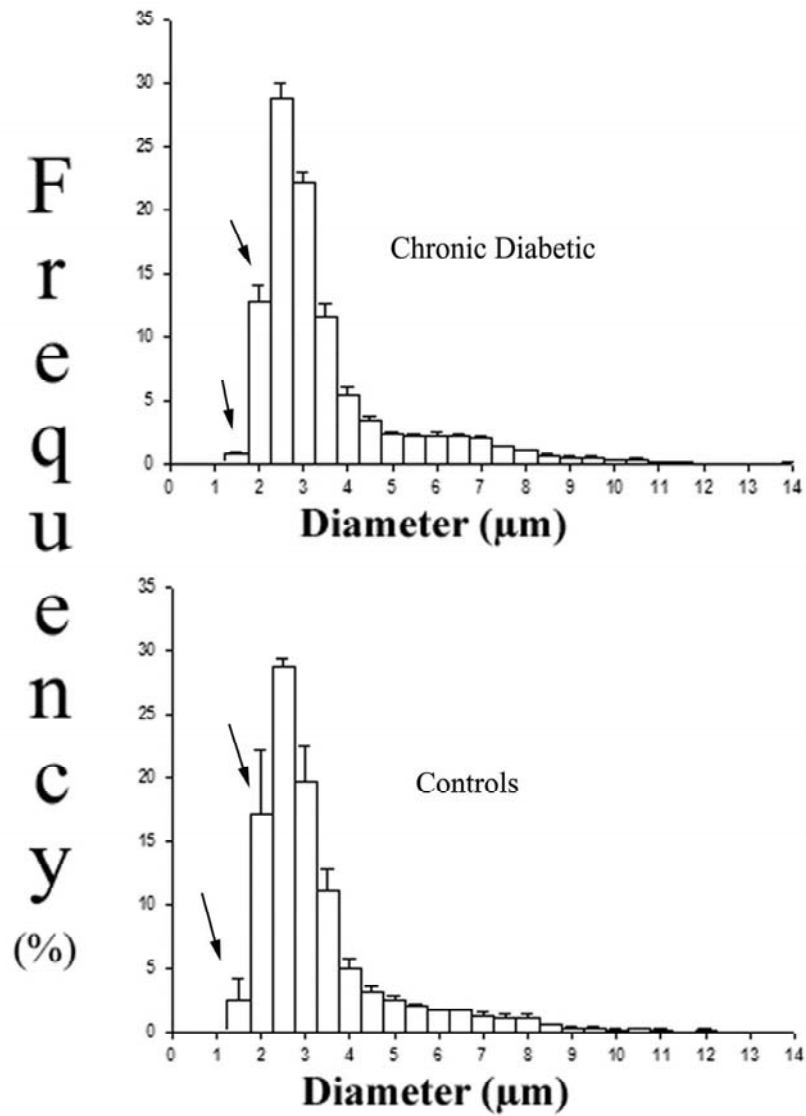
Figure 5:

Figure 5: Frequency distribution histograms of the myelinated fibers of the cervical vagus nerve in chronic STZ-diabetic animals (upper panel) compared to controls (lower panel). Although the shape of the distributions is very similar, note the reduction of the frequency of small myelinated fibers (arrows) on the diabetic animals' nerve.

4.3 – ARTIGO ORIGINAL INTERNACIONAL

Light and Transmission Electron Microscopy Studies of the Vestibulocochlear Nerve in Chronic Diabetic Rats

Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos^{1,2}, Valéria Paula Sassoli Fazan^{3,4*}, Kenneth Charles Moore⁴, Marcelo Moraes Valença¹

¹Department of Neuropsychiatry, Division of Neurology and Neurosurgery, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Electron Microscopy Section; Recife, PE, Brazil; ³*Department of Surgery and Anatomy, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ⁴Central Microscopy Research Facility, The University of Iowa, Iowa City, IA, USA.

Number of text pages: 13

Number of figures: 2

***Corresponding author and reprint request:** Valéria Paula Sassoli Fazan, M.D., Ph.D., Associate Professor, Department of Surgery and Anatomy, School of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900. Phone: + 55 16 3602-2501. FAX: + 55 16 3633-0017. E-mail: vpsfazan@yahoo.com.br or vpsfazan@gmail.com

Abstract:

It is widely described in the literature that diabetic patients present hearing impairment. Despite the histological alterations of the internal ear structures in these patients as in experimental models of diabetes, to the best of our knowledge, an histological evaluation of the vestibulocochlear nerve was not performed. In the present study, ultrastructural alterations were described and compared between a spinal nerve and a cranial nerve in rats with chronic induced diabetes. Male Wistar rats ($n = 12$), fed with standard diet from the animal care facility, with 42 days of age were used. Induced diabetic animals ($n=6$) were fasted for 12 hours and injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ - 60mg/kg) in a single dose. Control animals ($n=6$) received vehicle. Ten weeks after STZ injection the animals were perfused intracardially with Karnowsky solution. Right and left vestibulocochlear nerves were dissected and histologically processed for epoxy resin embedding. Samples were observed under the transmission electron microscope. Our results showed large myelinated fibers with morphological signs of axonal atrophy in the vestibulocochlear nerves. Our findings suggest that chronic STZ-induced diabetes in rats caused alterations in the myelinated fibers and Schwann cells, compatible to the classic diabetes signs and symptoms. Morphological alterations of the vestibulocochlear nerve in diabetes is being described for the first time and such information corroborate to a better understanding of changes in hearing observed in diabetic patients.

Keywords: Experimental diabetes, vestibulocochlear nerve, ultrastructure, myelinated fibers, axonal atrophy

Among several metabolic diseases, diabetes is the affection most commonly related with auditory disorders [17]. Studies about the relationship between diabetes and auditory impairment have shown variable results [16]. Nevertheless, the sensorineural hearing loss is one the most well documented signs of the hearing impairment in diabetic patients [5,11,17,21]. Despite the well documented sensorineural hearing loss in diabetic patients, there is still a controversy regarding the etiopathogenesis of this loss [5,17] as two main theories have been under investigation for many years: angiodysplasia and neuropathy. The angiodysplasia in diabetic patients with hearing loss was characterized by the thickening of the basement membrane, particularly on the stria vascularis vessels [6,15,18], also associated with endothelial proliferation and narrowing of vessels lumen. In terms of neuropathy, spiral ganglion neurons atrophy and demyelination on the 8th cranial nerve were observed in diabetic patients [17,18]. Animal models of diabetes have been widely used in biomedical studies because they offer promise of new insights into human diabetes [24]. Streptozotocin (STZ)–treated rats are an animal model of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) commonly used to study the peripheral nervous system alterations caused by diabetes even though the changes do not fully match the alterations observed under clinical conditions. Despite the failure to reproduce the widespread structural abnormalities in peripheral nerve observed in cases of established neuropathy in man, animal studies may be informative as to the changes that develop in the early stages of human diabetes [22,26]. In order to investigate the auditory impairment in diabetic animals, the brainstem acoustic evoked potentials were studied in STZ-diabetic rats [23] and mice [12], with similar results. But, to the best of our knowledge, an histological evaluation of the 8th cranial nerve (vestibulocochlear nerve) in STZ-diabetic rats was not yet performed. In this study we have undertaken morphologic studies of the 8th cranial nerve in untreated STZ-diabetic rats and nondiabetic control animals over a 12-week period. The presence of neuropathy was assessed by transmission electron microscopy in the mid segment of the nerves from both right and left sides.

Experiments were performed on male adult Wistar rats weighing 180-200 g at the beginning of the experiments. Animals were born and raised in a carefully regulated environment maintained at 21 to 23 °C, 40 to 70 % relative humidity and 12/12 hour light/dark cycle. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (60 mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) on overnight-fasted rats (N = 6). High plasma glucose levels, excessive daily water intake and a large increase in urinary volume confirmed the diabetic state. Control rats (N = 6) received vehicle (0.01 mol/l citrate buffer, pH 4.5) injected intraperitoneally. Fasting blood glucose (mg/dl) was determined with

a glucose analyzer (Beckman Instruments, Inc., Brea, California, USA) on the experimental day. Rats with fasting glucose levels higher than 150 mg/dl were considered diabetic.

