

Celina Cordeiro de Carvalho

**Avaliação dos Efeitos do Exercício Físico em Ratos com Diabetes
Experimental**

Recife

2010

Celina Cordeiro de Carvalho

**Avaliação dos Efeitos do Exercício Físico em Ratos com Diabetes
Experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, área de concentração em Neurociências, pela Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Arruda de Moraes

Co-orientador:

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

**Recife
2010**

Carvalho, Celina Cordeiro de

Avaliação dos efeitos do exercício físico em ratos com diabetes experimental / Celina Cordeiro de Carvalho. – Recife : O Autor, 2010.

212 folhas ; il., fig., tab., gráf.

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

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Diabetes experimental. 2. Treinamento físico aeróbico – Diabetes experimental. 3. Microvasos endoneurais. I. Título.

616-008
616.462

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2010-014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO**

COORDENADOR

Prof. Dr. Everton Botelho Sougey

CORPO DOCENTE

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Prof. Dr. Everton Botelho Sougey

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de oliveira

Prof. Dr. Luis Ataíde júnior

Profa. Dra. Maria Carolina Martins de Lima

Profa. Dra. Maria Lúcia Bustamantes Simas

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Prof. Dr. Murilo Duarte da Costa Lima

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

Prof. Dr. Othon Coelho Bastos Filho

Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Profa. Dra. Sheva Maria da Nóbrega

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DA
DOUTORANDA CELINA CORDEIRO DE CARVALHO**

No dia 10 de fevereiro de 2010, às 9h, no Auditório Murilo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os Professores: Andréa Lemos Bezerra de Oliveira, Doutora Professora do Departamento de Fisioterapia da Faculdade Integrada do Recife; Paloma Lys de Medeiros, Doutora Professora do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco; Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Doutor Professor do Departamento de Cirurgia da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas; Adelson Antônio da Silva Santos, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco e Otávio Gomes Lins, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüiram a Doutoranda CELINA CORDEIRO DE CARVALHO, sobre a sua Tese intitulada "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL**". Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da Doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Profª. Drª. Andréa Lemos Bezerra de Oliveira

Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros

Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta

Prof. Dr. Adelson Antônio da Silva Santos

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

Aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado

Andréa Lemos Bezerra de Oliveira

Profª. Drª. Andréa Lemos Bezerra de Oliveira

Paloma Lys de Medeiros

Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros

Guilherme Benjamin Brandão Pitta

Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta

Adelson Santos

Prof. Dr. Adelson Antônio da Silva Santos

Otávio Gomes Lins

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

Agradecimentos

A DEUS que tem me guiado e se mostrado presente em todos os momentos.

A minha família que sempre me apoiou nas decisões a serem tomadas com muito amor e confiança, em especial o meu marido Gilson Bezerra Feitosa, que em todos os momentos esteve sempre ao meu lado, sendo compreensivo e amoroso.

Ao meu filho Pedro que agora terá uma mãe mais presente e continua sendo o responsável pelo repensar das prioridades de minha vida.

À Prof^a. Dr^a Sílvia Regina Arruda de Moraes por sua orientação, paciência, amizade, incentivo e confiança.

Aos colegas do laboratório de Morfologia que participaram efetivamente deste projeto pela união, dedicação, amor, profissionalismo e competência com que realizaram cada procedimento desde o início.

À Prof. Dr^a Otávio Gomes Lins por ter acreditado neste projeto e ter dedicado seu tempo, paciência e ter sedido seu laboratório para a realização das avaliações funcionais.

Às funcionárias do Laboratório de Eletroneuromiografia do Hospital das Clínicas, Emmeline e Marta pelo carinho e sempre enorme disposição para a realização dos testes eletrofuncionais nos animais.

Às Prof^{as}. Dr^a Janaína Viana de Melo e Dr^a Christina Alves Peixoto pelo estudo ultraestrutural.

À Prof^{as}. Dr^a Andréa Lemos Bezerra de Oliveira pelos ensinamentos na realização da revisão sistemática.

Aos amigos pela amizade e amor, em especial a Dayse de Amorim Lins e Silva, irmã de coração, por todos os momentos.

À companheira, parceira e amiga Juliana Netto Maia por ter sido meus braços e pernas ao longo destes quatro anos, sempre ao meu lado “para o que der e vier”.

Aos colegas do Programa de Doutorado em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento pelos ensinamentos passados e acessibilidade, e as secretárias pela presteza, respeito e gentileza.

Aos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

*“Os que confiam no Senhor são como o monte de Sião,
que não se abala mas permanece para sempre.”*
Salmo 125:1

Resumo

O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico (TFA) na organização estrutural e funcional do tecido nervoso periférico em ratos com diabetes experimental. Foram utilizados 40 ratos machos, adultos, *Wistar*. Estes foram separados em 4 grupos: controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS), diabético treinado (DT). A indução do diabetes foi realizada nos animais, com 60 dias de vida, através da administração intraperitoneal de estreptozotocina, dose única de 60 mg/kg. O protocolo de exercício constou de nado forçado 1h/dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas. Semanalmente eram avaliados a glicemia, o peso, a velocidade de condução nervosa (VCN) e a amplitude do potencial de ação do nervo caudal. Vinte e quatro horas após o término do período de TFA foram realizadas a coleta do nervo ciático, obtidos os blocos e realizados os cortes semi-finos e ultra-finos. A contagem e análise histomorfométrica dos vasos endoneurais e da área do nervo de cada animal (n=5) foi realizada através da técnica de varredura de todos os campos microscópicos (200X) e 75 microvasos endoneurais (3-5/animal, n=5/grupo) foram ultramicrografados aleatoriamente nos campos microscópicos (8.900X) para a realização das análises morfométricas. A área e perímetro vascular, a área e perímetro do lúmen, a área e perímetro endotelial, a área e perímetro da membrana basal, e a área do pericito foram registradas. A partir daí, determinadas a espessura da membrana basal, espessura da parede do vaso, e também foi contado o número de núcleos das células endoteliais e do pericito. A análise estatística foi realizada utilizando a média dos valores $\pm$ desvio-padrão e as comparações entre os grupos foram realizadas (ANOVA), múltiplas comparações *post hoc* Tukey ($p < 0,05$). Ao final do experimento observou-se que os animais do grupo diabético apresentaram peso menor que os controles, contrariamente aos níveis glicêmicos que mostraram-se significativamente maiores no grupo diabético. A VCN não sofreu interferência do treinamento demonstrando não diferir entre os grupos diabéticos, porém quando comparados ao grupo controle, apresentaram VCN mais baixas sugerindo um comprometimento funcional do nervo caudal sensorial nos animais diabéticos. Não foram encontradas diferenças significativas no número de microvasos endoneurais entre os animais do grupo diabético (DT $41,4 \pm 11,9$ vs DS $39,2 \pm 3,6$). Apesar da área do nervo ciático não diferir entre os grupos, os animais do grupo diabético (DS $0,68 \pm 0,1$ vs DT $0,67 \pm 0,1$) apresentaram médias menores em relação aos grupos controles. Da mesma forma, a densidade dos microvasos endoneurais não diferiu entre os grupos. Todas as áreas dos microvasos endoneurais sofreram interferência do TFA ($p = 0,016$). Nos animais diabéticos, a espessura da membrana basal e a espessura da parede do vaso não foram diferentes quando comparados com os animais do grupo controle. Houve uma tendência a hiperplasia de células endoteliais no grupo de animais DT (DT $2,5 \pm 1,3$ vs DS $1,6 \pm 0,4$; $p = 0,063$), no entanto a hiperplasia de células do pericito foi significativamente maior nos ratos DT quando comparados com DS (DT $1,2 \pm 0,5$ vs DS $0,7 \pm 0,4$; $p = 0,038$). Diante destes resultados, pode-se concluir que o tempo do experimento foi suficiente para causar uma neuropatia periférica nos ratos diabéticos com perdas funcionais, contudo por ser a neuropatia uma patologia de origem multifatorial, a realização de um TFA baseado no modelo experimental utilizado neste estudo não mostrou alterações na estrutura dos microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental. Porém, ultraestruturalmente, todas as áreas dos microvasos endoneurais dos animais diabéticos mensuradas sofreram interferência do TFA, igualmente a atividade celular periendotelial, aumentando o número de pericitos que envolvem os microvasos endoneurais.

Palavras-chave: Diabetes experimental, Microvasos endoneurais, Treinamento físico aeróbio.

Abstract

The present study was designed to assess the effects of the aerobic physical training (APT) on the structural and functional organization of the peripheral nervous tissue on rats with experimental diabetes. Adult male *Wistar* rats (n=40) were divided into 4 groups: control sedentary (CS), control trained (CT), diabetic sedentary (DS), diabetic trained (DT). Diabetes was induced with streptozotocin on the animals aged 60 days through an intraperitoneal injection, single dose of 60 mg/kg. The exercise protocol consisted of forced-swim 1h/day, 5 days/week, during 5 weeks. The rats were evaluated weekly on glucose, weight, nervous conduction velocity (NCV) and the action potential amplitude of the caudal nerve. Twenty four hours after the end of the APT period the sciatic nerve was collected, the blocks were obtained and semi-thin and ultra-thin cuts were sectioned. The histomorphometric count and analysis of the endoneural vessels and the nerve area of each animal (n=5) was withheld through the scan technique of all the microscopical fields (200X) and 75 endoneural microvessels (3-5/animal, n=5/group) were randomly ultramicrographed in the microscopical fields (8.900X) for morphometric analysis. The area and vascular perimeter, the area and lumen perimeter, the area and endothelial perimeter, and the pericyte area were registered. Thenceforth, the basement membrane length and the vessel wall length were established, and the amount of endothelial cell and pericyte nuclei was counted. The statistical analysis was done using the average value $\pm$ standard deviation and the comparisons among groups were made through analysis of variance (ANOVA), and multiple comparisons *post hoc* using Tukey ($p < 0.05$). At the end of the experiment, the animals in the diabetic group presented lower weight than the controls, contrary to the glucose levels which showed to be significantly higher in the diabetic group. The NCV did not suffer any interference from the training, showing no difference between the diabetic groups, however, when compared to the control group they presented lower NCV suggesting a functional impairment of the sensory caudal nerve in the diabetic animals. No significant differences were found in the amount of endoneural microvessels among the animals in the diabetic group (DT 41.4 ± 11.9 vs DS 39.2 ± 3.6). In spite of no difference being found with the sciatic nerve area among groups, the animals in the diabetic group (DS 0.68 ± 0.1 vs DT 0.67 ± 0.1) presented lower averages in relation to the control groups. In the same way, no differences among groups were found in the density of the endoneural microvessels. All the endoneural microvessel areas suffered interference from the APT ($p = 0.016$). The basement membrane length and the vessel wall length in the diabetic animals were not different when compared to the animals in the control group. There was a tendency to endothelial cell hyperplasia in the animal group DT (DT 2.5 ± 1.3 vs DS 1.6 ± 0.4 ; $p = 0.063$), however the pericyte cell hyperplasia was significantly higher in the DT rats when compared to the DS (DT 1.2 ± 0.5 vs DS 0.7 ± 0.4 ; $p = 0.038$). We concluded from these results that the time of this experiment was sufficient to cause a peripheral neuropathy in the diabetic rats with functional loss, yet, being so the neuropathy a pathology with a multifactorial origin, the completion of an APT based on the experimental model that was used in this study did not show changes in the endoneural microvessel's structure in rats with experimental diabetes. However, ultrastructurally, all the endoneural microvessel areas measured in the diabetic animals suffered interference from the APT, in the same way the cellular activity, increasing the number of pericytes that involve the endoneural microvessels.

Key words: Experimental Diabetes, Endoneural microvessels, Aerobic physical training.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Posicionamento dos eletrodos de superfície do tipo “jacaré” na cauda do animal (A); e registros com onda típica do estudo da velocidade de condução nervosa e amplitudes dos potenciais de ação do nervo sensitivo caudal (B). (i), invertido, (ni), não-invertido, (-) catodo, (+) anodo. 38
- Figura 2.** Tanque cilíndrico de natação (A); câmara de aquecimento (B); e animais realizando nado forçado em grupo (C). 40
- Figura 3.** Incisão na pele da região posterior da coxa direita para exposição do nervo ciático (A) e sua dissecação (B). 41
- Figura 4.** Área de secção transversa do nervo ciático de rato diabético, 40X (A); e campo microscópico (200X) contendo vasos endoneurais, 200X (setas) (B); Azul de toluidina. 42
- Figura 5.** Eletromicrografia de corte transverso de vaso sanguíneo endoneural do nervo ciático de rato diabético (A); e contornos dos componentes da parede celular para determinação de áreas e perímetros usados nas mensurações morfométricas (B). Escala de barra com 2 μ m (8.900X). 44

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	11
2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
3. HIPÓTESES	16
4. OBJETIVOS	17
Geral	17
Específicos	17
5. REVISÃO DA LITERATURA	18
Artigo de Revisão Sistemática	19
6. MATERIAL E MÉTODOS	37
a. Animais	37
b. Grupos de Estudo	37
c. Indução do Diabetes Experimental	37
d. Avaliação Clínica	38
e. Estudo Eletrofisiológico	38
f. Treinamento Físico Aeróbico	40
g. Coleta e Processamento do Material	41
h. Análise Histomorfométrica	42
i. Análise Ultraestrutural	43
j. Análise Estatística	45
7. RESULTADOS	46
a. Artigo Original 1	47
b. Artigo Original 2	58
c. Artigo Original 3	71
8. DISCUSSÃO GERAL	99
9. CONCLUSÃO GERAL	103
REFERÊNCIAS	104
APÊNDICES	109
Apêndice A – Coleta dos dados	110
Apêndice B – Análises estatísticas	118
ANEXOS	127
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal	128
Anexo B – Documentação de encaminhamento dos artigos aos periódicos	129

Anexo C – Normas utilizadas para publicação dos artigos aos periódicos	131
Anexo D – Produção científica advinda do mesmo projeto	143
Anexo E – Declarações de participação e publicação em anais de congressos	206

1. APRESENTAÇÃO

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

2. Considerações iniciais;

3. Hipóteses;

4. Objetivos;

5. Revisão da literatura: consta de um **artigo de revisão sistemática da literatura** (intitulado: Alterações estruturais nos microvasos endoneurais causados pela neuropatia diabética induzida em animais de experimentação: Uma revisão sistemática.) que investigou através do nível de evidência disponível as alterações que a neuropatia diabética periférica induzida, em animais de experimentação, pode causar aos microvasos endoneurais. Foi submetido ao jornal Diabetes Research and Clinical Practice e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista (Anexo C);

6. Material e Métodos;

7. Resultados: este capítulo foi estruturado sob a forma de três artigos originais: O primeiro (**Artigo Original 1**) teve por objetivo verificar a aplicabilidade técnica do exame eletrofisiológico com eletrodos de superfície do “tipo jacaré” para avaliar o registro da velocidade de condução nervosa e da amplitude dos potenciais de ação do nervo sensitivo caudal em ratos diabéticos. Foi aceito para publicação na revista Acta Cirúrgica Brasileira e a previsão da publicação é para o volume 25, número 4, julho-agosto de 2010, e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista (Anexo C).

O segundo artigo (**Artigo Original 2**) refere-se aos resultados obtidos do estudo experimental desenvolvido durante o doutoramento, em que submetemos ratos com diabetes experimental a um protocolo de exercício e teve como objetivo avaliar se esse tipo de treinamento físico aeróbio exerce algum estímulo sobre o número e a densidade dos microvasos endoneurais. Este artigo será submetido para publicação no Journal of Exercise Physiology **online** e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista (Anexo C).

O terceiro artigo (**Artigo Original 3**) refere-se também aos resultados obtidos do estudo experimental desenvolvido durante o período de doutoramento, em que submetemos ratos com diabetes experimental a um protocolo de exercício e teve como objetivo verificar se o treinamento físico aeróbio exerce algum estímulo sobre a patologia dos microvasos endoneurais. Este artigo será submetido à publicação na revista Microvascular Research e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista (Anexo C).

8. Discussão Geral;

9. Conclusão Geral;

Referências.

2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O diabetes *mellitus* já afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo e está tornando-se a epidemia do século. Até 2025, a previsão é de que esse número chegue a 380 milhões. Estima-se que boa parte das pessoas que têm diabetes, doença que pode atingir crianças de qualquer idade, desconhece a sua própria condição. No Brasil, de acordo com o Vigitel 2007 (Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2%, o que representa 6.399.187 de pessoas que confirmaram ser portadoras da doença. A prevalência aumenta com a idade: o diabetes atinge 18,6% da população com idade superior a 65 anos (Ministério da Saúde, 2009).

De acordo com a Declaração das Américas sobre Diabetes – IDF/OPAS/OMS, o diabetes *mellitus* (DM), especialmente quando mal controlado, representa um considerável encargo econômico para o indivíduo e a sociedade. A maior parte dos custos diretos do tratamento do DM relaciona-se com suas complicações, que muitas vezes podem ser reduzidas, retardadas ou evitadas. Dependendo do país, as estimativas disponíveis indicam que o DM pode representar de 5% a 14% dos gastos com o setor de saúde (Consenso Brasileiro de Conceitos e Condutas para o Diabetes Mellitus, 1997).

A disfunção de nervos periféricos é uma complicação comum em indivíduos com diabetes *mellitus*. Sintomas clínicos de neuropatia periférica estão presentes em aproximadamente 25% desses indivíduos, embora todos os diabéticos tenham uma redução da velocidade de condução nervosa (Medori *et al.*, 1985).

A patologia nervosa periférica na polineuropatia diabética está caracterizada pela atrofia e degeneração neuronal. A desmielinização segmentar e hipertrofia, e proliferação de células de Schwann são ocasionalmente observadas, mas essas mudanças são cogitadas pelo envolvimento axonal secundário (Medori *et al.*, 1985; Timperley *et al.*, 1985; Veves; King, 2001; Cunha *et al.*, 2002).

A etiologia da neuropatia diabética está ainda sob questionamentos, e a relativa importância de fatores metabólicos e vasculares é desconhecida. Fagerberg em 1959, foi o primeiro a descrever que as lesões vasculares no nervo periférico na forma de hialinização, redução do calibre e espessamento da parede do vaso são mais comuns em pacientes com neuropatia diabética do que em outros grupos. Ele também atribuiu tais mudanças ao processo

degenerativo progressivo da doença e defendeu que ela seria responsável pelo dano estrutural da bainha de mielina nos pacientes diabéticos (Timperley *et al.*, 1985; Veves; King, 2001).

Inúmeros mecanismos são elucidados como causadores da neuropatia diabética (Gagliard, 2003). Estudos demonstraram que pacientes diabéticos apresentam uma atrofia axonal e uma redução de fibras mielinizadas, que seria explicada pela teoria bioquímica, que defende que a ausência de insulina altera as células de Schwann, elemento indispensável na manutenção da mielina, que se torna vacuolada e fragmentada. Estas alterações são produzidas pelo efeito tóxico do sorbitol e da frutose, que estão aumentados no diabetes, e pela depleção do mio-inositol (Thomaz *et al.*, 1996).

Outra teoria proposta para justificar a neuropatia diabética é a teoria vascular, na qual acredita-se que a visível microangiopatia da *vasa nervorum* é o fator desencadeante, pois a partir dela o nervo seria submetido a uma isquemia, já que o espessamento da membrana basal dificultaria o intercâmbio metabólico no tecido nervoso (Thomaz *et al.*, 1996).

Com o prolongamento de vida que a insulina e a antibioticoterapia tem oferecido ao paciente diabético, tem-se tornado aparente que as complicações macro e microvasculares (Feldman, 2003) do diabético constitui a maior causa de morbidade e morte nesta doença (Siperstein, Unger & Madison, 1968; Schratzberger *et al.*, 2001; Cunha *et al.*, 2002), tendo a infecção como a principal delas (Chen *et al.*, 2005).

Os sintomas decorrentes da neuropatia são tipicamente dominados pelos defeitos sensoriais. A consequência final de tais déficits sensoriais envolve as extremidades inferiores podendo começar pelas ulcerações no pé desencadeado por traumas imperceptíveis ao paciente. Pelo fato de que tais ulcerações podem levar à amputação do membro inferior é ostentado pelo fato que a frequência de amputações de membros inferiores é quinze vezes mais alta no diabético do que no não diabético (Schratzberger *et al.*, 2001).

O Consenso Brasileiro de Conceitos e Condutas para o Diabetes *Mellitus* em 1997, considera como exercício toda e qualquer atividade física que produza maior consumo de calorias e modificações dos hábitos em benefício da situação física e psíquica do indivíduo. Por induzir melhora da ação da insulina, facilitar o controle de peso, além de outros fatores benéficos, a atividade física é de grande importância na “prevenção” e controle do diabetes tipo 2.

O exercício físico de forma geral caracteriza-se por atividade que eleva significativamente a necessidade energética do organismo, exigindo, portanto, alterações agudas expressivas tanto no metabolismo celular como no controle neuroendócrino (Kemmer

& Berger, 1983). Alguns trabalhos têm demonstrado que o exercício físico regula e melhora as condições do diabetes, facilitando a captação periférica da glicose e o metabolismo de glicogênio e proteínas (Luciano & Mello, 1998; Oliveira, Rogatto & Luciano, 2002).

Não é bem caracterizada, entretanto, a ação específica do treinamento físico tanto na prevenção quanto na melhora do quadro neuropático no paciente diabético. A reprodução das alterações provocadas pelo diabetes no ser humano, em animais de experimentação, parece ser o caminho mais apropriado para se obter respostas concretas para esses questionamentos, por oferecer estudos aleatórios de longo seguimento, com uniformidade da amostra e controle das variáveis.

Ainda não há estudos que relacionem o treinamento físico aeróbio com essas alterações morfológicas e muitos questionamentos ficam sem esclarecimentos. Estudos que observaram as alterações estruturais que a neuropatia diabética causa nos microvasos endoneurais em animais com diabetes experimental, ainda são escassos e com resultados divergentes, por isso sentimos a necessidade de realizar uma revisão sistemática da literatura para, através do nível de evidência disponível, identificar as alterações estruturais que a neuropatia diabética causa nos microvasos endoneurais.

Desta forma, este estudo visa investigar se o treinamento físico aeróbio pode interferir na evolução do processo degenerativo da neuropatia diabética tendo como base de avaliação o estudo da condução nervosa sensorial, a quantificação e a verificação das possíveis alterações dos microcapilares endoneurais.

3. HIPÓTESES

O treinamento físico aeróbico em ratos com diabetes experimental:

- Aumenta o número e a densidade de capilares endoneurais do nervo ciático;
- Melhora a velocidade de condução nervosa do nervo caudal;
- Interfere no processo degenerativo das ultraestruturas da parede vascular dos microcapilares endoneurais do nervo ciático.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico na organização estrutural e funcional do tecido nervoso periférico em ratos com diabetes experimental.

Objetivos Específicos

- Avaliar a velocidade de condução nervosa e a amplitude do potencial de ação do nervo sensitivo caudal dos animais com diabetes experimental e no grupo controle, com animais não diabéticos;
- Quantificar e comparar os capilares endoneurais do nervo ciático entre os grupos de animais diabéticos treinados e não treinados;
- Mensurar e comparar a área da secção transversa do nervo ciático entre os grupos de animais diabéticos treinados e não treinados;
- Comparar a densidade dos capilares endoneurais do nervo ciático entre os grupos de animais diabéticos treinados e não treinados;
- Avaliar e comparar ultraestruturalmente a parede vascular dos capilares endoneurais do nervo ciático entre os grupos de animais diabéticos treinados e não treinados.

5. REVISÃO DA LITERATURA

Artigo de Revisão Sistemática da Literatura

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NOS MICROVASOS ENDONEURAIIS CAUSADOS
PELA NEUROPATIA DIABÉTICA INDUZIDA EM ANIMAIS DE
EXPERIMENTAÇÃO: Uma revisão sistemática.**

^{1,*}Celina C. de Carvalho; ²Juliana N. Maia; ³Rodrigo R. Oliveira; ²Andréa L.B. de Oliveira;
⁴Otávio G. Lins; ⁵Sílvia Regina A. de Moraes.

¹Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento,

²Departamento de Fisioterapia, ³Programa de Pós-graduação do Departamento de
Fisioterapia, ⁴Departamento Neuropsiquiatria, ⁵Departamento de Anatomia; Universidade
Federal de Pernambuco, Brasil.

***Autor Correspondente:** Endereço: Rua Rio Tejió 183- 201, Cordeiro, CEP: 50721-640
Recife, Pernambuco, Brasil Telefone: 55-81-9132.3733
E-mail: celinacordeiro@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: Realizar uma revisão sistemática de estudos em animais de experimentação para avaliar através do nível de evidência disponível as alterações estruturais que a neuropatia diabética causa nos microvasos endoneurais. **Metodologia:** Estudos randomizados controlados com animais de experimentação, com indução química do diabetes *mellitus* que tenham realizado avaliação ultraestrutural dos microvasos endoneurais dos nervos ciático, sural ou tibial preencheram os critérios de inclusão. Foi realizada uma busca sistemática no período de agosto a outubro de 2009, nas bases de dados PubMed/MEDLINE, LILACS, SciELO, e Cochrane Library datados de 1966 a 2009 que abordassem a questão pesquisada nos parâmetros do nosso estudo, e de forma independente por três revisores. Os termos utilizados, extraídos do MeSH: “*vasa nervorum*”; “*vasa nervorum*”/ultraestrutura; microcirculation; microvessels; “blood-nerve barrier”; “diabetes *mellitus*”, experimental; “diabetic neuropathies”. Pela lista dos DeCS: “*vasa nervorum*”; “*vasa nervorum*”/ultraestrutura; “neuropatias diabéticas”; “neuropatias diabéticas”/ quimicamente induzidas; microvasos. Foram utilizadas ainda as palavras “neuropatias periféricas” e microangiopatia, além da lista de referência dos estudos incluídos. A qualidade metodológica dos estudos foi avaliada utilizando alguns dos critérios publicados para estudos com animais de experimentação. **Resultados:** Seis estudos de pobre qualidade metodológica, envolvendo 151 animais, foram incluídos. A área do lúmen capilar foi a alteração mais presente observada com aumento da circunferência, mas outros parâmetros foram também analisados, como as alterações no número e no tamanho das células endoteliais dos capilares endoneurais. **Conclusão:** A revisão sistemática de estudos experimentais em animais sobre a influência da neuropatia diabética nas alterações estruturais dos microvasos endoneurais indicam que há um aumento da área luminal, hipertrofia e hiperplasia das células endoteliais.

Palavras chaves: diabetes mellitus experimental, neuropatia diabética, *vasa nervorum*, ultraestrutura.

INTRODUÇÃO

A etiologia da neuropatia diabética está ainda sob questionamentos, e a relativa importância de fatores metabólicos e vasculares ainda continua desconhecida. Fagerberg, em 1959 foi o primeiro a descrever que as lesões vasculares no nervo periférico na forma de hialinização, redução do calibre e espessamento da parede do vaso eram mais comuns em pacientes com neuropatia diabética do que em outros grupos de indivíduos. Atribuiu ainda tais mudanças ao processo degenerativo progressivo da doença e que essas lesões vasculares também seriam responsáveis pelo dano estrutural da bainha de mielina nos pacientes diabéticos [1,2], devido ao espessamento e a reduplicação da lâmina basal [3].

Em virtude do avanço e desenvolvimento de técnicas ultraestruturais para avaliação das fibras nervosas através de biópsias do tecido nervoso, inúmeros mecanismos são apontados como causadores da neuropatia diabética [3,4]. Estudos [5,6] demonstraram que pacientes diabéticos apresentam uma atrofia axonal e uma redução de fibras mielinizadas, e estas seriam justificadas pela teoria bioquímica, que associa a ausência de insulina à alteração das células de Schwann, elemento indispensável na manutenção da mielina, que se torna vacuolada e fragmentada. Estas alterações seriam produzidas pelo efeito tóxico do sorbitol e da frutose, que estão aumentados no diabetes, e pela depleção do mio-inositol. Outra teoria proposta para justificar a neuropatia diabética é a teoria vascular, na qual se acredita que a visível microangiopatia da *vasa nervorum* é o fator desencadeante, pois a partir dela o nervo seria submetido a uma isquemia, já que o espessamento da membrana basal dificultaria o intercâmbio metabólico no tecido nervoso [7].

As alterações estruturais na microvasculatura endoneurais da neuropatia diabética não são claras e as possíveis causas não estão elucidadas [5,8]. Capilares endoneurais de pacientes diabéticos com neuropatia demonstraram espessamento da membrana basal, hipertrofia e hiperplasia das células endoteliais com degeneração de pericito, que se relaciona com a severidade neuropática [3,5,6,9,10]. Entretanto, pacientes diabéticos sem evidências de neuropatia apresentam também espessamento da membrana basal e degeneração do pericito [6]. Interessantemente, as anormalidades são mais severas nos capilares endoneurais do que no epineuro, pele e músculos, indicando uma complexa interação neurovascular intraneural [11]. O espessamento da membrana basal tem sido observado em neuropatias hereditária sensitiva e motora e, portanto, poderia representar uma resposta ao dano do nervo. Contudo, o espessamento da membrana basal e a hiperplasia da célula endotelial poderia ser também uma resposta a hipóxia causando uma redução da capacidade de difusão, portanto, agravando a hipóxia [3].

O papel da área luminal capilar e a oclusão dos vasos também permanece controversa. Vários grupos têm demonstrado hiperplasia endotelial, levando a reduções da área luminal [1,12,13]. Isto, em conjunção com anormalidades hemorreológicas incluindo depósitos de fibrina [1], ativação plaquetária e a agregação das hemácias poderia causar a oclusão vascular e hipóxia endoneural [3]. Na verdade, o grau de neuropatia foi estreitamente relacionado com o número de vasos fechados [13]. Porém, uma conclusão contrária de aumento da área luminal capilar endoneural na polineuropatia simétrica distal também foi relatado, indicando que esta poderia ser uma mudança adaptativa à hipóxia endoneural [10].

Diante do exposto esse estudo visa realizar uma revisão sistemática de estudos em animais de experimentação para avaliar através do nível de evidência disponível as alterações estruturais que a neuropatia diabética causa nos microvasos endoneurais.

METODOLOGIA

Foi realizada uma busca sistemática nas bases de dados PubMed/MEDLINE, LILACS, SciELO, e Cochrane Library no período de agosto a outubro de 2009, sem restrição linguística, datados de 1966 a 2009. Foi utilizada uma combinação de termos de pesquisa cuidadosamente escolhidos com a colaboração de profissionais especialistas em trabalhos com animais de experimentação.

Os termos utilizados, extraídos do Medical Subject Headings (MeSH) para uso na base de dados do PubMed/MEDLINE e Cochrane Library, foram: “*vasa nervorum*”; “*vasa nervorum*”/ultraestrutura; microcirculation; microvessels; “blood-nerve barrier”; “diabetes mellitus”, experimental; “diabetic neuropathies”. Pela lista dos descritores em ciências da saúde (DeCS) utilizados para a base de dados do LILACS e SciELO, os descritores selecionados foram: “*vasa nervorum*”; “*vasa nervorum*”/ultraestrutura; “neuropatias diabéticas”; “neuropatias diabéticas”/quimicamente induzidas; microvasos. Além disso, foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: “neuropatias periféricas” e microangiopatia, por não terem sido encontradas indexação no MeSH. A lista de referência dos estudos incluídos também foi analisada para identificar outros estudos não capturados pelas buscas eletrônicas.

A estratégia de busca utilizada foi a associação entre os descritores nas bases de dados realizada por três pesquisadores independentes (CCC, JNM, RRO). Título e resumos identificados através de pesquisas foram examinados independentemente pelos três investigadores na tela do computador para selecionar os estudos potencialmente relevantes.

Para seleção dos estudos os seguintes critérios de inclusão foram considerados: (1) população: estudos com qualquer tipo de animal de experimentação, independente do sexo;

(2) intervenção: qualquer tipo de indução química do diabetes *mellitus* e utilização de grupo controle e grupo experimental; (3) desfecho: avaliação morfológica ultraestrutural apenas dos microvasos endoneurais dos nervos ciático, sural ou tibial, sendo avaliado somente os subgrupos que não sofreram qualquer tipo de intervenção medicamentosa. Com relação à estrutura dos microvasos endoneurais foi considerado como desfecho primário para avaliação dos estudos a presença de alterações no número e no tamanho das células endoteliais, e como desfechos secundários, as repercussões ou alterações no lúmen capilar, repercussões ou alterações da área da membrana basal, repercussões ou alterações degenerativas no pericito, modificações da área vascular dos capilares endoneurais. Estudos de revisão narrativa, ou estudos experimentais em animais que avaliaram outro tipo de neuropatia que não a diabética, foram excluídos. Não foi feito mascaramento quanto aos autores dos trabalhos para a análise dos estudos.

A qualidade metodológica dos estudos individuais foi avaliada pelos três pesquisadores de forma também independente. Foram utilizados alguns dos critérios publicados para estudos com animais de experimentação [14,15] e, sendo esses, ainda, adaptados para o caso específico de animais induzidos ao estado de diabetes. Estes critérios foram: (1) publicação revisada pelos pares; (2) atribuição aleatória dos grupos em tratamento (sendo este tratamento considerado apenas o estado de diabetes) ou controle – adaptado; (3) indução cega do diabetes – adaptado; (4) avaliação cega do desfecho; (5) monitorização dos parâmetros fisiológicos (peso, níveis de glicose sanguínea, e estudo da condução nervosa) – adaptado; e (6) conformidade com as normas de bem-estar animal. Para cada item apresentado foi atribuído um ponto de qualidade de um total possível variando de 0-6 pontos, e a média do grupo foi calculada. A qualidade do estudo foi considerada como baixa quando a pontuação alcançou 3 pontos ou menos.

Em todo o processo de coleta e análise dos dados os casos de discordâncias, quando presentes, foram discutidos e resolvidos com um quarto avaliador (SRAM).

RESULTADOS

Foram identificados 283 artigos através da busca eletrônica, e destes, 270 artigos foram excluídos. Dessa forma, 13 artigos foram retidos por serem considerados potencialmente relevantes e foram totalmente recuperados para uma avaliação mais detalhada. Nove estudos foram então excluídos, pois em oito deles a análise estrutural da microvasculatura endoneural não foi objeto de estudo, e em um, o estado de diabetes dos animais em experimentação não foi induzido quimicamente, ficando assim, um total de quatro

estudos que preencheram os critérios de inclusão [16,17,19,20]. Além desses, foram incluídos ainda, dois estudos adicionais identificados através da análise das referências bibliográficas dos estudos selecionados que escaparam da busca eletrônica [18,21] (Figura 1).

As características dos seis estudos que foram incluídos nesta revisão sistemática estão listados na Tabela 1, e ordenados de forma cronológica. No total, 90 animais foram induzidos ao estado do diabetes e 61 animais serviram como controles. Em todos os estudos [16-21] foram utilizados animais machos e apenas em um estudo [17] foi utilizado como modelo experimental, cães, ao invés de ratos.

A droga mais utilizada como método para a indução foi a estreptozotocina em três dos estudos [19-21] e um estudo [17] utilizou uma mistura da aloxana com a estreptozotocina para realizar a indução. A via intravenosa foi a mais eleita para a veiculação da droga com apenas um estudo realizando a indução através da via intraperitoneal [21]. Os nervos mais comumente usados para avaliação morfológica foram o nervo ciático, em três estudos [16-18] e o nervo sural, em dois deles [19,20].

A qualidade metodológica dos estudos incluídos teve uma média de 3,16 pontos (faixa entre 2-4). Apenas dois estudos fizeram uma distribuição aleatória dos grupos para o tratamento ou controle [19,20], apesar de nenhum dos estudos ter induzido a diabetes de forma cega. Quatro estudos [16,19-21] apresentaram uma avaliação cega do desfecho, e em apenas um [17] refere que os experimentos foram conduzidos de acordo com padrões internacionais de bem-estar animal (Tabela 2).

Os parâmetros fisiológicos como o peso e os níveis de glicose sanguínea foram acompanhados em todos os animais de experimentação, porém sem maiores detalhes sobre a metodologia, no que diz respeito ao intervalo e a forma das verificações. A maioria dos estudos se refere apenas, ou ao peso dos animais [16,18], que teve uma variação de 300-450g, ou apenas a idade [17,19]. Os dois únicos estudos [20,21] que referem tanto a idade quanto o peso dos animais, apresentam dados bastante discrepantes (8 semanas de idade com peso de 250-280g, e 19 semanas de idade com peso médio de 450g, respectivamente). Em apenas dois dos estudos foi relatado o método utilizado para verificação dos níveis glicêmicos [19,20]. Todos eles informam sobre o período de verificação desses parâmetros, mas um [16] não refere este período em relação ao peso corpóreo dos animais, e outro [19] relata ter feito as avaliações desses parâmetros de forma seriada, mas não oferece maiores detalhes.

O estudo da velocidade de condução nervosa foi realizado em três estudos em períodos diferentes. Dois deles, ao final do período de experimentação, com 27 dias [21] e 12

semanas [20] depois da indução; e o terceiro [19], serialmente durante todo período de experimentação.

Quanto a metodologia empregada para seu estudo morfológico, Powell *et al.* [18], não a detalha limitando-se a pormenorizar apenas a preparação do material para o estudo ultraestrutural e relata seus resultados de forma qualitativa. Da mesma forma, Walker *et al.* [17], apenas refere que os parâmetros avaliados estão baseados em estudos prévios [9].

Já no estudo de Powell & Myers [16], eles detalham na metodologia que utilizaram um segmento do nervo ciático para análise morfométrica ultraestrutural, que as lâminas foram feitas a partir dos blocos selecionados randomicamente e as micrografias foram obtidas de forma seqüencial, tanto quanto possível na mesma direção e, em seguida, a varredura das grades em seqüência. Relataram ainda, que à medida que cada vaso foi identificado uma micrografia eletrônica foi tomada e um número de referência gravado. Igualmente, o estudo de Sugimoto & Yagihashi [19], define como foi realizado o procedimento de corte do segmento do nervo sural emblocado para análise morfométrica ultraestrutural, o tipo de microvaso e como foi feita a identificação das estruturas analisadas. Relata que todos os microvasos achados foram fotografados para análise, sem o conhecimento da identidade dos animais, e que as medições foram realizadas de modo duplo-cego, da mesma forma que o estudo de Uehara *et al.* [20]. O estudo de Walker *et al.* [21], também refere que uma técnica de amostragem aleatória sistemática foi empregada para obtenção de imagens do microscópio eletrônico para a quantificação de fibras nervosas, mas não deixa claro se a mesma técnica também tenha sido utilizada para a análise da microvasculatura.

A maioria dos estudos desta revisão refere a utilização de métodos para fixação de seus materiais bastante similares: na forma de imersão em glutaraldeído, pós-fixação com tetróxido de ósmio, seguido por uma desidratação seriada em álcools [17-21], e incorporados em resinas: araldite [16,18], epon [19], epox [20], e Spurr's [17,21]. Apenas um estudo utiliza uma forma de contrate do material diferente dos demais, ao invés do acetato de uranila seguida do citrato de chumbo [16-20], foi utilizado acetato de uranila seguida do citrato de sódio em 0.1M de hidróxido de sódio [21].

O resultado dos desfechos dos seis estudos incluídos pode ser observado na tabela 3. Um deles não apresenta tratamento estatístico de seus resultados [18] referindo haver espessamento da parede do vaso, e reduplicação das lâminas da membrana basal com depósitos eletrondensos entre elas. Esses mesmos achados também foram relatados em um segundo estudo [16], porém sem apresentar também resultados significativos. A área do lúmen capilar, avaliada por cinco estudos [16,17,19-21], foi a alteração mais presente

observada e com aumento significativo da circunferência em dois deles [19,21], em um [17] não foi encontrado como resultado um aumento significativo, e apenas um [16] foi de encontro aos achados anteriores, observando uma diminuição luminal ao invés de aumento, porém sem resultados significativos. Um dos estudos [20] apresenta seus dados morfométricos relacionados aos microvasos endoneurais na forma de gráfico de colunas não deixando claro suas médias e desvios/erros padrão, apresentando apenas de forma objetiva, seus resultados quanto aos níveis de significância.

Outros parâmetros importantes foram analisados como as alterações no número e no tamanho das células endoteliais [16,17,21], e as relações de patência luminal, de ocupação endotelial, de ocupação de pericito [19,20], e da área da membrana basal [19], expressados pela relação da sua área com a área vascular, como pode ser observado na tabela 3. A proliferação endotelial capilar foi analisada apenas por um trabalho [16] que mostrou um tamanho significativamente maior do endotélio citoplasmático em animais diabéticos (2.769 ± 0.166 vs 0.667 ± 0.225 , $p < 0.001$), e a subsequente medição da circunferência endotelial revelou que é aproximadamente o dobro nos ratos diabéticos.

DISCUSSÃO

Resultados positivos em estudos com animais de experimentação podem fornecer um impulso para o início dos estudos clínicos em seres humanos. De fato, os achados em estudos com animais têm alimentado adequadamente importantes avanços no entendimento da fisiopatologia das doenças e previram várias respostas para o acometimento dessas em seres humanos selecionados para intervenções terapêuticas.

Contudo, apesar da utilidade dos estudos com animais, ainda há uma variabilidade na qualidade da concepção desses trabalhos. Na área clínica, os projetos de estudos randomizados e controlados são rigorosamente analisados. E, mesmo as pesquisas com animais de experimentação, favorecer a base para estudos aplicados em seres humanos, a mesma análise crítica do desenho do estudo não tem sido amplamente aplicada [22].

Na presente investigação, que avaliou a existência de evidências que os experimentos com animais têm ou não sobre as alterações estruturais desencadeada pela neuropatia diabética nos microvasos endoneurais, foi observada uma ausência de uniformidade metodológica para as análises estruturais. Diversos parâmetros diferiram entre si, além de existir divergências nos achados das áreas, espessuras e das estruturas analisadas nos microvasos endoneurais.

O controle de fatores como o pareamento completo das amostras e o uso de metodologia com mascaramento, sem o conhecimento prévio do grupo a que o animal pertencia, precisam estar explícitos nos estudos, pois são dados importantes para se avaliar a interferência do pesquisador na análise dos resultados. Por estas razões, a qualidade metodológica dos estudos incluídos foi pobre. Apesar da maioria dos estudos [16,19-21] relatarem uma avaliação cega de resultados, questões como randomização e mascarado na atribuição da indução da diabetes, que são questões relevantes e que fornecem robustez ao controle dos vieses dos estudos [14], foram especialmente negligenciadas nestes experimentos com animais. Sem esquecer que a conformidade com as normas de bem estar animal para sua utilização em experimentos científicos foi citada em apenas um estudo [17]. É imprescindível que os estudos informem o tipo de procedimento realizado em seus laboratórios no uso de animais de experimentação.

Pelo fato de apresentarem semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes humano, os modelos experimentais de diabetes induzidos em ratos têm sido amplamente utilizados por pesquisadores em todo o mundo [23-26]. Em apenas um dos estudos desta revisão [17] o rato não foi o modelo animal eleito, sendo utilizado, cães de 3-4 meses que permaneceram num seguimento de 4 anos para a análise dos resultados, o que não interfere na presente análise pois cães com diabetes induzidos demonstraram uma redução na velocidade de condução nervosa [27], desmielinização depois de aproximadamente 4-5 anos de diabetes [28] e anormalidades morfológicas características do diabetes humano [29].