Ten weeks after STZ injection the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (Nembutal, 40 mg/kg, i.p.) and perfused through the left ventricle first with a phosphate buffered saline 0.05 M solution, pH 7.4 and then with a 2.5 % glutaraldehyde and 4 % paraformaldehyde solution, in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. All procedures adhered to *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH Publication n° 80-23, revised 1978) and the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Pernambuco State, Brazil (protocol number 23076.015775/2005-14). Every effort was made to minimize the suffering of the animals and the number of animals used. The 8th cranial nerves from both sides were dissected from the spiral ganglion through the point they enter the brain stem. Nerves were placed in the fixative solution for an additional 12 hours. Thereafter, they were washed in cacodylate buffer, pH 7.2 and their distal segments (close to the brain stem) were excised and processed for epoxy resin embedding (EMbed 812®, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) as described elsewhere [1,4]. The methods for histological preparation of the nerves were previously described [7-9,25]. Briefly, before embedding, the nerves were oriented to permit semi-thin (0.5 to 1.0 µm thick) transverse sections of the fascicles, which were stained with 1% toluidine blue and observed under the oil immersion lens of an Axioimager M1 photo-microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The light microscopy study was carried out in order to check for the good quality of the histological preparation of the nerves to be studied. For the transmission electron microscopy studies, thin transverse sections were mounted on 2x1 slot grids, covered with formvar 0.5% solution, stained with lead citrate and uranyl acetate, and observed under the transmission electron microscope (JEM-1230, JEOL-USA, Inc., Peabody, MA, USA), equipped with a digital camera.

Body weight and plasma glucose level values for control and diabetic animals are shown in Figure 1. Control animals showed a significant increase in body weight from the day of injection to the day of the experiment. Diabetic animals also showed an increase in body weight during the 10-week period but there was a significant difference between diabetic compared to controls at the end of the experiment. Diabetic animals gained less weight compared to controls. As expected, plasma glucose levels were significantly increased in STZ-injected animals compared to controls during the 10-week experimental period.

All nerves included in this study showed good preservation of structures and consisted of a single fascicle in both experimental groups. The perineurium was found to be very thin, consisted of one layer of flattened connective tissue cells. The endoneurium consisted mainly of longitudinally oriented collagen fibers that occupied much of the space between the myelinated and unmyelinated axons (Figure 2). Most of the myelinated axons were of large size, intermingled with small caliber myelinated ones. Unmyelinated fibers were rarely seen. No morphological differences were observed between sides in the same group. STZ animals showed large myelinated fibers with clear signs of axonal atrophy (Figure 2) and swollen Schwann cells. Myelin infolds and balls of myelin were also present (Figure 2) as were swollen large axons. The unmyelinated fibers were more preserved, despite the presence of some Schwann cells devoid of axons and/or with vacuoles in the cytoplasm. No myelinated or unmyelinated axonal sprouts were evidenced. There was no evidence of endoneural capillaries damage in the vestibulocochlear nerves of STZ-injected animals. Pericytes were present and mostly normal.

Despite the fact that our study was limited to 10 weeks of diabetes, previous studies from our laboratory [10,24] have demonstrated that 15 days of diabetes is long enough for the observation of the first morphometric signs of axonal atrophy in this model of diabetes. The axon diameter is thought to be the most important parameter of conduction velocity [20]. Although we have not performed a nerve conduction velocity in this study, our ultrastructural observations clearly indicate a reduction of the axon size, what might contribute to the impaired function of brainstem acoustic evoked potentials observed in rodent models of diabetes [12,23]. Our results suggest that there is a vestibulocochlear neuropathy in the STZ-diabetic rat and that this may be an axonopathy, as suggested for other nerves in this diabetes model [2,3,10,19,22,26].

The STZ-diabetes model is widely used to investigate the experimental diabetic peripheral neuropathies [13,14,19,26-28] but few studies have performed a detailed assessment of either unmyelinated fibers or capillary morphology in this animal model [8] and the ultrastructure of the vestibulocochlear nerve was investigated for the first time. Rodrigues Filho and Fazan [22] demonstrated, by light microscopy, axonal atrophy on the phrenic nerves' large myelinated fibers. A posterior ultrastructural study of these nerves [8] added the evidence of small myelinated fiber neuropathy due to the STZ injection clearly associated to the endoneural vessels severe damage present on diabetic animals. The present study confirms the axonal atrophy observed by Rodrigues Filho and Fazan [22] but not the blood vessels damage. This could be due to the fact that our STZ-injected animals presented mild diabetes

(blood glucose levels between 150 and 250 mg/dl) compared to those on Fazan et al. [8] study (blood glucose levels above 350 mg/dl) and also that Fazan et al. [8] studied a longer period of induced diabetes than the present study. This comparison suggests that the blood vessel damage might be related to a higher blood glucose level and that the axonal atrophy observed in both investigations is related to the hyperglycemia. Morphological alterations of the vestibulocochlear nerve in experimental diabetes is being described for the first time and such information corroborates to a better understanding of changes in hearing observed in diabetic patients.

Acknowledgements

The authors thank the excellent technical support of Mr. Sérgio Silva and Mr. Rafael Padilha, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco and Mr. Raimundo Pimentel, FIOCRUZ, Recife, Brazil. The authors are also thankful to Drs. Fábio Brayner and Luiz Alves for the support during the use of the TEM at the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) and Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, Brazil. The authors appreciated the strong support from Drs. Raquel Costa-Cruz and Rubem Guedes. Grant sponsor: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the fellowship to CACV; Grant sponsor: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo); Grant numbers: 04-01390-8, 06/03200-7, 06/06362-8 and 09/50389-6; Grant sponsor: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia); Grant numbers: 202079/2007-4 and 300963/2009-2.

References

1. A.C.L. Alcântara, H.C. Salgado, V.P.S. Fazan, Morphology and morphometry of the vagus nerve in male and female spontaneously hypertensive rats, *Brain Res.* 1197 (2008) 170-180.
2. S. Bhoyrul, A.K. Sharma, D. Stribling, D.D. Mirrlees, R.G. Peterson, M.O. Farber, P.K. Thomas, Ultrastructural observations on myelinated fibres in experimental diabetes: effect of the aldose reductase inhibitor ponalrestat given alone or in conjunction with insulin therapy, *J. Neurol. Sci.* 85 (1988) 131-147.
3. S.T. Britland, A.K. Sharma, I.G. Duguid, P.K. Thomas, Ultrastructural observations on myelinated fibers in tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment, *Life Support Syst.* 3(Suppl.) (1985) 524-529.
4. S.A.R. Campos, L.S. Sanada, K.L. Sato, V.P.S. Fazan, Morphometry of sural nerves in young rats, *J. Neurosci. Methods* 168 (2008) 8-14.
5. O. Celik, S. Yalçın, H. Celebi, A. Oztürk, Hearing loss in insulin-dependent diabetes mellitus, *Auris Nasus Larynx* 23 (1996) 127-132.
6. O.A. Costa, Inner ear pathology in experimental diabetes, *Laryngoscope* 77 (1967) 68-75.
7. V.P.S. Fazan, X. Ma, M.W. Chapleau, A.A. Barreira, Qualitative and quantitative morphology of renal nerves in C57BL/6J mice, *Anat. Rec.* 268 (2002) 399-404.
8. V.P.S. Fazan, A.O. Rodrigues Filho, C.E. Jordão, K.C. Moore, Phrenic nerve diabetic neuropathy in rats: unmyelinated fibers morphometry, *J. Peripher. Nerv. Syst.* 14 (2009) 137-145.
9. V.P.S. Fazan, H.C. Salgado, A.A. Barreira, Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 (2001) H1560-H1564.
10. V.P.S. Fazan, H.C. Salgado, A.A. Barreira, Aortic depressor nerve myelinated fibers in acute and chronic experimental diabetes, *Am. J. Hypertens.* 19 (2006) 153-160.
11. S.A. Friedman, R.H. Schulman, S. Weiss, Hearing and diabetic neuropathy, *Arch. Intern. Med.* 135 (1975) 573-576.
12. B.N. Hong, T.H. Kang, Auditory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mouse, *Neurosci. Lett.* 431 (2008) 268-272.

13. J. Jakobsen, Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient diabetic rats, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 42 (1979) 509-518.
14. J. Jakobsen, K. Lundbaek, Neuropathy in experimental diabetes: an animal model, *Br. Med. J.* 2 (1976) 278-279.
15. M.B. Jorgensen, N.H. Bunch, Studies on inner ear and cranial nerves in diabetes, *Acta Otolaryngol.* 107 (1961) 179-182.
16. L.V.D. León-Morales, K. Jáuregui-Renaud, M.E. Garay-Sevilla, J. Hernández-Prado, J.M. Malacara-Hernández, Auditory impairment in patients with type 2 diabetes mellitus, *Arch. Med. Res.* 36 (2005) 507-510.
17. C.A.S. Maia, C.A.H. Campos, Diabetes mellitus as etiological factor of hearing loss, *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 71 (2005) 208-214.
18. K. Makishima, A.K. Tanaka, Pathological changes of the inner ear and central auditory pathways in diabetes, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 80 (1971) 218-228.
19. K.N. McCalum, A.K. Sharma, D.S. Blanchard, D. Stribling, D.J. Mirrlees, I.G. Duguid, P.K. Thomas, The effect of continuous subcutaneous insulin infusion therapy on morphological and biochemical abnormalities of peripheral nerves in experimental diabetes, *J. Neurol. Sci.* 74 (1986) 55-67.
20. P. Minwegen, R.L. Friede, Conduction velocity varies with osmotically induced changes of the area of the axons' profile, *Brain Res.* 297 (1984) 105-113.
21. A.B. Pessin, R.H. Martins, W.P. Pimenta, A.C. Somões, A. Marsiglia, A.V. Amaral, Auditory evaluation in patients with type 1 diabetes, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 117 (2008) 336-370.
22. O.A. Rodrigues Filho, V.P.S. Fazan, Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats, *J. Neurosci. Methods* 151 (2006) 131-138.
23. R. Rubini, F. Biasiolo, F. Fogarolo, V. Magnavita, A. Martini, M.G. Fiori, Brainstem auditory evoked potentials in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 16 (1992) 19-25.
24. H.C. Salgado, R. Fazan Jr., V.P.S. Fazan, V.J. Dias da Silva, A.A. Barreira, Arterial baroreceptors and experimental diabetes, *Ann. NY Acad. Sci.* 940 (2001) 20-27.
25. K.L. Sato, J.M. Carmo, V.P.S. Fazan, Ultrastructural anatomy of the renal nerves in rats, *Brain Res.* 1119 (2006) 94-100.
26. A.K. Sharma, I.G. Duguid, D.S. Blanchard, P.K. Thomas, The effect of insulin treatment on myelinated nerve fiber maturation and integrity and on body growth in streptozotocin diabetic rats, *J. Neurol. Sci.* 67 (1985) 285-297. 1975

27. A.K. Sharma, P.K. Tomas, A.F de Molina, Peripheral nerve fiber size in experimental diabetes, *Diabetes* 26 (1977) 689-692.
28. K. Sugimura, A.J. Windebank, V. Natarajan, E.H. Lambert, E.H. Schmid, P.J. Dyck, Interstitial hyperosmolarity may cause axis cylinder shrinkage in streptozotocin-diabetic nerve, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 39 (1980) 710-721.

FIGURAS

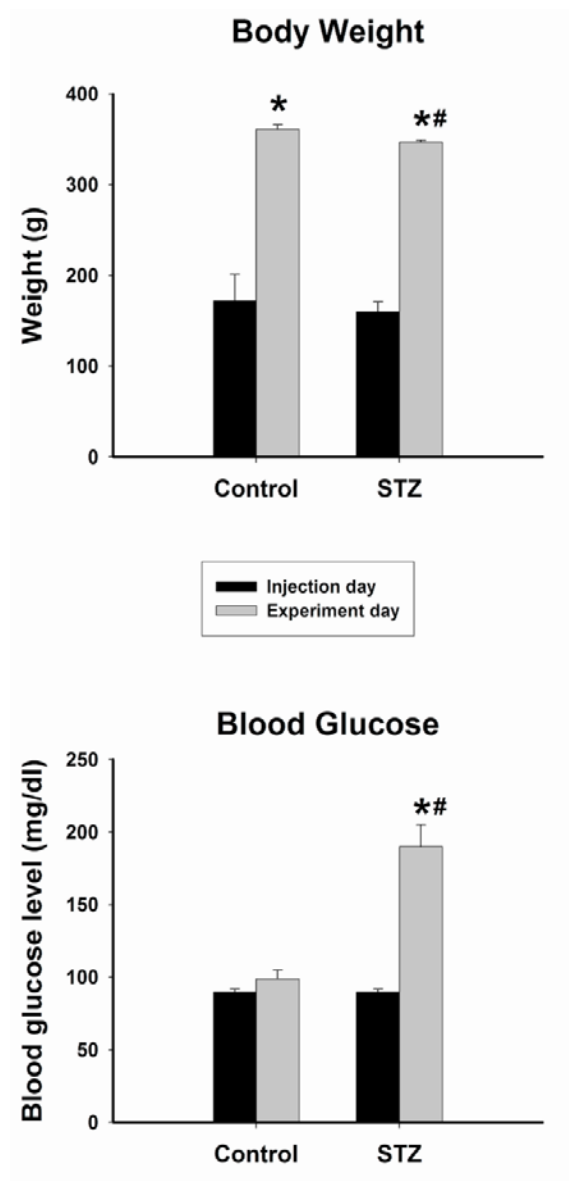


Figure 1: *Upper panel:* Body weight on the day of injection (streptozotocin (STZ) or vehicle) (black bars) and 10 weeks later (gray bars). *Lower panel:* Fasting blood glucose level on the day of injection (STZ or vehicle) (black bars) and 10 weeks later (gray bars). * indicates significant difference compared to the day of injection. # indicates significant difference compared to control group (N = 6 for both groups).

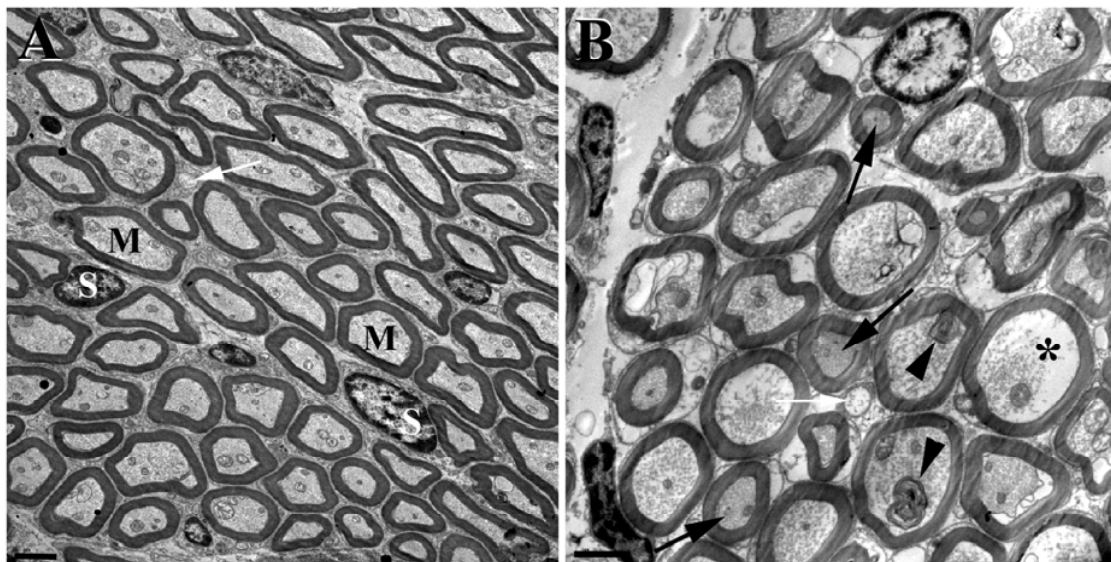


Figure 2: Electron micrographs of vestibulocochlear nerves from male adult Wistar rats. In the endoneural space of control nerves (A), note the presence of large myelinated fibers (M), Schwann cell nuclei (S) and few unmyelinated fibers (white arrow). The diabetic animals' nerves (B) showed myelinated fibers with clear signs of axonal atrophy (black arrows), myelin infolds (arrowheads) and axoplasmic swelling (*). The white arrowhead points to a normal unmyelinated fiber. Bars = 2 μ m.

5. CONCLUSÕES

Foi demonstrado no presente estudo que no modelo experimental do diabetes mellitus crônico do tipo I que como consequência do diabetes fibras mielínicas grandes com sinais de atrofia e degeneração axonal foram encontradas tanto no nervo isquiático quanto no nervo vestibulo-coclear. Algumas fibras mielínicas de pequeno diâmetro dos nervos isquiáticos mostraram sinais de degeneração da bainha de mielina, caracterizando uma neuropatia do tipo mista. Em ambos os nervos, células de Schwann com citoplasma edemaciado estavam presentes.

O diabetes crônico induzido pela STZ em ratos provocou alterações das fibras mielínicas e das células de Schwann, alterações essas provavelmente relacionadas com sinais e sintomas clássicos da neuropatia diabética. As alterações observadas no nervo espinal (nervo isquiático) são comparáveis às observadas no nervo craniano (nervo vestibulo-coclear). Nossos resultados sugerem que existe uma neuropatia do nervo vestibulo-coclear no rato diabético crônico induzido pela STZ na forma de axonopatia ou neuronopatias. Alterações morfológicas ultraestruturais do nervo vestibulo-coclear no diabetes experimental em ratos estão sendo descritas pela primeira vez na literatura e podem corroborar para o melhor entendimento das alterações da audição encontradas em pacientes diabéticos.