A idade para a indução do diabetes é um dado importante descrito na literatura devido ao tempo em que ocorre a maturação nervosa. Acredita-se que essa maturação aconteça por volta da 26ª a 30ª semana de idade em ratos, tornando assim a idade de indução um fator importante nas alterações nervosas decorrente do aumento dos níveis glicêmicos [30]. Assim, tal informação é de bastante utilidade para comparação com outros estudos. A descrição dos grupos experimentais utilizada inicialmente foi bastante variada. Com relação à idade e o peso inicial dos animais temos uma outra divergência de relato metodológico, no entanto, em dois dos estudos que apresentam tanto o peso quanto a idade inicial dos animais [20,21], a diferença entre esses parâmetros é bastante discrepante. O nervo periférico de mamíferos, desde que em condições de repouso, depende principalmente do metabolismo oxidativo. Porém, o aumento da idade está associado a uma diminuição progressiva do consumo de oxigênio em repouso e a um aumento progressivo na resistência à falta de oxigênio [31], desse modo, o estudo de Walker *et al.* [21] ao utilizar animais mais velhos poderia levar a uma interferência nos resultados das repercussões nervosas à indução diabética.

Nenhum dos estudos relata a quantidade inicial de animais utilizada na distribuição inicial dos grupos experimentais, nem a quantidade de perdas ocorridas nesse período pós-indução ou em decorrência de complicações, apesar das drogas utilizadas para a indução do diabetes já serem bastante conhecidas por sua alta toxicidade. Este é um dado importante que repercute na reprodutibilidade do trabalho, pois reflete os efeitos da droga e a sensibilidade do organismo e, conseqüentemente, a adequação da dosagem correta utilizada para uma indução diabética precisa.

Atualmente, o agente diabetogênico mais comumente utilizado para a indução do diabetes em ratos é a estreptozotocina, apesar de seu alto custo em comparação com o da aloxana [32]. Todos os estudos incluídos nesta revisão indicam doses similares às dosagens utilizadas na literatura que pode variar de 40 a 70 mg/Kg para a estreptozocina [24,25], e de 30 a 50 mg/kg para a aloxana [26,33] e mostram coerência entre si. Apenas um estudo [21] utilizou uma dosagem baixa de estreptozotocina (30 mg/kg) quando comparado com o que se tem empregado na literatura. No entanto, estudos [23,34] mostram que mesmo pequenas doses desse agente também são capazes de induzir alterações não duradouras do estado do diabetes, em um curto período de tempo como foi o caso do estudo de Walker *et al.* [21], que utilizou um período de seguimento de apenas 27 dias.

A microscopia eletrônica é o método padrão ouro para a avaliação das alterações estruturais que a neuropatia diabética causa nos microvasos endoneurais, sendo utilizada tanto para animais de experimentação [35,36] quanto para humanos [5,6,8]. Assim, todos os estudos analisados nesta revisão [16-21] corroboram com as normas metodológicas de acordo com a literatura atual. Quatro desses estudos [17,19-21] utilizaram programas de digitalização computadorizados para a avaliação e análise de seus desfechos, achando resultados mais próximos aos da literatura, tornando o estudo mais confiável. Dessa forma, o método utilizado nos dois outros estudos, através de micrografias [18] e de medidas feitas com um planímetro [16], se tornaram obsoletos com o advento da digitalização.

Para a realização do estudo ultraestrutural, há ainda, um problema em potencial com relação ao processamento histológico que pode provocar distorções na forma e no tamanho dos vasos, depois de processados, que vão diferir da forma encontrada *in vivo*, ou em outras formas de fixação. Porém, uma vez que ambos os grupos, controles e diabéticos são tratados da mesma forma, as análises serão mais fidedignas e não estarão sujeitas a erros [8]. A maioria dos estudos desta revisão refere à utilização de métodos para fixação de seus materiais bastante similares, estando todos de acordo com os parâmetros utilizados na literatura [8,35].

O diabetes tem efeitos diretos sobre a função da *vasa nervorum* de ratos, em especial no endotélio vascular, onde déficits nos sistemas vasodilatadores principais como o óxido nítrico e as prostaciclina foram percebidos. Isso também aumenta a reatividade dos vasoconstritores tais como a noradrenalina, angiotensina II e endotelina-1, um fenômeno provavelmente exacerbado por sínteses locais elevadas de angiotensina II e endotelina-1. Normalmente, estes mecanismos interagem em um sistema integrado de controle de fluxo sanguíneo do nervo. Se esta é a principal causa da neuropatia experimental, a proeminente disfunção vascular é o resultado desses múltiplos danos metabólicos, tendo como um dos principais alvos, o endotélio vascular [37]. Dessa forma, as células endoteliais exibem hiperplasia e hipertrofia, na neuropatia diabética estabelecida, e esta situação é conhecida como o início de uma série de alterações metabólicas e patológicas em pacientes diabéticos [5].

Utilizando-se de técnicas confiáveis, de forma digitalizada e comum para este tipo de análise, o resultado encontrado não foi o de obstrução/oclusão do microvaso endoneural, e sim, de um aumento da área do lúmen na maioria dos estudos, de forma significativa [19,21] ou apenas de uma tendência a esse aumento [17,20]. Corroborando os achados dessa revisão, esse aumento da área luminal também foi demonstrado em estudos com humanos diabéticos [3,5,6,9,10], em doentes diabéticos com insuficiência renal leve [5] e com neuropatia estabelecida [9]. O estudo de Powell *et al.* [16], apesar de não achar valores significativos, foi o único a apresentar uma tendência a redução do lúmen vascular.

Três dos estudos em análise [16,17,21] apresentaram como objeto de suas análises, as alterações no número (hiperplasia) e no tamanho das células endoteliais (hipertrofia) dos capilares endoneurais. Porém, o estudo de Powell *et al.* [16], divergiu dos outros dois estudos [17,21] quanto a presença significativa de hiperplasia das células endoteliais nos capilares, observando com isso uma diminuição do lúmen capilar e, de um aumento no número das células endoteliais. Já com relação a hipertrofia das células endoteliais, que pode ser uma característica tardia da microangiopatia diabética [5], o estudo de Powell & Myers [16] apresentou este achado com quase uma duplicação da área da célula endotelial nos animais diabéticos. E, no estudo de Walker *et al.* [17], mesmo sem um resultado significativo, também foi observado dados tendendo a um aumento dessa área. Contrariamente, outro estudo que também analisou a área da célula endotelial [21], apresentou como resultado uma redução dessa área, mesmo que de forma não significativa. Se confrontarmos o método de avaliação utilizado para a análise no estudo de Powell *et al.* [16] com o resultado de seus desfechos, que

diverge dos demais [17,21], podemos supor que eles podem ter sofrido a influência do tipo de metodologia empregada para o estudo morfológico.

CONCLUSÃO

A revisão sistemática de estudos experimentais em animais sobre a influência da neuropatia diabética nas alterações estruturais dos microvasos endoneurais indicam que há um aumento da área luminal, hipertrofia e hiperplasia das células endoteliais. No entanto, essa inferência deve ser avaliada com ressalva em virtude da baixa qualidade metodológica dos estudos disponíveis.

Assim, estudos futuros nessa área deverão ser melhor delineados considerando os seguintes aspectos pontuais que não foram controlados nos estudos incluídos como: randomização do grupo em tratamento e ou controle, indução cega da diabetes, e a referência de conformidade com padrões internacionais de bem-estar animal.

REFERÊNCIAS

- [1] W.R. Timperley, A.J.M. Boulton, G.A.B. Davies-Jones, J.A. Jarratt, J.D. Ward. Small vessel disease in progressive diabetic neuropathy associated with good metabolic control. *J Clin Pathol* 1985; 38:1030-8.
- [2] A. Veves, G.L. King. Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? *J Clin Invest* 2001; 107(10):1215-8.
- [3] N.E. Cameron, S.E.M. Eaton, M.A. Cotter, S. Tesfaye. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2001; 44:1973-88.
- [5] R.A. Malik, A. Veves, E.A. Masson, A.K. Sharma, A.K. Ah-See, W. Schady, R.H. Lye, A.J.M. Boulton. Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 35:557-61.
- [4] A.R.T. Gagliard. Neuropatia diabética periférica. *J Vasc Br* 2003; 2(1):67-74.
- [6] C. Giannini, P.J. Dyck. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol* 1995; 37:498-504.
- [7] J.B. Thomaz, J.C.P. Oliveira, C.D.C. Herdy, S.B. Brancaglioni, F.M. Abílio, Y.C.M. Thomaz, M.V. Lima. Pé diabético: Curso de atualização em vasculopatia - Parte I. *ARS CVRANDI – A revista da clínica médica* 1996: 61-104.
- [8] H. Yasuda, P.J. Dyck. Abnormalities of endoneurial microvessels and sural nerve pathology in diabetic neuropathy. *Neurology* 1987 Jan; 37:20-8.

- [9] R.A. Malik, P.G. Newrick, A.K. Sharma, A. Jennings, A.K. Ah-See, T.M. Mayhew, J. Jakubowski, A.J.M. Boulton, J.D. Ward. Microangiopathy in human diabetic neuropathy: relationship between capillary abnormalities and the severity of neuropathy. *Diabetologia* 1989; 32:92-102.
- [10] R.A. Malik. The pathology of human diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997; 46(Suppl 2):S50-S53.
- [11] R.A. Malik, S. Tesfaye, S.D. Thompson, A. Veves, A.K. Sharma, A.J.M. Boulton, J.D. Ward. Endoneurial localization of microvascular damage in human diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1993; 36:454-9.
- [12] W.R. Timperley, J.D. Ward, F.E. Preston, T. Duckworth, B.C. O'Malley. Clinical and histological studies in diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1976; 12:237-43.
- [13] J.P. Dyck, S. Hansen, J. Karnes, P. O'Brien, H. Yasuda, A. Windebank, B. Zimmerman. Capillary number and percentage closed in human diabetic sural nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:2513-7.
- [14] J. Horn, R.J. de Haan, M. Vermeulen, P.G.M. Luiten, M. Limburg. Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: A systematic review. *Stroke* 2001; 32:2433-8.
- [15] M.R. Macleod, T. O'Collins, D.W. Howells, G.A. Donnan. Pooling of animal experimental data reveals influence of study design and publication bias. *Stroke* 2004; 35:1203-8.
- [16] H.C. Powell, R.R. Myers. Axonopathy and microangiopathy in chronic alloxan diabetes. *Acta Neuropathol* 1984; 65(2):128-37.
- [17] D. Walker, I. Siddique, H. Anderson, T.A. Gardiner, D.B. Archer, A.J.M. Boulton, R.A. Malik. Nerve pathology in the type 1 diabetic dog: effects of treatment with sulindac. *J Peripher Nerv Syst* 2001; 6(4):219-26.
- [18] H. Powell, D. Knox, S. Lee, A.C. Charters, M. Orloff, R. Garrett, P. Lampert. Alloxan diabetic neuropathy: electron microscopic studies. *Neurology* 1977; 27(1):60-6.
- [19] K. Sugimoto, S. Yagihashi. Effects of aminoguanidine on structural alterations of microvessels in peripheral nerve of streptozotocin diabetic rats. *Microvasc Res* 1997; 53:105-12.
- [20] K. Uehara, K. Sugimoto, R. Wada, T. Yoshikawa, K. Marukawa, Y. Yasuda, Y. Kimura, S. Yagihashi. Effects of cilostazol on the peripheral nerve function and structure in STZ-induced diabetic rats. *J Diabetes Complications* 1997; 11(3):194-202.
- [21] D. Walker, A. Carrington, S.A. Cannan, D. Sawicki, J. Sredy, A.J. Boulton, R.A. Malik. Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozotocin diabetic rat. *J Anat* 1999; 195:419-27.
- [22] D.S. Lee, Q.T. Nguyen, N. Lapointe, P.C. Austin, A. Ohlsson, J.V. Tu, D.J. Stewart, J.L. Rouleau. Meta-analysis of the effects of endothelin receptor blockade on survival in experimental heart failure. *J Cardiac Fail* 2003; 9(5):368-74.

- [23] A. Junod, A.E. Lambert, W. Stauffacher, A.E. Renold. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48:2129-39.
- [24] I.G. Obrosova, F. Li, O.I. Abatan, M.A. Forsell, K. Komjati, P. Pacher, C. Szabo, M.J. Stevens. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes* 2004; 53:711-20.
- [25] N. Kato, K. Nemoto, N. Nakanishi, R. Morishita, Y. Kaneda, M. Uenoyama, T. Ikeda, K. Fujikawa. Nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor improves streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Diabetes* 2005; 54:846-54.
- [26] C.A.M. Oliveira, E. Luciano, M.C.C.G. Marcondes, M.A.R. Mello. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. *J Diabetes Complications* 2007; 21:258-64.
- [27] R.L. Engerman, T.S. Kern, M.E. Larson. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosemia in dogs. *Diabetologia* 1994; 37:141-4.
- [28] A.K. Sharma, R.A. Malik, P. Dhar, R.D. Mehra, I. Ahmed, C.T. Lowrie, W.D. Schall. Peripheral nerve abnormalities in spontaneously diabetic dog. *Int J Diabetes* 1995; 3:130-9.
- [29] T.S. Kern, R.L. Engerman. Vascular lesions in diabetes are distributed non-uniformly within the retina. *Exp Eye Res* 1995; 60:545-9.
- [30] J.I. Malone, S. Lowitt, J.K. Korthals, A. Salem, C. Miranda. The Effect of Hyperglycemia on Nerve Conduction and Structure Is Age Dependent. *American Diabetes Association* 1996; 45:209-15.
- [31] P.A. Low, J.D. Schmelzer, K.K. Ward. The effect of age on energy metabolism and resistance to ischemic conduction failure in rat peripheral nerve. *J. Physiol.* 1986; 374:263-71.
- [32] M.M. Lerco, C.T. Spadella, J.L.M. Machado, S.A. Schellini, C.R. Padovani. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cir Bras* [serial online] 2003 Mar-Apr;18(2). Available from: URL: <http://www.scielo.br/acb>
- [33] L.H. Cazarolli, F.R.M.B. Silva. Estudo da atividade de flavonóides e de complexos de vanádio na glicemia de ratos diabéticos induzidos com aloxana. 2004; (**dissertação**).
- [34] S. Cellek, N.A. Foxwell, S. Moncada. Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 2003; 52:2353-62.
- [35] K. Maeda, H. Yasuda, Y. Taniguchi, M. Terada, R. Kikkawa. Endoneurial microvasculature of chronically transected sciatic nerves in diabetic rats. *J Peripher Nerv Syst* 1999; 4(1):13-8.
- [36] E.C. Carlson, J.L. Audette, N.J. Veitenheimer, J.A. Risan, D.I. Laturus, P.N. Epstein. Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. *Anat Rec Part A* 2003; 271A:332-41.
- [37] N.E. Cameron. The aetiology of neuropathy in experimental diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2003; 3:98-105.

[38] A. Liberati, D.G. Altman, J. Tetzlaff, C. Mulrow, P.C. Gøtzsche, J.P.A. Ioannidis, M. Clarke, P.J. Devereaux, J. Kleijnen, D. Moher. The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. *Ann Intern Med* 2009; 151(4):W65–W94.

FIGURAS

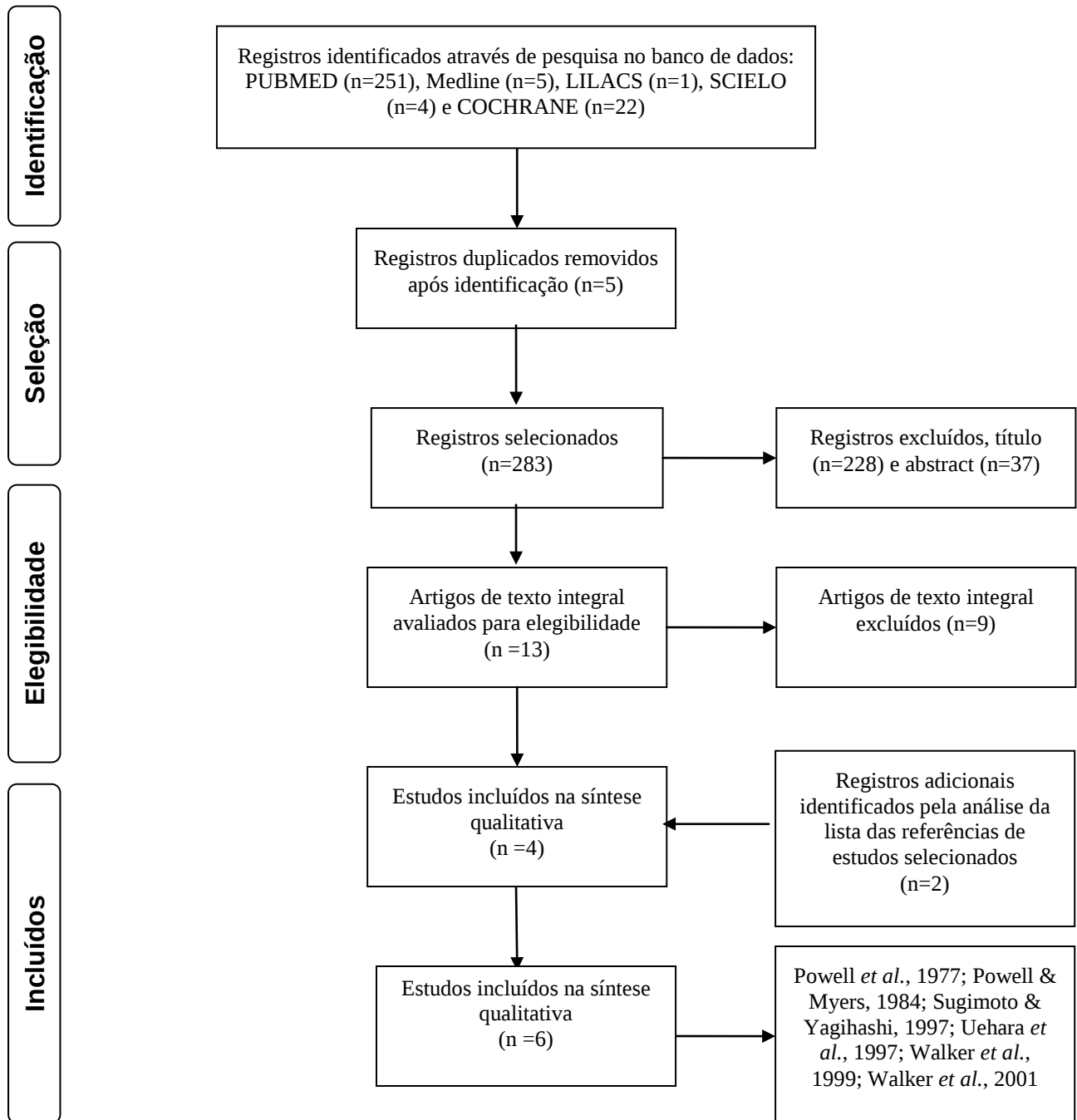


Figura 1. Busca e seleção de estudos para a revisão sistemática de acordo com o PRISMA [38].

TABELAS

Tabela 1. Características dos 6 estudos incluídos na revisão sistemática.

Primeiro autor, ano de publicação	Animal, sexo, linhagem, n (diabético/controles)	Droga, dosagem, método de indução	Monitorização dos parâmetros fisiológicos	Seguimento	Nervo estudado
Powell, 1977	Ratos machos, Lewis (8/8)	Aloxana 42-44 mg/kg, intravenosa	Peso, glicemia	24 meses	Ciático
Powell, 1984	Ratos machos, Lewis (17/21)	Aloxana 42-44 mg/kg, intravenosa	Peso, glicemia	24 meses	Ciático
Sugimoto, 1997	Ratos machos, Wistar (14/7)	Estreptozotocina 45 mg/kg, intravenosa	Peso, glicemia, MNCV	16 semanas	Sural
Uehara, 1997	Ratos machos, Wistar (29/9)	Estreptozotocina 50 mg/kg, intravenosa	Peso, glicemia plasmática, MNCV, hemoglobina glicosilada	12 semanas	Sural
Walker, 1999	Ratos machos, Sprague-Dawley (10/10)	Estreptozotocina 30 mg/kg, intraperitoneal	Peso, glicemia, MNCV	27 dias	Tibial
Walker, 2001	Cães machos, Beagles (12/6)	Aloxana 40 mg/kg + estreptozotocina 35 mg/kg, intravenosa	Peso, glicemia, hemoglobina glicosilada	4 anos	Ciático

MNCV, indica estudo da velocidade de condução do nervo motor.

Tabela 2. Características de qualidade dos estudos incluídos.

Publicação	Ano	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	Pontuação	Referência
Powell <i>et al.</i>	1977	X				X		2	18
Powell & Myers	1984	X			X	X		3	16
Sugimoto & Yagihashi	1997	X	X		X	X		4	19
Uehara <i>et al.</i>	1997	X	X		X	X		4	20
Walker <i>et al.</i>	1999	X			X	X		3	21
Walker <i>et al.</i>	2001	X				X	X	3	17

Estudos que atendam aos critérios: (1) publicação revisada pelos pares, (2) alocação randomizada para o grupo tratado e controle, (3) sigilo na indução do diabetes, (4) avaliação cega dos resultados, (5) monitorização de parâmetros fisiológicos, e (6) conformidade com os padrões de regulamentação de bem-estar animal.

Tabela 3. Resultados dos desfechos de 6 estudos incluídos na revisão sistemática.

		Powell, 1984	Sugimoto, 1997	Uehara, 1997	Walker, 1999	Walker, 2001
Área luminal (μm^2)	C	42.97 $\pm$ 3.43	40.0 $\pm$ 12.1	NS	25.0 $\pm$ 2.6	7.6 $\pm$ 1.2
	DM	36.01 $\pm$ 2.38	80.5 $\pm$ 15.2	NS	35.4 $\pm$ 1.7	10.7 $\pm$ 1.3
	<i>p</i> valor	NS	< 0.05	NS	< 0.03	NS
Área da célula endotelial (μm^2)	C	106.28 $\pm$ 9.93	-	-	24.8 $\pm$ 2.6	13.7 $\pm$ 1.7
	DM	192.25 $\pm$ 28.24	-	-	21.7 $\pm$ 2.6	15.1 $\pm$ 1.5
	<i>p</i> value	< 0.01	-	-	< 0.08	NS
Área da membrana basal (μm^2)	C	-	-	-	16.8 $\pm$ 1.1	14.1 $\pm$ 0.8
	DM	-	-	-	16.7 $\pm$ 2.4	17.8 $\pm$ 1.3
	<i>p</i> value	-	-	-	NS	< 0.05
Área vascular (μm^2)	C	-	98.7 $\pm$ 14.3	NS	-	-
	DM	-	151.5 $\pm$ 18.9	NS	-	-
	<i>p</i> value	-	< 0.03	NS	-	-
Núcleos da célula endotelial, N°	C	1.33 $\pm$ 0.26	-	-	5.3 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 3.7
	DM	2.33 $\pm$ 0.40	-	-	5.1 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.3
	<i>p</i> value	< 0.005	-	-	NS	NS
Espessura da membrana basal (μm)	C	-	0.30 $\pm$ 0.02	-	-	-
	DM	-	0.31 $\pm$ 0.01	-	-	-
	<i>p</i> value	-	NS	-	-	-
Frequência de patência luminal	C	-	0.34 $\pm$ 0.06	NS	-	-
	DM	-	0.49 $\pm$ 0.04	NS	-	-
	<i>p</i> value	-	< 0.05	NS	-	-
Frequência de ocupação endotelial	C	-	0.36 $\pm$ 0.03	NS	-	-
	DM	-	0.26 $\pm$ 0.03	NS	-	-
	<i>p</i> value	-	< 0.02	NS	-	-
Frequência de ocupação da membrana basal	C	-	0.14 $\pm$ 0.02	-	-	-
	DM	-	0.10 $\pm$ 0.01	-	-	-
	<i>p</i> value	-	< 0.05	-	-	-
Frequência de ocupação do pericito	C	-	0.17 $\pm$ 0.03	Resultado gráfico	-	-
	DM	-	0.15 $\pm$ 0.01	Resultado gráfico	-	-
	<i>p</i> value	-	NS	< 0.05	-	-

Estudos representados por seu primeiro autor e ano da publicação; C, indica grupo controle; DM, animais diabéticos; NS, não significativo.

6. MATERIAL E MÉTODOS

a. Animais

Utilizamos ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus*), com idade aproximada de 60 dias e peso inicial médio de $264 \pm 40,46$ g, oriundos do biotério do Departamento de Nutrição – UFPE. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia em gaiolas plásticas coletivas (máximo cinco animais/gaiola), a uma temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro invertido de 12h, com livre acesso à água e a ração (Labina; Purina PetCare Company).

Os procedimentos aplicados para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas – UFPE (Anexo A).

b. Grupos de Estudo

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo Controle Sedentário (CS), não diabéticos; Grupo Controle Treinado (CT), não diabéticos, submetidos ao treinamento físico aeróbio; o Grupo Diabético Sedentário (DS), com diabetes experimental, sem qualquer tipo de tratamento; e o Grupo Diabético Treinado (DT) com diabetes experimental, submetidos ao treinamento físico aeróbio; constituídos de 10 animais cada um dos grupos. O grupo de animais treinados foi submetido a um protocolo de treinamento físico aeróbico e os demais limitaram-se a atividades dentro da própria gaiola.

c. Indução do Diabetes Experimental

O diabetes experimental, similar ao tipo I, foi induzido pela administração de dose única intraperitoneal de Streptozotocina (STZ; Sigma Chemical Co., USA), após jejum alimentar de 12 horas. A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal, medido cuidadosamente em balança digital de precisão (BS3000A). Os animais não diabéticos receberam, da mesma forma, doses equivalentes de solução tampão citrato de sódio e, decorridos 30 minutos do tratamento os animais foram alimentados normalmente (Dall'Ago *et al.*, 2002).

d. Avaliação Clínica

Foram caracterizados como diabéticos e incluídos no experimento apenas os animais que apresentaram valores de glicose sanguínea acima de 200 mg/dL 72 h após a indução pela STZ (Lehti *et al.*, 2007) com amostra de sangue colhida da ponta da cauda do animal após um jejum de 12 horas (Glicosímetro AcuChek; Roche). Após a confirmação do diabetes foi realizada uma verificação semanal da glicose sanguínea, após jejum de 12h, e do peso corpóreo em todos os grupos. Os animais diabéticos em nenhum momento do período de estudo foram tratados para controle da glicemia, e mostraram sintomas compatíveis com o diabetes tipo I, tais como poliúria, polidipsia e perda de peso.

e. Estudo Eletrofisiológico

O registro da velocidade de condução nervosa foi realizado no Laboratório de Eletroneuromiografia do Hospital das Clínicas – UFPE. Nos animais do grupo controle esse registro foi realizado ao completarem 60 dias de vida (semana 0) e durante as sete semanas consecutivas (semanas de 1-7). Nos animais diabéticos o registro foi realizado aos 59 dias de idade (semana 0), ou seja, um dia anterior à realização da indução e após uma semana foi realizado o registro semanal que se estendeu durante seis semanas consecutivas (semana 2-7).

O estudo da velocidade de condução nervosa (VCN) e da amplitude, pico-a-pico, do potencial de ação do nervo sensitivo caudal foram verificados na cauda do animal. Para isto foi utilizado um eletromiógrafo (Demetec centor – M4V) com o programa Racia-Alvar

Centor M version v2.1 [software Altromed GmbH, version 2.81 (4 channels), 1999] e acoplado a este aparelho foi construída uma tábua formicada e a ela afixados 6 eletrodos do tipo “jacaré” posicionados em linha reta a cada três centímetros. Os dois eletrodos distais foram utilizados para estimulação, os dois proximais para registro e os dois centrais como terra.

Após serem anestesiados, com uma solução de cloridrato de xilazina (Rompum – Bayer®) e quetamina (Ketalar®), por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (Massone, 1988) e após limpeza e desengorduramento da cauda do animal, este era posicionado ventralmente, de forma que sua cauda ficasse completamente livre, para ser posicionada entre os eletrodos (Figura 1).

As medidas de latência, amplitude e duração dos potenciais de ação do nervo sensitivo caudal foram automaticamente calculadas pelo aparelho, após a inserção da distância, mantida constante, de oito centímetros entre o eletrodo registrador e estimulador no aparelho, verificadas na cauda do rato por um estímulo distal e registrado proximalmente através da técnica ortodrômica. A VCN e a amplitude dos potenciais de ação do nervo sensitivo caudal foram calculadas automaticamente, e apresentadas em metros por segundo (m/s) e microvolt (μV).

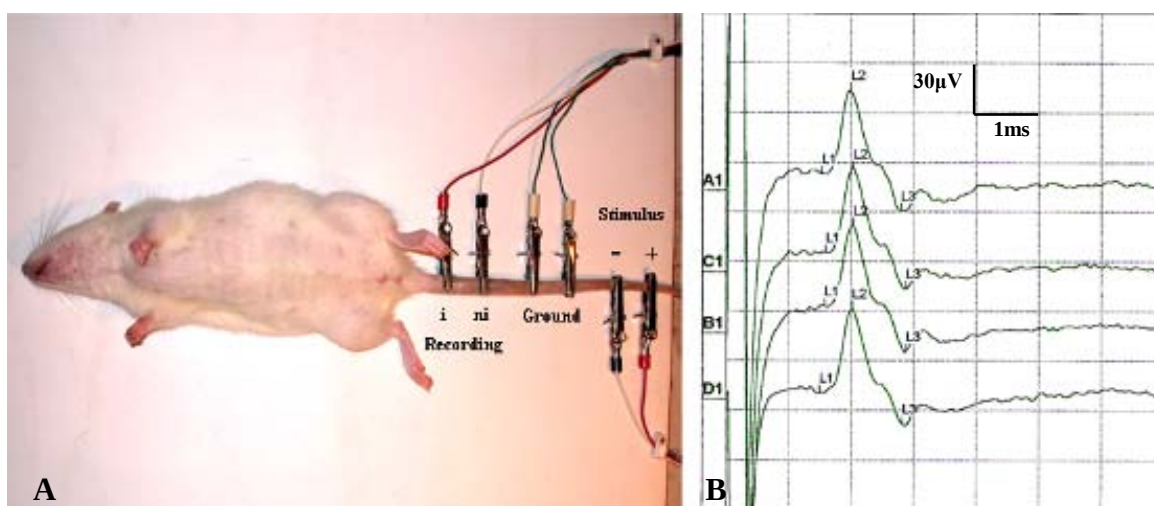


Figura 1. Posicionamento dos eletrodos de superfície do tipo “jacaré” na cauda do animal (A); e registros com onda típica do estudo da velocidade de condução nervosa e amplitudes dos potenciais de ação do nervo sensitivo caudal (B). (i), invertido, (ni), não-invertido, (-) catodo, (+) anodo.

Durante todo o procedimento a temperatura da cauda foi mensurada e controlada, sendo mantida em uma média constante de 31,5 °C, verificada através de um termômetro subdermal (Doc Thermo; modelo n. HD – 11; Comdek Industrial Corp.) imediatamente antes do estímulo para cada animal, e usada uma lâmpada dicróica posicionada a cerca de 10cm da cauda do animal para aquecimento e controle.

f. Treinamento Físico Aeróbio

Após a determinação do diabetes experimental, os animais do grupo treinado (CT e DT), com um mesmo período de tempo, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos ao treinamento físico aeróbio enquanto os grupos sedentários permaneceram em suas respectivas gaiolas, estando sujeito apenas a manipulação.

O protocolo de treinamento físico aeróbio consistiu de nado forçado em tanque cilíndrico de 60 x 80 cm (diâmetro, altura), desenvolvido pelo Departamento de Anatomia – UFPE, com água a uma profundidade de 35 a 40 cm, a temperatura monitorada e controlada de 32 ± 1 °C, por um período de 6 semanas, 5 dias/semana, sendo precedido de um período de adaptação de uma semana com treino progressivo de 10 minutos por cinco dias até que o animal nadasse continuamente 1h/dia. O nado em grupo foi usado por promover um exercício mais vigoroso do que quando o animal realiza o treino sozinho no tanque (Nakao *et al.*, 2000). A temperatura da água foi controlada por um termostato que a mantinha em 32°C (± 1), (Figuras 2A e 2C).

Ao final de cada sessão de treinamento, para minimizar os efeitos da exposição ao frio, os animais eram enxutos e ficavam em uma câmara de aquecimento (Királi *et al.*, 2007), também desenvolvido pelo Departamento de Anatomia da UFPE, por cerca de 20 minutos (Figura 2B).

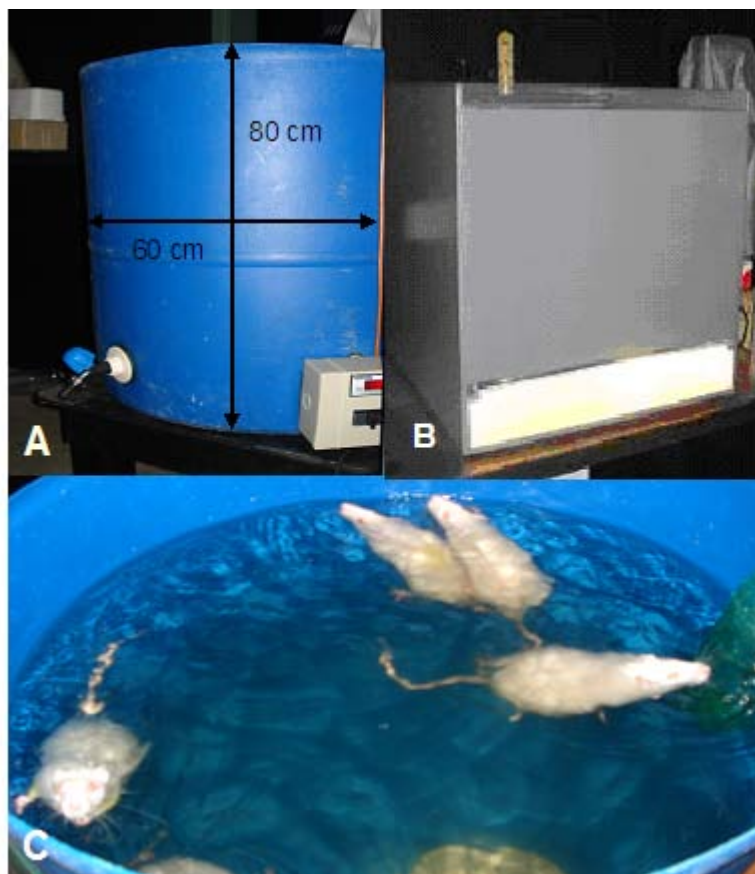


Figura 2. Tanque cilíndrico de natação (A); câmara de aquecimento (B); e animais realizando nado forçado em grupo (C).

g. Coleta e Processamento do Material

Vinte e quatro horas após o término do período de treinamento físico aeróbio, os animais de ambos os grupos experimentais, animais diabéticos e controles, foram anestesiados com uma solução de xilazina (Rompun; Bayer) e cloridrato de cetamina (Ketalar, Parke Davis Warner Lambert) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (Massone, 1988) para a retirada do nervo ciático.

Foi realizada uma incisão na pele da região posterior da coxa direita, realizado um corte de três centímetros médio-lateral e, em seguida, os músculos glúteo máximo, glúteo médio e os isquiotibiais foram rebatidos para exposição do nervo ciático direito e em seguida seccionado transversalmente (10 mm) (Figura 3). A pré-fixação do nervo foi feita a partir da visualização da estrutura na região anatômica através do gotejamento de 1ml *in situ* de solução de glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M.

O nervo ciático foi removido ao nível da sua emergência na região glútea até a sua ramificação na região poplítea. O material recolhido foi, então, fixado por imersão na solução fixadora e mantido em condições de resfriamento (6 °C em geladeira).

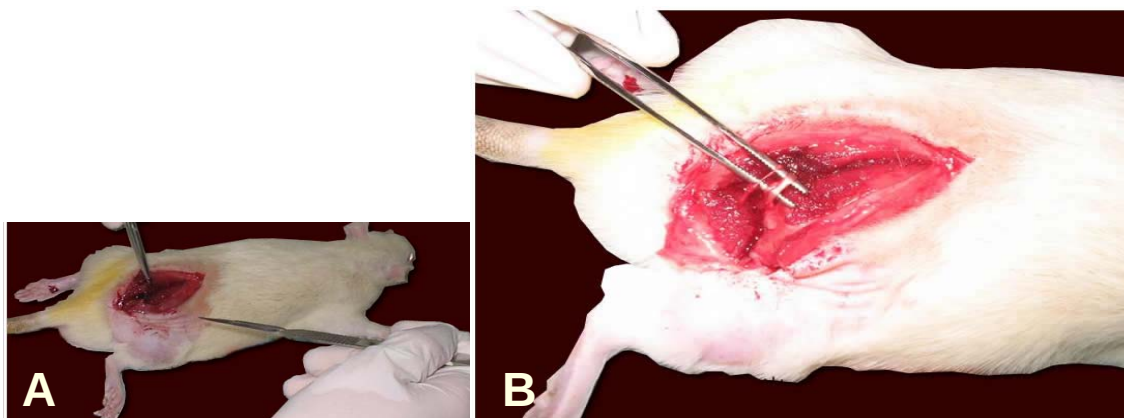


Figura 3. Incisão na pele da região posterior da coxa direita para exposição do nervo ciático (A) e sua dissecação (B).

Após a coleta e fixação, o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio a 0,1M e realizada a pós-fixação dos segmentos em tetróxido de ósmio a 1% acrescido de tampão cacodilato de sódio a 0,1M durante 2h em ambiente de total escuridão. Posteriormente, os segmentos foram novamente lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e desidratados em soluções de concentração crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). Sendo, então, inclusos em resina sintética (EPON 812, Polysciences®). Obtidos os blocos com os fragmentos do nervo ciático, foi utilizado um ultramicrotomo (ULTRACUT, Leica) para a realização dos cortes semifinos (0,38 µm) os quais foram corados com azul de toluidina (1%) para exame ao microscópio de luz.

h. Análise Histomorfológica

A determinação da área de secção transversa total e o perímetro do nervo ciático (Figura 4A), e a contagem do número de vasos endoneurais (Figura 4B) foi realizada sem o

conhecimento do material analisado por um único examinador (C.C.C.) através da técnica de varredura de todos os campos microscópicos (Figura 4B).

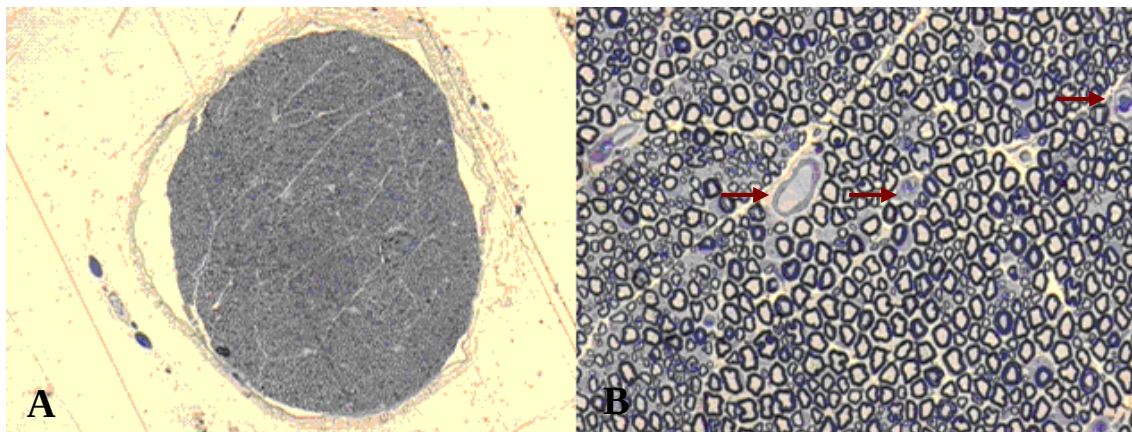


Figura 4. Área de secção transversa do nervo ciático de rato diabético, 40X (A); e campo microscópico (200X) contendo vasos endoneurais, 200X (setas) (B); Azul de toluidina.

A contagem e captura das imagens foi realizada utilizando-se de uma vídeo-câmera (Samsung, SHC-410 NAD) através do software Power VCR II, acoplado a um microscópio de luz (Olympus – BX50), com aumento final de 200X, e a mensuração da área e perímetro do nervo de cada animal foi realizada através do software Scion Image for Windows (Beta 4.0.2.). Apenas os vasos sanguíneos claramente definidos contendo hemácias no lúmen e/ou com a presença uma única camada de pericitos ao redor da célula endotelial foram contados. A técnica não distingue arteríolas de vênulas, em parte porque a vasa nervorum compreende um grande número de anastomoses arteriovenosas.

i. Análise Ultraestrutural

Para a análise ultraestrutural foi realizada a ultramicrotomia do material embocado contendo os fragmentos da secção transversa do nervo ciático de cada animal para aquisição dos cortes ultrafinos (70 nm). Estes foram coletados em grades de níquel com malha de 300 orifícios e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 5% por 1 h e, com citrato de chumbo a 1% por 3 min. As grades contendo as seções ultrafinas das amostras foram

observadas em microscópio eletrônico FEI Morgagni 268D a uma voltagem de 60 kV. Os capilares foram definidos como vasos sanguíneos cujas células endoteliais estavam envolvidas por uma camada descontínua de pericitos. A identificação do pericito foi baseada na presença da membrana basal.

Cinquenta e sete capilares endoneurais (variando entre 3-5 por animal) que estavam desobstruídos pelas linhas das grades ou outros artefatos, tais como rasgões, buracos e dobras, foram fotografados com uma magnitude final de 8.900X para as análises morfométricas e de 14.000-28.000X para análise qualitativa mais detalhada das estruturas da parede celular. A composição de múltiplos registros, para os vasos mais largos foram necessárias pois não se ajustaram dentro de uma única imagem, e foram realizadas através do software Fireworks (Macromedia, 8.0.0.777). A área e perímetro vascular (AV e PV), a área e perímetro do lúmen (AL e PL), a área e perímetro endotelial (AE e PE), a área e perímetro da membrana basal (AMB e PMB), e a área do pericito (AP) foram realizadas nos registros eletromicrográficos através do software Scion Image for Windows (Beta 4.0.2.), como mostra a figura 5, e operado sem o conhecimento do material analisado por um único examinador (C.C.C.).

A área vascular foi delineada pela circunferência externa do pericito e membrana basal menos a área do lúmen que foi delineada pela circunferência interna da célula endotelial que reveste o lúmen, a área endotelial pela circunferência externa do endotélio menos a área referente ao lúmen, a área da membrana basal pela sua circunferência externa menos o endotélio, e a área do pericito pela área vascular menos a área da membrana basal. Também foram contados o número de núcleos das células endoteliais e o número de núcleos de pericito.

Com áreas e perímetros mensurados, foram determinadas a espessura da membrana basal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) = $\frac{\text{área da membrana basal}}{\text{perímetro externo da célula endotelial}}$; a espessura da parede do vaso (μm) = $\frac{\text{área da célula endotelial} - \text{área do lúmen}}{1/2 \times (\text{perímetro da célula endotelial} + \text{perímetro do lúmen})}$; e a hiperplasia das células endotelial e pericito = $\frac{\text{número de núcleos}}{\text{vaso}}$, como descrito previamente (Estrella *et al.*, 2008). Vasos com razão entre o eixo menor e maior mais que 1:3 foram excluídos.

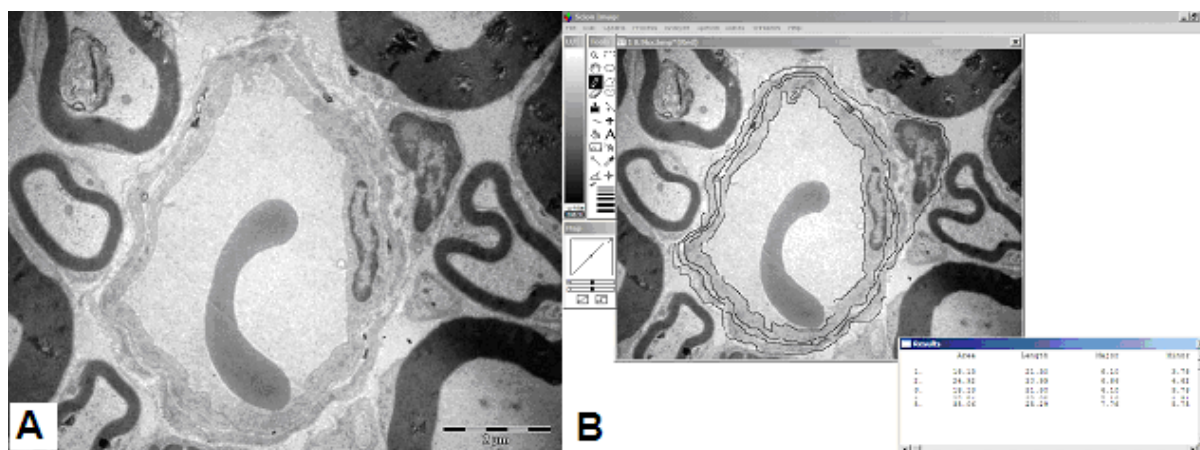


Figura 5. Eletromicrografia de corte transverso de vaso sanguíneo endoneural do nervo ciático de rato diabético (A); e contornos dos componentes da parede celular para determinação de áreas e perímetros usados nas mensurações morfométricas (B). Escala de barra com 2 µm (8.900X).

j. Análise Estatística.

Os resultados referentes aos parâmetros estudados por grupo de animais foram sumarizados em média, desvio padrão e limites mínimo e máximo. A análise estatística das diferenças foi realizada por análise de variância (ANOVA). As múltiplas comparações *post-hoc* foram feitas com teste de Tukey HSD. O *p* crítico para todos os testes foi de 0,05. Os dados analisados através do programa estatístico XLStat® versão 2009.4.03.

7. RESULTADOS

a. Artigo Original 1

ORIGINAL ARTICLE
Experimental Neurology

Sensory nerve conduction in the caudal nerves of rats with diabetes^I

Condução nervosa sensorial no nervo caudal de ratos com diabetes experimental

Celina Cordeiro de Carvalho^I, Juliana Netto Maia^{II}, Marina Hazin Galvão^{III}, Anderson de Lima Silva^{III}, Ana Carine Gouveia Mendes^{III}, Otávio Gomes Lins^{IV}, Sílvia Regina Arruda de Moraes^V

^I Fellow PhD degree, Program in Neuropsychiatry and Behavioural Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

^{II} Master Full Professor Faculty Maurice of Nassau, Recife, Brazil.

^{III} Physiotherapists.

^{IV} MD, PhD Associate Professor Department of Neuropsychiatry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

^V PhD Associate Professor Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

¹ Research performed at Departament de anatomy, Post-Graduation Program in Neuropsychiatry and Behavioural Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Purpose: To study sensory nerve conduction of the caudal nerve in normal and diabetic rats.

Methods: Diabetes was induced to twenty 60 days Wistar male rats. Twenty normal rats served as controls. Caudal nerve conduction studies were made before diabetes induction and weekly at end of six consecutive weeks. The caudal nerve was stimulated distally and nerve potentials were recorded proximally on the animal's tail using common "alligator" clips as surface electrodes. **Results:** After induction, nerve conduction velocities (NCV) increased slower with age in the diabetic than in the control group. Sensory nerve action potentials (SNAP) conduction velocities increased slower in the diabetic than in the control group (slope of regression line: 0.5 vs 1.3m/s per week; NCV in the 15th week = 39±3m/s vs 44±4m/s). Tukey's tests showed differences between groups at the 11th, 13th and 15th weeks. From the 10th week, SNAP amplitudes increased faster in the diabetic than in the control group (slopes of the regression line: 10 vs 8µV per week; SNAP amplitudes in the 15th week: 107±23µV vs 85±13µV). Differences at the 12th, 13th and 15th weeks were significant. **Conclusions:** In diabetic rats NCV were slower whereas amplitudes were larger than in normal rats.

Key-words: Caudal nerve, Experimental diabetes, Nerve conduction study.

RESUMO

Objetivo: Estudar a condução nervosa sensorial do nervo caudal em ratos normais e diabéticos. **Métodos:** O diabetes foi induzido em vinte ratos Wistar 60 dias. Vinte ratos serviram como controle. Os estudos da condução do nervo caudal foram feitos antes da indução do diabetes e semanalmente ao final de seis semanas consecutivas. O nervo caudal foi estimulado distalmente e potenciais foram registrados proximalmente na cauda do animal, usando cliques comum "jacaré" como eletrodos de superfície. **Resultados:** Após a indução, a velocidade de condução nervosa (VCN) aumentou mais lentamente com a idade no grupo diabético que no controle. Potenciais de ação dos nervos sensitivos (PANS) aumentaram a velocidade de condução mais lentamente no grupo diabético que no controle (linha de regressão: 0,5 vs 1,3m/s por semana; VCN na 15^a semana = 39±3m/s vs 44±4m/s). O teste de Tukey mostrou diferenças entre os grupos nas 11^a, 13^a e 15^a semanas. A partir da semana 10, os PANS aumentaram mais rapidamente no grupo diabético que no controle (linha de regressão: 10 vs 8µV por semana; PANS na 15^a semana: 107±23µV vs 85±13µV). Diferenças na semana 12, 13 e 15 foram significativas. **Conclusões:** Nos ratos diabéticos a VCN foi mais lenta enquanto que as amplitudes foram maiores que em ratos normais.

Descritores: Nervo Caudal, Diabetes experimental, Estudo da condução nervosa.

INTRODUÇÃO

Polineuropatia periférica é uma complicação comum do diabetes *mellitus*¹. Consiste em desmielinização e degeneração axonal dos nervos periféricos², levando à diminuição da velocidade de condução nervosa (VCN) e redução da amplitude dos potenciais de ação dos nervos sensitivos (PANS) e motor^{1,3-9}. Estas características da polineuropatia diabética são observados nos seres humanos com diabetes^{2,10,11} e em animais com o diabetes induzido experimentalmente³⁻⁹.

Junto com o ciático, os nervos fibular, tibial, sural, safeno, facial^{4,7,12-15}, e o nervo caudal tem sido freqüentemente utilizado para estudos eletrofisiológicos em ratos^{3,5,6,16}, porque a cauda longa permite a medição precisa de distâncias e o pequeno diâmetro da cauda facilita a colocação dos eletrodos de estimulação e registro junto ao nervo^{16,17}. A maioria dos estudos de condução nervosa animal se utiliza de técnicas invasivas, com eletrodos de agulha^{3-7,15,16,18,19} ou com acesso cirúrgico ao nervo¹²⁻¹⁴. Um menor número de estudos utiliza técnicas não-invasivas, com eletrodos de superfície²⁰⁻²².

O objetivo deste trabalho foi estudar a condução nervosa sensitiva do nervo caudal em ratos normais e diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais. Foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), albinos machos com 60 dias de idade, provenientes do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas (máximo de 5 animais/gaiola), sob uma temperatura de 23 ± 1 °C, um ciclo invertido 12h de dia/noite, com livre acesso à água e ração (Labina). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 20 animais: Grupo Controle, sem diabetes; e o Grupo Diabetes, com diabetes não-tratados induzido experimentalmente. O diabetes foi induzido por uma única injeção intraperitoneal de 60mg/kg estreptozotocina (Sigma Chemical Co., E.U.A.) diluído em solução tampão (citrato de sódio, 10mM, pH 4,5) após 12 horas de jejum²³. Os animais do grupo controle receberam a mesma solução tampão, sem estreptozotocina. Após 30 minutos os dois grupos foram alimentados normalmente. A glicose sanguínea foi medida 3 e 7 dias após a indução, com amostras de sangue coletadas a partir da ponta da cauda após 12 horas de jejum. Apenas os animais com glicemia sanguínea acima de 200 mg/dL (Glucosymmetry AccuCheck – Roche) foram admitidos no Grupo de Diabetes. Ambos os grupos tiveram o peso e a glicemia sanguínea avaliados semanalmente.

Os métodos utilizados para tratar e cuidar dos animais estão de acordo com os padrões do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal, e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco.

Eletrofisiologia: Os estudos da condução do nervo caudal foram feitos antes da indução do diabetes e de forma semanal no final de seis semanas consecutivas. Após anestesia com uma injeção intramuscular de uma mistura de cloridrato de xilazina (Rompum) e quetamina (Ketalar), 0,2 ml/100g²⁴, os animais foram posicionados ventralmente para que a sua cauda ficasse completamente solta, sendo limpa com álcool em 70% para que ficasse livre de gordura.

Uma técnica ortodrômica foi utilizada (Figura 1A): O nervo caudal foi estimulado distalmente (duração: 0,1ms; intensidade: 10-20 μ A, supramáxima) e o PANS foi registrado proximalmente (filtro passa-alta: 10 Hz; filtro passa-baixa: 10 kHz) na cauda do animal. Nenhum movimento da cauda foi observado durante a estimulação. Um eletromiógrafo Racia-Alvar Centor foi usado. Os parâmetros estudados do PANS foram amplitude pico-a-pico (μ V) e velocidade de condução nervosa (m/s), derivada do início da latência (ms). As medidas foram tomadas quatro vezes e o resultado foi a sua média aritmética (Figura 1B). Os eletrodos de estímulo, registro e terra eram idênticos a garras do tipo “jacaré” padrão. A distância entre o catodo e o eletrodo de registro foi de 8 cm, enquanto que a distância entre o par de eletrodos de estimulação e registro foi de 3 cm. O eletrodo terra estava ligado ao par de garras do tipo “jacaré” localizado entre os eletrodos de estimulação e registro. As molas dos eletrodos foram removidas para evitar a compactação excessiva da cauda.

Devido à relação quase linear entre a temperatura da cauda e da velocidade de condução nervosa²⁵, antes de cada registro, a temperatura da cauda foi verificada com um termômetro subdermal (Doc Thermo; Comdek Industrial Corp) e mantida a 31-32 °C através de uma lâmpada dicróica utilizado para o aquecimento.

Análise estatística: Os dados foram resumidos por média $\pm$ desvio padrão. A significância estatística das diferenças foi testado com o modelo misto de análise de variância (ANOVA). As comparações *post-hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. O *p* crítico para ambos os testes foi de 0,05.

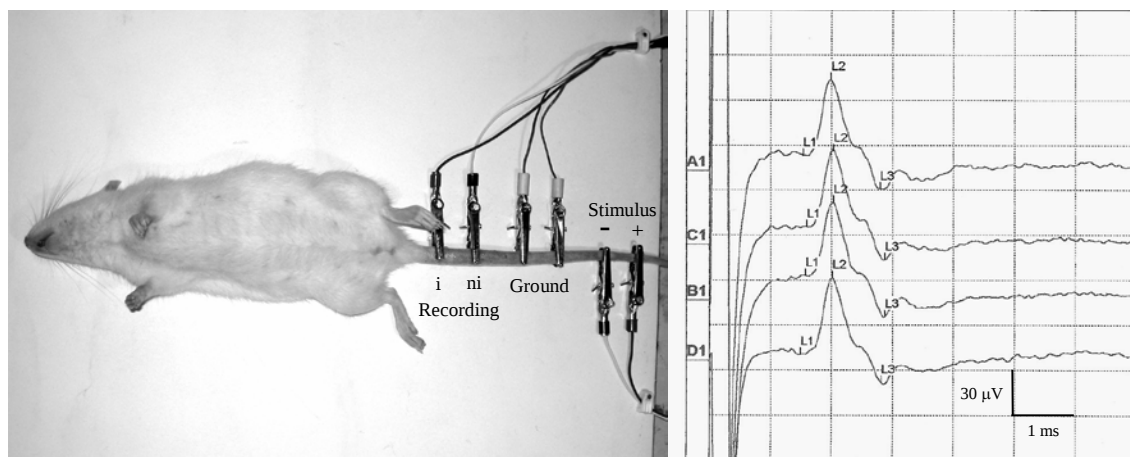


Figura 1 - Estudo da condução nervosa sensorial do nervo caudal de ratos: (1A) Posicionamento para estimulação, registro e eletrodos terra na cauda do rato. (- catodo), (+ anodo), (i), invertido, (NI), não-invertido. (1B) onda típica do PANS do nervo caudal.

RESULTADOS

Com 10 semanas de vida os animais do grupo com o diabetes experimental mostraram níveis aumentados de glicose no sangue, enquanto que o grupo controle apresentavam níveis glicêmicos normais (Tabela 1).

Tabela 1 - Média (desvio padrão) dos níveis de glicose no sangue (mg/100ml) por idade (semanas) de ratos controles e diabéticos.

	8	10	11	12	13	14	15
Diabéticos	83±10	251±111	249±129	251±121	349±151	314±109	324±101
Controles	79±9	78±21	76±14	80±8	81±16	79±12	68±10

As velocidades de condução dos PANS dos animais diabéticos e controles são mostrados na figura 2. Não houve diferença significativa entre eles, com oito semanas de vida (pré-indução): 36±2m/s vs 34±3m/s, respectivamente. Após a indução, as velocidades de condução dos PANS aumentaram mais lentamente no grupo diabético do que no grupo controle (inclinação da linha de regressão: 0,5 vs 1,3 m/s por semana; VCN na semana de 15 = 39±3m/s vs 44±4m/s). Testes *post hoc* (Tukey) mostrou diferenças significativas entre os grupos na semana 11, 13 e 15.

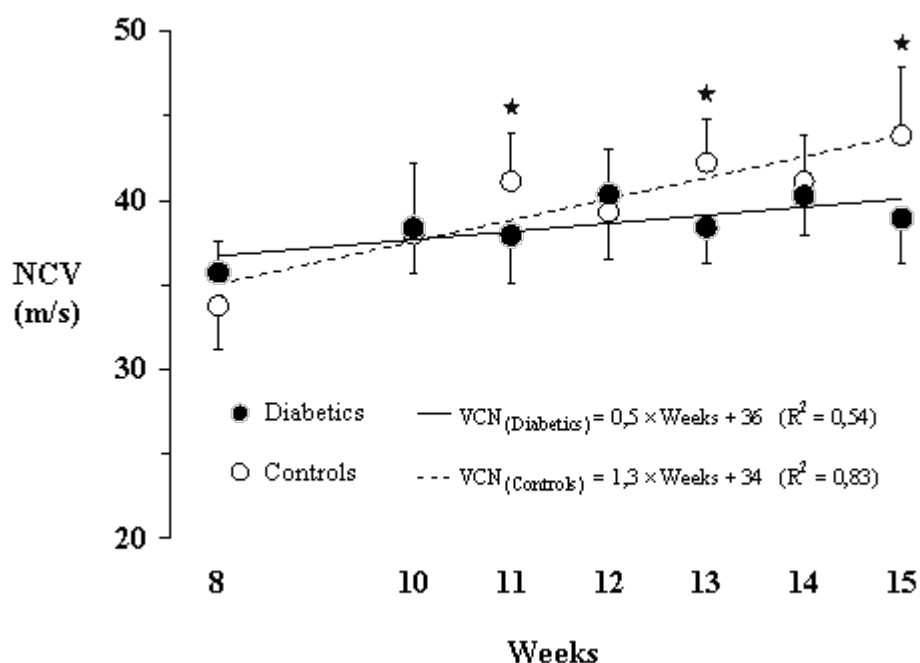


Figura 2 - Média (desvio padrão) das velocidades de condução (m/s) por idade (semanas) de ratos diabéticos (círculos cheios) e controle (círculos abertos). Equações de regressão linear e quadrado do coeficiente de correlação de Pearson (R^2).

★ Tukey, $p < 0.05$; ratos diabéticos vs ratos controles.

A Figura 3 mostra amplitudes dos PANS de animais diabéticos e controle. Na 8ª semana (pré-indução) as amplitudes PANS não foram diferentes entre os dois grupos ($33 \pm 7 \mu V$ vs $29 \pm 6 \mu V$). A partir da semana 10, as amplitudes dos PANS aumentaram mais rápido no grupo diabético do que no grupo controle (inclinação da linha de regressão: 10 versus $8 \mu V$ por semana; amplitudes dos PANS na semana de 15: $107 \pm 23 \mu V$ vs $85 \pm 13 \mu V$). Diferenças na semana 12, 13 e 15 foram estatisticamente significativas (Tukey).

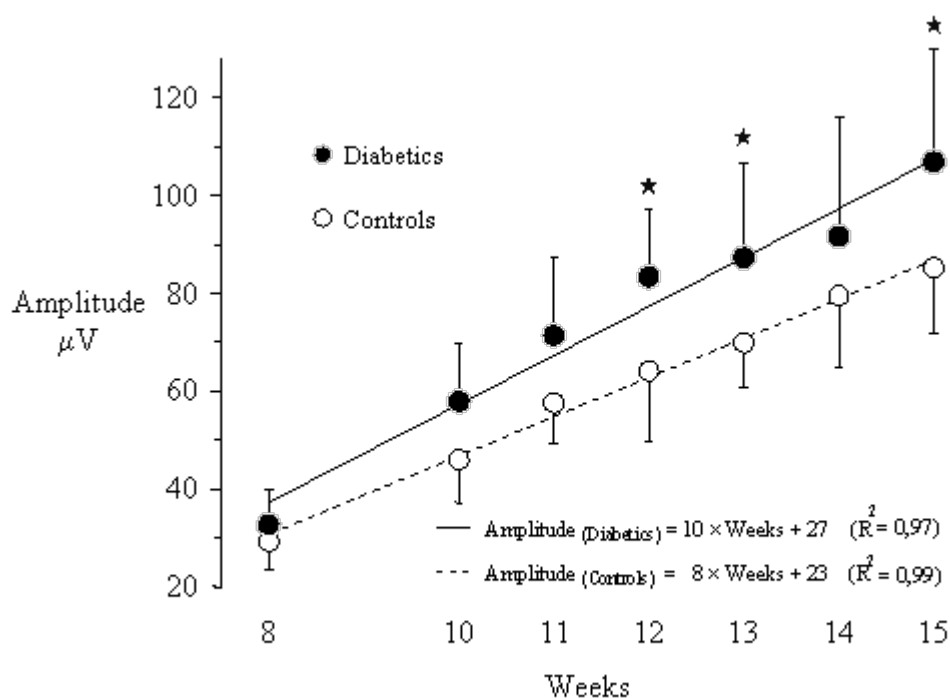


Figura 3 - Média (desvio padrão) de amplitudes (μV) por idade (semanas) de ratos diabéticos (círculos cheios) e controle (círculos abertos). Equações de regressão linear e quadrado do coeficiente de correlação de Pearson (R^2).

★ Tukey, $p < 0.05$; ratos diabéticos vs ratos controles.

DISCUSSÃO

O nervo caudal do rato tem boas características para o estudo da condução nervosa utilizando técnicas não-invasivas. Sua trajetória superficial permite fácil estimulação e gravação de potenciais com eletrodos de superfície²⁶ e sua longa trajetória (10-15cm) permite a medição precisa de distâncias²².

Em nossos dados, a velocidade de condução dos PANS aumentou mais lentamente com a idade nos ratos diabéticos do que nos ratos normais. Este foi um resultado esperado. Vários autores obtiveram resultados semelhantes estudando o nervo caudal^{3,5,6,25,27} ou outros nervos^{4,7,8,13,28}. A velocidade de condução é mais lenta, provavelmente devido a um desenvolvimento anormal da bainha de mielina nos nervos periféricos de ratos diabéticos.

A amplitude dos PANS do nervo caudal aumentou mais rapidamente nos ratos diabéticos do que nos ratos normais. Este foi, um resultado inesperado. Esperávamos uma redução na taxa de crescimento da amplitude dos PANS nos ratos diabéticos, devido à perda axonal e dispersão temporal dos PANS relacionados com a polineuropatia diabética. Zochodne & Nguyen²⁹ relataram maiores amplitudes do PANS do nervo caudal em ratos

diabéticos comparados aos ratos não-diabéticos. No entanto, eles não discutem resultado nem estado, se esta diferença alcançou significância.

Uma maior amplitude do PANS em ratos diabéticos pode ser causado por uma temperatura mais baixa da cauda do animal. A baixa temperatura é conhecida por causar aumento da amplitude dos PANS e queda da velocidade de condução nervosa²⁵. No entanto, nós monitoramos a temperatura da cauda e se manteve relativamente constante.

Muito provavelmente a razão para esta conclusão foi o menor desenvolvimento do diâmetro da cauda em ratos diabéticos, em relação aos do grupo controle. Em um condutor de volume, a amplitude do PANS (uma fonte quadripolar) diminui na razão inversa do cubo da distância entre o nervo e o ponto de registro³⁰. Portanto, o menor diâmetro da cauda e, conseqüentemente, a distância mais curta entre o nervo caudal e o eletrodo de gravação nos ratos diabéticos, resultaria em maiores amplitudes do PANS.

Infelizmente, nós não medimos o diâmetro das caudas dos animais. No entanto, as variações do diâmetro da cauda pode ser indiretamente estimada pela variação no peso dos animais. Qualquer dimensão linear de um corpo de qualquer forma é proporcional à raiz cúbica do seu volume³¹. Como o peso de um corpo é proporcional ao seu volume, o diâmetro da cauda do rato é proporcional à raiz cúbica do peso do rato. Como pode ser visto na Figura 4, os ratos com diabetes perderam peso durante o experimento, enquanto que o grupo controle aumentou de peso. Na semana 15, o peso médio dos ratos diabéticos foi de cerca de 40% menor do que os pesos dos ratos controle. Assim, é razoável supor que o diâmetro da cauda, e, conseqüentemente, as distâncias entre o nervo caudal e os eletrodos de registro, foram significativamente menores nos ratos diabéticos do que nos ratos controle. Autores que usaram eletrodos de registro do tipo agulha^{3-7,15,16,18,19} não observaram este fenômeno e as amplitudes se comportaram como o esperado, provavelmente porque o eletrodo de gravação foi sempre colocado perto da nervo em estudo, independentemente do peso do animal.

Em conclusão, a VCN foi mais lenta em ratos diabéticos enquanto que suas amplitudes foram maiores que em ratos normais.

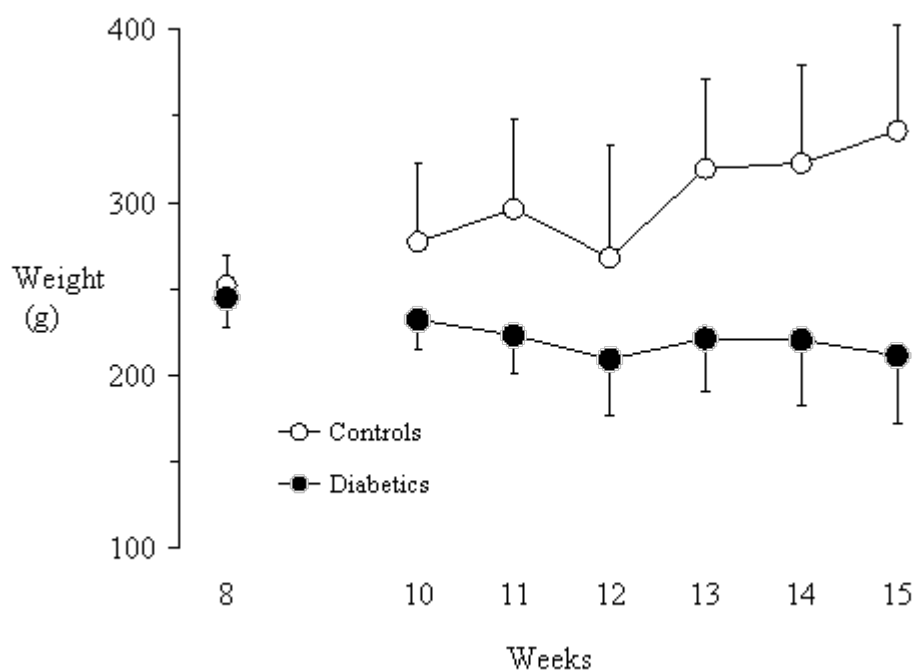


Figura 4 - Média (desvio padrão) do peso (g) por idade (semanas) de ratos diabéticos (círculos cheios) e controle (círculos abertos).

REFERÊNCIAS

1. Medori R, Autilio-Gambetti L, Monaco S, Gambetti P. Experimental diabetic neuropathy: Impairment of slow transport with changes in axon cross-sectional area. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82:7716-20.
2. Timperley WR, Boulton AJM, Davies-Jones GAB, Jarratt JA, Ward JD. Small vessel disease in progressive diabetic neuropathy associated with good metabolic control. *J Clin Pathol.* 1985;38:1030-8.
3. Brussee V, Cunningham A, Zochodne DW. Direct insulin signaling of reverses diabetic neuropathy. *Diabetes* 2004;53:1824-30.
4. Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: A new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 2006;55:3335-43.
5. Kennedy JM, Zochodne DW. Influence of experimental diabetes on the microcirculation of injured peripheral nerve: functional and morphological aspects. *Diabetes* 2002;51:2233-40.
6. Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery: Is there irreparable damage? *Diabetes* 2005;54:830-7.

7. Obrosova IG, Li F, Abatan OI, Forsell MA, Komjáti K, Pacher P, Szabó C, Stevens MJ. Role of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Activation in Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 2004;53:711-20.
8. Prince AS, Agthong S, Middlemas AB, Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2004;53:1851-6.
9. Snow LM, Sanchez AO, Mcloon LK, Serfass RC, Thompson LV. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *Am J Phys Med Rehabil.* 2005;84:770-9.
10. Dumitru D. *Electrodiagnostic Medicine*. Philadelphia, Hanley & Belfus/Mosby 1995; pp. 821-4.
11. King RHM. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 2001;54:400-8.
12. Cameron NE, Cotter MA, Robertson S. The effect of aldose reductase inhibition on the pattern of nerve conduction deficits in diabetic rats. *Quarterly J Exp Physiol.* 1989;74:917-26.
13. Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1993;36:299-304.
14. Cameron NE, Cotter MA. Neurovascular dysfunction in diabetic rats. *J Clin Invest.* 1995;96:1159-63.
15. Zochodne DW, Ward KK, Low PA. Guanethidine adrenergic neuropathy: an animal model of selective autonomic neuropathy. *Brain Research* 1988;461:10-6.
16. Low PA, Schmelzer JD, Ward KK. The effect of age on energy metabolism and resistance to ischaemic conduction failure in rat peripheral nerve. *J Physiol.* 1986;374:263-71.
17. Schmelzer JD, Low PA. Electrophysiological studies on the effect of age on caudal nerve of the rat. *Exp Neurol.* 1987;96:612-20.
18. Coppey LJ, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA. Slowing of motor nerve conduction velocity in streptozotocin-induced diabetic rats is preceded by impaired vasodilatation in arterioles that overlie the sciatic nerve. *Int J Exp Diab Res.* 2000;1:131-43.
19. Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, Silver M, Krainin JG, Weinberg DH, Ropper AH, Isner JM. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *J Clin Invest.* 2001;107(9):1083-92.
20. Feitosa MM, Larsson MHMA, Ushikoshi WS, Perri SHV. Determination of the motor nerve conduction velocity of the radial and ulnar nerves in clinically normal dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52(3):185-90.
21. Feitosa MM, Larsson MHMA, Ushikoshi WS, Perri SHV. Sensory nerve stimuli conduction evaluation standardization of tibial and peroneal nerves in healthy dogs using surface electrodes. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54(2):127-32.

22. Kurokawa K, Almeida DF, Zhang Y, H  lbert CD, Page JG, Schweikart KM, Oh SJ. Sensory nerve conduction of the plantar nerve compared with other nerve conduction in rats. *Clin Neurophys.* 2004;115:1677-82.
23. Dall'Ago P, Silva VOK, De Angelis KLD, Irigoyen MC, Fazan Jr R, Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:843-9.
24. Massone F. *Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas.* Guanabara: Rio de Janeiro 1988.
25. Miyoshi T, Goto I. Serial in vivo determinations of nerve conduction velocity in rat tails. Physiological and pathological changes. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1973;35:125-31.
26. Leandri M, Saturno M, Cilli M, Bisaglia M, Lunardi G. Compound action potential of sensory tail nerves in the rat. *Exp Neurol.* 2006;203:148-57.
27. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, Savino C, Cavaletti G, Oggioni N, Lauria G, Borgna M, Lombardi R, Cimen B, Comelekoglu U, Kanik A, Tataroglu C, Cerami A, Ghezzi P. Erythropoietin both protect from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(3):823-8.
28. Patel J, Tomlinson DR. Nerve conduction impairment in experimental diabetes-proximodistal gradient of severity. *Muscle Nerve* 1999;22:1403-11.
29. Zochodne DW, Nguyen C. Increased peripheral nerve microvessels in early experimental diabetes neuropathy: quantitative studies of nerve and dorsal root ganglia. *J Neurol Sci.* 1999;166:40-6.
30. Lagerlund TD. Volume Conduction. In: *Clinical Neurophysiology.* (Daube, J.R. ed.), Philadelphia, F.A.: Davis, Co. 1996; pp. 29-39.
31. Batschelet E. *Introduction to Mathematics for Life Sciences.* Springer-Verlat Berlin: Heidelberg 1971.

Conflito de interesse: nenhum
Fonte de financiamento: nenhuma

Correspondência:

Celina Cordeiro de Carvalho.
Rua Rio Tejipi   183/201
50721-640 Recife, PE, Brazil
Telephone: 55-81-91323733
celinacordeiro@hotmail.com

b. Artigo Original 2



Journal of Exercise Physiology **online**
(JEP **online**)

Volume 0 Number 0 June 0000

Managing Editor

Robert Robergs, Ph.D.

Editor-in-Chief

Jon Linderman, Ph.D.

Review Board

Todd Astorino, Ph.D.
Julien Baker, Ph.D.
Tommy Boone, Ph.D.
Lance Dalleck, Ph.D.
Dan Drury, DPE.
Hermann Engels, Ph.D.
Eric Goulet, M.Sc.
Robert Gotshall, Ph.D.
Knight-Maloney,
Mellisaa, Ph.D.
Len Kravitz, Ph.D.
James Laskin, Ph.D.
Jon Linderman, Ph.D.
Melissa Knight-Maloney,
Ph.D.
Derek Marks, Ph.D.
Cristine Mermier, Ph.D.
Daryl Parker, Ph.D.
Robert Robergs, Ph.D.
Brent Ruby, Ph.D.
Jason Siegler, Ph.D.
Greg Tardie, Ph.D.
Lesley White, Ph.D.
Chantal Vella, Ph.D.
Thomas Walker, Ph.D.
Ben Zhou, Ph.D.

Official Research Journal
of The American Society of
Exercise Physiologists
(ASEP)

ISSN 1097-9751

Topic Header

AVALIAÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE OS MICROVASOS ENDONEURAIS DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL

CELINA CARVALHO¹, JULIANA MAIA¹, MARINA
GALVÃO³, ANDERSON SILVA³, ANA CARINE
MENDES³, OTÁVIO LINS², SÍLVIA MORAES³.

¹ Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências
do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Brasil

² Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, Brasil

³ Departamento de Anatomia, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, Brasil

RESUMO

Carvalho CC, Maia JN, Galvão M, Silva AL, Mendes AC, Silva DAL, Lins OG, Moraes SRA. Treinamento físico sobre os microvasos endoneurais de ratos com diabetes. *JEPonline* 2005;8(4):1-10. Existem evidências, tanto clínicas quanto experimentais, que o exercício físico promove um efeito protetor no desenvolvimento da neuropatia diabética periférica. Verificamos se o treinamento físico aeróbico (TFA) exerce algum estímulo sobre os microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental. Ratos *Wistar*, machos com 60 dias foi induzido o diabetes (60mg/kg; estreptozotocina), e agrupados em: Controle Sedentário (CS); Diabético Sedentário (DS); e Diabético Treinado (DT); n = 5. O TFA consistiu de nado forçado 1h/dia, 5 dias/semana, durante 6

semanas. Vinte e quatro horas após o término do período de TFA foram realizadas a coleta do nervo ciático e obtidos cortes semi-finos. A contagem e análise histomorfométrica dos vasos endoneurais e da área do nervo de cada animal foi realizada através da técnica de varredura de todos os campos microscópicos (200x) e as comparações entre os grupos foram realizadas (ANOVA; $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas no número de microvasos endoneurais entre os animais do grupo diabético ($DT 41,4 \pm 11,9$ vs $DS 39,2 \pm 3,6$). Apesar da área do nervo ciático não diferir entre os grupos, os animais do grupo diabético apresentaram médias menores em relação aos grupos controles ($DS 0,7 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ vs $CS 0,9 \pm 0,2 \text{ mm}^2$; $P = 0,076$). Da mesma forma, a densidade dos microvasos endoneurais não diferiu entre os grupos. A realização de um treino físico aeróbio de natação no modelo em que foi implementado não alterou a estrutura dos microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental.

Palavras-chave: Neuropatia diabética, Microcirculação, Exercício.

INTRODUÇÃO

A neuropatia periférica diabética é uma das mais comuns complicações tardias do diabetes, e é a mais freqüente e severa na população diabética do tipo 1. Sua patogênese é considerada multifatorial, com contribuições de fatores tanto metabólicos como vasculares (1). Nenhuma terapia efetiva existe ainda para prevenir ou tratar esta complicação (2). A importância da doença microvascular tem sido destacada nos estudos em pacientes diabéticos assintomáticos (3) ou naqueles com presença mínima de neuropatia (4,5), que se caracteriza por uma significativa microangiopatia endoneural presente de forma precoce no curso da doença (1,6). No entanto, o papel da microangiopatia no desenvolvimento da neuropatia diabética periférica ainda não está bem elucidado (6), apesar de estudos experimentais terem mostrado o efeito preventivo de vários agentes vasoativos nas anormalidades de nervos periféricos em animais diabéticos (7,8) e de se saber que o controle glicêmico pode reduzir significativamente a neuropatia diabética periférica (1).

A redução da velocidade de condução nervosa demonstrada em modelos animais com diabetes experimental sugerem resultados primariamente decorrentes de hipóxia endoneural causada pela deficiência na perfusão nervosa (9). Os microvasos endoneurais tem características anatômicas e fisiológicas, únicas e distintas como sua distribuição espacial e rede de ligações. O prejuízo do fluxo sanguíneo endoneural tem correlação com o déficit funcional precoce do nervo periférico observado em animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina (10).

Apesar da severidade das complicações vasculares do diabetes, existe uma relativa escassez de dados específicos sobre a patogênese, prevenção e tratamento dessas complicações vasculares. Vários achados demonstraram que o exercício físico tem efeitos terapêuticos e protetores no diabetes tipo 1 por diminuir o estresse oxidativo e melhorar a capacidade oxidativa da parede vascular (11). A realização de um treinamento físico moderado diariamente pode oferecer muitos benefícios ao indivíduo diabético devido à redução dos níveis de glicose sanguínea e ao aumento de fluxo sanguíneo periférico (1,8,12). Além disso, estudos têm demonstrado que o exercício físico promove atenuação das complicações clínicas decorrentes do diabetes como a melhora do perfil lipídico e a diminuição da concentração de ácidos graxos livres (13-15).

Além disso, existem evidências, porém escassas, tanto clínicas (1,16) quanto experimentais (8), que o exercício físico promove um efeito protetor no desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, porém o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está totalmente esclarecido. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar se o efeito do treinamento físico aeróbio exerce algum estímulo sobre os microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental.

MÉTODOS

Animais e Grupos Experimentais. Utilizamos ratos machos, da linhagem *Wistar (Rattus Norvegicus)*, com idade aproximada de 60 dias e peso inicial médio de $264 \pm 40,46\text{g}$, oriundos do biotério do Departamento de Nutrição – UFPE. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas (máximo cinco animais/gaiola), a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro invertido de 12h, com livre acesso à água e a ração (Labina; Purina PetCare Company).

Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais: Controle Sedentário (CS), não diabéticos; Diabético Sedentário (DS), com diabetes experimental, sem qualquer tipo de tratamento; e o Diabético Treinado (DT) com diabetes experimental, submetidos ao treinamento físico aeróbio e sem qualquer tipo de tratamento; constituídos de 5 animais cada um dos grupos. O diabetes experimental, similar ao tipo I, foi induzido pela administração de dose única intraperitoneal de Streptozotocina (STZ, 60 mg/kg; Sigma Chemical Co., USA), dissolvido em solução tampão citrato de sódio (10mM, pH 4,5) após jejum alimentar de 12 horas. Os animais do grupo controle, da mesma forma, receberam doses equivalentes apenas de solução tampão citrato de sódio. Decorridos 30 minutos do tratamento os animais de ambos os grupos foram alimentados normalmente (17).

Foram caracterizados como diabéticos e incluídos no experimento apenas os animais que apresentaram valores de glicose sanguínea acima de 200 mg/dL, setenta e duas horas após a indução pela STZ (18) com amostra de sangue colhida da ponta da cauda do animal após um jejum de 12 horas (Glicosímetro AcuChek; Roche). Após a confirmação do diabetes foi realizada uma verificação semanal da glicose sanguínea e do peso corporal em ambos os grupos. Os animais diabéticos em nenhum momento do período de estudo receberam tratamento para controle da glicemia, e mostraram sintomas compatíveis com o diabetes tipo I, tais como poliúria e perda de peso.

Os procedimentos aplicados para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas – UFPE.

Eletrofisiologia. A velocidade de condução nervosa (VCN) caudal foi registrada na cauda do animal semanalmente, após serem anestesiados, através da técnica ortodrômica, ao final do período experimental. Foram utilizados eletrodos de superfície e um eletromiógrafo (Demetec centor – M4V) com o programa Racia-Alvar Centor M version v2.1 [software Altromed GmbH, version 2.81 (4 channels), 1999], onde as medidas de latência, amplitude e duração dos potenciais de ação do nervo caudal foram automaticamente calculadas pelo aparelho, após a inserção da distância, mantida constante, de 8 cm entre os eletrodos registrador e estimulador no aparelho. A VCN foi calculada automaticamente e apresentada em metros por segundo (m/s). Durante todo o procedimento a temperatura da cauda foi mensurada e mantida

em uma média constante de 31,5 °C, verificada através de um termômetro subdermal (Doc Thermo; modelo n. HD – 11; Comdek Industrial Corp.) imediatamente antes do estímulo para cada animal, e usada uma lâmpada dicrômica para aquecimento e controle.

Treinamento Físico Aeróbio. Após a determinação do diabetes, os animais do grupo treinado, com um mesmo período de tempo, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos ao treinamento físico aeróbio enquanto os grupos sedentários permaneceram em suas respectivas gaiolas, estando sujeito apenas a manipulação. O protocolo de treinamento físico aeróbio consistiu de nado forçado em tanque cilíndrico de 60 x 80 cm (diâmetro, altura), desenvolvido no Departamento de Anatomia – UFPE, com água a uma profundidade de 35 a 40 cm, temperatura monitorada e controlada de 32 ± 1 °C, por um período de 6 semanas, 5 dias/semana, sendo precedido de um período de adaptação de uma semana com treino progressivo de 10 minutos por cinco dias até que o animal nadasse continuamente 1h/dia. O nado em grupo foi usado por promover um exercício mais vigoroso do que quando o animal realiza o treino sozinho no tanque (19). Ao final de cada sessão de treinamento, para minimizar os efeitos da exposição ao frio, os animais eram enxutos e permaneciam em uma câmara de aquecimento (20) durante 20 minutos.

Histologia. Vinte e quatro horas após o término do período de treinamento físico crônico, os animais dos três grupos experimentais foram anestesiados com uma solução de xilazina (Rompun; Bayer) e cloridrato de cetamina (Ketalar, Parke Davis Warner Lambert) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2ml para cada 100g de peso (21) para coleta do nervo ciático. Foi realizada uma incisão na pele da região posterior da coxa direita e, em seguida os músculos glúteo máximo, glúteo médio e os isquiotibiais foram rebatidos para exposição do nervo ciático. A pré-fixação do nervo foi feita a partir da visualização da estrutura na região anatômica através do gotejamento de solução de glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M. O nervo ciático foi removido ao nível da sua emergência na região glútea até a sua ramificação na região poplíteia. O material colhido foi, então, fixado por imersão na solução fixadora e mantido em condições de resfriamento (6 °C em geladeira).

Após a coleta e fixação, o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio a 0,1M e realizada a pós-fixação dos segmentos em tetróxido de ósmio a 1% acrescido de tampão cacodilato de sódio a 0,1M durante 2h em ambiente de total escuridão. Posteriormente, os segmentos foram novamente lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e desidratados em soluções de concentração crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). Sendo, então, inclusos em resina sintética (EPON 812). Obtidos os blocos, foram realizados os cortes semifinos (0,38 µm) corados com azul de toluidina para exame ao microscópio óptico.

Histomorfometria. A determinação da área de secção transversa total e o perímetro do nervo ciático e a contagem do número de vasos endoneurais foi realizada sem o conhecimento prévio do material analisado por um único examinador (CCC) através da técnica de varredura de todos os campos microscópicos. A contagem e captura das imagens foi realizada utilizando-se uma vídeo-câmera (Samsung, SHC-410 NAD) através do software Power VCR II, acoplada a um microscópio de luz Olympus, com aumento final de 200X (Figura 1), e a mensuração da área e perímetro do nervo de cada animal foi realizada através do software Scion Image for Windows (Beta 4.0.2.). Apenas os vasos sanguíneos claramente definidos contendo hemácias no lúmen e/ou com a presença de uma única camada de pericitos ao redor da célula endotelial foram contados.

Análise Estatística. A análise estatística foi realizada comparativamente entre os grupos por uma análise de variância (ANOVA). As comparações *post-hoc* foram feitas com teste de Tukey. O *p* crítico para ambos os testes foi de 0,05 e os resultados referentes a todos os parâmetros estudados foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão (DP); sendo os dados analisados através do programa estatístico SPSS versão 17.0.

RESULTADOS

Os animais com diabetes experimental demonstraram alterações clínicas como polidipsia e poliúria logo na primeira semana após a indução com STZ. O peso corpóreo dos animais do grupo diabético foi menor ao final das seis semanas do período experimental, em relação ao grupo controle. Os animais diabéticos após o treinamento físico continuaram apresentando redução de peso. Observou-se uma glicemia elevada nos animais do grupo diabético quando comparado com os animais do grupo controle, não havendo diferença da glicose sanguínea nos ratos após o treinamento físico. A VCN foi menor no grupo de animais diabético sedentário quando comparado com o grupo controle. Não foi observada diferença da VCN entre os grupos de animais diabéticos controle e treinado (Tabela 1).

A análise comparativa do estudo histomorfométrico realizada entre os grupos experimentais mostrou não haver diferença no número de microvasos endoneurais tanto nos animais diabéticos (DS 39 ± 4 vs CS 49 ± 5 ; $P > 0,05$) quanto nos diabéticos submetidos ao treinamento físico por natação (DT 41 ± 12 vs DS 39 ± 4 ; $P > 0,05$) (Tabela 2). Da mesma forma, a densidade dos microvasos endoneurais não foi alterada pelo diabetes experimental ou pelo treinamento físico quando comparado com grupo controle (Tabela 2).