REFERÊNCIAS

ALADAG, I.; EYIBILEN, A.; GÜVEN, M.; ATIŞ, O.; ERKOKMAZ, U. Role of oxidative stress in hearing impairment in patients with type two diabetes mellitus. **Journal of Laryngology and Otology** 123(9):957-63, 2009.

COMI, G. Evoked potentials in diabetes mellitus. **Clinical Neuroscience** (6):374-9, 1997.

ECKERSLEY, L.; ANSSELIN, A. D.; TOMLINSON, D. R. Effects of experimental diabetes on axonal and Schwann cell changes in sciatic nerve isografts. **Molecular Brain Research** 92(1-2):128-37, 2001.

FAZAN, V. P.; RODRIGUES FILHO, O. A.; JORDÃO, C. E.; MOORE, K. C. Phrenic nerve diabetic neuropathy in rats: unmyelinated fibers morphometry. **Journal of the Peripheral Nervous System** 14(2):137-45, 2009.

FRIEDMAN, S. A.; SCHULMAN, R. H.; WEISS, S. Hearing and diabetic neuropathy. **Archives of Internal Medicine** 135(4):573-6, 1975.

FUKUSHIMA, H.; CUREOGLU, S.; SCHACHERN, P. A.; KUSUNOKI, T.; OKTAY, M. F.; FUKUSHIMA, N.; PAPARELLA, M. M.; HARADA, T. Cochlear changes in patients with type 1 diabetes mellitus. **Otolaryngology Head and Neck Surgery** 133(1):100-6, 2005.

FUKUSHIMA, H.; CUREOGLU, S.; SCHACHERN, P. A.; PAPARELLA, M. M.; HARADA, T.; OKTAY, M. F. **Archives Otolaryngology Head and Neck Surgery** 132(9):934-8, 2006.

HILDEBRAND, M. S.; NEWTON, S. S.; GUBBELS, S. P.; SHEFFIELD, A. M.; KOCHHAR, A.; SILVA, M. G.; DAHL, H. H.; ROSE, S. D.; BEHLKE, M. A.; SMITH, R. J. Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. **Molecular Therapy** 16(2):224-36, 2008.

HONG, B. N.; KANG, T. H. Auditory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mouse. **Neuroscience Letters** 6;431(3):268-72, 2008.

JERONIMO, A.; JERONIMO, C. A.; RODRIGUES FILHO, O. A.; SANADA, L. S.; FAZAN, V. P. Microscopic anatomy of the sural nerve in the postnatal developing rat: a longitudinal and lateral symmetry study. **Journal of Anatomy** 206(1):93-9, 2005.

KALE, B.; YÜKSEL, F.; CELİKÖZ, B.; SIRVANCI, S.; ERGÜN, O.; ARBAK, S. Effect of various nerve decompression procedures on the functions of distal limbs in streptozotocin-induced diabetic rats: further optimism in diabetic neuropathy. **Plast. Reconstr. Surg.** 111:2265-2272, 2003.

KALICHMAN, M. W.; POWELL, H. C.; CALCUTT, N. A.; MIZISIN, A. P. Mast cell degranulation and blood-nerve barrier permeability in rat sciatic nerve after 7 days of hyperglycemia. **American Journal of Physiology** 268(2 Pt 2):H740-8, 1995.

KANDLER, K.; CLAUSE, A.; NOH, J. Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits. **Nature Neuroscience** 12(6):711-7, 2009.

KENNEDY, J. M.; ZOCHODNE, D. W. Influence of experimental diabetes on the microcirculation of injured peripheral nerve: functional and morphological aspects. **Diabetes** 51(7):2233-40, 2002.

KESSER, B. W.; LALWANI, A. K. Gene therapy and stem cell transplantation: strategies for hearing restoration. **Advances in Otorhinolaryngology** 66:64-86, 2009.

MAIA, C. A. S.; CAMPOS, C. A. H. *Diabetes Mellitus* como causa de perda auditiva. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** 71, 2:208-214, 2005.

MEDORI, R.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; JENICH, H.; GAMBETTI, P. Changes in axon size and slow axonal transport are related in experimental diabetic neuropathy. **Neurology** 38(4):597-601, 1988.

MERCHANT, S. N.; ROSOWSKI, J. J. Auditory Physiology. In: **Glasscock-Shambaugh surgery of the ear**. Eds. Glasscock, M. E. and Gulya, A. J. BC Decker Inc., Fifth Edition, p 59-82, 2003.

MYERS, S.F. Myelin-sheath abnormalities in the vestibular nerves of chronically diabetic rats. **Otolaryngology Head and Neck Surgery** 119(5):432-8, 1998.

OBROSOVA, I. G. Diabetes and the peripheral nerve. **Biochimica et Biophysica Acta** 1792(10):931-40, 2009.

PESSIN, A. B.; MARTINS, R. H.; PIMENTA, W. P.; SIMÕES, A. C.; MARSIGLIA, A.; AMARAL, A. V. Auditory evaluation in patients with type 1 diabetes. **Annals of Otology, Rhinology and Laryngology** 117(5):366-70, 2008.

REBSCHER, S. J.; HETHERINGTON, A. M.; SNYDER, R. L.; LEAKE, P. A.; BONHAM, B. H. Design and fabrication of multichannel cochlear implants for animal research. **Journal of Neuroscience Methods** 166(1):1-12, 2007.

RODRIGUES FILHO, O. A.; FAZAN, V. P. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. **Journal of Neuroscience Methods** 151(2):131-8, 2006.

SERAFÍN, A.; MOLÍN, J.; MÁRQUEZ, M.; BLASCO, E.; VIDAL, E.; FORADADA, L.; AÑOR, S.; RABANAL, R. M.; FONDEVILA, D.; BOSCH, F.; PUMAROLA, M. Diabetic neuropathy: Electrophysiological and morphological study of peripheral nerve degeneration and regeneration in transgenic mice that express IFN β in beta cells. **Muscle & Nerve** 13 ,2009. *In Press*.

SUGIMURA, K.; WINDEBANK, A. J.; NATARAJAN, V.; LAMBERT, E. H.; SCHMID, H. H.; DYCK, P. Interstitial hyperosmolarity may cause axis cylinder shrinkage in streptozotocin diabetic nerve. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** 39(6):710-21, 1980.

VASCONCELOS, C. A. C. Aspectos descritivos e quantitativos da anatomia macroscópica e microscópica do nervo vestibulo-coclear de cobaias. **Dissertação de Mestrado**. Área de concentração: Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 75p, 2005.

VASCONCELOS, C. A. C.; OLIVEIRA, L. M.; EVANGELISTA, R. A.; COLAFÊMINA, J. F. Efeitos das variações de polaridades nos potenciais evocados auditivos de ratos durante o desenvolvimento. **Neurobiologia** 71(3) 67-73, 2008.

WANG, Y.; SCHMEICHEL, A. M.; IIDA, H.; SCHMELZER J. D.; LOW, P. Ischemia-reperfusion injury causes oxidative stress and apoptosis of Schwann cell in acute and chronic experimental diabetic neuropathy. **Antioxidants & Redox Signaling**, Mary Ann Liebert, Inc. 7(11-12):1513-20, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A



9th Inter-American Congress of Electron Microscopy

PROGRAM

Cusco 23-28
September 2007

CUSCO Convention Center

www.ciasem2007.com

ULTRASTRUCTURAL ANALYSES OF THE VESTIBULOCOCHLEAR NERVE IN CONTROL WISTAR RATS

Vasconcelos, C. A. C.^{1,3,4*}; Alves, L. C.^{2,3}; Brayner, F. A.^{2,3}; Silva, S. S.^{2,3}; Pimentel, R. N.²; Lima Filho, J. L.³; Guedes, R. C. A.⁴ and Valença, M. M.¹

^{1*}Departamento de Neuropsiquiatria - Divisão de Neurologia e Neurocirurgia, 50670-420, CCS/HC-UFPE.

Recife-PE, Brazil. Phone/Fax: +55 81 2126-8539. E-mail: cacv@ufpe.br

²Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ).

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE, Setor de Microscopia Eletrônica.