A área de secção transversa do nervo ciático não diferiu entre os grupos analisados, embora os animais do grupo diabético tenham apresentado valores médios menores em relação aos animais controles (DS $0,7 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ vs CS $0,9 \pm 0,2 \text{ mm}^2$; $P = 0,076$). Da mesma forma, o treinamento físico não modificou este parâmetro (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O aumento nos níveis da glicose sanguínea e a redução da perfusão nervosa são fatores importantes na etiologia da neuropatia diabética periférica. Por essa razão o tratamento da neuropatia diabética periférica está tradicionalmente focado no controle da hiperglicemia e o impacto de um intensivo controle glicêmico na neuropatia diabética tem sido amplamente avaliado. Para esse controle, a realização de treinamento físico diariamente pode ser benéfica para o diabético devido à redução na produção de radicais livres e dos níveis de glicose sanguínea, além de aumentar o fluxo sanguíneo periférico (1,8).

O presente estudo foi baseado em um protocolo prévio de treino físico com natação (19) que demonstrou aumento da capacidade oxidativa no músculo gastrocnêmio. Há evidências de que as respostas hemodinâmicas aguda e crônica à natação, como hipercapnia e acidose, são diferentes das respostas de outros tipos de exercícios como corrida. Comparado com a corrida, o treino com natação leva a uma ampla diferença de respostas físicas e mecânicas em decorrência dos efeitos da pressão da água, utilização de diferentes músculos e redução da gravidade (19). Além disso, durante a natação observa-se que há uma redistribuição do fluxo de sangue entre os tecidos sem uma marcada alteração do débito ou da frequência cardíaca (22).

O menor peso corporal apresentado pelo grupo diabético no presente estudo, quando comparado ao controle, corrobora outros estudos (11,23-25) que evidenciaram o mesmo comportamento em animais com diabetes experimental. A redução no ganho de peso, nessa condição, pode parcialmente, ter sido ocasionada por um aumento da sensibilidade à insulina pelos músculos dos animais treinados, embora este estudo não permita identificar o seu mecanismo, o treinamento físico aeróbico pode ter sido responsável por este fenômeno, já que a redução da obesidade pode melhorar a tolerância e a sensibilidade à insulina (23).

Acredita-se que a diminuição dos níveis glicêmicos ocorra porque quando o exercício é realizado na presença de hiperinsulinemia, a captação de glicose pelos músculos aumenta drasticamente diminuindo a glicemia sanguínea (26). Embora os resultados desse estudo não mostrem diferenças nos níveis de glicose sanguínea nos ratos diabéticos submetidos a um programa de seis semanas de treinamento físico aeróbico de natação, quando comparados com seu grupo sedentário, observa-se valores médios menores que o grupo que não realizou esta atividade, semelhantemente aos resultados encontrados por Oliveira, Luciano e Mello (27) quando submeteram animais diabéticos a um programa de natação por um período de 10 semanas, e a Coskun *et al.* (28) que realizaram um treinamento de moderada intensidade através do nado com um grupo de animais com diabetes induzido por 12 semanas.

São grandes as evidências sugerindo que os déficits funcionais do nervo periférico em ratos com diabetes induzida pela STZ estão relacionados à alteração do fluxo sanguíneo endoneural e a hipóxia do nervo (7,8). A redução da VCN em modelos animais com diabetes experimental tem sido sugerida como resultante primária dessa hipóxia endoneural causada pelo déficit na perfusão nervosa (9). No presente estudo, o registro eletrofisiológico das fibras do nervo caudal ao final do período experimental de seis semanas identificou alteração na VCN nos animais com diabetes, indicando que houve um déficit funcional como descrito na literatura (7,9). Entretanto, ao final do treinamento físico aeróbico com natação não foi observada modificação da VCN entre os animais do grupo diabético, semelhante aos achados de Snow *et al.* (24) que submeteu ratos diabéticos a treinamento físico em esteira durante 12 semanas.

O estudo realizado por Tesfaye *et al.* (29) nos fornece mais informações sobre o papel que o fluxo sanguíneo no nervo periférico causa na neuropatia diabética quando estudaram o efeito do exercício na VCN em indivíduos normais e diabéticos, com e sem neuropatia. Eles observaram que tanto a VCN do nervo sural quanto a temperatura subcutânea perto do nervo sural aumentou significativamente após o exercício de esteira nos indivíduos normais e diabéticos sem neuropatia, mas não nos indivíduos neuropatas. E sugere que esses indivíduos neuropatas precisam ser analisados através de estudos mais detalhados como biópsias do nervo para ver se eles têm anormalidades precoce do fluxo sanguíneo do nervo e da microvasculatura, e que o comprometimento da VCN induzida pelo exercício na neuropatia diabética pode ser devido a deficiência de fluxo sanguíneo do nervo.

O grau e a causa de mudanças no calibre axonal em ratos com diabetes induzido por STZ são controversos. Medore (30) refere que o tipo de mudança no calibre dos axônios do nervo ciático varia de acordo com a distância do corpo celular neuronal. Ele também descreve três mecanismos patogénéticos postulados para explicar a diminuição do calibre distal de axônios em ratos com diabetes induzida por STZ: (1) o calibre da fibra continua a crescer com a idade e o ganho de peso corporal, devido ao fato de os ratos diabéticos terem um menor ganho de peso corporal, a redução do tamanho contribui para um atraso no crescimento neuronal; (2) essa diminuição de tamanho pode representar uma retração do axônio secundária ao aumento

da osmolaridade dos fluidos endoneurais associadas à diabetes; e (3) o número cada vez menor de axônios distais é uma alteração patológica primária do axônio associado com o diabetes. Apesar dos resultados não mostrarem diferenças quanto a área de secção transversa do nervo ciático no período experimental, o grupo de animais diabéticos, treinados ou não, demonstraram valores menores que o grupo controle.

Mudanças estruturais podem também apoiar a hipótese de que as alterações do fluxo sanguíneo endoneural são relevantes para o comprometimento funcional do nervo periférico e contribuir para o desenvolvimento de neuropatia em ratos diabéticos (10,31). A densidade microvascular é considerada um determinante importante para se estimar o volume total de sangue no nervo periférico e, eventualmente, no fluxo sanguíneo no nervo (31). Os resultados aqui apresentados para a densidade microvascular estão em consonância com os achados dos estudos de Sugimoto & Yagihashi (10) e Walker *et al.* (32), que também não observaram uma diminuição significativa na densidade capilar no nervo ciático de ratos diabéticos, porém observaram alterações morfológicas ultraestruturais, sugerindo que as anormalidades estruturais da parede microvascular endoneural já estão presentes antes do desenvolvimento da neuropatia, e que a gravidade dessas mudanças aumenta com a severidade da doença (33).

Ainda não há estudos que relacionem o treinamento físico aeróbio com as alterações estruturais dos microvasos endoneurais e muitos questionamentos ficam sem esclarecimentos. Entretanto, na neuropatia diabética alterações vascular e metabólica induzidas pelo exercício têm sido relatadas (29). Durante o exercício de curto prazo o aumento da expressão vascular do fator de crescimento endotelial vascular tem sido proposta para proporcionar um aumento do fluxo sanguíneo endoneural (34) e melhorar a anormal perfusão e a viscosidade do plasma facilitando o fornecimento de oxigênio (35,36). Sabe-se que o treinamento físico expõe os vasos a repetidos episódios de hiperemia e que as elevadas forças de cisalhamento com o aumento do fluxo sanguíneo causado pelo exercício aeróbio aumenta, a longo prazo, a vasodilatação elevando a expressão vascular da óxido nítrico sintetase e aumentando a liberação de óxido nítrico (37-40). O aumento da síntese de óxido nítrico pode ser útil na prevenção das mudanças induzidas pelo diabetes na via do poliol (41).

Estudos adicionais mais aprofundados são necessários para entender melhor os efeitos do treinamento físico aeróbio nos microvasos endoneurais de ratos diabéticos. Talvez essas modificações sejam mais bem expressadas num estudo mais aprofundado através de uma análise ultraestrutural dessa microvasculatura endoneural como sugere Tesfaye *et al.* (29), já que tais alterações se manifestam de forma mais precoce e são, prováveis responsáveis pelo desenvolvimento de neuropatia em ratos diabéticos (10,31).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo, utilizando o protocolo de treinamento físico com natação, não demonstraram nenhum efeito dessa intervenção ao nível da estrutura dos microvasos endoneurais composta pelo número de capilares e área de secção transversa do nervo ciático de ratos com diabetes experimental.

Address for Correspondence:

Celina C. Carvalho, Fellow PhD degree; Mailing Address: Rua Rio Tejió 183- 201, Cordeiro, CEP: 50721-640 Recife, Pernambuco, Brazil
 Telephone: 55-81-9132.3733
 E-mail: celinacordeiro@hotmail.com

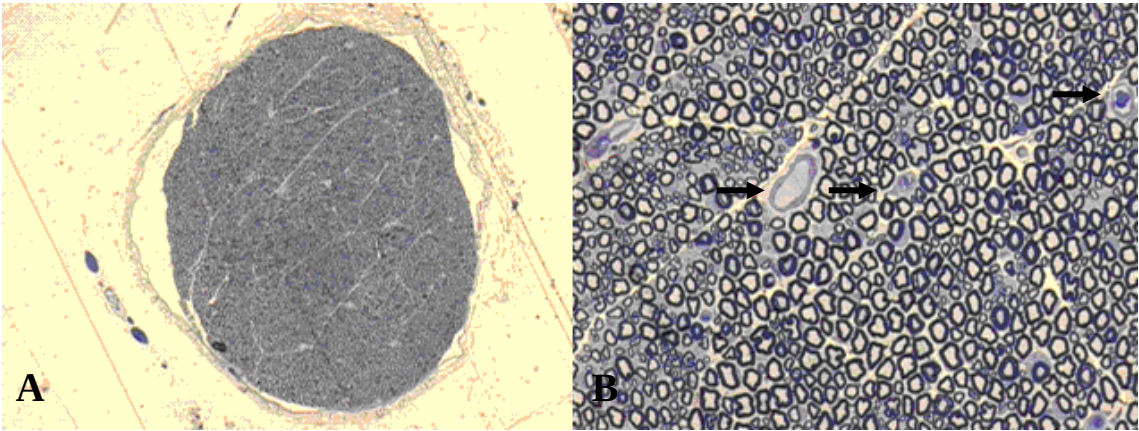
REFERÊNCIAS

1. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F, Fallucca F. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes and its Complications* 2006;20:216-223.
2. Sima AA. Pathological mechanisms involved in diabetic neuropathy: can we slow the process. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2006;7:324-337.
3. Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Annals of Neurology* 1995;37(4):498-504.
4. Malik RA, Veves A, Masson EA, Sharma AK, Ah-See AK, Schady W, Lye RH, Boulton AJ. Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1992;55:557-561.
5. Malik RA, Tesfaye S, Newrick PG, Walker D, Rajbhandari SM, Siddique I, Sharma AK, Boulton AJM, King RHM, Thomas PK, Ward JD. Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. *Diabetologia* 2005;48:578-585.
6. Estrella JS, Nelson RN, Sturges BK, Vernau KM, Williams DC, Lecouteur RA, Shelton GD, Mizisin AP. Endoneurial Microvascular Pathology in Feline Diabetic Neuropathy. *Microvascular Research* 2008;75(3):403-410.
7. Uehra K, Sugimoto K, Wada R, Yoshikuwa T, Marukawa K, Yasuda Y, Kimura Y, Yagihashi S. Effects of Cilostazol on the Peripheral Nerve Function and Structure in STZ-induced Diabetic Rats. *Journal of Diabetes and its Complications* 1997;11(3):194-202.
8. Selagzi H, Buyukakilli B, Cimen B, Yilmaz N, Erdogan S. Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal Endocrinological Investigation* 2008;31:971-978.
9. Maxfield EIS, Cameron NE, Cotter MA. Effects of Diabetes on Reactivity of Sciatic Vasa Nervorum in Rats. *Journal of Diabetes and its Complications* 1997;11(1):47-55.
10. Sugimoto K, Yagihashi S. Effects of Aminoguanidine on Structural Alterations of Microvessels in Peripheral Nerve of Streptozotocin Diabetic Rats. *Microvascular Research* 1997;53:105-112.
11. Heidarianpour A, Hajizadeh S, Khoshbaten A, Niaki AG, Bigdili MR, Pourkhalili K. Effect of chronic exercise on endothelial dysfunction and insulin signaling of cutaneous microvascular in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 2007;14:746-752.
12. Maiorana A, O'Driscoll G, Goodman C, Taylor R, Green D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2002;56:115-123.
13. De Angelis K, Pureza DY, Flores LJF, Rodrigues B, Melo KFS, Schaan BD, Irigoyen MC. Efeitos fisiológicos do treinamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 2006;50:1005-1013.
14. Cambri LT, Décimo JP, Souza M, Oliveira FR, Gevaerd MS. Efeito agudo e crônico do exercício físico no perfil glicêmico e lipídico em diabéticos tipo 2. *Motriz* 2007;13(6):238-248.

15. Gomes RJ, Leme JACA, Mello MAR, Luciano E, Caetano FH. Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. **Motriz** 2008;14(3):320-328.
16. Veves A, Saouaf R, Donaghue VM, Mulloly CA, Kistler JA, Giurinin JM, Horton ES, Fielding RA. Aerobic exercise capacity remains normal despite impaired endothelial function in the micro and macrocirculation of physically active IDDM patients. **Diabetes** 1997;46(11):1846-1852.
17. Dall'Ago P, Silva VOK, De Angelis KLD, Irigoyen MC, Fazan Jr R, Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 2002;35:843-849.
18. Lehti TM, Silvennoinen M, Kivelä R, Kainulainen H, Komulainen J. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretch-sensing complexes in mouse striated muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism** 2007;292:533-542.
19. Nakao C, Ookawara T, Kizaki T, Oh-Ishi S, Miyazaki H, Haga S, Sato Y, Li Ji L, Ohno H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **Journal of Applied Physiology** 2000;88:649-654.
20. Király MA, Bates HE, Yue JTY, Goche-Montes D, Fediuc S, Park E, Matthews SG, Vranic M, Riddell MC. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. **Metabolism – Clinical and Experimental** 2007;56:732-744.
21. Massone F. **Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
22. Flaim SF, Minter WJ, Clark DP, Zelis R. Cardiovascular response to acute aquatic and treadmill exercise in the untrained rat. **Journal of Applied Physiology** 1979;46:302-308.
23. Tancrede G, Rousseau-Mignerot S, Nadeu A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Diabetes** 1982;31:406-409.
24. Snow LM, Sanchez AO, Mcloon LK, Serfass RC, Thompson LV. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation** 2005;84:770-779.
25. Oliveira CAM, Luciano E, Marcondes MCG, Mello MAR. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **Journal of Diabetes and its Complications** 2007;21:258-264.
26. Forjaz CLM, Tinucci T, Alonso DO, Negrão CE. Exercício físico e diabetes. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo** 1998;5:981-990.
27. Oliveira CAM, Luciano E, Mello MAR. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Experimental Physiology** 2004;90:79-86.
28. Coskun O, Ocakci A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. **Tohoku Journal of Experimental Medicine** 2004;203:145-154.
29. Tesfaye S, Harris ND, Wilson RM, Ward JD. Exercise-induced conduction velocity increment: a marker of impaired peripheral nerve blood flow in diabetic neuropathy. **Diabetologia** 1992;35:155-159.
30. Medori R, Autilio-Gambetti L, Jenich H, Gambetti P. Changes in axon size and slow axonal transport are related in experimental diabetic neuropathy. **Neurology** 1988;38:597-601.
31. Low PA, Lagerlund TD, McManis PG. Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic and ischemic neuropathy. **International Review of Neurobiology** 1989;31:355-438.
32. Walker D, Carrington A, Cannan SA, Sawicki D, Sredy J, Boulton AJ, Malik RA. Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozotocin diabetic rat. **Journal of Anatomy** 1999;195:419-427.

33. Giannini C, Dyck PJ. Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneurial microvessels in diabetes mellitus. *Annals of Neurology* 1994;36:408-415.
34. Gustafsson T, Puntchart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 1999;276:H679-H685.
35. Terjung RL, Mathien GM, Erney TP, Ogilvie RW. Peripheral adaptations to low blood flow in muscle during exercise. *American Journal of Cardiology* 1988;62:15E-19E.
36. Fuchsjager-Mayrl G, Pleiner J, Wiesinger GF, Sieder AE, Quittan M, Nuhr MJ, Francesconi C, Seit HP, Francesconi M, Schmetterer L, Wolzt M. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1795-1801.
37. McAllister RM, Hirai T, Musch TI. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1995;27:1145-1151.
38. Niebauer J, Cooke JP. Cardiovascular effects of exercise: Role of endothelial shear stress. *Journal of the American College of Cardiology* 1996;28:1652-1660.
39. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *Journal of Clinical Investigation* 2000;105:1631-1639.
40. Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Medicine* 2003;33:1013-1035.
41. Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003;17:417-425.

Figuras



Legendas das Figuras

Figura 1. Área de secção transversa do nervo ciático (40X) de rato diabético (A); e campo microscópico (200X) contendo vasos endoneurais (setas) (B); Azul de toluidina.

Tabelas

Tabela 1. Dados do peso corporal, da glicose sanguínea e da velocidade de condução sensorial das fibras caudais de animais com diabetes experimental, e submetidos ao treinamento físico de natação ao final de 6 semanas.

	<i>Controle sedentário</i>	<i>Diabético sedentário</i>	<i>Diabético treinado</i>	<i>ANOVA p valor</i>
Peso final (g)	336 ± 64	216 ± 20 *	191 ± 39 †	0,001
Glicose sanguínea final (mg/dl)	84 ± 17	360 ± 44 ‡	303 ± 87 §	< 0,0001
Velocidade de condução nervosa (m/s)	43 ± 2	38 ± 1	39 ± 4	0,032

Valores expressos em média ± DP; n = 5.

* P = 0,003 vs controle sedentário;

† P = 0,001 vs controle sedentário;

‡ P < 0,0001 vs controle sedentário;

§ P = 0,000 vs controle sedentário;

|| P = 0,037 vs controle sedentário (*post-hoc* Tukey).

Tabela 2. Número e densidade dos microvasos endoneurais e área de secção transversa do nervo ciático de animais com diabetes experimental e submetidos ao treinamento físico de natação ao final de 6 semanas.

	<i>Controle sedentário</i>	<i>Diabético sedentário</i>	<i>Diabético treinado</i>	<i>ANOVA p valor</i>
Número de microvasos	49 ± 5	39 ± 4	41 ± 12	0,182
Área do nervo ciático (mm²)	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,076
Densidade dos microvasos (# /mm²)	59 ± 17	58 ± 3	62 ± 17	0,898

Valores expressos em média ± DP; n = 5 por grupo.

c. Artigo Original 3

**ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DAS ALTERAÇÕES MICROVASCULARES
ENDONEURAIS EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL SUBMETIDOS A
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO.**

Celina C.Carvalho^{*1}; Juliana N, Maia¹; Marina H. Galvão²; Anderson L. Silva²; Ana Carine
G. Mendes²; Otávio G. Lins³; Silvia R. A. Moraes⁴.

¹ Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento,
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; ² Departamento de Fisioterapia, Universidade
Federal de Pernambuco, Brasil; ³ Departamento Neuropsiquiatria, Universidade Federal de
Pernambuco, Brasil; ⁴ Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco,
Brasil.

***Autor Correspondente:**

Endereço: Rua Rio Tejió 183- 201, Cordeiro, CEP: 50721-640 Recife, Pernambuco, Brasil

Telefone: 55-81-91323733

E-mail: celinacordeiro@hotmail.com

RESUMO

Verificamos se o treinamento físico aeróbio (TFA) exerce algum estímulo sobre a patologia dos microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental. O diabetes foi induzido em 20 ratos *Wistar* (60 dias) por dose única intraperitoneal (60 mg/kg) de STZ e agrupados aleatoriamente: Controle Sedentário (CS); Controle Treinado (CT); Diabético Sedentário (DS); e Diabético Treinado (DT); $n = 5$ por grupo. Após a determinação da diabetes, os animais (CT e DT), foram submetidos ao TFA que consistiu de nado forçado em tanque cilíndrico, 1h/dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas. Vinte e quatro horas após o término do período de TFA, os animais dos quatro grupos experimentais, foram anestesiados para a coleta do nervo ciático. Do material recolhido foram obtidos os blocos para análise ultraestrutural dos microvasos endoneurais. As comparações entre os grupos foram realizadas com ANOVA ($p < 0,05$). Todas as áreas dos microvasos endoneurais sofreram interferência do TFA ($p = 0,016$). Nos animais diabéticos, a espessura da membrana basal e a espessura da parede do vaso não foram diferentes quando comparados com os animais do grupo controle. Houve uma tendência a hiperplasia de células endoteliais no grupo de animais DT (DT $2,5 \pm 1,3$ vs DS $1,6 \pm 0,4$; $p = 0,063$), no entanto a hiperplasia de células do pericito foi significativamente maior nos ratos DT quando comparados com DC (DT $1,2 \pm 0,5$ vs DS $0,7 \pm 0,4$; $p = 0,038$). Todas as áreas dos microvasos endoneurais dos animais diabéticos mensuradas sofreram interferência do TFA, igualmente a atividade celular periendotelial, aumentando o número de pericitos que envolvem os microvasos endoneurais.

Palavras-chave: Diabetes experimental, Treinamento físico, Microvasos endoneurais, Membrana basal, Célula endotelial.

INTRODUÇÃO

A polineuropatia periférica é uma complicação comum da diabetes *mellitus* (Medori *et al.*, 1985). Consistem em desmielinização e degeneração axonal dos nervos periféricos (Timperley *et al.*, 1985), levando à diminuição da velocidade de condução nervosa e redução da amplitude do músculo composto e potenciais de ação dos nervos sensitivos (Schmelzer & Low, 1987; Kennedy & Zochodne, 2002; Snow *et al.*, 2005). Estas características da polineuropatia diabética são observadas nos seres humanos diabetes (Timperley *et al.*, 1985) e diabetes induzida experimentalmente em animais (Kennedy & Zochodne, 2002; Snow *et al.*, 2005). A patogênese da neuropatia diabética experimental ou humana envolve a associação de hiperglicemia e alterações metabólicas. As alterações estruturais na microvasculatura endoneurais da neuropatia diabética não são claras, as possíveis causas não estão elucidadas e as alterações ultra-estruturais são mal compreendidas (Yasuda & Dyck, 1987, Malik *et al.*, 1992).

Capilares endoneurais de pacientes diabéticos com neuropatia demonstraram espessamento da membrana basal, hipertrofia e hiperplasia das células endoteliais com degeneração de pericito, que se relaciona com a severidade neuropática (Malik *et al.*, 1989, 1992, 1997; Giannini & Dyck, 1995; Cameron *et al.*, 2001). Entretanto, pacientes diabéticos sem evidências de neuropatia apresentam também espessamento da membrana basal e degeneração do pericito (Giannini & Dyck, 1995). Interessantemente, as anormalidades são mais severas nos capilares endoneurais do que no epineuro, pele e músculos, indicando uma complexa interação neurovascular intraneural (Malik *et al.*, 1993). O espessamento da membrana basal tem sido observado em neuropatias hereditária sensitiva e motora e, portanto, poderia representar uma resposta ao dano do nervo. Contudo, o espessamento da membrana basal e a hiperplasia da célula endotelial poderia ser também uma resposta a hipóxia causando uma redução da capacidade de difusão, portanto, agravando a hipóxia (Cameron *et al.*, 2001).

A realização de um treinamento físico moderado diariamente pode oferecer muitos benefícios ao indivíduo diabético devido à redução dos níveis de glicose sanguínea e ao aumento de fluxo sanguíneo periférico (Maiorana *et al.*, 2002; Balducci *et al.*, 2006; Selagzi *et al.*, 2008). Além disso, estudos têm demonstrado que o exercício físico promove atenuação das complicações clínicas decorrentes do diabetes como a melhora do perfil lipídico e a diminuição da concentração de ácidos graxos livres (De Angelis *et al.*, 2006; Cambri *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008). Existem evidências, tanto clínicas (Veves *et al.*, 1997; Balducci *et al.*, 2006) quanto experimentais (Selagzi *et al.*, 2008), que o exercício físico promove um efeito protetor no desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, porém o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está totalmente esclarecido. Dessa forma, este estudo teve como objetivo verificar se o treinamento físico aeróbio exerce algum estímulo sobre a ultraestrutura dos microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Grupos Experimentais. Utilizamos ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus*), com idade aproximada de 60 dias e peso inicial médio de 250 ± 45 g, oriundos do biotério do Departamento de Nutrição – UFPE. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas (máximo cinco animais/gaiola), a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro invertido de 12h, com livre acesso à água e a ração (Labina; Purina PetCare Company).

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo Controle Sedentário (CS), não diabéticos; o Grupo Controle Treinado (CT), não diabéticos; o Grupo Diabético Sedentário (DS), com diabetes experimental, sem qualquer tipo de tratamento; e o Grupo Diabético Treinado (DT) com diabetes experimental, submetidos ao treinamento físico aeróbio; constituídos de cinco animais cada um dos grupos. O diabetes

experimental, similar ao tipo I, foi induzido pela administração de dose única intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 60 mg/kg; Sigma Chemical Co., USA), dissolvido em solução tampão citrato de sódio (10mM, pH 4,5) após jejum alimentar de 12 horas. Os animais do grupo controle, da mesma forma, receberam doses equivalentes apenas de solução tampão citrato de sódio. Decorridos 30 minutos do tratamento os animais de ambos os grupos foram alimentados normalmente (Dall'Ago *et al.*, 2002).

Foram caracterizados como diabéticos e incluídos no experimento apenas os animais que apresentaram valores de glicose sanguínea acima de 200 mg/dL 72 h após a indução pela STZ (Lehti *et al.*, 2007) com amostra de sangue colhida da ponta da cauda do animal após um jejum de 12 horas (Glicosímetro AcuChek; Roche). Após a confirmação da diabetes foi realizada uma verificação semanal da glicose sanguínea em ambos os grupos. Os animais diabéticos em nenhum momento do período de estudo foram tratados para controle da glicemia, e mostraram sintomas compatíveis com o diabetes tipo I, tais como poliúria e perda de peso.

Os procedimentos aplicados para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas – UFPE.

Eletrofisiologia. Uma semana após o início do período experimental, a velocidade de condução nervosa (VCN) caudal foi registrada na cauda do animal após serem anestesiados, através da técnica ortodrômica, ao final do período experimental. Foram utilizados eletrodos de superfície e um eletromiógrafo (Demetec centor – M4V) com o programa Racia-Alvar Centor M version v2.1 [software Altromed GmbH, version 2.81 (4 channels), 1999], onde as medidas de latência, amplitude e duração dos potenciais de ação do nervo caudal foram automaticamente calculadas pelo aparelho, após a inserção da distância, mantida constante, de

oito centímetros entre os eletrodos registrador e estimulador no aparelho. A VCN foi calculada automaticamente e apresentada em metros por segundo (m/s). Durante todo o procedimento a temperatura da cauda foi mensurada e mantida em uma média constante de 31,5 °C, verificada através de um termômetro subdermal (Doc Thermo; modelo n. HD – 11; Comdek Industrial Corp.) imediatamente antes do estímulo para cada animal, e usada uma lâmpada dicróica para aquecimento e controle.

Treinamento Físico Aeróbio. Após a determinação da diabetes, os animais do grupo treinado (CT e DT), com um mesmo período de tempo, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos ao treinamento físico aeróbio enquanto os grupos sedentários (CS e DS) permaneceram em suas respectivas gaiolas, estando sujeito apenas a manipulação. O protocolo de treinamento físico aeróbio consiste de nado forçado em tanque cilíndrico de 50 x 80 cm (diâmetro, altura), desenvolvido pelo Departamento de Anatomia – UFPE, com água a uma profundidade de 35 a 40 cm, a temperatura monitorada e controlada de 32 ± 1 °C, por um período de 6 semanas, 5 dias/semana, sendo precedido de um período de adaptação de uma semana com treino progressivo de 10 minutos por cinco dias até que o animal nadasse continuamente 1h/dia. O nado em grupo foi usado por promover um exercício mais vigoroso do que quando o animal realiza o treino sozinho no tanque (Nakao *et al.*, 2000). Ao final de cada sessão de treinamento, para minimizar os efeitos da exposição ao frio, os animais eram enxutos e ficavam em uma câmara de aquecimento (Királi *et al.*, 2007), também desenvolvidos pelo Departamento de Anatomia da UFPE, por cerca de 20 minutos.

Histologia. Vinte e quatro horas após o término do período de treinamento físico aeróbio, os animais de ambos os grupos experimentais, animais diabéticos experimentais e controles, foram anestesiados com uma solução de xilazina (Rompun; Bayer) e cloridrato de cetamina (Ketalar, Parke Davis Warner Lambert) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (Massone, 1988) para a retirada do nervo ciático. Foi realizada uma

incisão na pele da região posterior da coxa direita e, em seguida, os músculos glúteo máximo, glúteo médio e os isquiotibiais foram rebatidos para exposição do nervo ciático. A pré-fixação do nervo foi feita a partir da visualização da estrutura na região anatômica através do gotejamento de solução de glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M. O nervo ciático foi removido ao nível da sua emergência na região glútea até a sua ramificação na região poplítea. O material recolhido foi, então, fixado por imersão na solução fixadora e mantido em condições de resfriamento (6 °C em geladeira).

Após a coleta e fixação, o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio a 0,1M e realizada a pós-fixação dos segmentos em tetróxido de ósmio a 1% acrescido de tampão cacodilato de sódio a 0,1M durante 2h em ambiente de total escuridão. Posteriormente, os segmentos foram novamente lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e desidratados em soluções de concentração crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). Sendo, então, inclusos em resina sintética (EPON 812). Após a obtenção dos blocos foi realizada a ultramicrotomia da secção transversa do nervo ciático de cada animal para aquisição dos cortes ultrafinos (70 nm). Estes foram coletados em grades de níquel com malha de 300 orifícios e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 5% por 1 h e, com citrato de chumbo a 1% por 3 min.

Ultraestrutura. As grades contendo as seções ultrafinas das amostras foram observadas em microscópio eletrônico FEI Morgagni 268D a uma voltagem de 60 kV. Os capilares foram definidos como vasos sanguíneos cujas células endoteliais estavam envolvidas por uma camada descontínua de pericitos. A identificação do pericito foi baseada na presença da membrana basal. Setenta e cinco capilares endoneurais (variando entre 3-5 por animal) que estavam desobstruídos pelas linhas das grades ou outros artefatos, tais como rasgões, buracos e dobras, foram fotografados aleatoriamente nos campos microscópicos com uma magnificação final de 8.900X para as análises morfométricas e de 14.000-28.000X para

análise qualitativa mais detalhada das estruturas da parede celular. A composição de múltiplos registros, para os vasos mais largos foram necessárias pelo fato de não se ajustarem dentro de uma única imagem, e realizadas através do software Fireworks (Macromedia, 8.0.0.777) sem nenhuma modificação no tamanho das imagens.

Morfometria. A área e perímetro vascular (AV e PV), a área e perímetro do lúmen (AL e PL), a área e perímetro endotelial (AE e PE), a área e perímetro da membrana basal (AMB e PMB), e a área do pericito (AP) foram registradas nos registros fotográficos através do software Scion Image for Windows (Beta 4.0.2.), como mostra a figura 1. A área vascular foi delineada pela circunferência externa do pericito e membrana basal menos a área do lúmen que foi delineada pela circunferência interna da célula endotelial que reveste o lúmen, a área endotelial pela circunferência externa do endotélio menos a área referente ao lúmen, a área da membrana basal pela sua circunferência externa menos o endotélio, e a área do pericito pela área vascular menos a área da membrana basal. Também foram contados o número de núcleos das células endoteliais e o número de núcleos do pericito. Com áreas e perímetros mensurados, foram determinadas a espessura da membrana basal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) = área da membrana basal dividida pelo perímetro externo da célula endotelial; a espessura da parede do vaso (μm) = $\frac{\text{área da célula endotelial} - \text{área do lúmen}}{1/2 \times (\text{perímetro da célula endotelial} + \text{perímetro do lúmen})}$; e a hiperplasia das células endotelial e pericito = número de núcleos/vaso, como descrito previamente (Estrella *et al.*, 2008). Vasos com razão entre o eixo menor e maior mais que 1:3 foram excluídos.

Análise Estatística. Os resultados referentes aos parâmetros estudados por grupo de animais foram sumarizados em média, desvio padrão e limites mínimo e máximo. A análise estatística das diferenças foi realizada por análise de variância (ANOVA). A análise das áreas foi feita através de uma ANOVA com três fatores ($5 \times 2 \times 2$): estrutura analisada (parede do vaso; pericito; membrana basal; endotélio; lúmen) por condição (controle, diabético) por situação

(sedentário, treinamento). O peso final dos animais, níveis glicêmicos, VCN, espessuras da parede do vaso e da membrana basal, e os números de núcleos do pericito e do endotélio foram analisados através de ANOVAs com 2 fatores (2×2): condição (controle, diabético) por situação (sedentário, treinamento). As múltiplas comparações *post-hoc* foram feitas com teste de Tukey HSD. O p crítico para todos os testes foi de 0,05. Os dados analisados através do programa estatístico XLStat[®] versão 2009.4.03.

RESULTADOS

Os animais com diabetes experimental demonstraram alterações clínicas como polidipsia e poliúria já na primeira semana após a indução com STZ, e ao final do período experimental, opacidade afetando pelo menos um dos olhos sugerindo um estado de catarata. Como mostra a Tabela 1, o peso corpóreo dos ratos diabéticos foi significativamente menor que os ratos do grupo controle independentemente do treinamento ao final das seis semanas do período experimental (ANOVA, efeito principal peso, $p = 0,001$). Por outro lado, o peso dos ratos treinados foi menor que os sedentários independentemente de serem diabéticos (ANOVA, efeito principal exercício, $p = 0,028$). A interação entre a condição e a situação não foi significativa ($p = 0,211$). A glicemia dos ratos diabéticos foi significativamente maior que a dos ratos controles tanto nos animais sedentários quanto nos treinados (ANOVA, efeito principal glicemia, $p < 0,0001$), porém não houve interferência do treinamento nos níveis de glicose sanguínea dos animais diabéticos, nem interação entre a condição e a situação foram significativos ($p = 0,196$ e $p = 0,239$, respectivamente). Da mesma forma, a VCN no registro eletrofisiológico das fibras do nervo caudal ao final do período experimental, foi significativamente menor nos ratos diabéticos quando comparado com o grupo de ratos controle tanto sedentários quanto treinados (ANOVA, efeito principal situação, $p = 0,000$), sugerindo um comprometimento funcional do nervo caudal sensorial nos animais diabéticos.

O efeito principal situação e, a interação entre a situação e a condição não foram significativos ($p = 0,152$ e $p = 0,437$, respectivamente).

A análise morfométrica ultraestrutural das áreas dos microvasos endoneurais está resumida na Tabela 2. A ANOVA revelou efeito principal significativo para o treinamento ($p = 0,016$), isto é, as áreas medidas foram maiores nos ratos submetidos ao treinamento físico aeróbio, tanto nos animais diabéticos quanto nos controles. O efeito principal para a condição do diabetes não alcançou significância ($p = 0,519$), assim como a interação entre a condição e a situação não alcançaram significância ($p = 0,524$). Nos animais diabéticos, a espessura da membrana basal, representada pela reduplicação da lâmina basal e, a espessura da parede do vaso, não foram significativamente diferente quando comparados com os animais do grupo controle (Tabela 3, Figura 4). Apesar do número de núcleos das células endoteliais ser maior no grupo de animais diabético treinado que nos sedentários essa diferença não chegou a alcançar significância estatística ($p = 0,063$). No entanto, o número de núcleos do pericito foi significativamente maior nos ratos diabéticos treinados quando comparados com seu grupo sedentário ($p = 0,038$), caracterizando uma hiperplasia de células do pericito.

DISCUSSÃO

Apesar da gravidade das complicações vasculares do diabetes *mellitus*, há uma relativa escassez de dados especificamente sobre a patogênese, prevenção e seu tratamento. Várias descobertas demonstraram que o treinamento físico tem efeitos terapêuticos e de proteção no diabetes tipo 1, diminuindo o estresse oxidativo e melhorando a capacidade antioxidante da parede vascular (Heidarianpour *et al.*, 2007). Há evidências que o déficit funcional do nervo periférico em ratos diabéticos diz respeito à alteração do fluxo sanguíneo e da hipóxia do endoneuro (Uehara *et al.*, 1997). Para uma avaliação discriminada das áreas microvasculares, isto pode ser possível apenas através de análises ultraestruturais (Sugimoto & Yagihashi,

1997) e esse tipo de análise pode, portanto, fornecer uma indicação da forma dos microvasos nervosos e o seu tamanho *in vivo*.

Para tanto, o presente estudo utilizou-se dessas técnicas morfométricas através da microscopia eletrônica para avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio nas anormalidades nos microvasos endoneurais do nervo ciático de ratos diabéticos induzidos por STZ. Nossos dados morfométricos mostraram alterações causadas pela influência do treinamento físico aeróbio sobre as áreas analisadas, o grupo de animais diabéticos submetidos ao treinamento apresentou valores maiores para todas as áreas avaliadas (Figura 2 e 3). Tais alterações não foram acompanhadas por alterações degenerativas mensuráveis da parede desses microvasos, apesar de estarem aparentes nos registros eletromicrográficos (Figura 4), que podem eventualmente refletir o início das alterações hemodinâmicas do fluxo sanguíneo endoneural. Essas possíveis mudanças estruturais podem também apoiar a hipótese de que as alterações do fluxo sanguíneo endoneurial são relevantes para o comprometimento funcional do nervo periférico e contribuir para o desenvolvimento de neuropatia em ratos diabéticos (Low, Langerlund & McManis, 1989; Sugimoto & Yagihashi, 1997) que realizam treinamento físico.

A dilatação do lúmen microvascular não é específica para ratos diabéticos induzidos por STZ, mas é um achado no nervo periférico de indivíduos com neuropatia leve (Malik *et al.*, 1989). Tal alteração pode ser sinal precoce de microangiopatia endoneural secundária a hiperglicemia. No entanto, não foi possível demonstrar as alterações degenerativas de microvasos ou fechamento de lúmen nos animais apresentados neste modelo experimental. A oclusão e estreitamento dos vasos endoneurais são relatos que parecem ser característicos no nervo periférico de humanos diabéticos (Dyck *et al.*, 1985; Timperley *et al.*, 1985), embora alguns estudos não tenham conseguido reproduzir estes dados (Sima *et al.*, 1991; Yasuda e Dyck, 1987). Nossa análise morfométrica confirmou a tendência do lúmen microvascular

endoneural se expandir em ratos diabéticos, principalmente com o treinamento, o que tem sido descrito previamente (Uehara *et al.*, 1997). A importância da proliferação endotelial é que o aumento anormal do número de grandes células endoteliais tende a reduzir a área luminal em relação ao tamanho do capilar e podem ter um impacto sobre o fluxo sanguíneo microvascular (Powell & Myers, 1984).

O diabetes tem efeitos diretos sobre a função da *vasa nervorum* de ratos, em especial no endotélio vascular, onde déficits nos sistemas vasodilatadores principais como o óxido nítrico e as prostaciclina foram percebidos. Normalmente, estes mecanismos interagem em um sistema integrado de controle de fluxo sanguíneo no nervo. Se esta é a principal causa da neuropatia experimental, a proeminente disfunção vascular é o resultado desses múltiplos danos metabólicos, tendo como um dos principais alvos, o endotélio vascular (Cameron, 2003). Dessa forma, as células endoteliais exibem hiperplasia e hipertrofia, na neuropatia diabética estabelecida, e esta situação é conhecida como o início de uma série de alterações metabólicas e patológicas em pacientes diabéticos (Malik *et al.*, 1992). A respeito da hipertrofia das células endoteliais, que pode ser uma característica tardia da microangiopatia diabética (Malik *et al.*, 1992), o estudo de Powell & Myers (1984) apresentou este achado com quase uma duplicação da área da célula endotelial nos animais diabéticos. E, no estudo de Walker *et al.* (2001), mesmo sem um resultado significativo, também foi observado dados tendendo a um aumento dessa área, da mesma forma que os nossos.

Existe também a possibilidade de que a frequência de microvasos endoneurais fechados esteja correlacionada com a idade, mas não com a duração do diabetes (Sima *et al.*, 1991) mas poucos estudos anteriores (Powell & Myers, 1984) examinaram a morfologia capilar em um modelo animal, com uma longa duração do diabetes de forma induzida. Por outro lado, o espessamento da membrana basal da microvasculatura endoneurial é um achado constante em nervos diabéticos humanos (Dyck *et al.*, 1985; Powell & Myers, 1984; Yasuda e

Dyck, 1987). No presente estudo, os ratos diabéticos não mostraram aumento da espessura da membrana basal apesar de isto poder ser visualizado nas eletromicrografias (Figura 4b e 4c).

Os pacientes diabéticos com neuropatia demonstram espessamento da membrana basal capilar endoneural, hipertrofia e hiperplasia das células endoteliais com degeneração de pericito, que está relacionado com a gravidade neuropática (Malik, 1997; Malik *et al.*, 1989, 1992). Pacientes sem evidências de neuropatia mostram menos espessamento de membrana basal e degeneração celular do pericito (Giannini & Dyck, 1995). Igualmente aos parâmetros anteriores, não observamos hiperplasia ou hipertrofia das células do endotélio capilar nos animais diabéticos. Embora tenham mostrado uma hiperplasia de pericito nos animais que foram submetidos ao programa de treinamento físico aeróbio, comparativamente aos animais do grupo diabético sedentário, mostrando uma interferência desta atividade nessa estrutura vascular. Quantitativamente, a degeneração celular periendotelial parece ser um fenômeno proeminente nos nervos diabéticos. As implicações funcionais da degeneração do pericito permanecem obscuras. Pericitos são células primitivas com propriedades contráteis que pode ser útil na manutenção da forma vascular e *in vitro* demonstram exercer um efeito inibitório sobre a proliferação de células endoteliais. A perda desse efeito tem sido considerada um possível fator para estimular a proliferação das células endoteliais (Giannini & Dyck, 1994).

Giannini & Dyck (1994) questionam sobre a interferência do pericito disfuncional na permeabilidade microvascular e sugerem que a tensão da junção de microvasos pode ser influenciada pela função ou disfunção do pericito. As observações atuais, que anormalidades estruturais da parede microvascular endoneural já estão presentes antes do desenvolvimento da neuropatia e que a gravidade dessas mudanças aumenta com a severidade da doença, sugerem que se deve ressaltar o papel do pericito na manutenção da homeostase do microambiente vascular e do desenvolvimento de neuropatia diabética.

A ausência de degeneração de células endoteliais ou pericitos na neuropatia diabética do rato sugere que a reduplicação da lâmina basal resulte de alterações funcionais, não estruturais dessas células, como tem sido sugerido para a neuropatia diabética humana, baseada na observação de que a reduplicação está presente antes de alterações degenerativas celulares (Giannin & Dyck, 1995). Em biópsias de nervo sural em pacientes diabéticos, hipertrofia e hiperplasias endoteliais são comumente relatadas (Malik *et al.*, 1989, 1992, 1993; Yasuda & Dyck, 1987), com a degeneração de pericito sendo observada ocasionalmente (Giannin & Dyck, 1994, 1995; Yasuda & Dyck, 1987), que é provavelmente um reflexo da duração e da gravidade do diabetes. Embora não tenhamos encontrado resultados que comprovem a reduplicação da membrana basal e a hipertrofia de células endoteliais nas nossas análises, o aumento no número de pericitos ($p = 0,038$) e uma tendência a um aumento no número de células endoteliais ($p = 0,063$) dos animais do grupo diabético treinado, também elevou esta tendência de aumento para a área da parede do microvaso endoneural, apesar de não interferir nos valores da espessura da parede.

É geralmente aceito que o endotélio desempenha um papel central na manutenção da função vascular e uma consequência funcional importante na disfunção endotelial é a incapacidade de liberação de óxido nítrico, o vasodilatador do músculo liso vascular subjacente às células (Fuchsjäger-Mayrl *et al.*, 2002). Diversas mudanças vasculares e metabólicas induzidas pelo exercício poderiam ser invocadas para explicar os efeitos do treinamento sobre o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica (Balducci *et al.*, 2006). Uma maior expressão vascular do fator de crescimento endotelial vascular durante o exercício de curto prazo tem sido proposto para desempenhar um papel no aumento de fluxo sanguíneo endoneural (Gustafsson *et al.*, 1999). O exercício também pode melhorar a anormal perfusão e a viscosidade do plasma facilitando o fornecimento de oxigênio (Terjung *et al.*, 1988; Fuchsjäger-Mayrl *et al.*, 2002) e, que o treinamento físico expõe os vasos a repetidos

episódios de hiperemia e, as elevadas forças de cisalhamento com o aumento do fluxo sanguíneo causado pelo exercício aeróbio aumenta a vasodilatação a longo prazo elevando a expressão vascular da óxido nítrico sintetase, aumentando a liberação de óxido nítrico (Fukai *et al.*, 2000; Maiorana *et al.*, 2003; McAllister, Hirai, & Musch, 1995; Niebauer & Cooke, 1996).

CONCLUSÃO

Todas as áreas dos microvasos endoneurais dos animais diabéticos mensuradas sofreram interferência do TFA, que interferiu da mesma forma, na atividade celular periendotelial aumentando o número de pericitos que envolvem os microvasos endoneurais controlando o efeito proliferativo das células endoteliais. No entanto, o mesmo não ocorreu com as espessuras da membrana basal e, da parede do vaso.

REFERÊNCIAS

- Balducci, S., Iacobellis, G., Parisi, L., Di Biase, N., Calandriello, E., Leonetti, F., Fallucca, F., 2006. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J. Diabet. Complic.* 20, 216-223.
- Cambri, L.T., Decimo, J.P., Souza, M., Oliveira, F.R., Gevaerd, M.S., 2007. Efeito agudo e crônico do exercício físico no perfil glicêmico e lipídico em diabéticos tipo 2. *Motriz.* 13(6), 238-248.
- Cameron, N.E., Eaton, S.E.M., Cotter, M.A., Tesfaye, S., 2001. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia.* 44, 1973-1988.

Cameron, N.E., 2003. The aetiology of neuropathy in experimental diabetes. *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.*, 3, 98-105.

Dall'ago, P., Silva, V.O.K., De Angelis, K.L.D., Irigoyen, M.C., Fazan Jr, R., Salgado, H.C., 2002. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35, 843-849.

De Angelis, K., Pureza, D.Y., Flores, L.J.F., Rodrigues, B., Melo, K.F.S., Schaan, B.D., Irigoyen, M.C., 2006. Efeitos fisiológicos do treinamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 50, 1005-1013.

Dyck, J.P., Hansen, S., Karnes, J., O'brien, P., Yasuda, H., Windebank, A., Zimmerman, B., 1985. Capillary number and percentage closed in human diabetic sural nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2513-2517.

Estrella, J.S., Nelson, R.N., Sturges, B.K., Vernau, K.M., Williams, D. C., Lecouteur, R.A., Shelton, G.D., Mizisin, A.P., 2008. Endoneurial Microvascular Pathology in Feline Diabetic Neuropathy. *Microvasc. Res.* 75(3), 403-410.

Fuchsjäger-Mayrl, G., Pleiner, J., Wiesinger, G.F., Sieder, A.E., Quittan, M., Nuhr, M.J., Francesconi, C., Seit, H.P., Francesconi, M., Schmetterer, L., Wolzt, M., 2002. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 25, 1795-1801.

Fukai, T., Siegfried, M.R., Ushio-Fukai, M., Cheng, Y., Kojda, G., Harrison, D.G., 2000. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.* 105, 1631-1639.

Giannini, C., Dyck, P.J., 1994. Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneurial microvessels in diabetes mellitus. *Ann. Neurol.* 36, 408-415.

Giannini, C., Dyck, P.J., 1995. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann. Neurol.* 37(4), 498-504.

Gomes, R.J., Leme, J.A.C.A., Mello, M.A.R., Luciano, E., Caetano, F.H., 2008. Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. *Motriz.* 14(3), 320-328.

Gustafsson, T., Puntchart, A., Kaijser, L., Jansson, E., Sundberg, C.J., 1999. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 276, H679-H685.

Heidarianpour, A., Hajizadeh, S., Khoshbaten, A., Niaki, A.G., Bigdili, M.R., Pourkhalili, K., 2007. Effect of chronic exercise on endothelial dysfunction and insulin signaling of cutaneous microvascular in streptozocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 14, 746-752.

Kennedy, J.M., Zochodne, D.W., 2002. Influence of experimental diabetes on the microcirculation of injured peripheral nerve: functional and morphological aspects. *Diabetes.* 51, 2233-2240.

Király, M.A., Bates, H.E., Yue, J.T.Y., Goche-Montes, D., Fediuc, S., Park, E., Matthews, S.G., Vranic, M.; Riddell, M.C., 2007. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. *Metab. Clin. Exper.* 56, 732-744.

Lehti, T.M., Silvennoinen, M., Kivelä, R., Kainulainen, H., Komulainen, J., 2007. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretch-sensing complexes in mouse striated muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, 533-542.

Low, P.A., Lagerlund, T.D., Mcmanis, P.G., 1989. Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic and ischemic neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 355-438.

Maiorana, A., O'Driscoll, G., Goodman, C., Taylor, R., Green, D., 2002. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. *Diab. Res. Clin. Prac.* 56, 115-123.

Maiorana, A., O'Driscoll, G., Taylor, R., Green, D., 2003. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med.* 33(14), 1013-1035.

Malik, R.A., Newrick, P.G., Sharma, A.K., Jennings, A., Ah-See, A.K., Mayhew, T.M., Jakubowski, J., Boulton, A.J.M., Ward, J.D., 1989. Microangiopathy in human diabetic neuropathy: relationship between capillary abnormalities and the severity of neuropathy. *Diabetologia.* 32, 92-102.

Malik, R.A., Tesfaye, S., Thompson, S.D., Veves, A., Sharma, A.K., Boulton, A.J.M., Ward, J.D., 1993. Endoneurial localization of microvascular damage in human diabetic neuropathy. *Diabetologia.* 36, 454-459.

Malik, R.A., 1997. The pathology of human diabetic neuropathy. *Diabetes.* 46(Suppl 2), S50-S53.

Malik, R.A., Veves, A., Masson, E.A., Sharma, A.K., Ah-See, A.K., Schady, W., Lye, R.H., Boulton, A.J., 1992. Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 55, 557-561.

Massone, F. (Ed.), 1988. *Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas*. Guanabara, Rio de Janeiro.

Mcallister, R.M., Hirai, T., Musch, T.I., 1995. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. *Méd. Sci. Sports. Exe.* 27, 1145-1151.

Medori, R., Autilio-Gambetti, L., Monaco, S., Gambetti, P., 1985. Experimental diabetic neuropathy: Impairment of slow transport with changes in axon cross-sectional area. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 7716-7720.

Nakao, C., Ookawara, T., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Miyazaki, H., Haga, S., Sato, Y., Li Ji, L., Ohno, H., 2000. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J. Appl. Physiol.* 88, 649-654.

Niebauer, J., Cooke, J.P., 1996. Cardiovascular effects of exercise: Role of endothelial shear stress. *J. Am. Coll. Cardiol.* 28, 1652-1660.

Powell, H.C., Myers, R.R., 1984. Axonopathy and microangiopathy in chronic alloxan diabetes. *Acta Neuropathol.* 65(2), 128-137.

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

- Schmelzer, J.D., Low, P.A., 1987. Electrophysiological studies on the effect of age on caudal nerve of the rat. *Exp. Neurol.* 96, 612-620.
- Sima, A.A., Nathaniel, V., Prashar, A., Bril, V., Greene, D.A., 1991. Endoneurial microvessels in human diabetic neuropathy. Endothelial cell dysjunction and lack of treatment effect by aldose reductase inhibitor. *Diabetes.* 40, 1090-1099.
- Snow, L.M., Sanchez, A.O., Mcloon, L.K., Serfass, R.C., Thompson, L.V., 2005. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 84, 770-779.
- Sugimoto, K., Yagihashi, S., 1997. Effects of Aminoguanidine on Structural Alterations of Microvessels in Peripheral Nerve of Streptozotocin Diabetic Rats. *Microvasc. Res.* 53, 105-112.
- Terjung, R.L., Mathien, G.M., Erney, T.P., Ogilvie, R.W., 1988. Peripheral adaptations to low blood flow in muscle during exercise. *Am. J. Cardiol.* 62, 15E-19E.
- Timperley, W.R., Boulton, A.J.M., Davies-Jones, G.A.B., Jarratt, J.A., Ward, J.D., 1985. Small vessel disease in progressive diabetic neuropathy associated with good metabolic control. *J. Clin. Pathol.* 38, 1030-1038.
- Uehra, K., Sugimoto, K., Wada, R., Yoshikuwa, T., Marukawa, K., Yasuda, Y., Kimura, Y., Yagihashi, S., 1997. Effects of Cilostazol on the Peripheral Nerve Function and Structure in STZ-induced Diabetic Rats. *J. Diabet. Complic.* 11(3), 194-202.
- Veves, A., Saouaf, R., Donaghue, V.M., Mulloly, C.A., Kistler, J.A., Giurinin, J.M., Horton, E.S., Fielding, R.A., 1997. Aerobic exercise capacity remains normal despite impaired

endothelial function in the micro and macrocirculation of physically active IDDM patients. *Diabetes*. 46(11), 1846-1852.

Walker, D., Siddique, I., Anderson, H., Gardiner, T.A., Archer, D.B., Boulton, A.J.M., Malik, R.A., 2001. Nerve pathology in the type 1 diabetic dog: effects of treatment with sulindac. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 6(4), 219-226.

Yasuda, H., Dyck, P.J., 1987. Abnormalities of endoneurial microvessels and sural nerve pathology in diabetic neuropathy. *Neurology*. 37, 20-28.

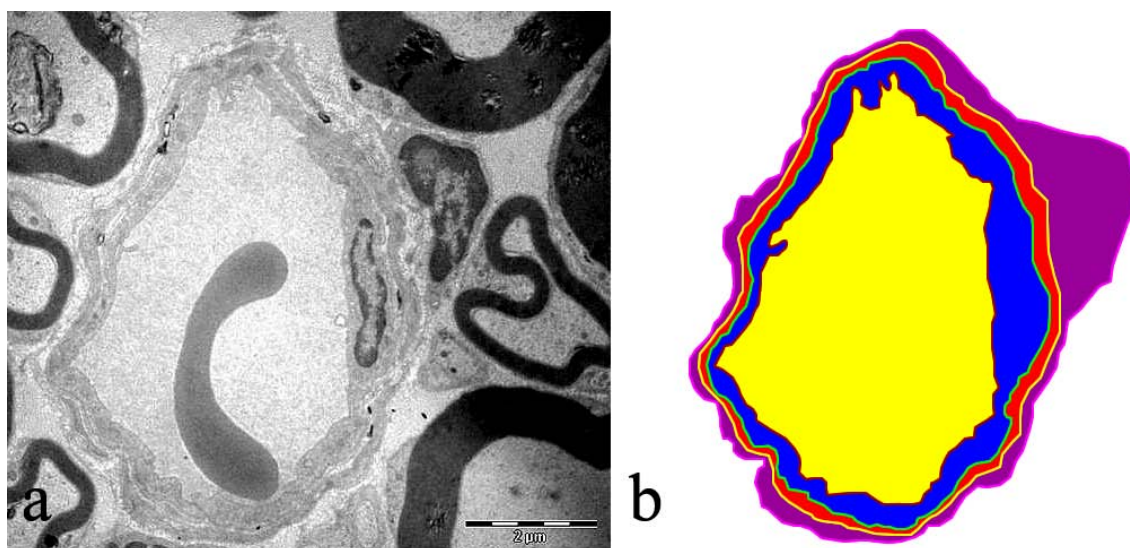


Figura 1. Eletromicrografia de corte transverso de vaso sanguíneo endoneural do nervo ciático de rato diabético (a) e contornos dos componentes da parede celular para determinação de áreas e perímetros usados nas mensurações morfométricas sobre este vaso designado pelo código de cores (b) como segue: área luminal - *amarelo*; área da célula endotelial - *azul*; área da membrana basal - *vermelho*; área do pericito - *púrpura*; perímetro do lúmen - *laranja*; perímetro exterior de células endoteliais - *verde*; perímetro interior do pericito - *amarelo*; e perímetro exterior do pericito - *rosa*. Escala de barra com 2 μm (8.900X).

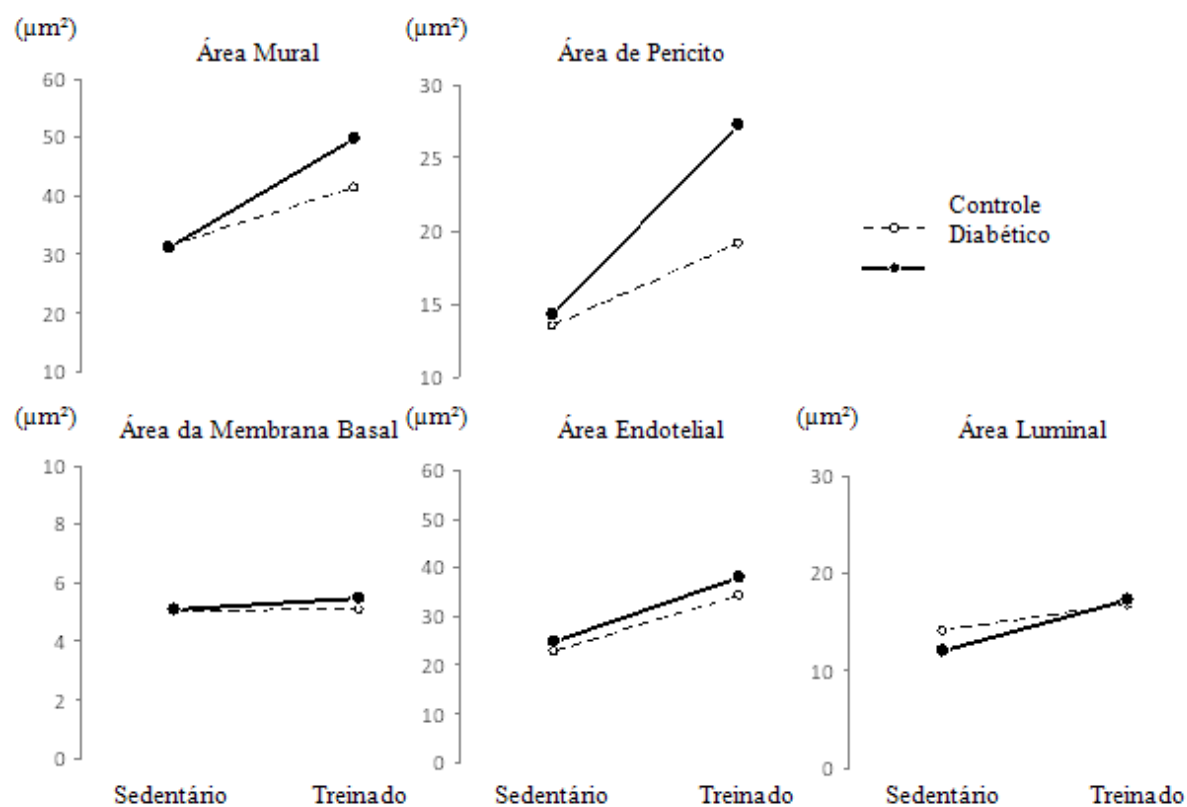


Figura 2. Esboço das análises de variâncias (ANOVA) das áreas das estruturas analisadas nos microvasos endoneurais do nervo ciático de animais com diabetes experimental e submetidos ao treinamento físico.

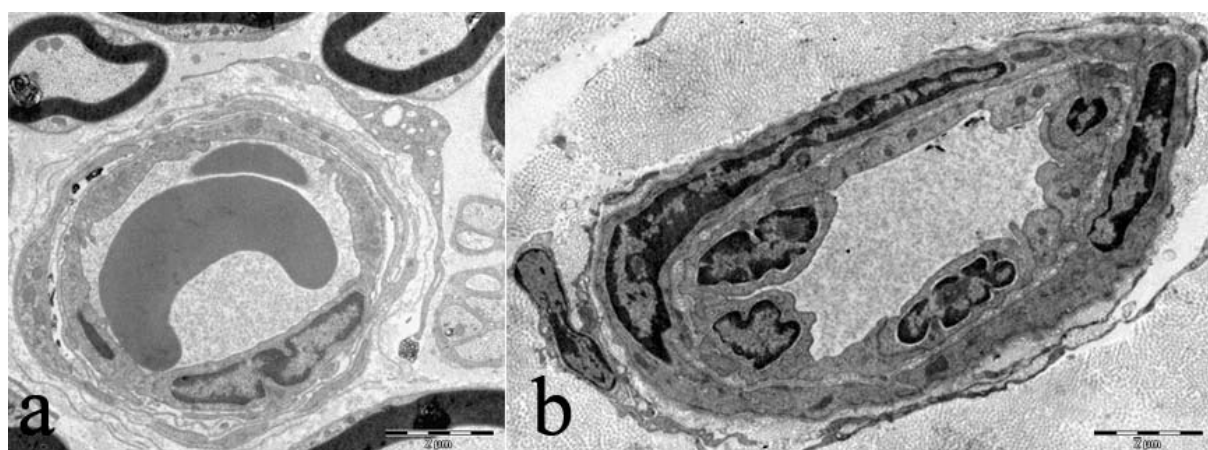


Figura 3. Eletromicrografias de corte transverso de vaso sanguíneo endoneural do nervo ciático de ratos diabéticos sedentário (a), e treinado (b). Presença de maiores áreas das estruturas da parede do vaso dos ratos diabéticos treinados. Escala de barra com 2 μ m (8.900X).

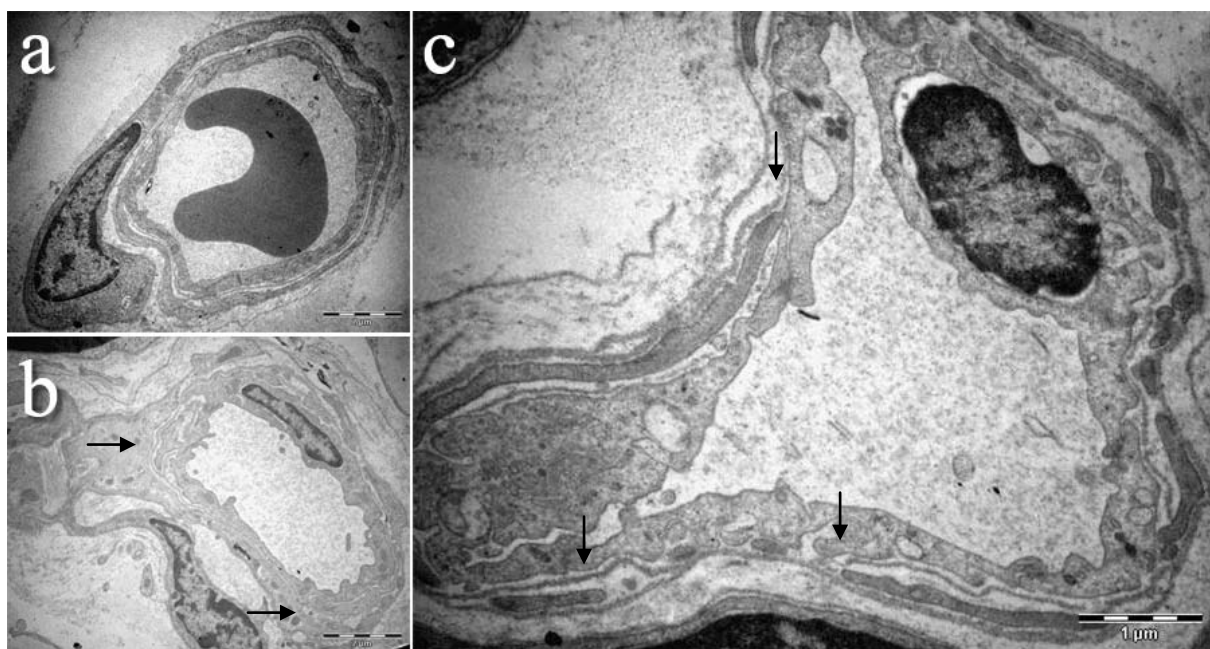


Figura 4. Eletromicrografias de corte transverso de vaso sanguíneo endoneural do nervo ciático de ratos controle (a), diabético (b) e diabético treinado (c). Presença de duplicação da membrana basal entre o endotélio e pericitos no vaso dos ratos diabéticos (seta). Escala de barra com 2 μm (a,b) e 1 μm (c).

Tabela 1. Dados do peso corporal, da glicose sanguínea e da velocidade de condução nervosa sensorial das fibras caudais de animais com diabetes experimental, e submetidos ao treino físico ao final do período experimental.

Variáveis	Controle sedentário	Controle treinado	Diabético sedentário	Diabético treinado	ANOVA <i>p</i> valor
Peso final (g)	336 ± 64 (262-398)	256 ± 57 (208-356)	216 ± 20 (190-246)	191 ± 39 (148-238)	0,001
Glicose sanguínea final (mg/dl)	84 ± 17 (59-100)	81 ± 12 (65-94)	360 ± 44 (324-423)	303 ± 87 (179-420)	< 0,0001
Velocidade de condução nervosa (m/s)	43 ± 2 (41-46)	47 ± 2 (44-50)	38 ± 1 (37-40)	39 ± 4 (33-44)	0,000

Valores expressos em média ± DP; *p* valor para efeito principal a situação diabetes; n = 5. Os valores entre parênteses são os intervalos mínimo e máximo nos grupos.

Tabela 2. Morfometria das áreas dos microvasos endoneurais do nervo ciático de animais com diabetes experimental e submetidos ao treino físico.

Áreas (μm^2)	Controle sedentário	Controle treinado	Diabético sedentário	Diabético treinado
Parede Vascular	32 ± 9 (19-39)	41 ± 18 (27-73)	32 ± 12 (21-42)	50 ± 30 (24-99)
Pericito	14 ± 5 (8-20)	19 ± 14 (11-43)	15 ± 9 (6-23)	27 ± 20 (10-59)
Membrana Basal	5 ± 2 (3-7)	5 ± 1 (3-7)	5 ± 1 (3-6)	6 ± 2 (4-10)
Endotélio	14 ± 4 (9-20)	17 ± 4 (11-22)	13 ± 2 (10-13)	17 ± 8 (10-31)
Lúmen	23 ± 14 (4-42)	34 ± 28 (9-68)	28 ± 10 (18-41)	38 ± 47 (7-119)

Valores expressos em média $\pm$ DP; n = 5 por grupo. Os valores entre parênteses são os intervalos mínimo e máximo nos grupos.

Tabela 3. Morfometria das variáveis mensuradas dos microvasos endoneurais do nervo ciático de animais com diabetes experimental e submetidos ao treino físico.

Variáveis	Controle sedentário	Controle treinado	Diabético sedentário	Diabético treinado	ANOVA <i>p</i> valor
Espessura da Membrana Basal (μm)	$0,18 \pm 0,04$ (0,12-0,23)	$0,16 \pm 0,04$ (0,12-0,21)	$0,19 \pm 0,03$ (0,14-0,22)	$0,18 \pm 0,03$ (0,16-0,22)	0,652
Espessura Mural (μm)	$0,5 \pm 0,12$ (0,46-0,70)	$0,6 \pm 0,10$ (0,50-0,73)	$0,5 \pm 0,05$ (0,44-0,49)	$0,6 \pm 0,18$ (0,38-0,85)	0,459
Número de Núcleos do Pericito	$0,7 \pm 0,3$ (0,25-1)	$0,4 \pm 0,3$ (0-0,75)	$0,7 \pm 0,4$ (0,2-0,75)	$1,2 \pm 0,5$ * † (0,75-2,0)	0,007 §
Número de Núcleos do Endotélio	$1,3 \pm 0,3$ (1-1,5)	$1,5 \pm 0,3$ (1,25-2)	$1,6 \pm 0,4$ (1-2,2)	$2,5 \pm 1,3$ (1,3-4,7)	0,063

Valores expressos em média $\pm$ DP; n = 5 por grupo. Os valores entre parênteses são os intervalos mínimo e máximo nos grupos. § resultado de interação entre a situação diabetes e a condição treinamento.

* P = 0,038 vs diabético sedentário;

† P = 0,008 vs controle treinado (*post-hoc* Tukey).

8. DISCUSSÃO GERAL

A neuropatia periférica diabética é uma das mais comuns complicações tardias do diabetes, e é a mais freqüente e severa na população diabética do tipo 1. Sua patogênese é considerada multifatorial, com contribuições de fatores tanto metabólicos como vasculares (Balducci *et al.*, 2006). Apesar da gravidade das complicações vasculares do diabetes, há uma relativa escassez de dados especificamente sobre sua patogênese, prevenção e tratamento (Heidarianpour *et al.*, 2007). Embora o mecanismos subjacentes à neuropatia diabética permanecem desconhecidos, a hiperglicemia crônica pode levar à distúrbio metabólico que afeta diretamente os neurônios (axônios) ou células de Schwann ou pode, indiretamente, afeta-los, atingindo primeiro um outro tecido, como os vasos (Dyck *et al.*, 1985).

Pelo fato de apresentarem semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes humano, os modelos experimentais de diabetes induzidos em ratos têm sido amplamente utilizados por pesquisadores em todo o mundo (Junod *et al.*, 1969; Obrosova *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007). A administração de uma única dose de STZ, em ratos, resulta na produção de diabetes com marcada hiperglicemia, semelhante ao diabetes tipo I em humanos. A simplicidade desse modelo levou este a se tornar o modelo animal mais comum para o estudo do diabetes e suas complicações, inclusive a neuropatia periférica (Kishi *et al.*, 2002). No entanto, os estudos parecem não demonstrar uma dose padrão para esta indução. Acredita-se que esta dose deva ser de quatro a cinco vezes menor que a letal. No presente estudo foi utilizada a dose de 60mg/Kg para indução do diabetes, dose esta, que segundo a literatura é capaz de promover diabetes de forma duradoura nos animais injetados (Delfino *et al.*, 2002).

A idade para a indução do diabetes é um dado importante descrito na literatura devido ao tempo em que ocorre a maturação nervosa. Acredita-se que essa maturação aconteça por volta da 26ª a 30ª semana de idade em ratos, tornando assim a idade de indução um fator importante nas alterações nervosas decorrente do aumento dos níveis glicêmicos (Malone *et al.*, 1996). No presente estudo a idade de indução do diabetes foi 60 dias, idade em que o animal é considerado adulto jovem e a maturação nervosa ainda não ocorreu, fato este demonstrado nesse estudo pelo aumento linear da VCN e da amplitude do potencial de ação da 8ª a 15ª semana de vida do animal. O nervo periférico de mamíferos, desde que em condições de repouso, depende principalmente do metabolismo oxidativo. Porém, o aumento da idade está associado a uma diminuição progressiva do consumo de oxigênio em repouso e a um aumento progressivo na resistência à falta de oxigênio (Low, Schmelzer & Ward, 1986).

Não apenas a idade do animal, mas também o tempo de instalação do diabetes parece ser crucial para a instalação de uma neuropatia periférica. Um dos sinais mais precoces da neuropatia pode ser facilmente avaliado através do estudo da condução nervosa que, por volta da 3ª semana pode apresentar valores da VCN diminuídos nos animais diabéticos (Kato *et al.*, 2005), conforme observamos no presente estudo. Há evidências que o déficit funcional do nervo periférico em ratos diabéticos diz respeito à alteração do fluxo sanguíneo e da hipóxia do endoneuro (Uehara *et al.*, 1997). A redução da VCN em modelos animais com diabetes experimental tem sido sugerida como resultante primária dessa hipóxia endoneural causada pelo déficit na perfusão nervosa (Maxfield, Cameron & Cotter, 1997).

Entretanto, para se evidenciar alterações nos componentes estruturais do nervo parece ser necessário um período um pouco maior de instalação da doença (Malone *et al.*, 1996, Machado *et al.*, 2000), e para uma avaliação discriminada das áreas microvasculares, apenas através de análises ultraestruturais isto pode ser possível (Sugimoto & Yagihashi, 1997). A microscopia eletrônica é o método padrão ouro para a avaliação das alterações estruturais que a neuropatia diabética causa nos microvasos endoneurais, sendo utilizada tanto para animais de experimentação (Maeda *et al.*, 1999; Carlson *et al.*, 2003) quanto para humanos (Yasuda & Dyck, 1987; Malik *et al.*, 1992; Giannini & Dyck, 1995).

O diabetes tem efeitos diretos sobre a função dos microvasos endoneurais de ratos, em especial no endotélio vascular, onde déficits nos principais sistemas vasodilatadores como o óxido nítrico e as prostaciclina foram percebidos. Isso também aumenta a reatividade dos vasoconstritores tais como a noradrenalina, angiotensina II e endotelina-1, um fenômeno provavelmente exacerbado por sínteses locais elevadas de angiotensina II e endotelina-1. Normalmente, estes mecanismos interagem em um sistema integrado de controle de fluxo sanguíneo do nervo. Se esta é a principal causa da neuropatia experimental, a proeminente disfunção vascular é o resultado desses múltiplos danos metabólicos, tendo como um dos principais alvos, o endotélio vascular (Cameron, 2003).

Uma boa alternativa para controlar os níveis glicêmicos e o peso corporal dos portadores de diabetes é através da realização de um programa de exercícios físicos (Balducci *et al.*, 2006). A realização de um treinamento físico moderado diariamente pode oferecer muitos benefícios ao indivíduo diabético devido à redução dos níveis de glicose sanguínea e ao aumento de fluxo sanguíneo periférico (Maiorana *et al.*, 2002; Balducci *et al.*, 2006; Selagzi *et al.*, 2008). Isto foi demonstrado neste estudo em que os animais diabéticos exercitados apresentaram perda do peso corporal e níveis glicêmicos menores que os animais diabéticos sedentários.

Dessa forma, o presente estudo utilizou-se dessas técnicas morfométricas através da microscopia de luz e eletrônica para avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio nos microvasos endoneurais do nervo ciático de ratos diabéticos induzidos por STZ.

Várias mudanças vascular e metabólica induzidas pelo exercício poderiam ser invocadas para explicar os efeitos do treinamento sobre o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica (Balducci *et al.*, 2006). Maior expressão vascular do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) durante o exercício de curto prazo tem sido proposto para desempenhar um papel no aumento de fluxo sanguíneo endoneural (Gustafsson *et al.*, 1999). O exercício também pode melhorar a anormal perfusão e a viscosidade do plasma facilitando o fornecimento de oxigênio (Terjung *et al.*, 1988; Fuchsjager-Mayrl *et al.*, 2002). Sabe-se que o treinamento físico expõe os vasos a repetidos episódios de hiperemia e que as elevadas forças de cisalhamento com o aumento do fluxo sanguíneo causado pelo exercício aeróbio aumenta a vasodilatação a longo prazo elevando a expressão vascular da óxido nítrico sintetase, aumentando a liberação de óxido nítrico (Fukai *et al.*, 2000; Maiorana *et al.*, 2003; McAllister, Hirai, & Musch, 1995; Niebauer & Cooke, 1996).

A mudanças estruturais podem apoiar a hipótese de que as alterações do fluxo sanguíneo endoneural são relevantes para o comprometimento funcional do nervo periférico e contribuir para o desenvolvimento de neuropatia em ratos diabéticos (Low *et al.*, 1989; Sugimoto & Yagihashi, 1997). A densidade microvascular é considerada um determinante importante do volume total de sangue no nervo periférico e, eventualmente, no fluxo sanguíneo do nervo (Low, Lagerlund & McManis, 1989). Nossos resultados para a densidade microvascular estão em consonância com os achados de outros estudos (Cameron *et al.*, 1991; Sugimoto & Yagihashi, 1997; Walker *et al.*, 1999) quando comparamos os dados dos animais sedentários, que não conseguiam encontrar uma diminuição significativa na densidade capilar no nervo ciático de ratos diabéticos.

Embora nossos dados morfométricos sobre as áreas analisadas não tenham mostrado alterações causadas pela influência do treinamento físico aeróbio, o grupo de animais submetidos ao treinamento apresentou valores médios aumentados para todas as áreas avaliadas. Essas alterações não foram acompanhadas por alterações degenerativas mensuráveis das paredes desses microvasos, apesar de estarem aparentes nos registros elétron-micrográficos.

Pacientes sem evidências de neuropatia mostram menos espessamento de membrana basal e degeneração celular do pericito (Giannini & Dyck, 1995). Igualmente aos parâmetros anteriores, não observamos hiperplasia ou hipertrofia das células do endotélio capilar nos

animais diabéticos. Embora nossos dados tenham mostrado um número de células de pericito aumentado nos animais submetidos ao programa de treinamento físico aeróbio, comparativamente aos animais do grupo diabético sedentário, mostrando uma interferência desta atividade nessa estrutura vascular. Quantitativamente, a degeneração celular periendotelial parece ser um fenômeno proeminente nos nervos diabéticos. As implicações funcionais da degeneração do pericito permanecem obscuras. Pericitos são células primitivas com propriedades contráteis que pode ser útil na manutenção da forma vascular e *in vitro* demonstram exercer um efeito inibitório sobre a proliferação de células endoteliais. A perda desse efeito tem sido considerada um possível fator para estimular a proliferação das células endoteliais (Giannini & Dyck, 1994).

9. CONCLUSÃO GERAL

Em ratos diabéticos, ao se estudar a condução nervosa do nervo sensitivo caudal utilizando-se eletrodos de superfície, a VCN foi mais lenta enquanto que as amplitudes dos potenciais de ação do nervo sensitivo caudal foram maiores que em ratos normais.

A realização do TFA de natção no modelo em que foi implementado não demonstrou alteração da estrutura dos microvasos endoneurais composta pelo número de capilares e área de secção transversa do nervo ciático de ratos com diabetes experimental.

Todas as áreas dos microvasos endoneurais dos animais diabéticos mensuradas sofreram interferência do TFA, que interferiu da mesma forma, na atividade celular periendotelial aumentando o número de pericitos que envolvem os microvasos endoneurais controlando o efeito proliferativo das células endoteliais. No entanto, o mesmo não ocorreu com as espessuras da membrana basal e, da parede do vaso.

REFERÊNCIAS

- BALDUCCI, S.; IACOBELLIS, G.; PARISI, L.; DI BIASE, N.; CALANDRIELLO, E.; LEONETTI, F.; FALLUCCA, F. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. **J Diabet Complications**, 20:216-223, 2006.
- CAMERON, N.E. The aetiology of neuropathy in experimental diabetes. **Br J Diabetes Vasc Dis**, 3:98-105, 2003.
- CAMERON, N.E.; COTTER, M.A.; ROBERTSON, S. Essential fatty acid diet supplementation. Effects on peripheral nerve and skeletal muscle function and capillarization in streptozocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, 40:532-539, 1991.
- CARLSON, E.C.; AUDETTE, J.L.; VEITENHEIMER, N.J.; RISAN, J.A.; LATURNUS, D.I.; EPSTEIN, P.N. Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. **Anat Rec Part A**, 271A:332-341, 2003.
- CHEN, H.; BRAHMBHATT, S.; GUPTA, A.; SHARMA, A.C. Duration of streptozotocin-induced diabetes differentially affects p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation in renal and vascular dysfunction. **Cardiovasc Diabet**, 4:3, 2005.
- CONSENSO BRASILEIRO DE CONCEITOS E CONDUTAS PARA O DIABETES MELLITUS. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 1997.
- CUNHA, R.P.F.; BRITO, M.M.T.; PRAZERES, E.M.B.; PONTES FILHO, N.T. A plasticidade neural e a neuropatia periférica diabética. **Fisiot Br**, 3(2):108-115, 2002.
- DALL'AGO, P.; SILVA, V.O.K.; DE ANGELIS, K.L.D.; IRIGOYEN, M.C.; FAZAN JR, R.; SALGADO, H.C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, 35:843-849, 2002.
- DELFINO, V.D.A.; FIGUEIREDO, J.I.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A. Diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras. Nefrol**, 24(1):31-36, 2002.
- DYCK, J.P.; HANSEN, S.; KARNES, J.; O'BRIEN, P.; YASUDA, H.; WINDEBANK, A.; ZIMMERMAN, B. Capillary number and percentage closed in human diabetic sural nerve. **Proc Natl Acad Sci USA**, 82:2513-2517, 1985.
- ESTRELLA, J.S.; NELSON, R.N.; STURGES, B.K.; VERNAU, K.M.; WILLIAMS, D.C.; LECOUEUR, R.A.; SHELTON, G.D.; MIZISIN, A.P. Endoneurial Microvascular Pathology in Feline Diabetic Neuropathy. **Microvasc Res**, 75(3):403-410, 2008.
- FELDMAN, E.L. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. **J Clin Invest**, 111(4):1-3, 2003.

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

FUKAI, T.; SIEGFRIED, M.R.; USHIO-FUKAI, M.; CHENG, Y.; KOJDA, G.; HARRISON, D.G. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **J Clin Invest**, 105:1631-1639, 2000.

GAGLIARD, A.R.T. Neuropatia diabética periférica. **J Vasc Br**, 2(1):67-74, 2003.

GIANNINI, C.; DYCK, P.J. Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneurial microvessels in diabetes mellitus. **Ann Neurol**, 36:408-415, 1994.

GIANNINI, C.; DYCK, P.J. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. **Ann Neurol**, 37(4):498-504, 1995.

GUSTAFSSON, T.; PUNTSCHART, A.; KAIJSER, L.; JANSSON, E.; SUNDBERG, C.J. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. **Am J Physiol**, 276:H679-H685, 1999.

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

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J Clin Invest**, 48:2129-2139, 1969.

KATO, N.; NEMOTO, K.; NAKANISHI, N.; MORISHITA, R.; KANEDA, Y.; UENOYAMA, M.; IKEDA, T.; FUJIKAWA, K. Nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor improves streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. **Diabetes**, 54:846-854, 2005.

KEMMER, F.W.; BERGER, M. Exercise and diabetes mellitus: physycial activty as a part of daily life and its role in the treatment of diabetic patients. **Int J Sports Med**, 4:77-88, 1983.

KIRÁLY, M.A.; BATES, H.E.; YUE, J.T.Y.; GOCHE-MONTES, D.; FEDIUC, S.; PARK, E.; MATTHEWS, S.G.; VRANIC, M.; RIDDELL, M.C. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. **Metab Clin Exper**, 56:732-744, 2007.

KISHI, M.; TANABE, J.; SCHMELZER, J.D.; LOW, P.A. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, 51(3):819-824, 2002.

LEHTI, T.M.; SILVENNOINEN, M.; KIVELÄ, R.; KAINULAINEN, H.; KOMULAINEN, J. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretch-sensing complexes in mouse striated muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 292:533-542, 2007.

LOW, P.A.; SCHMELZER, J.D.; WARD, K.K. The effect of age on energy metabolism and resistance to ischemic conduction failure in rat peripheral nerve. **J Physiol**, 374:263-371, 1986.

LOW, P.A.; LAGERLUND, T.D.; MCMANIS, P.G. Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic and ischemic neuropathy. **Int Rev Neurobiol**, 31:355-438, 1989.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev Paul Educ Fís**, 12(2):202-209, 1998.

MACHADO, J.L.M.; MACEDO, A.R.; SILVA, M.D.; SPADELLA, C.T.; MONTENEGRO, M.R.G. Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos por aloxana. **Acta Cir Bras** [serial online] 15(2), 2000. Disponível em: URL: <http://www.scielo.br/acb>

MAEDA, K.; YASUDA, H.; TANIGUCHI, Y.; TERADA, M.; KIKKAWA, R. Endoneurial microvasculature of chronically transected sciatic nerves in diabetic rats. **J Peripher Nerv Syst**, 4(1):13-18, 1999.

MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R.; GREEN, D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. **Sports Medicine**, 33:1013-1035, 2003.

MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; GOODMAN, C.; TAYLOR, R.; GREEN, D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. **Diab Res Clin Prac**, 56:115-123, 2002.

MALIK, R.A.; VEVES, A.; MASSON, E.A.; SHARMA, A.K.; AH-SEE, A.K.; SCHADY, W.; LYE, R.H.; BOULTON, A.J. Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy. **J Neurol Neurosurg Psychiat**, 55:557-561, 1992.

MALONE, J.I.; LOWITT, S.; KORTHALS, J.K.; SALEM, A.; MIRANDA, C. The Effect of Hyperglycemia on Nerve Conduction and Structure Is Age Dependent. **Am Diab Assoc**, 45:209-215, 1996.

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

MAXFIELD, E.I.S.; CAMERON, N.E.; COTTER, M.A. Effects of diabetes on reactivity of sciatic vasa nervorum in rats. **J Diabet Complic**, 11(1):47-55, 1997.

MCALLISTER, R.M.; HIRAI, T.; MUSCH, T.I. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. **Med Sci Sports Exe**, 27:1145-1151, 1995.

MEDORI, R.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; MONACO, S.; GAMBETTI, P. **Proc Natl Acad Sci USA**, 82:7716-7720, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=29793&janela=1 Acessado em: 18/12/2009.

MOLTENI, R.; ZHENG, J.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F.; TWISS, J.L. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **PNAS**, 101(22):8473-8478, 2004.

NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S.; SATO, Y.; LI JI, L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **J Appl Physiol**, 88:649-654, 2000.

NIEBAUER, J.; COOKE, J.P. Cardiovascular effects of exercise: Role of endothelial shear stress. **J Am Coll Cardiol**, 28:1652-1660, 1996.

OBROSOVA, I.G.; LI, F.; ABATAN, O.I.; FORSELL, M.A.; KOMJATI, K.; PACHER, P.; SZABO, C.; STEVENS, M.J. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. **Diabetes**, 53:711-720, 2004.

OLIVEIRA, C.A.M.; ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. **Rev Bras Med Esp**, 8(6):219-224, 2002.

OLIVEIRA, C.A.M.; LUCIANO, E.; MARCONDES, M.C.C.G.; MELLO, M.A.R. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **J Diabet Complic**, 21:258-264, 2007.

SCHRATZBERGER, P.; WALTER, D.H.; RITTIG, K.; BAHLMAMM, F.H.; POLA, R.; CURRY, C.; SILVER, M.; KRAININ, J.G.; WEINBERG, D.H.; ROPPER, A.H.; ISNER, J.M. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. **J Clin Invest**, 107(9):1083-1092, 2001.

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

SIPERSTEIN, M.D.; UNGER, R.H.; MADISON, L.L. Studies of muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic, and prediabetic patients. **J Clin Invest**, 47:1973-1999, 1968.

SUGIMOTO, K.; YAGIHASHI, S. Effects of Aminoguanidine on Structural Alterations of Microvessels in Peripheral Nerve of Streptozotocin Diabetic Rats. **Microvasc Res**, 53:105-112, 1997.

TERJUNG, R.L.; MATHIEN, G.M.; ERNEY, T.P.; OGILVIE, R.W. Peripheral adaptations to low blood flow in muscle during exercise. **Am J Cardiol**, 62:15E-19E, 1988.