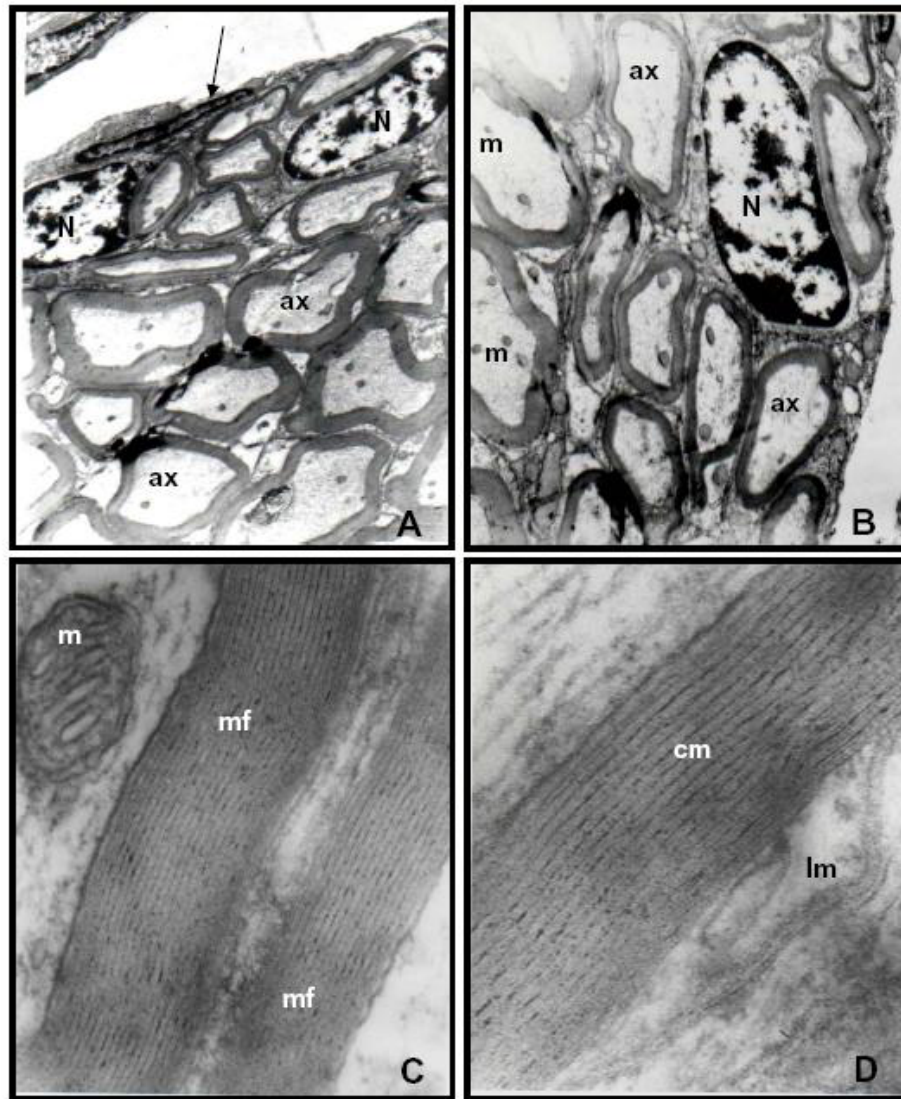
⁴Departamento de Nutrição/UFPE.

The vestibulocochlear (VIIIth cranial nerve) nerve of rats have special features not common for sensory peripheral nerves in general. There are no detailed reports on the morphological characteristics of the VIII nerve in malnourished and diabetics adult rats. This is a descriptive study that shows normal parameters that are useful in experimental models. Two control rats were perfused with 2.5% glutaraldehyde and 4.0% paraformaldehyde in cacodilate buffer 0.1M (Karnovsky solution). The right (n=2) and left (n=2) nerves were dissected in the medio-distal region, post-fixed in 1% osmium tetroxide and embedded in 812 epoxy resin. Semithin (0.38 μ m) transverse sections were stained with 1% toluidine blue for light microscopy study and ultrathin (50 nm) transverse sections were stained with 5% uranyl acetate and lead citrate for transmission electron microscopy (TEM). The descriptive histology and the topographical aspects of the medio-distal region of the nerve were analyzed. Both, the cochlear and the vestibular nerves join to form the vestibulocochlear nerve with a Y shape. The nerve is widely vascularized and presents a complete mixture of the vestibular and cochlear myelinated fibers when the VIII nerve fascicle is constituted. The myelinated fibers are longitudinally oriented. The eighth nerve of rat had compact myelin, which was composed of major dense lines with regular periodicity, showing typical axonal units and cytoplasm of Schwann cells, as well as several nuclei (Figures A-D). Similar results were gotten by Tatsuoka [1], Naito [2] and Vasconcelos [3] working with guinea pig and hamster respectively. The vestibulocochlear nerve of the rat is a special afferent nerve, differing of others peripheral nerves (sensitive and motor) in its main anatomic and physiological characteristics, compared to others nerves from mammals. The rat is an excellent model for the vestibulocochlear nerve neuropathy studies once it is similar to the human nerve, as well as others peripheral nervous system diseases and diabetes disease.

Acknowledgements: CPqAM/FIOCRUZ, LIKA/UFPE, CNPq and CAPES.

References:

- [1] H. Tatsuoka, T. Nagano, T. Chiba. Characteristics of the myelin sheath membrane of the spiral ganglion cell and the cochlear nerve of guinea pig. *Journal of Electron Microscopy*, 1 (1997) 103-106.
- [2] R. Naito, et al. Myelin-deficiency in the cochlear nerve of the 'bt' mutant hamster. *Hearing Research*, 176 (2003) 17-24.
- [3] C. A. C. de Vasconcelos. Macro and microscopic anatomical aspects of the guinea pig VIIIth cranial nerve. Master Thesis in Neurosciences. Dept. of Neurology, University of São Paulo/Ribeirão Preto (2005) 75p.



Figures A-D: Electron micrographs of transverse sections of the eighth nerve of Wistar rat with axoplasmic cytoskeleton well organized and dense lines were observed in myelin sheaths. **A)** Note the clustering of myelinated axons (ax) surrounded by Schwann cells with a large nucleus (N). Observed presence elongated nucleus (thin arrow). 6.000x. **B)** Myelin sheath surrounding the axons. Note the presence of several mitochondrias (m) into axoplasm. The large nucleus of Schwann cell (N). 9.000x. **C)** Magnification of two myelinated fibers (mf) showing compact density between nervous fibers. Observed a presence of mitochondria (m). 120.000x. **D)** Magnification of the myelin sheath with presence of the compact myelin (cm) and loose myelin (lm) of the internal mesaxon. 210.000x.

APÊNDICE B

ARQUIVOS DE NEURO-PSIQUIATRIA



JORNAL OFICIAL DA ACADEMIA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA

VOL 66 SUPLEMENTO 2 AGOSTO 2008 BELÉM PA BRASIL

XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEUROLOGIA

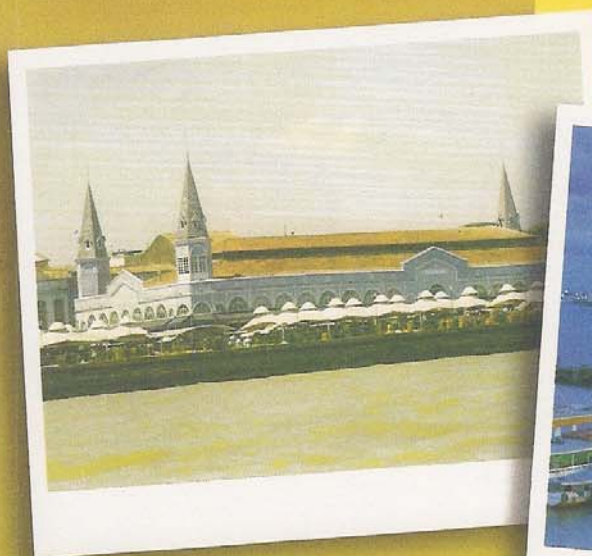
ÉTICA, RESPONSABILIDADE SOCIAL

VIII Encontro Luso-brasileiro de Neurologia

I Encontro Pan-Amazônico de Neurologia Tropical

VIII Encontro da Sociedade Brasileira de Investigação Neurológica - SBIN

16 a 21 de agosto de 2008 | Belém | PA | Brasil
Hangar, Centro de Convenções e Feiras da Amazônia



iniciou-se o metotrexato via oral. Três dias após o início da quimioterapia e iniciado metotrexato intramuscular, em 2003 a paciente deu entrada novamente no hospital com pneumonia grave adquirida na comunidade. Foi confirmado o agente etiológico. Deu entrada no hospital e morreu por treze dias, sendo reanimada e distribuído, subsequente a imunossupressão e emergência de pneumonia comunitária grave. Ainda nessa internação, desenvolveu uma vasculite. A vasculite eosinofílica de Churg, com diagnóstico dificultado pela diversidade de sintomas. A paciente em questão apresentava sintomatologia de aprofundamento propedêutico da asma, com sintomas de tosse. O relato desse caso visa discutir as possibilidades e a importância da apresentação neurológica de doenças sistêmicas.