THOMAZ, J.B.; OLIVEIRA, J.C.P.; HERDY, C.D.C.; BRANCAGLION, S.B.; ABÍLIO, F.M.; THOMAZ, Y.C.M.; LIMA, M.V. Pé diabético: Curso de atualização em vasculopatia - Parte I. **ARS CVRANDI – A revista da clínica médica**, 61-104, 1996.

TIMPERLEY, W.R.; BOULTON, A.J.M.; DAVIES-JONES, G.A.B.; JARRATT, J.A.; WARD, J.D. Small vessel disease in progressive diabetic neuropathy associated with good metabolic control. **J Clin Pathol**, 38:1030-1038, 1985.

UEHRA, K.; SUGIMOTO, K.; WADA, R.; YOSHIKUWA, T.; MARUKAWA, K.; YASUDA, Y.; KIMURA, Y.; YAGIHASHI, S. Effects of Cilostazol on the Peripheral Nerve Function and Structure in STZ-induced Diabetic Rats. **J Diabet Complic**, 11(3):194-202, 1997.

VEVES, A.; KING, G.L. Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? **J Clin Invest**, 107(10):1215-1218, 2001.

WALKER, D.; CARRINGTON, A.; CANNAN, S.A.; SAWICKI, D.; SREDY, J.; BOULTON, A.J.; MALIK, R.A. Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozotocin diabetic rat. **J Anat**, 195:419-27, 1999.

YASUDA, H.; DYCK, P.J. Abnormalities of endoneurial microvessels and sural nerve pathology in diabetic neuropathy. **Neurology**, 37:20-28, 1987.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Coleta de dados

Tabela de Peso

		Peso (g)							
		Semanas							
	Animal	0	1	2	3	4	5	6	7
Controle Treinado	PPG2	275	296	310	318	318	336	328	356
	CABG16	178	196	208	220	212	246	244	244
	CAUG16	158	164	182	190	196	208	208	208
	DMG16	190	198	218	226	228	236	236	238
	PAG16	178	188	208	218	220	232	232	234
	Média	195,80	208,40	225,20	234,40	234,80	251,60	249,60	256,00
	DP	45,74	50,80	49,25	48,75	47,99	49,20	45,83	57,57
Controle Sedentário	PPDG1	314	314	321	354	354	370	374	398
	CAUG5	314	314	320	354	364	364	370	390
	PADG15	216	232	242	248	246	252	270	262
	CAUG13	262	262	278	298	320	330	342	356
	PAG18	278	278	278	276	270	278	274	276
	Média	276,80	280,00	287,80	306,00	310,80	318,80	326,00	336,40
	DP	40,88	35,16	33,27	47,27	51,59	52,24	50,83	63,71
Diabético Treinado	CABG7	258	246	236	232	230	224	224	223
	CAUG7	270	240	242	238	234	248	244	238
	CABG8	258	234	216	190	162	164	168	148
	CAUG8	238	220	226	198	184	194	198	190
	CABG12	239	218	202	192	168	168	174	158
	Média	252,60	231,60	224,40	210,00	195,60	199,60	201,60	191,40
	DP	13,78	12,28	15,96	23,11	34,22	36,18	32,42	39,28
Diabético Sedentário	CABG6	235	240	238	220	200	210	206	190
	DMG14	266	264	248	196	188	234	210	210
	PPG14	264	260	246	236	230	242	228	218
	PAEG15	230	232	246	244	254	250	262	246
	CABG17	240	252	240	240	214	218	240	214
	Média	247,00	249,60	243,60	227,20	217,20	230,80	229,20	215,60
	DP	16,82	13,45	4,34	19,68	25,87	16,59	22,92	20,12

DP para desvio padrão.

Tabela de Glicemia

		Glicemia (mg/dL)							
		Semanas							
	Animal	0	1	2	3	4	5	6	7
Controle Treinado	PPG2	94	80	89	94	80	89	80	94
	CABG16	87	87	85	75	68	59	75	87
	CAUG16	73	73	87	60	80	58	60	73
	DMG16	65	65	76	71	81	77	71	65
	PAG16	86	86	87	58	81	66	58	86
	Média	81,00	78,20	84,80	71,60	78,00	69,80	68,80	81,00
	DP	11,73	9,26	5,12	14,43	5,61	13,14	9,52	11,73
Controle Sedentário	PPDG1	88	88	88	88	88	88	92	81
	CAUG5	78	78	78	71	82	79	72	59
	PADG15	90	97	95	99	94	94	93	99
	CAUG13	93	93	95	99	84	82	100	100
	PAG18	73	73	82	78	79	81	79	80
	Média	84,40	85,80	87,60	87,00	85,40	84,80	87,20	83,80
	DP	8,50	10,08	7,64	12,51	5,81	6,14	11,39	16,81
Diabético Treinado	CABG7	100	452	362	170	125	336	279	298
	CAUG7	89	353	296	177	112	371	242	331
	CABG8	85	314	431	379	190	337	392	179
	CAUG8	82	284	353	129	115	320	314	289
	CABG12	73	340	350	387	196	450	446	420
	Média	85,80	348,60	358,40	248,40	147,60	362,80	334,60	303,40
	DP	9,88	63,55	48,16	124,27	41,78	52,17	83,36	86,70
Diabético Sedentário	CABG6	73	209	125	374	316	507	407	423
	DMG14	81	353	466	262	391	535	335	337
	PPG14	89	240	288	273	344	457	293	329
	PAEG15	94	107	298	272	452	263	237	389
	CABG17	79	308	288	332	330	290	275	324
	Média	83,20	243,40	293,00	302,60	366,60	410,40	309,40	360,40
	DP	8,32	94,85	120,65	48,54	55,45	125,75	64,95	43,58

DP para desvio padrão.

Tabela do estudo da condução nervosa

		Velocidade Condução (m/s)							
		Semanas							
	Animal	0	1	2	3	4	5	6	7
Controle Treinado	PPDG2	32,700	40,000	37,675	42,150	42,150	49,275	44,400	43,825
	CABG16	34,800	36,400	42,900	42,600	41,600	39,050	36,400	44,400
	CAUG16	33,300	35,600	39,050	38,500	41,050	38,100	37,300	46,475
	DMG16	36,400	40,050	41,500	47,100	41,050	42,800	40,500	50,000
	PAG16	32,900	39,570	40,000	41,050	39,050	43,800	40,000	45,750
	Média	34,350	37,905	40,863	42,313	40,688	40,938	38,550	46,656
Controle Sedentário	PPDG1	27,375	31,725	34,525	41,625	39,100	44,400	43,825	45,800
	CAUG5	33,525	38,150	36,425	40,525	41,575	43,825	43,825	44,400
	PADG15	33,300	37,250	32,350	32,020	35,800	37,700	39,500	40,500
	PAG18	37,725	34,825	39,525	41,575	40,525	41,100	39,525	42,675
	CAUG13	38,100	34,400	38,500	42,600	42,100	38,500	40,000	43,250
	Média	34,005	35,270	36,265	39,669	39,820	41,105	41,335	43,325
Diabético Treinado	CABG7	35,600	-	41,600	37,200	40,100	37,300	38,600	40,500
	CAUG7	35,200	-	44,400	39,500	39,100	38,600	40,500	40,500
	CABG8	32,600	-	40,050	37,200	41,050	38,200	39,050	32,900
	CAUG8	37,200	-	43,900	40,150	45,200	39,500	43,800	44,400
	CABG12	36,000	-	37,700	39,600	37,200	37,200	38,150	37,700
	Média	35,320		41,530	38,730	40,530	38,160	40,020	39,200
Diabético Sedentário	CABG6	34,100	-	38,100	34,050	36,420	39,050	38,500	39,050
	DMG14	37,300	-	33,700	34,500	43,800	40,100	40,000	38,100
	PPG14	38,100	-	41,100	34,500	42,600	40,050	43,800	37,700
	PAEG15	35,200	-	32,650	40,000	40,000	37,700	37,600	39,600
	CABG17	38,100	-	35,250	39,500	40,000	37,200	42,600	37,300
	Média	36,175		36,388	35,763	40,705	39,225	39,975	38,613

Tabela da morfometria em microscopia de luz

	Animal	Número de microvasos (#)	Área da secção transversa (mm ²)	Densidade (#/mm ²)
Controle Treinado	6550	41	1,145	35,81
	6676	37	0,570	64,91
	6677	26	0,581	44,75
	6688	36	0,781	46,09
	6678	29	0,547	53,02
	Média	33,80	0,72	48,92
	DP	6,14	0,25	10,84
Controle Sedentário	6547	39	1,199	32,53
	6567	53	0,929	57,05
	6675	51	0,681	74,89
	6685	50	0,700	71,43
	6707	50	0,822	60,83
	Média	48,60	0,87	59,34
	DP	5,50	0,21	16,69
Diabético Treinado	6669	32	0,790	40,51
	6681	45	0,653	68,91
	6687	58	0,727	79,78
	6689	44	0,602	73,09
	6691	28	0,598	46,82
	Média	41,40	0,67	61,82
	DP	11,87	0,08	17,17
Diabético Sedentário	6665	40	0,690	57,97
	6671	42	0,718	58,50
	6679	41	0,669	61,29
	6684	33	0,576	57,29
	6708	40	0,745	53,69
	Média	39,20	0,68	57,75
	DP	3,56	0,06	2,73

DP para desvio padrão.

Tabela das mensurações ultraestruturais

Grupo/ Animal	Fotografia	Parede Vaso		Pericito	Membrana		Endotélio		Lúmen		Espessura da		Espessura da		Nº de núcleos	
		área	perímetro		área	perímetro	área	perímetro	área	perímetro	memb. basal	parede vaso	pericito	endotélio		
CS_6547	2ab_8.9kx	36,52	32,44	36,46	8,07	27,53	9,75	25,22	24,96	21,87	0,32	0,41	0	1		
	4_8.9kx	33,23	31,11	13,87	8,62	27,23	10,02	49,56	23,06	20,18	0,17	0,29	1	0		
	5abc_8.9kx	27,15	47,44	14,50	5,21	30,04	7,10	21,08	20,29	18,76	0,25	0,36	3	1		
	6abc_8.9kx	58,22	48,83	14,26	8,41	46,17	35,55	45,57	9,12	44,31	0,18	0,79	0	2		
	Médias	38,78	39,96	19,77	7,58	32,74	15,61	35,36	19,36	26,28	0,23	0,46	1,00	1,00		
CS_6567	1ab_10kx	22,36	31,31	8,68	3,50	28,43	10,18	27,72	37,49	26,63	0,13	0,37	1	1		
	3ab_8.9kx	29,93	34,96	13,10	4,61	31,47	12,22	30,75	49,07	28,92	0,15	0,41	2	1		
	4ab_8.9kx	26,96	33,53	10,92	4,18	30,84	11,86	29,74	46,35	27,60	0,14	0,41	0	1		
	5ab_8.9kx	21,04	30,51	11,47	2,23	27,86	9,57	27,18	37,02	24,45	0,08	0,37	0	1		
	Médias	25,07	32,58	11,04	3,63	29,65	10,96	28,85	42,48	26,90	0,12	0,39	0,75	1,00		
CS_6707	1ab_8.9kx	30,65	34,09	10,90	4,61	29,83	15,14	27,84	18,96	25,47	0,17	0,57	0	1		
	2ab_8.9kx	26,12	31,25	7,16	4,10	27,85	14,86	27,35	18,94	23,62	0,15	0,58	0	1		
	3abcd_8.9kx	51,72	45,24	11,28	11,37	43,78	29,68	41,51	49,23	34,99	0,27	0,78	0	2		
	5ab_8.9kx	47,38	32,66	22,30	5,98	33,75	19,10	24,51	5,97	20,14	0,24	0,86	1	2		
	Médias	38,97	35,81	12,91	6,52	33,80	19,70	30,30	23,28	26,06	0,21	0,70	0,25	1,50		
CS_6675	2ab_8.9kx	45,24	34,05	16,51	5,04	29,08	23,69	28,75	20,30	19,88	0,18	0,97	1	2		
	3_8.9kx	19,56	24,92	8,26	2,84	21,70	8,40	21,09	15,34	17,75	0,13	0,43	1	1		
	4abc_8.9kx	58,64	40,65	35,11	5,36	33,23	18,17	33,30	47,11	30,04	0,16	0,57	1	2		
	5_8.9kx	19,15	24,33	5,50	4,65	21,78	9,30	19,49	15,00	16,69	0,24	0,51	0	1		
	Médias	35,65	30,99	16,35	4,47	26,45	14,89	25,66	24,44	21,09	0,18	0,62	0,75	1,50		
CS_6685	3_8.9kx	14,90	21,72	5,49	3,03	19,39	6,38	16,95	5,38	14,96	0,18	0,40	0	1		
	4_8.9kx	19,85	22,82	9,25	2,49	18,04	8,11	16,91	1,33	12,58	0,15	0,55	1	1		
	5ab_8.9kx	23,89	25,01	8,39	3,39	22,66	12,11	21,15	6,33	17,14	0,16	0,63	1	2		
	Médias	19,55	23,18	7,71	2,97	20,03	8,87	18,34	4,35	14,89	0,16	0,53	0,67	1,33		

Grupo/ Animal	Fotografia	Parede Vaso		Pericito	Membrana		Endotélio		Lúmen		Espessura da	Espessura da	Nº de núcleos	
		área	perímetro	área	área	perímetro	área	perímetro	área	perímetro	memb. basal	parede vaso	pericito	endotélio
CT_6550	1abc_8.9kx	44,15	44,43	18,54	6,67	40,89	18,94	39,59	85,12	36,76	0,17	0,50	0	1
	3ab_8.9kx	34,66	37,24	6,42	4,39	34,71	17,96	33,59	56,57	29,84	0,13	0,57	0	2
	4abc_8.9kx	29,78	35,70	5,89	3,88	34,19	18,58	33,14	57,92	30,43	0,12	0,58	0	1
	5ab_8.9kx	31,91	40,93	11,65	5,06	38,28	15,20	37,29	74,39	33,71	0,14	0,43	0	1
	Médias	35,13	39,58	10,63	5,00	37,02	17,67	35,90	68,50	32,69	0,14	0,52	0,00	1,25
CT_6676	1ab_8.9kx	27,00	28,87	11,47	2,77	23,57	12,76	22,62	19,02	17,97	0,12	0,63	1	2
	2ab_8.9kx	21,45	28,64	8,92	3,10	24,87	9,43	24,05	15,23	20,57	0,13	0,42	0	1
	3ab_8.9kx	27,07	33,48	11,52	3,21	27,59	12,34	26,80	25,12	23,81	0,12	0,49	1	1
	4ab_8.9kx	32,91	33,54	16,96	4,27	28,36	11,68	27,28	32,76	24,92	0,16	0,45	1	2
	Médias	27,11	31,13	12,22	3,34	26,10	11,55	25,19	23,03	21,82	0,13	0,50	0,75	1,50
CT_6688	1abc_8.9kx	32,28	49,42	11,07	5,46	47,03	15,75	46,69	93,93	43,07	0,12	0,35	0	1
	2abc_8.9kx	44,30	46,90	12,70	5,38	43,75	26,22	43,53	61,49	38,10	0,12	0,64	0	2
	4ab_8.9kx	53,31	33,15	32,66	3,20	24,07	17,45	24,03	8,05	23,43	0,13	0,74	1	2
	6abc_8.9kx	23,57	39,46	6,92	4,30	38,04	12,35	37,18	74,07	37,12	0,12	0,33	0	0
	Médias	38,37	42,23	15,84	4,59	38,22	17,94	37,86	59,39	35,43	0,12	0,52	0,25	1,25
CT_6677	3ab_8.9kx	74,91	43,64	42,24	7,08	35,48	25,59	36,53	13,21	33,30	0,19	0,73	0	4
	4ab_8.9kx	86,87	47,50	52,88	8,83	40,59	25,16	40,56	6,45	34,18	0,22	0,67	1	1
	5ab_8.9kx	56,15	31,87	35,50	5,51	22,54	15,14	23,77	6,44	15,30	0,23	0,78	1	1
	Médias	72,64	41,00	43,54	7,14	32,87	21,96	33,62	8,70	27,59	0,21	0,73	0,67	2,00
CT_6678	1ab_8.9kx	47,32	31,78	26,51	4,77	25,82	16,04	26,01	10,48	18,04	0,18	0,73	1	2
	2_8.9kx	23,87	27,84	6,45	5,74	25,51	11,68	23,52	17,36	18,59	0,24	0,55	0	2
	3ab_8.9kx	30,24	28,27	6,89	5,64	27,33	17,71	28,59	8,01	21,03	0,20	0,71	0	1
	Médias	33,81	29,30	13,28	5,38	26,22	15,14	26,04	11,95	19,22	0,21	0,67	0,33	1,67

Grupo/ Animal	Fotografia	Parede Vaso		Pericito	Membrana		Endotélio		Lúmen		Espessura da	Espessura da	Nº de núcleos	
		área	perímetro	área	área	perímetro	área	perímetro	área	perímetro	memb. basal	parede vaso	pericito	endotélio
DS_6671	1_8.9kx	16,93	25,29	7,52	2,62	22,05	6,79	20,99	18,13	21,30	0,12	0,32	1	1
	2_8.9kx	17,94	26,59	6,36	3,61	34,70	7,97	22,97	15,57	20,81	0,16	0,36	0	1
	4_8.9kx	17,00	23,66	6,70	2,82	20,33	7,48	19,75	11,86	17,01	0,14	0,41	0	1
	7abc_8.9kx	36,28	35,25	12,83	4,65	31,54	18,80	30,02	32,37	25,42	0,15	0,68	1	4
	Médias	22,04	27,70	8,35	3,43	27,16	10,26	23,43	19,48	21,14	0,14	0,44	0,50	1,75
DS_6684	4abc_8.9kx	47,89	38,37	24,90	5,74	33,02	17,25	32,51	44,72	27,69	0,18	0,57	1	1
	5_8.9kx	25,57	29,81	11,60	4,80	22,29	9,17	25,02	12,09	18,46	0,19	0,42	1	1
	6ab_8.9kx	41,01	39,43	18,65	7,80	38,05	14,56	31,19	10,66	28,98	0,25	0,48	0	1
	7ab_8.9kx	52,91	32,78	36,57	5,79	26,30	10,55	22,63	5,62	19,71	0,26	0,50	1	1
	Médias	41,85	35,10	22,93	6,03	29,92	12,88	27,84	18,27	23,71	0,22	0,49	0,75	1,00
DS_6708	1ab_8.9kx	37,02	63,78	18,98	6,08	30,54	11,96	29,74	26,76	26,38	0,20	0,43	1	1
	3ab_8.9kx	42,31	30,86	19,42	4,26	25,00	18,63	25,56	11,77	16,04	0,17	0,90	1	1
	4_8.9kx	24,19	29,52	8,88	4,37	26,33	10,94	24,80	26,60	21,37	0,18	0,47	1	1
	5abcd_8.9kx	85,69	54,22	54,48	8,64	43,76	22,57	42,68	67,58	41,18	0,20	0,54	2	3
	Médias	47,30	44,60	25,44	5,84	31,41	16,03	30,70	33,18	26,24	0,19	0,58	1,25	1,50
DS_6665	1abcd_8.9kx	34,44	40,77	12,11	6,53	38,06	15,80	36,60	70,92	66,71	0,18	0,31	1	3
	3ab_8.9kx	16,75	29,88	3,94	3,92	28,80	8,89	27,98	41,10	25,59	0,14	0,33	0	1
	4ab_8.9kx	26,69	28,19	9,01	6,80	24,83	10,88	22,48	21,44	17,94	0,30	0,54	1	1
	5ab_8.9kx	41,51	33,79	19,77	5,31	28,98	16,43	27,27	33,22	23,71	0,19	0,64	1	3
	6ab_8.9kx	28,70	31,82	8,74	5,01	29,83	14,95	28,58	40,06	24,65	0,18	0,56	0	3
	Médias	29,62	32,89	10,71	5,51	30,10	13,39	28,58	41,35	31,72	0,20	0,48	0,60	2,20
DS_6679	1_8.9kx	20,12	22,52	4,57	4,14	20,74	11,41	20,14	12,73	14,80	0,21	0,65	0	2
	2_8.9kx	19,54	24,87	4,95	4,49	23,60	10,10	22,21	21,13	17,58	0,20	0,51	0	1
	3_8.9kx	18,13	23,12	4,86	4,10	21,27	9,17	19,59	16,76	16,12	0,21	0,51	0	2
	4ab_8.9kx	29,18	34,00	12,05	4,29	30,64	12,84	29,40	42,96	26,60	0,15	0,46	1	1
	5ab_8.9kx	17,76	31,68	4,87	4,40	30,30	8,49	28,60	34,68	26,47	0,15	0,31	0	1
	Médias	20,95	27,24	6,26	4,28	25,31	10,40	23,99	25,65	20,31	0,18	0,49	0,20	1,40

Grupo/ Animal	Fotografia	Parede Vaso		Pericito	Membrana		Endotélio		Lúmen		Espessura da	Espessura da	Nº de núcleos	
		área	perímetro	área	área	perímetro	área	perímetro	área	perímetro	memb. basal	parede vaso	pericito	endotélio
DT_6669	1abc_8.9kx	91,96	56,99	46,70	8,21	47,68	37,05	46,85	20,70	45,54	0,18	0,80	1	5
	2_8.9kx	31,19	28,22	17,01	4,73	22,82	9,45	22,92	7,11	19,58	0,21	0,44	1	1
	3a1b1_8.9kx	53,58	38,34	32,75	4,27	31,10	16,56	30,66	16,76	28,40	0,14	0,56	2	2
	4ab_8.9kx	38,93	34,59	28,88	3,04	22,63	7,01	23,37	9,70	17,26	0,13	0,35	1	1
	Médias	53,92	39,54	31,34	5,06	31,06	17,52	30,95	13,57	27,70	0,16	0,54	1,25	2,25
DT_6681	1abcde_8.9kx	109,23	61,26	69,54	8,72	47,60	30,97	44,53	100,21	42,73	0,20	0,71	3	4
	3abcdef_8.9kx	93,07	61,38	50,24	9,93	55,36	32,90	54,53	157,07	51,50	0,18	0,62	1	6
	4abcd_8.9kx	95,62	56,43	56,42	10,31	46,47	28,89	44,82	99,24	41,67	0,23	0,67	2	4
	Médias	99,31	59,69	58,73	9,65	49,81	30,92	47,96	118,84	45,30	0,20	0,67	2,00	4,67
DT_6687	2ab_8.9kx	63,58	34,99	31,61	5,34	24,29	26,63	25,15	4,11	24,65	0,21	1,07	1	4
	3_8.9kx	36,49	27,55	20,87	4,58	21,62	11,04	20,28	9,31	18,07	0,23	0,58	1	1
	4ab_8.9kx	33,94	26,66	16,78	3,80	19,50	13,36	18,13	6,51	10,98	0,21	0,92	1	1
	Médias	44,67	29,73	23,09	4,57	21,80	17,01	21,19	6,64	17,90	0,22	0,85	1,00	2,00
DT_6689	1_8.9kx	25,87	27,38	10,02	4,42	24,37	11,43	22,55	17,87	19,39	0,20	0,55	1	2
	2_8.9kx	16,35	29,26	5,13	3,63	25,31	7,59	23,66	17,12	22,05	0,15	0,33	0	1
	3ab_8.9kx	17,41	27,08	4,07	3,45	25,26	9,89	23,67	14,82	21,38	0,15	0,44	0	2
	5ab_8.9kx	38,39	29,75	20,30	3,25	23,69	14,84	22,86	9,96	16,68	0,14	0,75	2	4
	Médias	24,51	28,37	9,88	3,69	24,66	10,94	23,19	14,94	19,88	0,16	0,52	0,75	2,25
DT_6691	1abcd_8.9kx	35,42	41,22	17,33	5,28	39,34	12,81	36,67	70,01	34,64	0,14	0,36	2	2
	2_8.9kx	9,59	24,16	3,23	2,14	22,39	4,22	21,78	25,2	20,44	0,10	0,20	0	1
	3_8.9kx	36,59	30,55	19,87	5,58	21,92	13,04	24,28	12,31	21,07	0,23	0,58	1	1
	Médias	27,20	31,98	13,48	4,33	27,88	10,02	27,58	35,84	25,38	0,16	0,38	1,00	1,33

CT para o grupo controle treinado; CS para o grupo controle sedentário; DT para o grupo diabético treinado; e DS para o grupo diabético sedentário.

APÊNDICE B – Análises estatísticas

Análise estatística do Artigo Original 1

Para a Velocidade de Condução Nervosa (VCN):

Análise da variância:

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Modelo	13	1732,871	133,298	17,115	< 0.0001
Erro	266	2071,703	7,788		
Total corrigido	279	3804,574			

Calculado contra o modelo $Y = \text{Média}(Y)$

Análise da Soma de Quadrados do tipo I:

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Semana	6	1185,111	197,519	25,361	< 0.0001
Diabetes	1	124,156	124,156	15,941	< 0.0001
Semana*Diabetes	6	423,604	70,601	9,065	< 0.0001

Semana*Diabetes / Tukey (HSD) / Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95%:

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Semana-7*Diabetes-0 vs Semana-7*Diabetes-1	4,912	5,566	3,354	< 0.0001	Sim
Semana-5*Diabetes-0 vs Semana-5*Diabetes-1	3,814	4,321	3,354	0,001	Sim
Semana-3*Diabetes-0 vs Semana-3*Diabetes-1	3,212	3,639	3,354	0,019	Sim
Semana-0*Diabetes-1 vs Semana-0*Diabetes-0	1,960	2,221	3,354	0,614	Não
Semana-4*Diabetes-1 vs Semana-4*Diabetes-0	1,056	1,196	3,354	0,996	Não
Semana-6*Diabetes-0 vs Semana-6*Diabetes-1	0,811	0,919	3,354	1,000	Não
Semana-2*Diabetes-1 vs Semana-2*Diabetes-0	0,411	0,466	3,354	1,000	Não
Valor crítico d de Tukey:			4,743		

Para a Amplitude dos Potenciais de Ação do Nervo Sensitivo:

Análise da variância:

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Modelo	13	131306,416	10100,494	47,085	< 0.0001
Erro	266	57061,398	214,517		
Total corrigido	279	188367,814			

Calculado contra o modelo $Y = \text{Média}(Y)$

Análise da Soma de Quadrados do tipo I:

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Semana	6	114992,063	19165,344	89,342	< 0.0001
Diabetes	1	14134,332	14134,332	65,889	< 0.0001
Semana*Diabetes	6	2180,021	363,337	1,694	0,123

Semana*Diabetes / Tukey (HSD) / Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95%:

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Semana-7*Diabetes-1 vs Semana-7*Diabetes-0	25,259	5,514	3,354	< 0.0001	Sim
Semana-4*Diabetes-1 vs Semana-4*Diabetes-0	19,205	4,147	3,354	0,003	Sim
Semana-5*Diabetes-1 vs Semana-5*Diabetes-0	17,431	3,763	3,354	0,012	Sim
Semana-3*Diabetes-1 vs Semana-3*Diabetes-0	13,815	2,983	3,354	0,144	Não
Semana-6*Diabetes-1 vs Semana-6*Diabetes-0	12,120	2,617	3,354	0,329	Não
Semana-2*Diabetes-1 vs Semana-2*Diabetes-0	11,935	2,577	3,354	0,355	Não
Semana-0*Diabetes-1 vs Semana-0*Diabetes-0	3,344	0,722	3,354	1,000	Não
Valor crítico d de Tukey:			4,743		

Análise estatística do Artigo Original 2

Oneway**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significante
Numero	Between Groups	241,733	2	120,867	1,973	,182
	Within Groups	735,200	12	61,267		
	Total	976,933	14			
Area	Between Groups	,120	2	,060	3,220	,076
	Within Groups	,223	12	,019		
	Total	,343	14			
Densidade	Between Groups	42,136	2	21,068	,109	,898
	Within Groups	2323,007	12	193,584		
	Total	2365,143	14			
Peso	Between Groups	57068,933	2	28534,467	14,100	,001
	Within Groups	24284,800	12	2023,733		
	Total	81353,733	14			
Glicose	Between Groups	244238,933	2	122119,467	66,720	,000
	Within Groups	21964,000	12	1830,333		
	Total	266202,933	14			
Velocidade	Between Groups	51,847	2	25,924	3,103	,082
	Within Groups	100,240	12	8,353		
	Total	152,087	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Numero	CS	DT	7,20000	4,95042	,346	-6,0070	20,4070
		DS	9,40000	4,95042	,181	-3,8070	22,6070
	DT	CS	-7,20000	4,95042	,346	-20,4070	6,0070
		DS	2,20000	4,95042	,898	-11,0070	15,4070
	DS	CS	-9,40000	4,95042	,181	-22,6070	3,8070
		DT	-2,20000	4,95042	,898	-15,4070	11,0070
Area	CS	DT	,19220	,08621	,106	-,0378	,4222
		DS	,18660	,08621	,118	-,0434	,4166
	DT	CS	-,19220	,08621	,106	-,4222	,0378
		DS	-,00560	,08621	,998	-,2356	,2244
	DS	CS	-,18660	,08621	,118	-,4166	,0434
		DT	,00560	,08621	,998	-,2244	,2356
Densidade	CS	DT	-2,47600	8,79963	,957	-25,9522	21,0002
		DS	1,59800	8,79963	,982	-21,8782	25,0742
	DT	CS	2,47600	8,79963	,957	-21,0002	25,9522
		DS	4,07400	8,79963	,890	-19,4022	27,5502
	DS	CS	-1,59800	8,79963	,982	-25,0742	21,8782
		DT	-4,07400	8,79963	,890	-27,5502	19,4022
Peso	CS	DT	140,60000*	28,45160	,001	64,6950	216,5050
		DS	118,20000*	28,45160	,004	42,2950	194,1050
	DT	CS	-140,60000*	28,45160	,001	-216,5050	-64,6950
		DS	-22,40000	28,45160	,718	-98,3050	53,5050
	DS	CS	-118,20000*	28,45160	,004	-194,1050	-42,2950
		DT	22,40000	28,45160	,718	-53,5050	98,3050
Glicose	CS	DT	-263,20000*	27,05796	,000	-335,3870	-191,0130
		DS	-277,60000*	27,05796	,000	-349,7870	-205,4130
	DT	CS	263,20000*	27,05796	,000	191,0130	335,3870
		DS	-14,40000	27,05796	,857	-86,5870	57,7870
	DS	CS	277,60000*	27,05796	,000	205,4130	349,7870
		DT	14,40000	27,05796	,857	-57,7870	86,5870
Velocidade	CS	DT	3,47600	1,82793	,181	-1,4007	8,3527
		DS	4,28600	1,82793	,087	-,5907	9,1627
	DT	CS	-3,47600	1,82793	,181	-8,3527	1,4007
		DS	,81000	1,82793	,898	-4,0667	5,6867
	DS	CS	-4,28600	1,82793	,087	-9,1627	,5907
		DT	-,81000	1,82793	,898	-5,6867	4,0667

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Análise estatística do Artigo Original 3

Para a variável Peso:

Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	3	60590,950	20196,983	8,668	0,001
Error	16	37281,600	2330,100		
Corrected Total	19	97872,550			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

Type I Sum of Squares analysis:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
S	1	42966,450	42966,450	18,440	0,001
E	1	13676,450	13676,450	5,869	0,028
S*E	1	3948,050	3948,050	1,694	0,211

Para a variável Glicemia:

Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	3	319393,350	106464,450	43,295	< 0.0001
Error	16	39345,200	2459,075		
Corrected Total	19	358738,550			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

Type I Sum of Squares analysis:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
S	1	311251,250	311251,250	126,572	< 0.0001
E	1	4470,050	4470,050	1,818	0,196
S*E	1	3672,050	3672,050	1,493	0,239

Para a variável VCN:

Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	3	196,892	65,631	9,113	0,001
Error	16	115,228	7,202		
Corrected Total	19	312,120			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

Type I Sum of Squares analysis:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
S	1	175,973	175,973	24,435	0,000
E	1	16,335	16,335	2,268	0,152
S*E	1	4,584	4,584	0,637	0,437

Para a variável Área:

Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	19	16288,838	857,307	3,172	0,000
Error	80	21618,934	270,237		
Corrected Total	99	37907,772			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

Type I Sum of Squares analysis:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
R	4	13580,949	3395,237	12,564	< 0.0001
S	1	113,548	113,548	0,420	0,519
E	1	1624,220	1624,220	6,010	0,016
R*S	4	109,381	27,345	0,101	0,982
R*E	4	680,128	170,032	0,629	0,643
S*E	1	110,424	110,424	0,409	0,524
R*S*E	4	70,188	17,547	0,065	0,992

S / Tukey (HSD) / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
D vs C	2,131	0,648	1,990	0,519	No
Tukey's d critical value:			2,814		

Category	Mean	Groups
D	22,505	A
C	20,374	A

E / Tukey (HSD) / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
T vs S	8,060	2,452	1,990	0,016	Yes
Tukey's d critical value:			2,814		

Category	Mean	Groups
T	25,470	A
S	17,410	B

Para a variável Espessura:

Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	7	1,409	0,201	25,242	< 0.0001
Error	32	0,255	0,008		
Corrected Total	39	1,664			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

Type I Sum of Squares analysis:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
R	1	1,367	1,367	171,417	< 0.0001
S	1	0,000	0,000	0,055	0,816
E	1	0,010	0,010	1,225	0,277
R*S	1	0,004	0,004	0,548	0,465
R*E	1	0,022	0,022	2,738	0,108

S*E	1	0,003	0,003	0,403	0,530
R*S*E	1	0,002	0,002	0,305	0,584

Para a variável Número de Núcleos do Pericito:

Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	3	1,797	0,599	5,296	0,010
Error	16	1,810	0,113		
Corrected Total	19	3,607			

Computed against model Y=Mean(Y)

Type I Sum of Squares analysis:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Diabete	1	0,572	0,572	5,060	0,039
Treinamento	1	0,159	0,159	1,406	0,253
Diabete*Treinamento	1	1,066	1,066	9,422	0,007

Diabete / Tukey (HSD) / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
D vs C	0,338	2,249	2,120	0,039	Yes

Tukey's d critical value: 2,998

Category	Mean	Groups
D	0,880	A
C	0,542	B

Treinamento / Tukey (HSD) / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
T vs S	0,178	1,186	2,120	0,253	No

Tukey's d critical value: 2,998

Category	Mean	Groups
T	0,800	A
S	0,622	A

Diabete*Treinamento / Tukey (HSD) / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
Diabetico Treinado vs Controle Treinado	0,800	3,761	2,861	0,008	Yes
Diabetico Treinado vs Diabetico Sedentario	0,640	3,009	2,861	0,038	Yes
Diabetico Treinado vs Controle Sedentário	0,517	2,429	2,861	0,111	No
Controle Sedentário vs Controle Treinado	0,283	1,332	2,861	0,557	No
Controle Treinado vs Diabetico Sedentário	0,123	0,580	2,861	0,937	No
Diabetico Sedentário vs Controle Treinado	0,160	0,752	2,861	0,874	No
Tukey's d critical value:			4,046		

Para a variável Número de Núcleos do Endotélio:

Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	3	4,541	1,514	2,975	0,063
Error	16	8,141	0,509		
Corrected Total	19	12,682			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

Type I Sum of Squares analysis:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Diabete	1	1,711	1,711	3,363	0,085
Treinamento	1	2,102	2,102	4,130	0,059
Diabete*Treinamento	1	0,728	0,728	1,431	0,249

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 17 de setembro de 2008

Ofício nº 59/08

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

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

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

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

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

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen

Prof^a. Maria Teresa Jansen
Presidente da CEEA

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;

Animais: Ratos Wistar ; Machos ; com 60 dias de vida; Número de animais previsto no protocolo: 40

ANEXO B – Documentação de encaminhamento dos artigos aos periódicos

Envio do artigo original 1 para publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira

Artigo para publicação

De:  **Celina Cordeiro** (celinacordeiro@hotmail.com)
Enviada: terça-feira, 19 de janeiro de 2010 18:35:44
Para: sgolden@terra.com.br
 2 anexos | [Baixar todos os anexos](#) (570,0 KB)
[Sensory n...doc](#) (392,5 KB), [Carta de ...doc](#) (177,5 KB)
Prof Saul Goldenberg,

Segue artigo original intitulado "**Sensory nerve conduction in the caudal nerves of rats with diabetes**" para publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira.

Att,
Celina Cordeiro

Envio do artigo de Revisão Sistemática para publicação na Revista Diabetes Research and Clinical Practice

Submission Confirmation

De:  ees.diab.0.69a6e.45da591f@eesmail.elsevier.com em nome de **Diabetes Research and Clinical Practice** (DIAB@elsevier.com)

 Você pode não conhecer este remetente. [Marcar como confiável](#) | [Marcar como lixo](#)

Enviada: segunda-feira, 25 de janeiro de 2010 5:05:29

Para: celinacordeiro@hotmail.com

Dear Sra Carvalho,

Your submission entitled "STRUCTURAL ALTERATIONS ON ENDONEURAL MICROVESSELS CAUSED BY DIABETES-INDUCED NEUROPATHY IN EXPERIMENTAL ANIMALS: A systemic revision." has been received by Diabetes Research and Clinical Practice

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/diab/>.

Your username is: celinacordeiro

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

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

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Diabetes Research and Clinical Practice

ANEXO C – Normas utilizadas para publicação dos artigos aos periódicos

Norma utilizada para a confecção do artigo de Revisão sistemática.

Diabetes Research and Clinical Practice

Formato do manuscrito

Estilo. Manchetes e subheadlines devem ser utilizados livremente na Métodos, Resultados e Discussão. Use parágrafos curtos sempre que possível. Clareza de expressão, sintaxe bem e evitar o jargão é apreciada pelos editores e leitores. Abreviaturas devem ser explicados no texto.

O **Título da página** deve incluir os nomes dos autores, o maior ganho graus, endereços acadêmica, endereço para correspondência, e apoio financeiro. Autoria deve ser assumida apenas por aqueles trabalhadores que contribuíram significativamente para o trabalho eo seu relatório. Colegas que de outra forma assistida ou colaborou deve ser reconhecido no **Agradecimento** seção, como deve fontes de financiamento. O título deve ser informativo e conciso. Evitar o uso de palavras estranhas como "estudo", "investigação", etc Se os dados do manuscrito foram apresentadas em uma reunião, lista o nome completo, data e local da reunião e qualquer referência resumos publicados anteriormente na bibliografia.

O **Abstract**, De não mais de 200 palavras, deve ser escrito com um cuidado especial, pois será a única parte do artigo, estudada por alguns leitores. No estado, primeira frase, o que foi feito. Especiais características técnicas dos métodos devem ser anotados. Os resultados devem ser resumidos, e os dados mais importantes e apoiar correlações estatísticas devem ser incluídos. Na frase final, os autores devem enfatizar a importância que atribuem às suas observações. **Palavras-chave** devem ser fornecidos no manuscrito; normalmente 3-5 itens devem ser incluídos.

O **Introdução** deve ser breve e definir as finalidades para as quais o estudo foi realizado.

O **Materiais e Métodos** deve ser suficientemente detalhado para que os leitores e comentadores podem entender exatamente o que foi feito sem estudar as referências

diretamente. A descrição pode ser abreviado quando bem aceite técnicas são utilizadas.

O **Resultados** devem ser apresentados de forma precisa e concisa. Manter a discussão da sua importância para um mínimo nesta seção do manuscrito.

O **Discussões** devem estar ligadas diretamente ao estudo que está sendo relatado com conclusões claras e uma perspectiva sobre a investigação futura possível. Não inclua uma revisão geral do tópico.

Referências. O autor (s) é / são os responsáveis pela exatidão e integridade das referências, o que deve ser identificado no texto por números arábicos entre colchetes na ordem de primeira citação (ou seja, [1,2]) e listadas em ordem numérica no final do texto. As referências devem incluir autor (es) Sobrenome (s), seguido pelas iniciais (lista todos se seis ou menos autores, ou os seis primeiros autores seguidos por *et al.* se sete ou mais), título do artigo, título da revista abreviado de acordo com o Index Medicus, ano de publicação entre parênteses, o volume (suplemento e, se necessário) e primeira e última páginas. Referências a livros devem incluir autor (es) Sobrenome (s), seguido pelas iniciais, título do capítulo, editor (es) Sobrenome (s) e iniciais, título do livro, editora, local de publicação, ano da publicação e, em primeiro e no último número da página. «Os artigos na imprensa" pode ser incluída na lista de referência, mas apresentou trabalho em consideração em um editor deve ser citado no texto como "X Autor, dados não publicados '. Projecto de análises podem ser referidos no texto principal como 'X Autor, comunicação pessoal '.

Jornal Exemplo de Referência

Lu P, Liu F, Yan L, Peng T, T Liu, Yao Z et al. Terapia com células estaminais para a diabetes tipo 1. Diabetes Res. Clin. Pract. 2007; 78:1-7.

Exemplo de livro de referência

1. Drury P, Gatling W. Diabetes: suas perguntas respondidas. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2005.

Figuras deve ser adequado para a reprodução de alta qualidade. Incrições devem ser completos, com qualidade profissional, e de um tamanho adequado ao da ilustração ou de desenho, com a redução no tamanho necessário ter em conta. Se, juntamente com o seu artigo

aceito, você apresentar valores utilizáveis cor, Elsevier irá assegurar que estes números aparecem livre de encargos em cores na versão eletrônica de seu artigo aceito, independentemente de haver ou não estas ilustrações são reproduzidas em cor na versão impressa. Ilustrações a cores só podem ser incluídas na impressão, se o custo adicional de reprodução é realizada pela autora: você receberá informações sobre os custos da Elsevier, após a recepção do seu artigo aceito. Por favor, vá para <http://ees.elsevier.com/diab> e clique sobre as diretrizes artísticas.

Arquivos Complementar o autor oferecer possibilidades adicionais para publicar os pedidos de apoio, filmes, seqüências de animação, imagens de alta resolução, conjuntos de dados de fundo, clips de som e muito mais. Complementar arquivos fornecidos serão publicados em linha junto com a versão eletrônica do seu artigo em produtos web Elsevier, incluindo ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. A fim de garantir que o material apresentado está diretamente utilizáveis, certifique-se que os dados são fornecidos em um dos formatos de arquivos recomendado. Os autores devem apresentar o material em formato electrónico, juntamente com o artigo e fornecer uma legenda conciso e descritivo de cada arquivo.

Tabelas devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, e conter apenas as linhas horizontais. Fornecer um breve título descritivo e uma explicação sobre cada tabela com as notas de rodapé embaixo.

O **Linguagem** da revista é o Inglês. A pedido, Elsevier vai direto autores a um agente que pode controlar e melhorar o Inglês do seu papel (antes da apresentação). Entre em contato com authorsupport@elsevier.com para mais informações.

Norma utilizada para a confecção do artigo Original 1.

ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

Preparação do artigo

Página Inicial

Título do artigo

O título do artigo deve ser em Inglês e Português, conciso mas informativo. Inserir o número um (algarismo arábico), sobrescrito que indicará no rodapé o local da realização da pesquisa. O nome completo de todos os autores com os números subsequentes sobrescritos (algarismo romano) que indicarão no rodapé a categoria acadêmica (cargo universitário) mais elevado de cada um, com o nome do departamento e da instituição. Observar os títulos acadêmicos no idioma inglês (Consultar Acta Cir Bras. 2006;21(2):60 MarAbr. **Academic degrees examples**). Verificar exemplos nas edições recentes da revista.

O abstract e o resumo não devem exceder 200 palavras e devem ser apresentados de forma estruturada:

ABSTRACT

Purpose: The main aim of the study or investigation. **Methods:** Selection of subjects (patients or experimental animals) and basic procedures. **Results:** Main findings (giving specific data and their statistical significance). **Conclusion:** State the main answer concerning the purpose of the study.