P-724

ANÁLISE DO NERVO FRÊNICO DE RATOS COM DIABETE EXPERIMENTALMENTE

AUTOR(ES): C. E. R.; RODRIGUES FILHO, O. A.
INSTITUIÇÃO: DEPARTAMENTO DE RIBEIRÃO PRETO E UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIBEIRÃO PRETO

O nervo frênico tem sido cada vez mais reconhecida e estudada em ratos, quanto à paralisia bilateral do diafragma, bem como a paralisia do diafragma. Entretanto, estudos sobre a morfológica do nervo frênico, demonstrando a presença de um dos fascículos analisados. Esse estudo foi realizado com o uso de microscopia de luz e os autores afirmam que a análise morfológica do nervo frênico ainda não está bem estabelecida, com o estudo de material humano. O nervo frênico, que pode facilmente ser biopsiado, a proposta de se realizar um estudo experimental, uma vez que animais podem ser utilizados como modelos. Estudos em nível de microscopia de luz do nervo frênico em nosso laboratório para investigar a presença de alterações morfológicas do nervo frênico, induzido experimentalmente que as fibras mielínicas, principalmente as fibras mielínicas do diabetes crônico experimental, apresentando alterações morfológicas. Não existem relatos sobre avaliações ultraestruturais das fibras mielínicas do nervo frênico em diabetes crônico experimental. **Métodos:** Os segmentos do nervo frênico de ratos com diabetes crônico (12 semanas de diabetes) foram preparados com técnicas histológicas e analisados com o uso de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados foram observados em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL Ltda.), acoplado a uma câmera de vídeo, com uma câmera CCD 1000 2k x 2k CCD, Gatan. Os resultados foram observados em capilares endoneurais formados entre os grupos experimentais. **Resultados:** As alterações ultraestruturais significativas da membrana basal dos axônios mielínicos se mostraram afetadas. As fibras mielínicas de grande calibre apresentaram afrouxamento da bainha de mielina. Observamos a presença de uma bainha muito espessa em relação a fibras mielínicas com sinais de desmielinização. **Conclusões:** O diabetes crônico, com sinais de uma

barreira hemato-neural. A expressão de metaloproteinases foi estudada na fibrose do nervo periférico na neuropatia hanseniana, utilizando-se biópsias de nervo periférico. Os grupos estudados foram G1: biópsias de nervo com aspecto normal mas de pacientes com a FNP, diagnosticada pela amplificação de DNA de *M. leprae* (PCR) ou pela presença de anticorpos anti-PGL1 no soro; G2: biópsias de pacientes com FNP e que se mostravam com infiltrado inflamatório no nervo; G3: biópsias de pacientes FNP, mostrando fibrose do nervo; G4: pacientes com a FNP, mostrando simultaneamente infiltrado inflamatório e fibrose. **Resultados:** Expressão de mRNA: o grupo G2 expressou altos níveis de MMP2 no grupo G2 em relação aos grupos G1 e G3 e G4. A MMP9 foi altamente expressa nos grupos G2 e G4, sendo mais baixa no grupo G3. A expressão de TIMP1 foi mais elevada no grupo G2, mantendo-se um pouco menos alta no grupo G4, mas com baixa expressão no grupo G3. **Expressão imuno-histoquímica:** o grupo G1 (normal) mostrou expressão de MMP2, MMP9 e TIMP1 nas células de Schwann e em axônios, enquanto o grupo G2 mostrou expressão de MMPs e de TIMP1 em células inflamatórias (macrófagos) e também nas células de Schwann e axônios remanescentes e que ainda não haviam sido destruídos pelo processo neurítico. O grupo G4 expressou MMPs em células de Schwann e em axônios e TIMP1 em células inflamatórias. Esses resultados sugerem que atividades opostas de MMPs e de TIMP1 contribuem para a configuração final da matriz extracelular fibrótica dos nervos periféricos acometidos pela hanseníase. **Palavras-chaves:** metaloproteinases, fibrose, neuropatia periférica, hanseníase.

P-726

ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS ADULTOS DIABÉTICOS

AUTOR(ES): VASCONCELOS, C. A. C.^{1,2,3*}
CO-AUTOR(ES): SANTOS, E. A. B.^{2,3}; ALVES, L. C.^{2,3}; FAZAN, V. P. S.⁴; PADILHA, R. J. R.³; GUEDES, R. C. A.³; VALENÇA, M. M.¹

INSTITUIÇÃO: ¹DEPARTAMENTO DE NEUROPSQUIATRIA/UFPE, 50.670-420, RECIFE-PE, BRASIL. ²DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA/FIOCRUZ - RECIFE-PE. ³LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI (LIKA) - UFPE. ⁴CENTRAL MICROSCOPY RESEARCH FACILITY, UNIVERSITY OF IOWA/USA. ⁵DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO/UFPE.

Introdução: O nervo isquiático é formado por fibras aferentes somáticas e eferentes somáticas e autonômicas. É o maior nervo do corpo humano e do rato, distribuindo-se extensamente aos membros inferiores. No rato, o nervo possui três divisões: sural, fibular e tibial. Este nervo, bem como suas divisões, podem ser afetados por neuropatias, inclusive a diabética, em determinadas condições clínicas ou experimentais. No presente estudo, foram descritas alterações ultraestruturais do nervo isquiático de ratos adultos, com diabetes induzido experimentalmente. **Métodos:** Foram utilizados 6 ratos adultos, machos, da linhagem Wistar. Três animais, com 42 dias de idade, foram injetados 60 mg/kg de estroptozotocina (STZ), i.p., após um jejum prévio de 12 horas. Três animais controles receberam injeção de tampão citrato. A glicemia foi aferida semanalmente até o dia do experimento. Aos 120 dias de idade, os animais foram perfundidos com solução de Karnovsky em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e, a seguir, seus nervos isquiáticos direito e esquerdo foram dissecados na coxa, antes da ramificação terminal, pós-fixados com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% e incluídos em resina epóxi Poly/Bed 812[®]. Os fragmentos foram cortados em seções transversais semitinas seriadas, com uma espessura de 0,38 µm e corados com azul de toluidina para estudo em microscopia de luz. Seções transversais ultrafinas, de 50 nm, foram contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo, para análise à microscopia eletrônica de transmissão (MET). **Resultados:** Discretas alterações foram encontradas no nervo isquiático de ratos controles. As fibras mielínicas apresentaram bainhas de mielina intactas, as fibras mielínicas são frequentes, os fascículos são vascularizados, porém algumas células com granulações foram encontradas entre as fibras mielínicas endoneurais. No grupo hiperglicêmico, foi intensa a presença de células do sistema vascular no endoneuro do nervo, com presença de fibroblastos e macrófagos, bem como de células inflamatórias dentro da luz dos vasos, inclusive linfocitárias. Em algumas fibras mielínicas evidenciou-se sinais de degeneração axonal, bem como possíveis degenerações da mielina em algumas fibras de pequeno calibre. **Conclusões:** Nossos achados sugerem que o diabetes induzido pela STZ provocou uma reação inflamatória no nervo isquiático de ratos, o que poderia ocasionar os sinais e sintomas clássicos das neuropatias diabéticas. **Apoio:** CPqAM/FIOCRUZ, LIKA/UFPE, CAPES, CNPq.

P-727

AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR EM PACIENTES COM NEUROPATIAS IDIOPÁTICAS DE FIBRAS FINAS

AUTOR(ES): COUTINHO, B. M.; NASCIMENTO, O.
CO-AUTOR(ES): FREITAS, M.; PUPE, C.; QUINTANILHA, G.; MAROCO, M.; MOREIRA, J.; PORTO, E.; MANTEZUMA, G.; CRESPO, E.; CARDOSO, F.
INSTITUIÇÃO: UFF

alterações sensitivas foram de caráter predominantemente distais em 28,57%. O período entre o diagnóstico e o início dos sintomas e a estabilização da progressão da doença foram de 23 (54,76%), 16 (36,36%) e 11 (26,20%) meses, respectivamente. Das 16 pacientes foi evidenciado distúrbio de consciência em 61,90% dos casos, sendo 11 (26,20%) não apresentaram encefalopatia orgânica. O envolvimento de nervos cranianos foi observado em 6 (14,28%) pacientes. Sinais de comprometimento de taquicardia, arritmia, sudorese e distúrbios de condução foram observados em 54,76% dos casos, sendo os mais comuns a taquicardia. O comprometimento do sistema nervoso central foi observado em 3 (6,82%) pacientes, sendo a síndrome de confusão mental e síndrome de hipotensão ortostática. O tratamento com imunoglobulina foi realizado em 11 (26,20%) pacientes, todos os quais receberam imunoglobulina intravenosa com uma média de internação de 26,7 dias. O tratamento cirúrgico foi realizado em 14 (40,42%) pacientes, permanecendo em 6 (14,28%) casos, devido a infecção, abscesso e sepse. **Conclusão:** A variedade de manifestações clínicas da SGB impõe que sejam estabelecidos critérios diagnósticos. Destacam-se, ainda as manifestações sistêmicas relacionadas à gravidade, sendo fundamental o acompanhamento, a fim de obter-se um melhor prognóstico.