Key words: should be provided based on Medical Subject Headings - Mesh

(<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Segue o **Resumo** no idioma português:

Objetivo: A proposição da pesquisa ou investigação. **Métodos:** Caracterização da amostra, na qualidade e na quantidade e os procedimentos. **Resultados:** Principais dados e sua significância estatística. **Conclusão:** É a resposta concisa, clara e precisa do objetivo.

Descritores: Baseados nos Descritores de Ciências da Saúde (DeCS) - <http://www.bireme.br>

Estrutura do artigo:

Introdução

Deve claramente apresentar o assunto e o objetivo do estudo e oferecer somente citações pertinentes, sem fazer revisão extensa do assunto. Autores devem ser apresentados em letras minúsculas ou simplesmente citados por números sobrescritos, sem o ano do artigo. No idioma português se aceita "e col." e em inglês "*et al.*"

Métodos

Deve apresentar a amostragem (quantidade e qualidade) e os procedimentos em pormenores suficientes que permitam a outros pesquisadores reproduzirem os resultados.

Oferecer referências para os procedimentos estatísticos. As normas de apresentação tabular conforme recomendações do Conselho Nacional de Estatística (Rev Bras Est. 1963; 24:42-60).

Ética

A investigação em seres humanos e em animais deve ser submetida ao Comitê de Ética da Instituição (enviar declaração assinada que aprova a pesquisa) e da Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2000 [*World Medical Association* (www.wma.net/e/policy/b3.htm) e da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm)].

Obrigação do registro de ensaios clínicos estabelecidos pela OMS, identificado pelo número do registro, no final do resumo. [CONSORT - *Consolidated Standards of Reporting Trials* (www.consort-statement.org) and *International Clinical Trials Registry Platform* (ICTRP)].

Revisões sistemáticas e metanálises enfocando temas cirúrgicos de interesse atual serão consideradas para publicação. Todas as metanálises de ensaios randomizados deverão atender os princípios do QUORUM (Lancet 1999;354:1896-1900) e o manuscrito submetido deverá conter o fluxograma detalhado da revisão sistemática.

A investigação em animais deve ser submetida à Comissão de  tica no Uso de Animais (CEUA) cumprindo a Lei Federal n  11.794, de 8 de outubro de 2008, http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm e o Decreto n  6.689, de 15 de julho de 2009 que regulamentada a Lei no 11.794, disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm.

Seguir o *CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences) ethical code for animal experimentation (WHO Chronicle 1985; 39(2):51-6)* e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA. (www.cobea.org.br).

O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumprem rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa, seja em humanos seja em animais.

.Identificar precisamente todas as drogas e substâncias químicas usadas, incluindo os nomes genéricos, dosagens e formas de administração. Não usar nomes comerciais ou de empresas. Não usar os nomes dos pacientes, iniciais ou registros de hospitais.

Resultados

Apresentar em sequência lógica no texto, usando tabelas, quadros e figuras (fotos e gráficos, **que devem ser de boa qualidade**). Não repetir no texto todos os dados constantes das tabelas e/ou figuras. No texto, enfatizar as observações importantes. Incluir os dados de significância estatística. As tabelas devem ser numeradas consecutivamente (algarismos arábicos) e apresentar um título breve, **colocado acima**. Utilizar abreviaturas aprovadas e padronizadas. As abreviaturas não padronizadas devem ser explicadas em notas de rodapé. As figuras também devem ser numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. As legendas devem aparecer **abaixo da figura**.

Discussão

Comparar os métodos e resultados com os anteriormente publicados.

Enfatizar novos e importantes aspectos do estudo. **NÃO REPETIR RESULTADOS.**

Conclusão

Deve ser clara e concisa e responder aos objetivos do estudo.

EVITAR AFIRMAÇÕES NÃO BASEADAS EM DADOS.

Referências

A Revista cumpre as normas de *Vancouver: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals do International Committee of Medical Journal Editors*

(www.icmje.org). Versão outubro de 2007.

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *Index Medicus* (abbreviations of journal titles) e pelo *National Library of Medicine's Citing Medicine*.

.As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto, com respectivo número sobrescrito.

Os nomes de todos os autores devem ser citados nas referências (e col/et al não são aceitos). Não são aceitas referências a resumos, comunicação pessoal ou qualquer outra comunicação não publicada. O artigo deve ter no máximo 20 referências, exceto no caso de artigos de revisão que podem apresentar 30 referências. Evitar citações de livros texto e teses, que não estão indexadas.

ATENÇÃO

- Não se repetem a dezena, centena, milhar da página final do artigo.

Exemplos de referências

Artigo de revista

Listar todos os autores

Goldenberg A, Romeo ACDCB, Moreira MB, Apodaca FR, Linhares MM, Matone J. Acta Cir Bras. 2007 Sept;22(5):366-71.

Livro, Capítulo de livro, Tese Não são aceitos

Agradecimentos

Reconhecer aqueles que contribuíram para o trabalho, mas sem possuírem as características de autores.

Declarar:

Conflito de interesse:
Fonte de financiamento:

Correspondência

Nome completo do autor principal
Endereço completo
Telefones
e-mail

Norma utilizada para a confecção do artigo Original 2.



Journal of Exercise Physiology**online**
(JEP**online**)

Manuscrito Formatação

Os autores devem submeter seus manuscritos, pré-formatada para **PEConline** requisitos. Os autores devem baixar o manuscrito modelo apropriado (ou pesquisa original manuscrito ou revisão, e adicionar o seu conteúdo para este documento. Ambos os documentos são formatados modelo utilizando o software Microsoft Word. Por favor, anote os recursos de formatação do modelo do documento (como o caso de letra, ponto fonte, cor, etc.) Um resumo conciso de características manuscrito segue.

Pesquisa Manuscritos

Todos espaçamento simples em Fonte Arial.

Título, Capitalizados, 14 point font, Vermelho

RESUMO maiúsculas

Title = 12 font, preto, em letras maiúsculas; Autores = 12 font, preto, negro. Caso de título; **PEConline** ano, volume (número): página a página. Resumo de texto em fonte 12 para trás.

Palavras-chave: Título processo e usar até 5 palavras não no título, separados por vírgulas e um Espaço

INTRODUÇÃO maiúsculas, fonte 12 em negrito. O texto é Arial 12, preta.

MÉTODOS maiúsculas, fonte 12 em negrito. Texto é de 12 letras pretas.

RESULTADOS maiúsculas, fonte 12 em negrito. O texto é Arial 12, preta.

DISCUSSÃO maiúsculas, fonte 12 em negrito. Texto é de 12 letras pretas.

CONCLUSÕES maiúsculas, fonte 12 em negrito. O texto é 12, fonte preta.

AGRADECIMENTOS maiúsculas, fonte 12 em negrito. O texto é Arial 12, preta.

Endereço para correspondência: endereço nome, endereço, telefone: (...) ... -; FAX: (...) ... E-mail -;: abcdef@ghijk.lmn

REFERÊNCIAS maiúsculas

Lista de referências na ordem de citação no manuscrito. Identificar todos os autores. Não tem uma linha de espaço entre as referências sucessivas. Recuo da seguinte forma.

1. Um Autor, Autor B, C Autor, Autor D. título completo do manuscrito. Abbreviated Journal Title. Ano, volume (número): página a página.
2. Um Autor, Autor B, C Autor, Autor D. título completo do manuscrito. Abbreviated Journal Title. Ano, volume (número): página a página.
3. Um Autor, Autor B, C Autor, Autor D. título completo do manuscrito. Abbreviated Journal Title. Ano, volume (número): página a página.
4. Um Autor, Autor B, C Autor, Autor D. título completo do manuscrito. Abbreviated Journal Title. Ano, volume (número): página a página.

Lista de referências em ordem de citação usando o número de referência entre parênteses, dentro da sentença. Por exemplo; "Nossos resultados são apoiados por estudos similares realizados com modelos animais e humanos (1,2,3)." Consulte os estilos de referência.

Artigo padrão

Vandewalle H. teste de potência crítica para o exercício de rampa. *Eur J Appl Physiol* 1995; 71:285-6.

Kachour M, Vandewalle H, Billat V, Huet M, THOMAIDIS M, Jousselin E et al. Velocidade crítica de contínuo e intermitente executando exercícios - um exemplo dos limites do conceito de potência crítica. *Eur J Appl Physiol* 1996:73:484-7.

Livros

Robergs R, Roberts S. **Aplicações Exercise Physiology: Exercise, Performance, and Clinical**. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1997.

Capítulo de Livro

Silva JM. Fatores relacionados à aquisição e expressão do comportamento agressivo do esporte. In: Silva JM, Weinberg RS, editores. **Fundamentos psicológicos do esporte**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1984:261-73.

Como citar informações da World Wide Web

Consulte a <http://www.apa.org/journals/webref.html> URL

Tabelas

Utilize o recurso de tabela do Word. Selecione **Mesa** do cabeçalho, em seguida, **Inserir**, Então **MesaE**, em seguida, selecione as linhas e números de coluna. Realce a tabela já inserida no texto e selecione **Mesa, Tabela Auto FormatE**, em seguida opção pré-formatado **Colorido 2**.

Utilização média $\pm$ SD dados para todas as tabelas. Use o símbolo de $\pm$ (selecione **Inserir, Símbolo**, Certifique-se a fonte é **SímboloE**, em seguida, clique duas vezes no $\pm$ símbolo). **Não utilize** sublinhou um sinal de + ($\pm$).

Todo o conteúdo da tabela, incluindo a legenda da tabela deve ser de 10 fontes.

Tabela 1. Os dados descritivos dos sujeitos.

Condições	A	B	C
<i>Medida 1 (unidades)</i>	Significar $\pm$ SD	Significar $\pm$ SD *	Significar $\pm$ SD $^{\wedge}$ *
<i>Medida 2 (unidades)</i>	Significar $\pm$ SD	Significar $\pm$ SD	Significar $\pm$ SD $^{\wedge}$ *
<i>Medida 3 (unidades)</i>	Significar $\pm$ SD	Significar $\pm$ SD	Significar $\pm$ SD $^{\wedge}$ *

*= significativamente diferente da Condição A; $^{\wedge}$ = significativamente diferente da Condição B

Coloque explicações adicionais tabela aqui em 10 de letra.

Use símbolos para representar os resultados significado - *, $^{\wedge}$, #, ~, bem como qualquer você decide as seleções de fonte de símbolos.

Figuras

PEConline publica na cor, então use cores para ajudar a melhorar a clareza dos números. No entanto, não o excesso de cores, utilize apenas porque você pode usá-lo. Os números são melhores em um fundo branco, preto com machados e rótulos do eixo, com a cor usada para identificar o símbolo do grupo e / ou diferenças de linha em gráficos de linha, e condição bar / diferenças entre os grupos em gráficos de barra. Use uma legenda do gráfico para explicar todos os símbolos e / ou diferenças de cor.

Norma utilizada para a confecção do artigo Original 3.

Microvascular Research

Preparação de Manuscritos

Os manuscritos devem ser em espaço duplo. As páginas devem ser numeradas e organizadas como segue:

O título da página (pág. 1) deve conter o título do artigo, nomes dos autores e afiliações completo, notas de rodapé ao título, eo endereço para correspondência do manuscrito (incluindo endereço de e-mail e números de telefone e fax). O título do trabalho deve ser breve, não mais do que 100 caracteres de comprimento, e deve captar e transmitir a mensagem-chave de sua pesquisa para um público mais amplo. Para ajudar a isto, as abreviações, a não ser familiar a um público amplo, deve ser evitada.

O Abstract (p. 2) deve ser um único número que resume as principais conclusões do papel em menos de 225 palavras. Depois que a lista um resumo de até 10 palavras-chave que serão úteis para a indexação ou pesquisa devem ser incluídos.

A Introdução deve ser o mais conciso possível, sem subtítulos.

Materiais e métodos deve ser suficientemente detalhada para permitir que as experiências possam ser reproduzidas.

Resultados e Discussões podem ser organizados em subtítulos.

Agradecimentos deve ser breve e deve preceder as referências bibliográficas.

Referências deve ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor. As referências devem ser citadas no texto pelo nome e data. Citação dos trabalhos com três ou mais autores com o sobrenome do primeiro autor e de "et al." Usar a edição mais recente do *Chemical Abstracts Service Source Index* para abreviações de títulos de periódicos.

Holleran, EA, Karki, S., Holzbaur, ELF, 1998. O papel do complexo Dynactin na mobilidade intracelular. In: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cytology*. Academic Press, San Diego, vol. 182, pp. 69-109.

Patel, S., Pittman, R.N., 2002. Impacto do microscópio abertura numérica em medições microspectrophotometric de hemoglobina em microvasos. *Microvasc. Res.* 64, 198-206.

Tsuchida, E. (Ed.), 1998. *Substitutos do sangue - Presente e Perspectivas Futuras*. Elsevier, Amsterdam.

Apenas artigos que foram publicados ou estão no prelo devem ser incluídos nas referências. Resultados não publicados ou comunicações pessoais devem ser citados como tal no texto.

Figuras. Números Número consecutivamente com algarismos arábicos. Consulte a ➡

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions> de diretrizes para a elaboração de arquivos arte eletrônica.

Valores de cor

Se, juntamente com o seu artigo aceito, você apresentar utilizável figuras a cores, em seguida, Elsevier garantirá, sem qualquer custo adicional, que estes números aparecem a cores na Web (eg, ScienceDirect e outros locais), independentemente de estas ilustrações são reproduzidas em cor na versão impressa. Para reprodução de cores na impressão, você receberá informações sobre os custos da Elsevier, após a recepção do seu artigo aceito. Para mais informações sobre a preparação da obra de arte eletrônica, consulte 

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions> [Nota: Devido a complicações técnicas que podem surgir na conversão de valores de cor para "escala cinzenta" (para a versão impressa que você não deve optar por cores na impressão), envie para além utilizável preto-e-branco arquivos correspondentes a todos os ilustrações a cores].

Os autores devem observar que um pedido de reversão de cores para colorir apenas a publicação eletrônica na fase de editoração e correção de prova, vai exigir acordo editorial independente, com uma eventual revisão, se necessário, e podem atrasar significativamente a publicação de seu manuscrito.

Tabelas devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem de aparição no texto. Tipo de cada tabela em espaço duplo em uma página separada com um título breve e descritivo digitado diretamente acima e abaixo com notas essenciais.

ANEXO D – Produção científica advinda do mesmo projeto

ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

**Title: CAN AEROBIC ACTIVITY CAUSE PERIPHERAL NEUROPATHY ON
EXPERIMENTED ANIMALS? A SYSTEMATIC REVIEW**

**Authors: Juliana N. Maia^{a*}; Kamilla D. S. Lira^b; Celina C. Carvalho^a; Otávio G. Lins^c,
Sílvia R. A. Moraes^d**

^a Post-Graduation Program in Neuropsychiatry and Behavioural Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil;

^b Department of Physiotherapy, Federal University of Pernambuco, Brazil;

^c Department of Neuropsychiatry, Federal University of Pernambuco, Brazil;

^d Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Brazil;

Corresponding Author:

Juliana Netto Maia

Mailing Address: Avenida Rosa e Silva, 1205 / 302, 52050-020. Recife, Pernambuco, Brazil

Telephone: 55-81-99999995

E-mail: juliananettomaia@hotmail.com

ABSTRACT

This study aimed to conduct a systematic review on the interference of aerobic exercise in the installation of peripheral neuropathy in rats with experimental diabetes. We include articles that presented randomized assays according to the criteria of inclusion and exclusion. The search was performed from research in LILACS, SciELO, MEDLINE, PubMed databases and Cochrane Library, by two independent reviewers. We selected 773 articles, published between 1976 and 2009 that addressed the question of the parameters investigated in our study. Amongst them, only two articles had been enclosed in the research. The first presents omissions of some methodological procedures and reports that there were no differences between the electrophysiological values (speed of nervous conduction and amplitude of action potential) between the trained diabetic groups and untrained, although both demonstrate inferior values than the control groups of animals. The second one, with fairly detailed methodology, describes that the physical activity played a protective function in the installation of peripheral diabetic neuropathy, using as data, analysis of electrophysiological parameters and thickness of the myelin sheath. By the scarcity of studies in the area, we concluded that it does not have sufficient studies to clarify which function of that the physical exercise can make in the installation of peripheral diabetic neuropathy in rats with experimental diabetes.

1. Introduction

Studies requiring experimentation on animals have always been a great alternative in scientific researches seeking more answers regarding pathologies evolution and the reaction of a specific treatment. Studies on experimented animals with type 1 Diabetes gotten through pills that destroy pancreas β cells were able to reproduce both micro and macrovascular changes that happen over time in patients with diabetes (Prabhakar, Starnes, Shi, Lonis, & Tran, 2007; Arora, Kumar, Kaundal, & Sharma, 2008; Morrison et al, 2008).

Diabetes is characterized by high glucose indices in blood following a lack, or even an absence of insulin (Fregonesi, Faria, Molinari, & Neto, 2004). This glucose accumulation causes several complications such as neuropathies (autonomic and peripheral) (Prabhakar, Starnes, Shi, Lonis, & Tran, 2007; Arora, Kumar, Kaundal, & Sharma, 2008; Morrison et al, 2008; Cherian, Roy, Pinheiro & Roy, 2009). Peripheral neuropathy is defined as a heterogeneous group of disturbances in which one, or all peripheral nervous system elements are damaged, thus affecting the myelin, the axon, or both, mainly (White, Pritchard, & Turner-Sotokes, 2008). Because of its varied cause, studies on its etiopathogeny face numerous ethical resistances on human studies (Gagliard, 2003).

Physical activity is one of the best therapeutic forms to lower glycemic indices. In general, it significantly increases the body's energy need, while making some mild changes both in cellular metabolism and in neuroendocrine control (Kemmer & Berger, 1983). Blood glucoses reduction, during physical activity, it is believed, might be due to the decrease in hepatitis blood glucoses production, when considering a normal increase in the glucoses muscle usage (Minuk et al, 1981). Physical activity's effect on insulin sensibility has been demonstrated between 12-48 hours after exercise, and back to pre-activity levels in three to five days after last exercise (Eriksson, Taimela, & Koivisto, 1997).

These gains seem to happen both in aerobics and in resistance exercises (Ciolac & Guimarães, 2002).

Studies using activities or physical activities in humans with diabetic neuropathy show a series of variables the investigator cannot fully control causing possible bias during research. Thus, this study's objective was systematically to review literature and assess those studies that have used physical exercise in animals infused with experimental diabetes.

2. Methodology

For that revision to take place between March-April 2009, published articles were selected from indexed periodicals in databases such as LILACS, SciELO, PubMed/MEDLINE and Cochrane published between 1976-2009.

Keywords used were based on MeSH list, and the following terms selected: neural conduction, diabetic neuropathies, exercise, diabetes Mellitus/chemically induced, ranvier's nodes, nerve fibers/myelinated. Selected terms for the DeCS' list were: streptozotocin induced diabetes, aerobic exercise, diabetic neuropathies, nerve conduction, peripheral nerves. Keywords from the topic were also selected during research: diabetes, neuropathy, exercise, velocity, conduction, nerves. It is only in pubmed there was a limit to the topic regarding studies with animals. All these combinations were used in all databases. References from selected articles were checked to identify other studies that could have been omitted during electronic search, also.

The title and abstracts identified during researches were independently examined by two investigators (JNM, KDSL, CCC), on computer screen to select possible relevant studies. A third investigator (SRAM), if present, would solve any existing disagreements.

The following inclusion criteria were considered in the study's selection: studies with male rats, submitted to chemical diabetes induction and studies that would use as peripheral

neuropathy evaluation from the nerve conduction velocity one, action potential amplitude and/or peripheral nerves morphologic and morphometric studies. Other criteria using control group and experimental group were also used, carpet training or swimming. Studies on humans, with anaerobic exercises or that only assessed autonomic neuropathy were excluded. Peripheral nerve morphofunctional repercussions were considered the primary outcome, ponderal evolution and glycemic behavior, the second.

3. Results

Among the 773 articles initially identified electronically, 5 were totally recuperated for more detailed evaluation, three of them excluded then, because neuropathy did not emanate from diabetes induction: Snow et al (2005) and Selagzi et al (2008) (Fig. 1).

Among selected studies, the one from Snow et al (2005) was about evaluating the aspect of myosin heavy chain in rats with experimental diabetic neuropathy submitted to exercise and Selagzi et al (2008) manage to determine physical exercise's therapeutic and protective effect in rats with experimental peripheral and diabetic neuropathy.

Snow et al (2005) evaluated these parameters using 32 Sprague Dawley rats initially weighing 200-250g and randomly chosen to compose both the diabetic and the control groups. Selagzi et al (2008) used 70 Wistar rats initially weighing on average $241\text{g} \pm 29.99$, with 12 weeks of age (table 1). Both kept the animals in inverted cycle, with Selagzi et al (2008) using the specific time – dark cycle 9AM-9 PM.

Snow et al, (2005) randomly divided their animals in 4 groups, each one 8 animals, without saying how: sedentary control (SC); sedentary diabetic (SD); exercise control (EC) and exercise diabetic (ED). Selagzi et al (2008) randomly divided the animals in 5 groups, and without explanation, also: C (n=10) control animal; E (n=15) group of healthy trained animals; D (n=15) untrained diabetic animals; DEx (n=15) diabetic animals submitted to

training; ExD (n=15) animals initially healthy started 4 weeks physical training. They were induced with diabetes after then continued with 4 more training weeks.

In both studies, diabetes induction was performed through streptozotocin peritoneal shot with a dosage between 50-60mg/Kg, in Snow et al (2005) study, and 45mg/Kg, in Selagzi et al (2008). Snow et al (2005) checked for glycemia 5 days after procedure to confirm diabetes. He considered diabetic, rats with glycemia ≥ 250 mg/dl. Selagzi et al (2008) received confirmation after 2 induction days, and the animals with blood glucoses levels of ≥ 200 mmol/dl were considered diabetics. Diabetes was only induced on animals in ExD group upon completing 16 weeks.

Snow et al (2005) applied insulin in animals, when glycemia was high than 200 mg/gl, to prevent hypoglycemia. For trained animals with administrated dosage it was 2.3 units and for sedentary, 2.5.

Both Snow et al (2005) and Selagzi et al (2008) studies exercises protocols are described in table 2; used electrophysiology study to evaluate neuropathy; present the methodology and results in table 2.

Selagzi et al (2008) performed the morphologic analysis on the sciatic nerve segment. The histology analysis happened secretly, as the authors do not say how. To prepare materials nervous system tissues were immediately infused in a neutral solution of formol at 10%, then in paraffin; transverse (4 μ m) and bloodstained slices with hematoxylin and eosin to evaluate myelin degeneration. One hundred myelin sheaths of each slice had their thickness measured by ocular micrometer attached to an optic microscope with 1000x of enlargement.

Snow et al (2005) compared both glycemic indexes and animals weigh, and realized a significant difference between control and diabetic animals, glycemia increase and weigh loss. Results evaluation from Selagzi et al (2008) study were obtained through glycemic levels quantification; swimming and diabetes effects on animals weight, on electromyography

parameters, and on myelin sheath thickness. These authors found out that swimming had no effects on the animals' glycemic levels.

Regarding animal weigh, a rapid increase was observed in control groups (C) and exercised (E). When control groups (C), diabetics (D) and exercised (E), were compared and induced diabetes (ExD) after, there was a significant weight reduction, as well as between exercised (E), diabetic (D) and exercised and induced diabetes after (ExD), groups. Meanwhile, exercised/trained group and after induced with diabetes (ExD) gained more weight than other diabetic groups. Thus, they concluded that exercising proved to be an effective prevention against weight loss.

During studied animals' myelin sheath thickness evaluation, the control group (C) average value was significantly higher when compared to diabetic group (D). A major increase in average values was found in exercised groups and after induced with diabetes (ExD), and trained diabetics (DEx), when compared to diabetic group (D). The authors concluded that exercising before and after induction prefigured injuries on the myelin. They also found significant differences between control groups (C) and exercised (E).

4. Discussion

The current review showed the existence of lack of studies with animals experimented on that evaluated effects of physical exercise on diabetic neuropathy.

In Snow et al (2005) study, we can see that the methodology to obtain results was not well detailed, as they are not clear as to whether they had compared electrophysiology parameters, or not; glycemia and weigh between diabetic animals. In Selagzi et al (2008), it was.

The sample's total size in both studies was one hundred and two animals but, Selagzi et al (2008) say that two animals from diabetic group (D), three from exercised diabetic group

(DEx) and four from exercised and induced diabetes (ExD) all died before the end of study; which shows a final sample of ninety three animals in both studies.

Both studies used unspecified and randomly chosen groups; control groups classifying the study as randomly controlled.

The literature describes various dosages for diabetes induction when using streptozotocin. The described dosage varies from 40mg/kg to 70mg/Kg (Tancredi, Rousseau-Migneron, & Nadeau 1982; Wright & Nukada, 1994; Kato et al, 2005; Heidarianpour et al, 2007) proving that the one used was coherent with those borrowed from other studies.

The induction's age to evaluate diabetic neuropathy presence varies a lot between the studies, which might affect researches results. Snow et al (2005) does not provide animals age, only their weigh. Selagzi et al (2008) induced diabetes to animals with only 12 weeks of age. One important fact found in literature is the moment nerve maturation takes place, which is believed to happen around the 26th-30th week of age, making the age induction pivotal in nerve alterations due to increase in glycemic levels. This information is thus useful regarding comparison with other studies (Malone, et al 1996).

Selagzi et al (2008) do not disclose slides analysis, and do not tell how the disclosure was. This is important regarding researcher's interference in results analysis.

The treadmill running program used in Snow et al (2005) study looks similar to the one described in literature that varies between 6 weeks-2 months, with average velocities of 20m/min. Training days also vary between protocols of 3-7 times per week, and duration of 30-90 minutes (Lamontagne et al, 2007; Lemos et al, 2007; Park, Hong, & Sung, 2007; Hsieh et al, 2008; Hung et al, 2008; Park, Hong, & Sung, 2008). The protocol of exercise used by Selagzi et al (2008) is also compatible with those presented in other experiments on diabetic rats. Trainings vary from 4-12 weeks, usually with 1 hour of swimming per day during 5 days

per week (Oliveira, Luciano, Marcondes, & Mello, 2007; Lemos et al, 2007; Gomes, Leme, Mello, Luciano, & Caetano, 2008).

Evaluation methods proposed by both Snow et al (2005) and Selagzi et al (2008): amplitude, CMAP latency and nerve conduction velocity, seem a good option to evaluate adjustment in nerve structure. Studies show that alterations in electrophysiology parameters can be observed after 3 weeks of induction (Kato et al, 2004). But Snow et al (2005) do not disclose if the base values were peak, or peak-to-peak, which could obstruct comparisons with other studies, like during segment temperature registration that could also influence values.

Selagzi et al (2008) also use the measurement of the myelin sheath thickness as evaluation method. Other authors also use this same structure as evaluation parameter, showing how it tends to decrease in animal with diabetes (Bestetti, Rossi, & Zemp, 1981; Malone et al, 1996).

It became evident that studies on physical exercise influence on the presence of peripheral neuropathy in rats with experimental diabetes are still rare, and with different results, making it difficult to tell if this intervention is beneficial or not. Regarding methodological aspect, we can see that evaluated methodologies are similar to literature (diabetes induction, training protocols, electrophysiology evaluation) though the criteria for evaluating the quality of articles (computation and kind of sample's randomization; obstruction of results analysis, etc.) were obscure, while one of the studies presents important omissions in methodology.

This intervention aspect needs a huge scientific support, as it aims at better understand physical exercise answers from the peripheral nerve structure in diabetic area. Other studies with similar methodology like the one described by Selagzi et al (2005) become thus critical that would also consider other ages for induction and for different exercises protocols.

References

Arora, M., Kumar, A., Kaundal, R. K., Sharma, S. S. (2008). Amelioration of neurological and biochemical deficits by peroxynitrite decomposition catalysts in experimental diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol.* 596, 77-83.

Bestetti, G., Rossi, G. L. Zemo, C. (1981). Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. *Acta Neuropathol (Berl).* 54,129-134.

Cherian, S., Roy, S., Pinheiro, A., Roy, S.(2009). Tight glycemic control regulates fibronectin expression and basement membrane thickening in retinal and glomerular capillaries of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, 943-949.

Ciolac, E. G., Guimarães, G. V. (2002). Importância do exercício resistido para o idoso. *Rev Soc Cardiol Est São Paulo.* 12S,15-26.

Ciolac, E. G., Guimarães, E. G. (2004). Exercício físico e síndrome metabólica. *Rev Bras Med Esporte.* 10, 319-324.

Eriksson, J., Taimela, S., Koivisto, V. A. (1997). Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia.* 40,125-135.

Fregonesi, C. E. P. T., Faria, C. R. G., Molinari, S. M., Neto, M. H. M. (2004). Etiopatogenia da neuropatia diabética. *Arq Ciênc Saúde Unipar.* 8, 147-156.

Gagliard, A.R.T. (2003). Neuropatia diabética periférica. *J vasc Br.* 2, 67-74.

Gomes, R. J., Leme, J. A. C. A., Mello, M. A. R., Luciano, E., Caetano, F. H. (2008). Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos.

Motriz. 14, 320-328.

Heidarianpour, A., Hajizadeh, A., Khoshbaten, A., Niaki, A. G., Bigdili, M. R., Pourkhalili, K. (2007). Effects of chronic exercise on endothelial dysfunction and insulin signaling of cutaneous microvascular in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 14, 746-752.

Kato, N., Nemoto, K., Nakanishi, N., Morishita, R., Kaneda, Y., Uenoyama, M., Ikeda, T., Fujikawa, K. (2005). Nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor improves streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Diabetes*. 54, 846-854.

Hsieh, Y. Y., Chang, C. C., Hsu, K. H., Tsai, F. J., Chen, C. P., Tsai, H. D. (2008). Effect of exercise training on calpain systems in lean and obese Zucker rats. *Int J Biol Sci*. 4,300-308.

Hung, C. H., Chen, Y. W., Shao, D. Z., Chang, C. N., Tsai, Y.Y., Cheng, J. T. (2008). Exercise pretraining attenuates endotoxin-induced hemodynamic alteration in type I diabetic rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 33, 976-983.

Kemmer, F. W., Berger, M. (1983). Exercise and diabetes mellitus: physical activity as a part of daily life and its role in the treatment of diabetic patients. *Int J Sports Med*. 4, 77-88.

Lamontagne, J., Masiello, P., Marcil, M., Delghingaro-Augusto, V., Burelle, Y., Prentki, M., Nolan, C. J. (2007). Circulating lipids are lowered but pancreatic islet lipid metabolism and

insulin secretion are unaltered in exercise-trained female rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 32, 241-248.

Lemos, E. T., Reis, F., Baptista, S., Pinto, R., Sepodes, B., Vala, H., Rocha-Pereira, P., Silva, A.S., Teixeira, F. (2007). Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. *Med Sci Monit.* 13, 168-174.

Malone, J. I., Lowitt, S., Korthals, J. K., Salem, A., Miranda, C. (1996). The Effect of Hyperglycemia on Nerve Conduction and Structure Is Age Dependent. *American Diabetes Association.* 45, 209-215.

Minuk, H.L., Vranic, M., Marliss, E. B., Hanna, A. K., Albisser, A. M., Zinman, B. (1981). Glucoregulatory and metabolic response to exercise in obese non-insulin-dependent diabetes. *Am J Physiol.* 240, 458-464.

Morrison, J. F., Shehab, S., Sheen, R., Dhanasekaran, S., Shaffiullah, M., Mensah-Brown, E. (2008). Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. *Exp Physiol.* 93, 213-222.

Oliveira, C. A. M., Luciano, E., Marcondes, M. C.C. G., Mello, M. A. R. (2007). Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes and its Complications.* 21, 258-264.

Park, S., Hong, S. M., Lee, J. E., Sung, S. R. (2007). Exercise improves glucose homeostasis that has been impaired by a high-fat diet by potentiating pancreatic beta-cell function and mass through IRS2 in diabetic rats. [*J Appl Physiol*](#).103, 1764-1771.

Park, S., Hong, S. M., Sung, S.R. (2008). Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats. [*Life Sci*](#). 82, 503-511.

Prabhakar, S., Starnes, J., Shi, S., Lonis, B., Tran, R. (2007). Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 8, 2945-2952.

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

Snow, L. M., Sanchez, O. A., McLoon, L. K., Serfass, R. C., Thompson, L. V.(2005). Effects of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *Am J Phys Med Rehabil*. 84, 770-778

Tancrède, G., Rousseau-Mignerot, S., Nadeau, A. (1982). Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes*. 31, 406-409.

White, C. M., Pritchard, J., Turner-Stokes L. (2008). Ejercicio para personas con neuropatía periférica. *Revisión Cochrane*.

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

Legends

Fig 1. Search and selection of studies for systematic review.

Table 1. Description of the data included in the studies and quality assessment of articles.

Table 2. Exercise protocol, electrophysiological techniques and results of electrophysiological study.

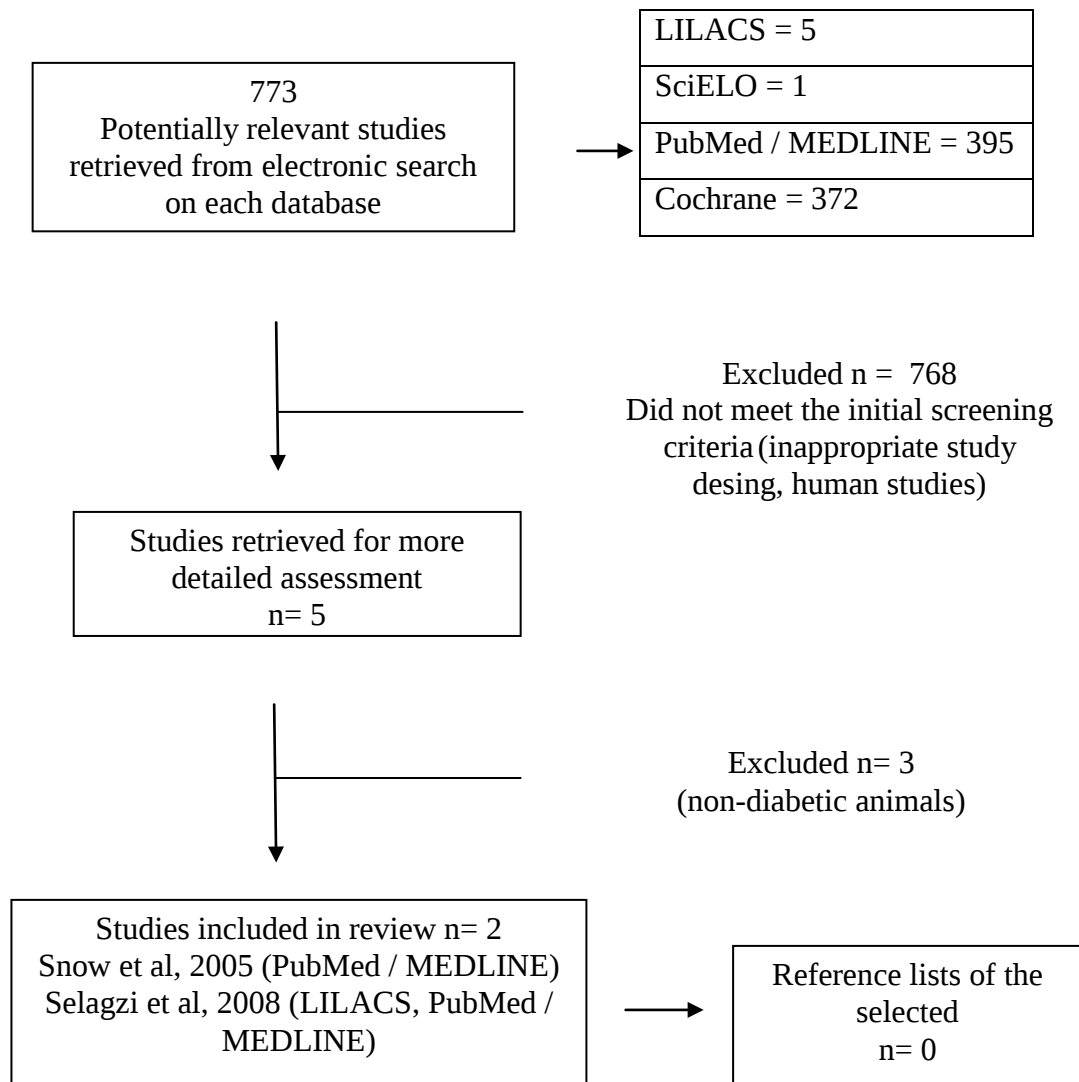
**Fig 1.**

Table 1

Author	Animal model	Total sample (N)	Randomization	Blinding of results analyzed
Snow et al, 2005	Sprague Dawley - male	32 animals	yes	no
Selagzi et al 2008	Wistar - male	70 animals	yes	yes

Table 2.

Study	Exercise protocol	Electrophysiological techniques	Results
Snow et al, 2005	Treadmill running 12wks, 5 days/wk 2wk accommodation period Training program began with the rats running for 60 mins at m/min and incline grade of 10%. The speed was increased at 2-wk intervals until a maximum speed of 27 m/min was reached. The fifth week of training, running times were 50 or 60 mins on alternate days to optimize animal cooperation and avoid overtraining	Electrophysiology testing was performed on the left leg to determine nerve conduction velocities and CMAP amplitudes in the tibial and sciatic nerves.	Electrophysiologic data were consistent with peripheral neuropathy in the diabetic animals. The CMAP amplitudes was significantly lower than both control groups
Selagzi et al 2008	Swimming exercise, 1h day 8wks, 5days/wk Glass tank (length 100cm, width 90cm, depth 60cm) 31±1C The duration of the first swimming exercise was limited to 15 min and increased by 15 min daily until it reached 1 h.	CMAP were recorded from the gastrocnemius muscle by the surface disc electrodes CMAP were recorded on the 0 th , 28 th and 56 th days in all 5 groups The amplitude of the CMAP is the height in millivolts from the baseline to the peak of the negative phase. The CMAP latency is the time in msec from the application of a stimulus to the initial deflection from the baseline. Temperature maintained at 37 C	Decrease of 37% of the amplitude of the CMAP in group D and 56% in the DEx group after 28 days of induction. Compared with group C, the amplitude decreased by 54% in group D and 43% in the DEx group at 56 days. However, the exercise, which was used before induction of diabetes, showed prevent axonal dysfunction in group ExD. With 28 days after the induction observed increase in CMAP latency in the diabetic group, characterizing diabetic neuropathy.

CMAP - compound motor action potencial; D – untrained diabetic animals; DEx – diabetic animals submitted to training; C – control animal; ExD – animals initially healthy started 4 weeks physical training

Carta de envio do artigo de Revisão Sistemática ao Journal of Diabetes and Its Complications

FW: A manuscript number has been assigned: JDC-D-09-00308

De:  **juliana netto maia** (juliananettomaia@hotmail.com)

Enviada: quinta-feira, 17 de dezembro de 2009 16:23:27

Para: celinacordeiro@hotmail.com

> From: JDC@utsouthwestern.edu
 > To: juliananettomaia@hotmail.com
 > Date: Sat, 24 Oct 2009 16:10:20 +0100
 > Subject: A manuscript number has been assigned: JDC-D-09-00308
 >
 > Ms. Ref. No.: JDC-D-09-00308
 > Title: Can aerobic activity cause peripheral neuropathy on experimented animals? A Systematic Review
 > Journal of Diabetes and Its Complications
 >
 > Dear CAN AEROBIC ACTIVITY CAUSE PERIPHERAL NE Maia,
 >
 > Your submission "Can aerobic activity cause peripheral neuropathy on experimented animals? A Systematic Review" has been assigned manuscript number JDC-D-09-00308.
 >
 > To track the status of your paper, please do the following:
 >
 > 1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jdc/>
 >
 > 2. Enter your login details
 >
 > 3. Click [Author Login]
 > This takes you to the Author Main Menu.
 >
 > 4. Click [Submissions Being Processed]
 >
 >
 > Thank you for submitting your work to Journal of Diabetes and Its Complications.
 >
 > Kind regards,
 >
 > Jessica Nolen
 > for Philip Raskin, M.D., Editor
 > The Journal of Diabetes and Its Complications
 > UT Southwestern Medical Center at Dallas
 > Department of Internal Medicine
 > 5323 Harry Hines Blvd, G5-238
 > Dallas, Texas 75390-8858
 > 214/648-2017 ph 214/648-4854 fx
 > jdc@utsouthwestern.edu
 >

ARTIGO ORIGINAL

ORIGINAL ARTICLE

Models, Biological

Eletrophysiological study of the caudal nerve on developing rats
 Estudo eletrofisiológico do nervo caudal em ratos em desenvolvimento

Juliana Netto Maia^I, Celina Cordeiro de Carvalho^{II}, Marina Hazin Galvão^{III}, Anderson de Lima Silva^{III}, Ana Carine Gouveia Mendes^{III}, Otávio Gomes Lins^{IV}, Sílvia Regina Arruda de Moraes^V.

^I Fellow Master degree in Neuropsychiatry and Behavioural Sciences, Federal University of Pernambuco, UFPE, Brazil.

^{II} Master in Biophysics, Fellow PhD degree in Neuropsychiatry and Behavioural Sciences, UFPE, Brazil

^{III} Graduate Student, Faculty of Physiotherapy, UFPE, Brazil

^{IV} Associate Professor, Department of Neuropsychiatry and Behavioural Sciences, UFPE, Brazil

^V Associate Professor, Department of Anatomy, UFPE, Brazil

ABSTRACT

Purpose: To non-invasively study the sensory nerve conduction of the caudal nerve of normal developing rats. **Methods:** Twenty normal Wistar male rats served as subjects. Caudal nerve conduction studies were performed at 60 days from birth and weekly at end of six consecutive weeks. The caudal nerve was stimulated distally and nerve potentials were recorded proximally on the animal's tail using common "alligator" clips as surface electrodes. **Results:** The amplitude and the conduction velocity of the caudal nerve sensory action potential increased linearly from $29 \pm 6 \mu V$ to $85 \pm 13 \mu V$ and from 34 ± 3 m/s to 44 ± 4 m/s, respectively, between the 8th and the 15th week of life. The equations of linear regressions were as followed: Amplitude (μV) = $8.1 \times \text{weeks} - 34$ ($R^2 = 0.99$) and NCV (m/s) = $1.2 \times \text{weeks} + 25$ ($R^2 = 0.86$). **Conclusions:** It was possible to study non-invasively the sensitive conduction of the caudal nerve of normal developing rats and describe reference values. The technique and data may be used as animal model in physiological and pathological studies. **Key words:** Nerve conduction. Rats. Electrodiagnosis.

RESUMO

Objetivo: Estudar de forma não invasiva a condução nervosa sensitiva do nervo caudal em ratos normais em desenvolvimento. **Métodos:** Vinte ratos machos Wistar foram utilizados. A condução nervosa foi realizada a partir dos 60 dias, semanal durante seis semanas consecutivas. O nervo caudal foi estimulado distalmente, os potenciais foram registrados proximalmente na cauda do animal usando garras comum do tipo "jacaré" como eletrodos de superfície. **Resultados:** A amplitude do potencial de ação de nervo sensitivo a velocidade de condução nervosa do nervo caudal cresceu linearmente de $29 \pm 6 \mu V$ para $85 \pm 13 \mu V$ e de 34 ± 3 m/s para 44 ± 4 m/s, respectivamente, entre a 8^ª e a 15^ª semana da vida do animal. As equações de regressão linear foram as seguintes: Amplitude (μV) = $8,1 \times \text{semanas} - 34$ ($R^2 = 0,99$) e velocidade de condução nervosa (m/s) = $1,2 \times \text{semanas} + 25$ ($R^2 = 0,86$). **Conclusões:** Foi possível estudar de forma não invasiva a condução nervosa sensitiva do nervo caudal de ratos normais em desenvolvimento e descrever valores de referência. A técnica e os dados podem ser usados como modelo animal em estudos fisiológicos e patológicos.