P-781

MOERCH-WOLTMAN
 LOPES, R. DORSA, P. G.; MONTANARO, A. C.; BRONER, I. S.; GUIMARÃES, M. V. C.; CECILIO, S. B.; MOREIRA, E. M.; ALVES, R. V.; COSTA, J. P. O.; SOUZA, J. P. O.

A síndrome de Moersch-Woltman é representada por rigidez muscular progressiva. Apresenta distribuição igual entre os sexos. Os sintomas da Síndrome do Homem Rígido são: (1) Rigidez muscular adiais; (2) Evolução lenta para músculos prostrados e endurecidos; (3) Deformidade fixa da coluna, distúrbios permanentes; (4) Espasmos precipitados por sobrecarga física, distúrbios emocionais; (5) Achados sob o exame motor e sensitivo; (6) Intelecto e afetividade preservados. A distinção da Síndrome de Stiff-Person é feita pela distribuição dos sintomas. Afetando nesta parte a parte superior e inferior e apresentando mioclonias e náuseas. O tratamento com Imunoglobulina Humana é eficaz. Também podendo ser usado fármacos imunossupressores. **Palavras-chave:** Síndrome de Moersch-Woltman, Síndrome do Homem Rígido, Imunoglobulina humana, glutamato. **Objetivo:** Relato de caso. **Relato de Caso:** SM, 50 anos, branca, solteira, natural de São Paulo. Queixando-se de rigidez muscular progressiva há 10 anos vem evoluindo com rigidez muscular progressiva e dor. Nos últimos meses a rigidez muscular está aumentando em intensidade, dificultando a manutenção da postura. Não consegue mais manter ortostase. Apresenta distúrbios de consciência, de diabetes mellitus, hipertensão arterial, extremamente ansiosa; lordeose cervical, dor no abdome, região lombar e coxas; rigidez muscular progressiva e estruturas musculares abdominais, lombares e coxas. **Tratamento:** Imunoglobulina Humana intravenosa, 75mg, de 12/12h, VO. Condições clínicas coincidentes com a clínica e a ressonância magnética.

P-782

RELATO DE CASO
 LOPES, R. DORSA, P. G.; KHOURY, E. D. T.; SILVA, H. S. L.; GUIMARÃES, M. V. C.; COSTA, J. P. O.; SOUZA, J. P. O.; LIMA-MACAPÁ-AP

A síndrome de Moersch-Woltman, organomegalia, endócrina, distúrbios de consciência, de diabetes mellitus, hipertensão arterial, extremamente ansiosa; lordeose cervical, dor no abdome, região lombar e coxas; rigidez muscular progressiva e estruturas musculares abdominais, lombares e coxas. **Tratamento:** Imunoglobulina Humana intravenosa, 75mg, de 12/12h, VO. Condições clínicas coincidentes com a clínica e a ressonância magnética.

um caso de Síndrome de POEMS diagnosticado na enfermaria de Clínica Médica do HCAL. **Relato de Caso:** F.T.C., 54 anos, pardo, sexo masculino, casado, natural de Mazagão-AP, previamente hígido, história de 7 meses de paralisia de MMII com dificuldade progressiva para deambular, apresentava astenia, hiporexia, com perda ponderal de 6 kg em 7 meses, sudorese noturna, hiperemia e hiperidrose. Ao exame físico apresentava-se hipocorado, com ginecomastia bilateral e lesões hipercrômicas em dorso, hepatomegalia e edema de MMII. O exame neurológico mostrou areflexia difusa, déficit motor grau IV em MMII, hipostesia em bota e luva. Exames laboratoriais mostraram níveis elevados de TSH e ACTH, com cortisol plasmático e aldosterona normais. LCR evidenciou proteinorraquia (794 mg/dl). O teste de imunofixação detectou a presença de proteína monoclonal IgG cadeia lambda. Raio-x de bacia observou-se lesões osteoscleróticas na pelve com halo radiotransparente, raio-x de tórax demonstrou pequena lesão osteoblástica em terço proximal de úmero esquerdo. USG abdominal confirmou a hepatomegalia. A eletroneuromiografia demonstrou polineuropatia sensitivo-motora, com sinais de deservação em MMSS e MMII. Após confirmação diagnóstica foi iniciado tratamento com metilalan, prednisona e talidomida. Paciente encontra-se em acompanhamento ambulatorial. **Conclusão:** A Síndrome de POEMS, embora rara, deve ser incluída no diagnóstico diferencial das polineuropatias.

P-783

ULTRAESTRUTURA DO NERVO VESTIBULO-COCLEAR DE RATOS ADULTOS DIABÉTICOS

AUTOR(ES): VASCONCELOS, CAC^{1,3,4}
CO-AUTOR(ES): ALVES, LC^{2,3}, BRAYNER, F^{2,3}, FAZAN, VPS¹, PIMENTEL, RN², GUEDES, RGA², LIMA-FILHO, JL³, VALENGA, MM⁴
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. ¹DEPT. DE NEUROPSIQUIATRIA. ²DEPT. DE PARASITOLOGIA/FIOCRUZ. RECIFE-PE. ³LABORATÓRIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (LIKA) - UFPE. ⁴CENTRAL MICROSCOPY RESEARCH FACILITY, UNIVERSITY OF IOWA/USA. ⁵DEPT. DE NUTRIÇÃO/UFPE.

Introdução: O nervo vestibulo-coclear do rato possui características morfológicas não encontradas em outros nervos periféricos; é um nervo aferente especial que possui uma atividade elétrica espontânea, vital a vida. Não foram encontradas evidências sobre a influência do diabetes e suas interações patológicas com esse nervo, que pudessem provocar surdez ou alterações neurossensoriais. A avaliação descritiva através da microscopia eletrônica de transmissão realizada no presente estudo, evidencia informações fundamentais, que precedem o estudo das alterações que ocorrem em modelos experimentais de neuropatias do VIII nervo craniano e as doenças ou lesões que possam afetar o homem. Mais ainda, alterações do VIII nervo craniano decorrente do diabetes experimental estão sendo descritas pela primeira vez na literatura. **Métodos:** Foram utilizados 6 ratos adultos, machos, da linhagem Wistar. Três animais, com 42 dias de idade, foram injetados 60 mg/kg de estroptozotocina (STZ), i.p., após um jejum prévio de 12 horas. Três animais controles receberam injeção de tampão citrato. A glicemia foi aferida semanalmente até o dia do experimento. Aos 120 dias de idade, os animais foram perfundidos com solução de Karnovsky em tampão cacodilato de sódio (0,1 M). Os nervos vestibulo-cocleares direito e esquerdo foram dissecados na sua região mediana, pós-fixados com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% e incluídos em resina epóxi Poly/Bed 812¹. Os fragmentos foram cortados em seções transversais semilunares seriadas, com uma espessura de 0,38 µm, e corados com azul de toluidina para observação em nível de microscopia de luz. Seções transversais ultrafinas de 50 nm de espessura, contrastadas com acetato de urânio a 5% e citrato de chumbo, foram submetidas à análise através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). **Resultados:** Não foram encontradas alterações na região mediana do VIII nervo nos ratos controles, sendo o nervo constituído por um único fascículo, com endoneuro repleto de fibras mielínicas densamente compactadas entre si, núcleos de células de Schwann proeminentes ou alongados e um grande número de vasos. No grupo diabético, foi evidente a presença de células do sistema circulatório no endoneuro, sugerindo assim uma possível quebra da barreira sangue-nervo e a penetração de infiltrado inflamatório no endoneuro, o que poderia ocasionar alterações na função do VIII nervo craniano. **Conclusões:** Essa é a primeira descrição de alterações do VIII nervo craniano no modelo de diabetes experimental causada pela injeção de STZ em ratos. Tais informações podem corroborar para o melhor entendimento das alterações da audição encontradas em pacientes diabéticos. **Apoio:** CPqAM/FIOCRUZ, LIKA/UFPE, CAPES, CNPq.

P-784

UMA VARIEDADE DE NEUROPATIA ATÁXICA TROPICAL (TAN) - OFTALMO POLINEUROPATIA TROPICAL (OPT)

AUTOR(ES): TERRA, M. F. G.; TERRA, F. M. G.
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO, PROGRAMA SAÚDE DA FAMÍLIA, MINAS GERAIS E PARÁ.

Introdução: Uma patologia oftálmica e neurológica é observada em comuni-

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal/UFPE

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



Ofício nº 64/05

Recife, 28 de dezembro de 2005

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: Prof. Marcelo Moraes Valença
Departamento de Neuropsiquiatria - UFPE

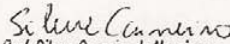
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado "ESTUDO NEUROLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL DOS NERVOS CIÁTICO E VESTÍBULO-COCLEAR DE RATOS CRONICAMENTE DESNUTRIDOS E DIABÉTICOS".

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,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

ANEXO B

Carta convite, declaração da Universidade de Iowa e Voto de Louvor
da Pós-Graduação/UFPE



Central Microscopy Research Facility

85 Eckstein Medical Research Building
Iowa City, Iowa 52242
319-335-8142 Fax 319-384-4469
www.uiowa.edu/~cemrf

September 8, 2008

To whom it may concern:

It will be my pleasure to have the Ph.D. student Carlos Augusto Vasconcelos from the Federal University of Pernambuco visiting the University of Iowa Central Microscopy Research Facility from March 20 to April 10, 2009. During this time, he will be able to get training on the JEOL JEM-1230 Transmission Electron Microscope in order to obtain final results for his PhD thesis. In addition, he will also have access to a wide range of other microscopy instrumentation including field emission scanning electron microscopy, stereology, immunocytochemistry, confocal microscopy, freeze-fracture, bioluminescent imaging, autoradiography and laser capture microdissection.

Dr. Valeria Fazan, his formal co-advisor from Brazil, has been working in our facility since July of 2007 and will be personally supervising his research while he is here. Also, during this visit, he will be able to attend the Neuroscience seminars and interact with other Neuroscientists on campus. I am positive this unique opportunity for Carlos will be highly productive and that he will be made aware of the possibility to develop other projects with University of Iowa Neuroscientists in the future.

It is always our privilege to be able to work with doctoral candidates and enhance their learning and discovery process. If you have any questions, please feel free to contact me.

Sincerely,

Kenneth C. Moore
Director, Central Microscopy Research Facility
Director, Holden Cancer Center Microscopy Resource
Director, Iowa Nanoscience Institute Microscopy Core
Co-Director, Gene Therapy Center Cell Morphology Core



Central Microscopy Research Facility

85 Eckstein Medical Research Building
Iowa City, Iowa 52242
319-335-8142 Fax 319-384-4469
www.uiowa.edu/~cmrf

April 7, 2009

Professor Moraes Valença,
Cidade Universitária
CEP. 50.670-420
Recife-PE, BRAZIL

Dear Professor Moraes Valença,

Ph.D. candidate Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos from the Federal University of Pernambuco visited The University of Iowa Central Microscopy Research Facility from March 20 to April 12, 2009. During this time, he was able to get training and operate the JEOL JEM-1230 transmission electron microscope to obtain final results for his PhD thesis. In addition, he had exposure to a wide range of other microscopy instrumentation including our Hitachi S-4800 field emission scanning electron microscope, Bio-Rad and Zeiss laser scanning confocal microscopes and LEICA TIRF microscope.

Dr. Valeria Fazan, his formal co-advisor from Brazil, as well as Dr. Kenneth C. Moore, Director of the central Microscopy Research Facility supervised Carlos Vasconcelos' research while he was in Iowa City. In addition, he was able to interact with other Neuroscientists on campus. I am positive that this unique opportunity was highly productive and he now has the possibility for developing projects with University of Iowa Neuroscientists in the future.

I am very interested in seeing the results of his thesis "Ultrastructure of the Vestibulocochlear and Sciatic Nerves in Adult Rats subjected to Streptozotocin-induced Diabetes. I would also be very supportive for Carlos Vasconcelos to return to The University of Iowa for post-doctoral training.

Sincerely,

Kenneth C. Moore
Director, Central Microscopy Research Facility
Director, Holden Cancer Center Cellular Imaging Resource
Co-Director, Gene Therapy Cell Morphology Core



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 - Nível Mestrado e Doutorado

DECLARAÇÃO

Declaro que o Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento em reunião realizada no dia 06 de janeiro de 2010 aprovou por unanimidade o voto de louvor para o Doutorando **CARLOS AUGUSTO DE CARVALHO VASCONCELOS** com o seguinte conteúdo: “fique registrado em Ata desta Reunião do Colegiado que o aluno de Doutorado Carlos Augusto de Carvalho Vasconcelos é merecedor de um voto de louvor pelo seu desempenho acadêmico, dedicação, seriedade e compromisso com a tarefa científica, enquanto aluno deste Programa. Além disso, o referido doutorando foi um sustentáculo nas atividades ligadas ao periódico Neurobiologia e que seu comportamento acadêmico é um exemplo para todos os que almejam a carreira Universitária no Âmbito da vida Acadêmica”.

Recife, 07 de janeiro de 2010.



Prof. Dr. Everton Botelho Sousa
Coordenador do Programa de
Pós-graduação (Mestrado e Doutorado)
em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento / CCE / UFPE

ANEXO C

Documentação de aceite e submissão dos Artigos aos Periódicos

 Pasta Atual: Entrada



[Lista de Mensagens](#) | [Apagar](#) | [Anterior](#) | [Próxima](#) | [Encaminhar](#) | [Encaminhar como anexo](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#)

Assunto: Int. J. Morphol., 167-09

De: "Mariano del Sol" <mdelsol@ufro.cl>

Data: Seg, Julho 13, 2009 6:22 pm

Para: vpsfazan@yahoo.com.br

CC: vpsfazan@gmail.com ([mais](#))

Prioridade: Normal

Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#) | [Ver detalhes da mensagem](#) | [Ver em HTML](#) | [Adicionar a lista de contatos](#)

Dear Dr. Fazán

I am very pleased to inform you that the paper:
"Diabetic peripheral neuropathies: A morphometric
overview", of the authors: Valéria Paula Sassoli
Fazan; Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos;
Marcelo Moraes Valença & Randy Nessler1, Kenneth
Charles Moore1. has been accepted by the
Scientific board for publication in International
Journal of Morphology.

Very truly yours

Dr. Mariano del Sol
Editor
Int. J. Morphol.

Anexados:

[untitled-\[2\]](#)

0.9 k

[text/html]

[baixar](#) | [Ver](#)

Endereço

[Apagar & Anterior](#) | [Apagar & Próxima](#)

Mova para: [Entrada](#)  **Mover**



 Pasta Atual: Entrada



Lista de Mensagens | Apagar | Anterior | Próxima | Encaminhar | Encaminhar como anexo | Responder | Responder a todos

Assunto: Enc: Manuscript number assigned
De: Valéria Fazan <vpsfazan@yahoo.com.br>
Data: Qua, Fevereiro 10, 2010 11:25 pm
Para: "Carlos Vasconcelos" <cacv@ufpe.br>
Prioridade: Normal
Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#) | [Ver detalhes da mensagem](#) | [Adicionar a lista de contatos](#)

----- Mensagem encaminhada -----

De: Valeria Paula Sassoli Fazan <vpsfazan@fmrp.usp.br>
Para: vpsfazan@yahoo.com.br
Enviadas: Quarta-feira, 10 de Fevereiro de 2010 23:19:15
Assunto: Fw: Manuscript number assigned

----- Forwarded Message -----
From: "Neuroscience Letters" <ns1@elsevier.com>
To: vpsfazan@fmrp.usp.br
Sent: 9 Feb 2010 17:50:59 +0000
Subject: Manuscript number assigned

Dear Dr. Fazan,

Your submission entitled "Transmission Electron Microscopy Studies of the Vestibulocochlear Nerve in Chronic Diabetic Rats" has been assigned the following manuscript number: NSL-10-254.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/ns1/>

Your username is: vpsfazan

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/ns1/automail_query.asp.

For guidelines on how to track your manuscript in EES please go the following address: <http://epsupport.elsevier.com/article.aspx?article=1056&p=3>

Thank you for submitting your work to Neuroscience Letters.

Kind regards,

Jaclyn Doherty
Journal Manager
Neuroscience Letters

----- End of Forwarded Message -----

--

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan
Departamento de Cirurgia e Anatomia
Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto - FMRP-USP
<http://www.fmrp.usp.br/>

Veja quais são os assuntos do momento no Yahoo! +Buscados
<http://br.maisbuscados.yahoo.com>