Descritores: Condução nervosa. Rato. Eletrodiagnóstico.

Introduction

Electrophysiological conduction studies of peripheral nerves are often used in animal experimental models and human clinical assessments¹. The caudal, saphenous, sural, sciatic, tibial, fibular and facial are the nerves most commonly accessed in animals^{2,3,4,5}. The literature has described several methods of nerve conduction studies, including their respective reference values^{6,7}. The technique varies according to the nerve to be studied and the method used for stimulating the nerve and recording the potentials. When attached to the skin, surface electrodes allow a non-invasive assessment of the nerve. Invasive techniques consist of surgically placing electrodes or introducing thin needles inside the animal body^{7,8,9,10}.

The caudal nerve has been used for nerve conduction studies in rats, for being easily accessed and long, enabling accurate measurement of distances^{11,12}. Some difficulties may arise in adjusting and fixating surface electrodes on the animal's relatively thin tail. There are not many electrophysiological studies on the rat caudal nerve during development. The objective of this work was to study electrophysiologically the rat caudal nerve during growth, using common "alligator" clips as stimulating and recording surface electrodes.

Methods

Twenty male 60 days of age albinos Wistar rats were studied. The animals were kept at the biotery of the Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, under 25° C ambient temperature, 12 hr light/12 hr dark photoperiod, in collective plastic cages (maximum 5 animal per cage), maintenance diet (Labina[®] Purina) and water *ad-libitum*. Nerve conduction studies were performed at the Electroneuromyography Laboratory of the Clinics Hospital, Department of Neuropsychiatry, Federal University of Pernambuco, during 8 consecutive weeks, once a week.

Six alligator clips were attached to a formicated board in straight line at 3 centimeters distance from one another except the two central clips that were 2 cm from each other. Thus, the distance between the stimulating cathode and the non-inverting recording electrode was 8 cm, whereas the inter-electrode distance of the stimulating and recording pairs was 3 cm. The spring of the alligator clips were removed to prevent compression of the tail.

After anesthesia using an intramuscular solution of Xylazin Chlorhydrate (Rompum - Bayer[®]) and Ketamin (Ketalar[®]), 0.2 ml/100g weight, the animal was laid ventrally on the board. The tail was cleaned and degreased with 70% alcohol and fixed between the electrodes by us (figure 1). The distal pair of electrodes was used for stimulation, the proximal pair for recording and the connected central pair as the ground electrode. Thus, an orthodromic sensory nerve conduction technique was used. Before each recording the tail was heated with a dichroic lamp to 32° C, measured at a middle of the tail by an infrared thermometer (Doc Thermo; modelo n. HD – 11; Comdek Industrial Corp.). This work was approved by the local ethical committee for animal research.

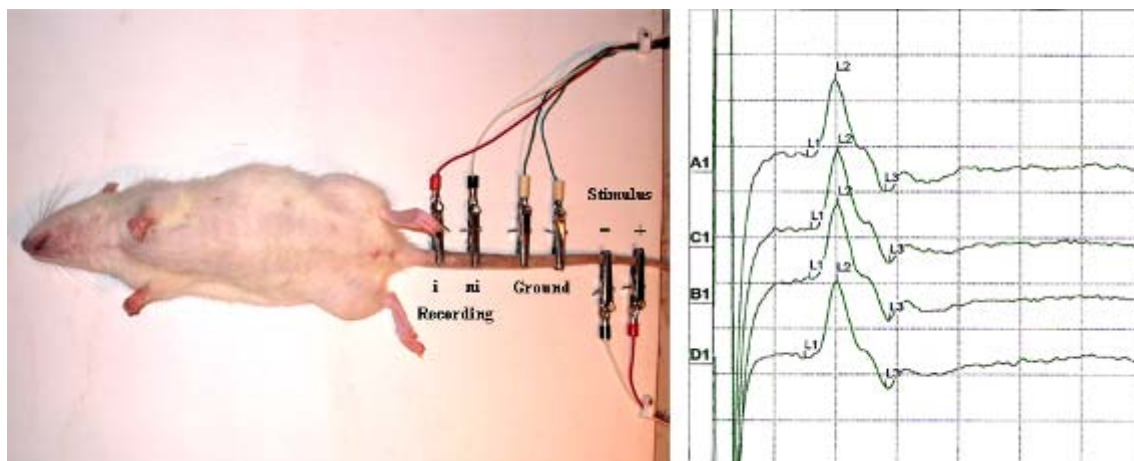


FIGURE 1 - The experimental setting is shown on the left side and the recording on the right side (ni). Non-inverting recording electrode (i) Inverting recording electrode. (-) Cathode stimulating electrode (+) Anode stimulating electrode

The electrophysiological parameters studied were peak-to-peak amplitude and onset latency nerve conduction velocity (NCV) of the sensory nerve action potential (SNAP). Measurements were taken 4 times and averaged together (figure 1). The data was tabulated and analyzed using Microsoft Excel® spreadsheet. Amplitudes and NCV were summarized as means and standard deviations. Linear regression was used to model the data.

Results

The amplitude and the NCV of the caudal nerve SNAP increased linearly between the 8th and the 15th week of animal life, from 29 ± 6 μ V to 85 ± 13 μ V and from 34 ± 3 m/s to 44 ± 4 m/s, respectively (Figures 2 and 3). The equations of linear regressions were as followed: Amplitude (μ V) = $8.1 \times \text{weeks} - 34$ ($R^2 = 0.99$) and NCV (m/s) = $1.2 \times \text{weeks} + 25$ ($R^2 = 0.86$).

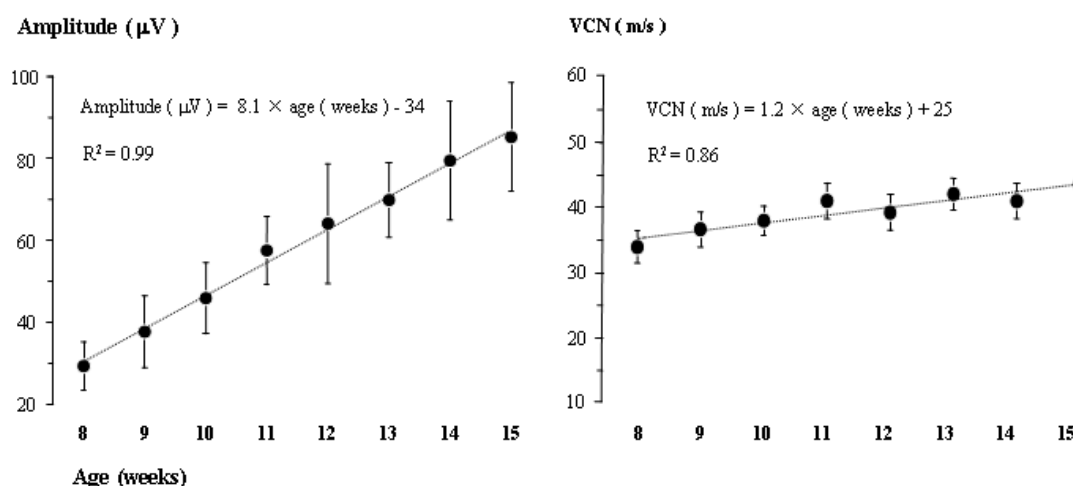


FIGURE 2 – Mean $\pm$ standard deviation of the SNAP amplitudes (left side) and NCV (right side) between the 8th and the 15th week of animal life. The equation of linear regression relating amplitude (μ V) or NCV (μ V) and age (weeks) and the squared correlation coefficient (R^2) is shown

Discussion

Both amplitude and NCV showed a linear increase proportionate to the age of the animal. This linear increase is probably due to the development of rats' peripheral nervous system itself. The mechanism of the conduction changes with aging is uncertain. It is believed that three mechanisms are involved on large diameter myelinated axons, interdonal length and nodal events¹.

There are not many electrophysiological studies of the caudal nerve of developing rats. Schmelzer and Low¹, in their electrophysiological study on the effect of age on caudal nerve of Sprague-Dawley male rats, used a similar orthodromic technique but recorded with near the nerve fine steel needles. They observed that both the amplitude and the NCV were parabolic functions of age - they increased progressively until about 1 year and then declined. However, between the 8th week and the 15th week the function is virtually linear, as the quadratic component of the function is quite small (0.02 and 0.005 for NCV and amplitude respectively, per squared week).

During similar time frame Schmelzer and Low¹ NCV were about 4-8 m/s faster than ours. One possible explanation for this small but consistent discrepancy is that we kept the temperature of the tail at 32°C whereas they kept it at 35°C. As NCV increases a little more than 1 m/s per °C¹² the difference in temperature fairly predicts the difference found in NCV. Schmelzer and Low¹ amplitudes were about 50% smaller than our amplitudes. Amplitude decreases about 0.04 µV per °C¹², therefore the difference in tail temperature is not sufficient to explain the difference in NCV. Unfortunately, they did not report how the amplitudes were measured: baseline-to-peak or peak-to-peak. If it was baseline-to-peak it could explain why their amplitudes were smaller than our peak-to-peak amplitudes.

Conclusion

In conclusion, it was possible to study non-invasively the sensitive conduction of the caudal nerve of normal developing rats and describe reference values. The technique and data may be used a useful animal model in physiological and pathological studies.

References

1. Schmelzer JD, Low PA. Electrophysiological studies on the effect of age on caudal nerve of the rat. *Experimental Neurology*. 1987;96:612-20.
2. Zollman PJ, Awad O, Schmelzer JD, Low PA. Effect of ischemia and reperfusion *in vivo* on energy metabolism of rat sciatic-tibial and caudal nerves. *Experimental Neurology*. 1991;114:315-20.
3. Cruz MW, Correa RS, Puccioni-Sohler M, Novis SAP. Eletromiografia e potenciais evicados somatossensitivos na mielopatia pelo HTLV-I. *Arq. Neuropsiquiatr*. 1998;56(4):756-62.
4. Murade ECM, Neto JSH, Avanzio O. Estudo da relação e da importância entre a semiologia clínica, tomografia axial computadorizada e eletroneuromiografia nas radiculopatias lombares. *Acta Ortop Bras*. 2002;10(4):18-25.
5. Sandrini FAL, Pereira-Junior ED, Gay-Escoda C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007;73(2):196-201.
6. Redding RW, Ingram JT, Colter SB. Sensory nerve conduction velocity of cutaneous afferents of the radial, ulnar, peroneal and tibial nerves of the dog: reference values. *Am J Vet Res*. 1983;43:145-62.

7. Feitosa MM, Larsson MHMA, Ushikoshi, WS, Perri SHV. Padronização da determinação da velocidade de condução nervosa sensitiva dos nervos tibial e peroneal de cães clinicamente sadios, pela utilização de eletrodos de superfície. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54(2).
8. Leal-cardoso JH, Matis-Brito BG, Lopes-Junior JEG, Viana-Cardoso KV, Sampaio-Freitas AB, Brasil RO, Coelho-de-Souza NA, Albuquerque AAC. Effects of estrangole on the compound action potenail of the rat sciatic nerve. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(8):1193-8.
9. Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Godoy BO, Plese JPP. Electrophysiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair resing suture of both technique. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(3-A):601-4.
10. Malta J, Campolongo GD, Barros TEP, Oliveira RP. Eletromiografia aplicada aos músculos da mastigação. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(2):106-7.
11. Low PA, Ward JD, Schmelzer JD, Brimijoin S. Ischemic conduction failure and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. *Am J Physiol.* 1985;248:457-62.
12. Leandri M, Lenadri S, Lunardi G. Effect of temperature on sensory and motor conduction of the rat tail nerves. *Neurophysiol Clin.* 2008; 38:297-304.

Conflict of interest: none

Financial source: none

Correspondence:

Juliana Netto Maia

Mailing Address: Avenida Rosa e Silva, 1205 / 302, 52050-020. Recife, Pernambuco, Brazil

Phone: (55-81)-9999.9995

juliananettomaia@hotmail.com

How to cite this article

Maia JN, Carvalho CC, Galvão MH, Silva AL, Mendes ACG, Moraes SRA, Lins OG. Eletrophysiological study of the caudal nerve on developing rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2010; jan-fev, 25(1).

Aceite do artigo enviado à Revista Acta Cirúrgica Brasileira.

RES: confirmação de recebimento

De:  **Saul Goldenberg** (sgolden@terra.com.br)

Enviada: segunda-feira, 8 de junho de 2009 16:08:31

Para: 'juliana netto maia' (juliananettomaia@hotmail.com)

Prezada Juliana Maia,

O artigo está agendado para o vol. 25 n.1 janeiro-fevereiro de 2010.

Att.

Prof. Saul

ARTIGO ORIGINAL**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO NERVO CIÁTICO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL SUBMETIDOS À NATAÇÃO**

Juliana N, Maia¹; Celina C.Carvalho¹; Marina H. Galvão²; Anderson L. Silva²; Ana Carine G. Mendes²; Otávio G. Lins¹; Silvia R. A. Moraes².

¹ Departamento de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, UFPE, Recife, PE, Brasil

² Departamento de Anatomia, UFPE, Recife, PE, Brasil

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

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito do exercício físico na instalação da neuropatia diabética periférica (NP). **Métodos:** 40 ratos, 6 semanas; Divididos em 4 grupos: controle sedentário (GCS), controle treinado (GCE), diabético sedentário (GDS), diabético treinado (GDE). Indução do diabetes através da estreptozotocina 60mg/Kg. Treinamento por seis semanas (natação, 1h/dia, 5x/sem). Semanalmente verificava-se glicemia, peso, velocidade condução nervosa (VCN), amplitude potencial de ação nervo caudal. Após sacrifício analisou-se: número, densidade, tamanho de fibras mielínicas, área de secção transversa do nervo ciático. **Resultados:** glicemia GDE diminuiu comparando ao GDS. Os diabéticos apresentaram diminuição ponderal. A VCN dos diabéticos, a partir da 3ª semana diminuiu em relação aos controles. Amplitude na 4ª semana aumentou no grupo dos diabéticos. Parâmetros morfométricos sem alteração exceto no tamanho das fibras intermediárias entre os grupos sedentários. **Conclusão:** quadro de instalação da NP apresenta-se mais precocemente na VCN. O exercício mostrou não influenciar no seu aparecimento.

Palavras-chave: Ratos, Neuropatia Diabética, Nervo Ciático, Condução Nervosa

INTRODUÇÃO

O tratamento clínico proposto aos pacientes portadores de diabetes consiste em associar insulinoaterapia, atividade física regular e um bom planejamento alimentar (1). Estudos têm demonstrado que o exercício físico promove atenuação das complicações clínicas decorrentes do diabetes como, por exemplo, melhora do perfil lipídico e glicêmico e diminuição da concentração de ácidos graxos livres (1,2,3).

No entanto ainda existe uma lacuna a respeito de como o exercício influencia o quadro de neuropatia diabética periférica, alteração tão frequente neste grupo de pacientes. A neuropatia diabética é resultado de uma perda da sensibilidade distal que pode levar à alterações musculoesqueléticas (4) trazendo um grande prejuízo na qualidade de vida desses indivíduos.

Existem evidências, tanto clínicas (5,6) quanto experimentais (7), que o exercício físico promove um efeito protetor no desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, porém o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está totalmente esclarecido.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia do nervo ciático e a resposta funcional do nervo caudal de ratos experimentalmente diabéticos submetidos a um protocolo de natação.

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, com 60 dias de idade, peso inicial em torno de 250g. Estes animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: grupo controle e grupo diabético, cada um com vinte animais. Em seguida, aleatoriamente, estes grupos foram subdivididos em duas condições treinados e não treinados, assim ficaram quatro grupos: grupo controle sedentário (GCS) composto por animais sadios restritos a movimentação dentro da própria gaiola; grupo controle exercitado (GCE) animais sadios submetidos ao exercício de natação; grupo diabético sedentário (GDS) formado por animais que foram induzidos o diabetes experimental, também restritos a movimentação dentro da própria gaiola e; grupo diabético exercitado (GDE), animais que sofreram indução de diabetes experimental e foram submetidos ao exercício de natação. Cada grupo constituído por 10 animais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo 59/08), estando de acordo com as normas internacionais estabelecida pelo National Intitute of Health Guide for care and use of Laboratory Animals.

Indução do diabetes experimental

Para indução do diabetes utilizou-se solução de streptozotocina (Sigma Chemical Co., USA), através de administração intraperitoneal, após jejum alimentar de 12 horas. A streptozotocina (STZ) foi diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos receberam, da mesma forma, doses equivalentes de solução tampão citrato de sódio, e decorridos 30 minutos do tratamento os animais foram alimentados normalmente (8).

A confirmação do diabetes foi realizada através da verificação da glicose sanguínea realizada após um jejum de 12 horas, 3 e 7 dias após a administração de STZ, por punção na cauda do rato para obtenção de uma gota de sangue para leitura em glicosímetro específico (Glicosímetro AcuChek – Roche®) (7). Apenas os animais que apresentaram glicose

sanguínea ≥ 200 mg/dL foram incluídos no experimento. Em seguida, semanalmente, foi verificada a glicemia (após jejum de 12h) e o peso de todos os animais.

Protocolo de exercício

Os animais exercitados realizaram um protocolo de exercício moderado de natação durante seis semanas, cinco dias por semana. A primeira semana (semana de condicionamento) foi composta por exercícios que tinha a duração inicialmente de 10 minutos e a cada dia ocorria um acréscimo de mais 10 minutos, de forma que ao final do quinto dia da semana o animal nadava durante 50 minutos. As cinco semanas posteriores foram compostas por exercício de 60 minutos realizados de segunda a sexta (9).

O exercício de natação foi realizado em um tanque com 60cm de comprimento, 50cm de largura e 40cm de profundidade. A temperatura da água foi controlada por um termostato que a mantinha em $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após as sessões de natação os ratos permaneciam durante 20 minutos em uma câmara de aquecimento para que secagem dos pêlos (10).

Estudo da velocidade de condução nervosa e amplitude do potencial de ação do nervo sensitivo

O estudo da condução nervosa foi realizado no Laboratório de Eletroneuromiografia do Hospital das Clínicas – UFPE. O registro do grupo controle ocorreu quando os animais atingiram a idade de 60 dias (semana 0), e por mais 7 semanas consecutivas (semana de 1-7); O registro dos animais diabéticos foi realizado aos 59 dias de idade (semana 0), em seguida foi promovida a indução. Após uma semana ocorreu o registro semanal durante seis semanas consecutivas (semana 2-7).

Para a verificação da velocidade de condução nervosa (VCN) e a amplitude pico-a-pico do potencial do nervo sensitivo foi utilizado um eletromiógrafo (Demetec centor – M4V) através do programa Racia-Alvar Centor M version v2.1, pelo software Altromed GmbH, version 2.81 (4 channels), 1999. Acoplado a este aparelho foi construída uma tábua formicada e a ela afixados seis eletrodos do tipo “jacaré” dispostos em linha reta a cada três centímetros. Os dois eletrodos distais foram utilizados para estimulação, os dois proximais para registro e os dois centrais como terra.

Após serem anestesiados, com uma solução de cloridrato de xilazina (Rompum – Bayer®) e quetamina (Ketalar®), por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (11) e após limpeza e desgorduramento da cauda, o animal era

posicionado ventralmente, de forma que sua cauda ficasse completamente livre, para posicioná-la entre os eletrodos. A cauda era previamente aquecida, com uma lâmpada dicróica colocada acerca de 10cm da cauda do animal de forma a obter-se uma temperatura média de 30 graus que era monitorada com termômetro subdermal (Doc Thermo; modelo n. HD – 11; Comdek Industrial Corp.) colocado no terço médio da cauda.

Em seguida foram registrados e analisados os potenciais da cauda do animal através da técnica ortodrômica.

Coleta do Material e Processamento Histológico

Ao completar seis semanas de exercício quatro animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, foram anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (Rompum® – Bayer) e quetamina (Ketalar®) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml para cada 100 g de peso (11).

Após a anestesia, foi realizada a tricotomia das regiões glútea e posterior da pata direita e uma incisão sobre os músculos glúteos e isquiotibiais para exposição do nervo ciático. O nervo ciático foi seccionado aproximadamente 1 cm anteriormente à bifurcação dos nervos tibial posterior e fibular comum.

Após a exposição do nervo, uma pré-fixação foi realizada com solução Karnowsky (solução de 2,5% de glutaldeído, 4% de paraformaldeído e 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH=7,4), através de gotejamento de 1 mL desta solução no nervo ciático *in situ*. O tecido nervoso foi seccionado transversalmente e encaminhado para processamento histológico.

Para o processamento histológico dos cortes semi-finos, foi utilizada a técnica sugerida por Chen (12). Os fragmentos nervosos foram fixados em solução Karnowsky por 24h a 4°C. Após este procedimento, os fragmentos foram lavados com solução aquosa de tampão cacodilato de sódio e pós-fixados com solução contendo 1% tetróxido de ósmio por 1 hora e 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado em concentrações crescentes de solução aquosa de acetona, (50%, 70%, 90% e 100%), sendo embebido em resina Epon 812 (Polysciences®). Para a realização dos cortes semi-finos dos fragmentos de nervo ciático emblocados, foi utilizado o ultramicrotomo (ULTRACUP, LEICA), obtidos cortes transversais com espessura de 0,5 µm. Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina (1%), corante específico para estruturas ricas em lipídios, como a bainha de mielina.

Análise Histomorfométrica do nervo ciático

Para quantificação das fibras nervosas mielínicas, utilizou-se o microscópio óptico (Olympus – BX50), objetiva de 40X – aumento final de 400X, conectado a uma vídeo-câmera (Samsung – SHC-410 NAD) e o software_TV Tuner Application. A quantificação do número de fibras mielínicas foi realizada utilizando o programa Mesurim Pro 08 (disponível gratuitamente na internet) analisando todos os campos microscópicos das imagens capturadas.

Para avaliação do diâmetro das fibras nervosas mielinizadas e da área total ocupada pelas fibras, utilizou-se o programa Scion Image for Windows (Beta 4.0.2). Foi padronizado, de acordo com a metodologia estabelecida por Chopra (13), que seriam consideradas fibras pequenas àquelas cujos diâmetros estivessem no intervalo de 1-5 μm , fibras intermediárias com diâmetros entre 6-9 μm e fibras grandes àquelas que apresentassem diâmetro superior a 10 μm . Para o cálculo da densidade das fibras utilizou-se a relação entre o número de fibras mielinizadas e a área total ocupada pelas fibras (mm^2) (14). Para a análise dos diâmetros das fibras nervosas mielínicas, foram escolhidas randomicamente, cinco imagens de campos microscópicos para cada animal, sendo consideradas para análises todas as fibras presentes nos campos microscópicos analisados.

Análise estatística

Para a realização da análise estatística dos resultados utilizou-se o programa Bioestat 5.0 (disponível gratuitamente na internet). Para os valores paramétricos foi utilizado o Teste t de Student, enquanto que para os valores não paramétricos, foi utilizado o Teste U de Mann-Whitney. Os Resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (paramétricos) e em mediana $\pm$ erro-padrão (não-paramétricos), utilizando 95% como nível de significância.

Na avaliação da velocidade de condução nervosa e da amplitude do potencial de ação, utilizamos o programa Xlstat. Neste realizou-se uma análise de variância - ANOVA modelo misto 2 x 2 x 7 (grupo, condição, tempo), com comparações a posteriori com teste de Tukey. O p crítico foi de 0,05.

RESULTADOS

Peso corpóreo e Glicemia

Na semana 0 os animais do GDS apresentaram peso corpóreo menor do que o GCS. Esta diferença se manteve durante todo o experimento (Figura 1). A avaliação do peso corpóreo dos animais dos grupos exercitados (GCE e GDE) revelou-se menor nos animais diabéticos nas semanas 3, 5, 6 e 7 (Figura 1). Comparando os grupos GCS e GCE, observou-

se uma diminuição no peso corpóreo do GCE nas semanas 3, 4, 6 e 7 (Figura 1). Na semana 1 e 2 houve uma diminuição significativa dos pesos corpóreos dos animais do GDE e GDS, nas semanas seguintes esta diferença não foi mais observada, no entanto os animais do GDE continuaram apresentando uma tendência a valores médios menores (Figura 1).

Os valores dos níveis glicêmicos foram obtidos a partir da semana 1, ou seja, após os animais terem sido submetidos à indução do diabetes. Comparando-se os valores da semana 1 com os valores da semana 7 observou-se que os animais dos grupos controles (GCS e GCE) apresentaram níveis glicêmicos significativamente menores (Figura 2).

Durante o período avaliado os valores de glicemia dos animais diabéticos se mantiveram significativamente maiores que o dos animais controle. Ao final do treinamento os valores glicêmicos apresentados pelo GDE foram significativamente menores que os do GDS (Figura 2).

Velocidade de Condução nervosa e amplitude do potencial de ação do nervo sensitivo

A velocidade de condução nervosa não apresentou diferença entre os grupos diabéticos (GDS e GDE), no entanto, a partir da 3ª semana pós indução, foi observado diminuição dos valores médios da velocidade de condução nervosa nos animais diabéticos quando comparados aos controles (Tabela 1).

A amplitude do potencial de ação do nervo caudal dos animais diabéticos apresentou a partir da 4ª semana pós indução, valores maiores que os apresentados pelo grupo controle (Tabela 2). Não foi observada diferença nos valores da amplitude do potencial de ação do nervo caudal entre os animais do GDS e GDE (Tabela 2).

Avaliação Histomorfométrica do nervo ciático

Em relação ao número de fibras mielínicas, área de secção transversa do nervo ciático e densidade de fibras mielinizadas não foi observada diferença entre os grupos analisados (Tabela 3).

Foi observado um aumento no número de fibras de tamanho intermediário (diâmetro entre 6-9 μm) no GDS ($362,5 \pm 39,11$) quando comparado ao GCS ($280 \pm 29,68$), ($p = 0,0158$).

A comparação entre os demais grupos não demonstrou diferença com relação aos tipos de fibras do nervo (Tabela 4).

Discussão

Dentre as complicações mais freqüentes e severas do diabetes destaca-se a neuropatia, alteração no sistema nervoso periférico, promovida, em longo prazo, por níveis elevados de

glicose no sangue (15). Um dos recursos preconizados para tentar controlar os níveis glicêmicos é a atividade física. Diminuição dos níveis glicêmicos foi observado em animais submetidos a protocolo de natação, de duração de quatro e oito semanas, respectivamente Gomes e cols (3) Lemos e cols (16). Acredita-se que esta diminuição ocorra porque quando o exercício é realizado na presença de hiperinsulinemia, a captação de glicose nos músculos aumenta drasticamente diminuindo a glicemia sanguínea (17).

Oliveira e cols (18) e Selagzi e cols (7) demonstraram uma diminuição do peso corpóreo de animais diabéticos submetidos a exercício de natação durante 06 e 08 semanas, respectivamente. No nosso estudo o peso dos animais do grupo controle apresentou um aumento gradual durante todo o experimento. Entretanto, os animais diabéticos tenderam a perda do peso, tendo o GDE demonstrado uma perda significativa.

Nos nossos resultados observamos uma diminuição da velocidade de condução nervosa nos animais dos grupos diabéticos após três semanas de indução, embora não tenha sido verificada alteração na estrutura do nervo entre os grupos avaliados.

Malone e cols (19) em seu estudo sobre o efeito da hiperglicemia na estrutura e na condução nervosa demonstraram uma diminuição significativa na velocidade de condução nervosa após 4 semanas da indução. A velocidade de condução nervosa está bastante relacionada aos nodos de Ranvier. Jakobsen (20) em seu estudo pode observar que após 4 semanas de indução o nodo de Ranvier apresentou-se levemente alargado e que havia um aumento paronodal em relação ao calibre da fibra nervosa. Essa mudança tem sido relatada como um sinal precoce de neuropatia diabética experimental. Não se sabe se este alargamento do nodo de Ranvier pode está associado a um alargamento da membrana nodal ao nível ultraestrutural. Se assim for isto poderia aumentar o tempo da ativação nodal, diminuindo a velocidade de condução nervosa, o que poderia explicar os nossos achados.

A literatura descreve a neuropatia como de origem multifatorial. Uma delas é a bioquímica. Dentre a via metabólica uma das mais estudadas é a via do poliol. Acredita-se que o acúmulo de sorbitol resulta em diminuição dos níveis intracelulares de mioinositol e taurina, até o ponto que sejam limitantes para o metabolismo intracelular. Demonstrou-se que a redução dos níveis de mioinositol se associa à diminuição da atividade do Na^+ , K^+ e da ATPase levando a diminuição da velocidade de condução nervosa (21,22,23).

Em nosso estudo não avaliamos as concentrações dessas substâncias, entretanto, no estudo de Malone e cols (19) ratos que foram induzidos na sexta semana de vida apresentaram após quatro semanas da indução diminuição da VCN, e ao final da 20ª semana pós-indução demonstraram valores aumentados de sorbitol.

Outro fator importante que pode interferir nos parâmetros eletrofisiológicos é a perfusão nervosa. No estudo de Kato e cols (24) eles induziram diabetes em ratos com quatro semanas de idade. Após três semanas pós-indução perceberam que a VCN e amplitude do potencial de ação dos animais diabéticos estavam diminuídas em relação ao grupo controle. No entanto não perceberam alterações no diâmetro das fibras mielínicas, porém houve uma diminuição significativa na densidade endoneural de capilares.

Diferente da literatura, em nosso estudo, a amplitude do potencial de ação aumentou nos animais diabéticos. Acreditamos que isto tenha ocorrido devido ao fato da espessura da cauda do animal está diminuída, aproximando assim os eletrodos e ampliando os valores da amplitude do potencial de ação.

Neste estudo o número das fibras mielínicas, a área de secção transversa do nervo ciático e a densidade de fibras mielinizadas não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. Diferente dos resultados de Selagzi e cols (7) estudando o efeito da natação com protocolo de 8 semanas, em animais com neuropatia diabética que observou aos 28º dia após a indução uma diminuição significativa da espessura da bainha de mielina nos animais do grupo diabético sedentário, quando comparados com o grupo controle. Ao comparar o grupo dos animais diabéticos treinados com os não treinados observou um significativo aumento nos valores médios da espessura da bainha dos animais treinados.

Não existe um consenso sobre o período necessário, após a indução do diabetes, para ocorrer alterações nos nervos periféricos. Jakobsen (25) descreve uma diminuição da área de corte transversal das fibras mielínicas do nervo fibular, quatro semanas após indução do diabetes. Observou também que as fibras pequenas sofreram mais alterações do que as fibras maiores, pois àquelas apresentaram uma redução da bainha de mielina duas vezes maior.

Segundo Malone e cols (19) a idade do animal para a indução do diabetes é um importante fator a ser levado em consideração. Em seu trabalho ele induziu diabetes em animais com 6 semanas de idade e observou que após 20 semanas os animais apresentavam diminuição da bainha de mielina, maior densidade de fibras pequenas, diminuição do número de fibras grandes, no entanto a área axonal não demonstrou alterações. Ao induzir o diabetes nos animais com 26 semanas de idade, não foram observadas alterações na VCN nem grandes alterações quando comparou estes animais ao grupo controle.

Um outro estudo, após indução de 4 meses com estreptozotocina em ratos Wistar com peso 100g demonstrou que após este período houve uma ligeira redução axonal na área de secção transversa e uma redução das fibras mielínicas (26).

Desta forma, observa-se que os protocolos de indução são bastante diferentes. A literatura demonstra que os efeitos sobre as estruturas nervosas dependerão da idade de indução do diabetes, das dosagens, da droga administrada, do sexo e da espécie utilizada (27). Talvez isto explique a diferença dos nossos resultados, uma vez que há uma dificuldade de fazer uma comparação direta com os diferentes protocolos utilizados.

Em relação aos tamanhos das fibras, neste trabalho foi adotada a classificação de descrita por Chopra e cols (13). No entanto todos os estudo classificam as fibras apenas em pequenas e grandes sem detalhar como foram classificadas (7, 19, 21, 26) motivo pelo qual tornou-se difícil a comparação com os resultados do presente trabalho.

Os resultados do presente estudo sugerem que o período de avaliação pós-indução adotado nesse modelo pode não ter sido suficiente para promover a instalação de alterações nos parâmetros avaliados da estrutura do nervo ciático embora a diminuição da VCN possa sugerir ser um dos primeiros sinais da instalação do quadro de neuropatia diabética periférica.

Referências

1. De Angelis K, Pureza DY, Flores LJF, Rodrigues B, Melo KFS, Schaan BD, Irigoyen MC. Efeitos fisiológicos do treinamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50:1005-13.
2. Cambri LT, Decimo JP, Souza M, Oliveira FR, Gevaerd MS. Efeito agudo e crônico do exercício físico no perfil glicêmico e lipídico em diabéticos tipo 2. *Motriz.* 2007;13(6):238-48.
3. Gomes RJ, Leme JACA, Mello, MAR, Luciano, E, Caetano FH. Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. *Motriz.* 2008;14(3), 320-28.
4. American College of Sports Medicine. Exercise and type 2 diabetes. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 32(7): 1354-60, 2000.
5. Veves, A; Saouaf, R; Donaghue, VM; Mulloly, CA; Kistler, JA; Giurinin JM; Horton, ES; Fielding, RA. Aerobic exercise capacity remains normal despite impaired endothelial function in the micro and macrocirculation of physically active IDDM patients. *Diabetes.* 1997;46(11):1846-52
6. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F, Falluca F. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes and it Complication.* 2006; 20:216-23.

7. Selagzi H, Buyukakilli B, Cimen B, Yilmaz N, Erdogan S. Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest.* 2008;31(11):971-8.
8. Dall'ago P, Silva VOK, De Angelis KLD, Irigoyen MC, Fazan JR, Salgado, HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35: 843-9.
9. Nakao C, Ookawara T, Kizari T, Oh-Ishi S, Miyazaki H, Haga S, Sato Y, Ji LL, Ohno H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 649-54.
10. Király MA, Bates HE, Yue JTY, Goche-Montes D, Fediuc S, Park E, Matthews SG, Vranic M, Ridell M. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2007;56:732-44.
11. Massone F. *Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas.* Rio de Janeiro: Guanabara; 1988.
12. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology.* 2007;204:443–53.
13. Chopra JS, Dhand UK, Mehta S, Bakshi V, Rana S, Mehta J. Effect of protein calorie malnutrition on peripheral nerves. *Brain.* 1986;109:307-23.
14. Endo C. Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático em ratos. *Dissertação de Mestrado.* São Paulo (SP): USP; 2002.
15. Smith, AG; Singleton, JR. Idiopathic neuropathy, prediabetes and the metabolic syndrome. *Journal of the Neurobiological Sciences* 242:9-14, 2006.
16. Lemos ET, Reis F, Baptista S, Pinto R, Sepodes B, Vala H, Rocha-Pereira P, Silva AS, Teixeira F. Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. *Med Sci Monit.* 2007; 13(8):168-74.
17. Forjaz CLM, Tinucci T, Alonso DO, Negrão CE. Exercício físico e diabete. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 1998;5:981-90.
18. Oliveira CAM, Luciano E, Marcondes MCG, Mello MAR. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes and its Complications.* 2007;21:258-64.
19. Malone JJ, Lowitt S, Korthals JK, Salem A, Miranda C. The Effect of Hyperglycemia on Nerve Conduction and Structure Is Age Dependent. *American Diabetes Association.* 1996;45(2):209-15.

20. Jakobsen, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres. *Diabetologia*. 1976;12:547-53.
21. Mayer JH, Tomlinson DR. Prevention of defects of axonal transport and nerve conduction velocity by oral administration of myo-inositol or an ARI in streptozotocin-diabetic rat. *Diabetologia*. 1983; 25:433-8.
22. Greene DA, Chakrabarti S, Lattimer AS, Sima AAF. Role of sorbitol accumulation and myoinositol depletion in paranodal swelling of large myelinated nerve fibres in the insulin-deficient spontaneously diabetic biobreeding rat. *J Clin Invest*. 1987;79:1479-85.
23. Stevens MJ, Lattimer AS, Kamijo M, Van Huysen C, Sima AAF, Greene DA. Osmotically induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia*. 1993; 36:608-14.
24. Kato N, Nemoto K, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y, Uenoyama M, Ikeda T, Fujikama K. Nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor improves streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Diabetes*. 2005; 54:846-54.
25. Jakobsen, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. I. A study of cross sectioned nerves. *Diabetologia*. 1976;12:539-46.
26. Bestetti G, Rossi GL, Zemo C. Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1981; 54:129-34.
27. Gold G, Manning M, Heldt A, Nowlain R, Pettit JR, Grodsky, GM. Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin. Lack of protection by exogenous superoxide dismutase. *Diabetes* 1981; 30: 634-8.

Figura 1.

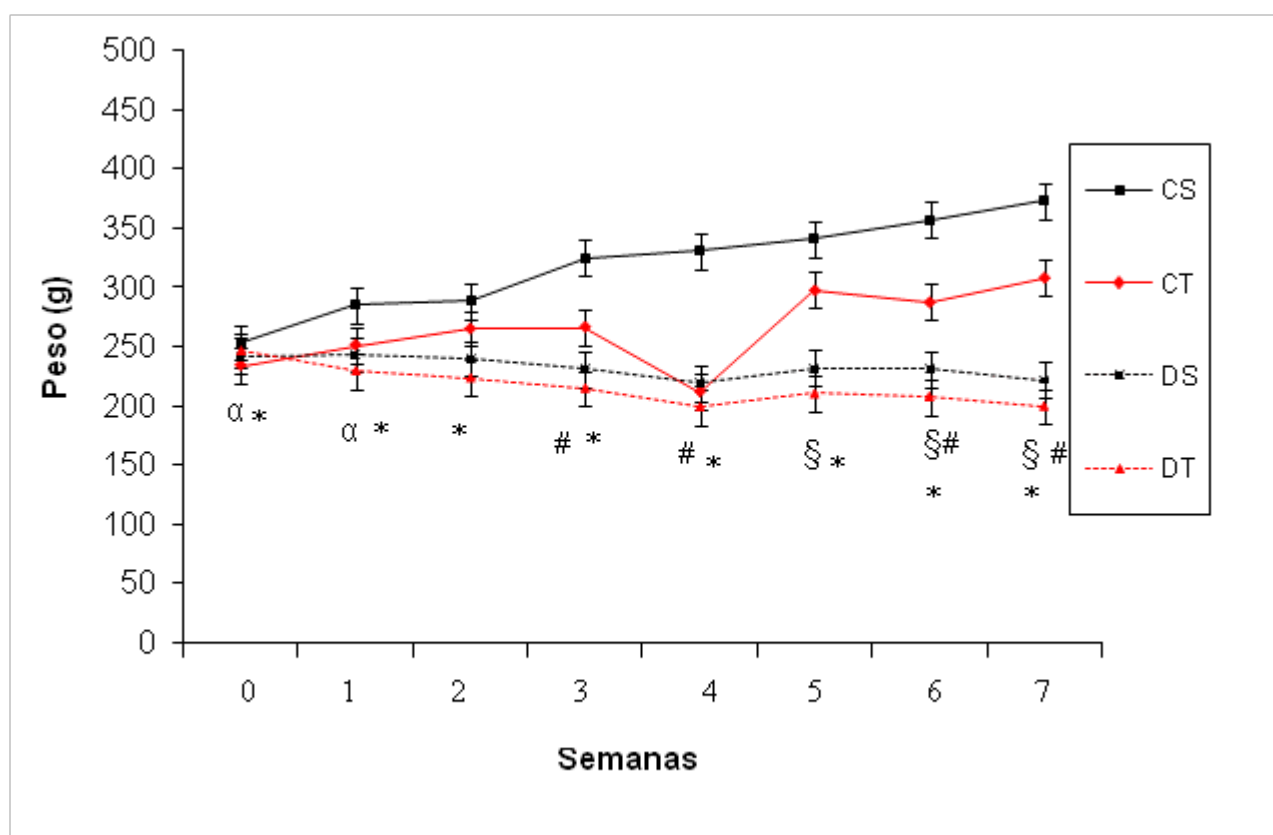
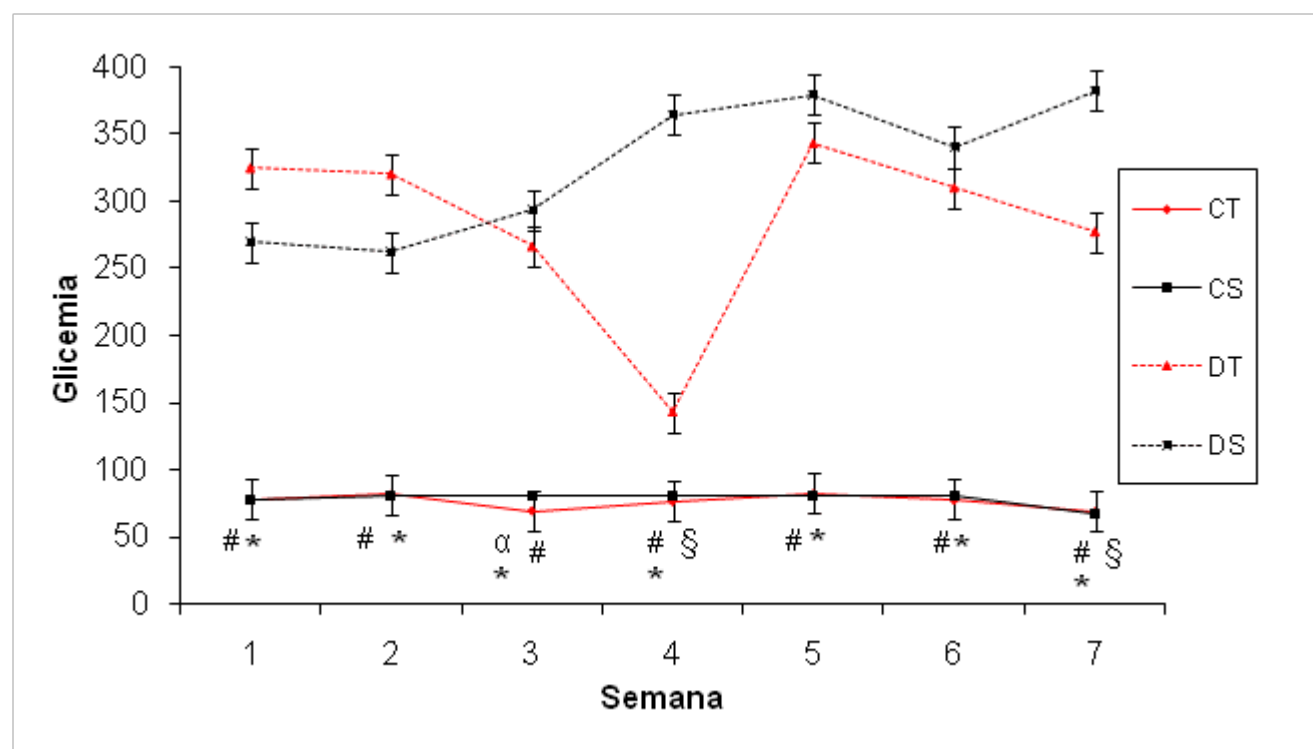


Figura 2.



Títulos e legendas das Figuras

Figura 1. Evolução ponderal dos animais dos quatro grupos estudados, durante todo o experimento. Valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

Legenda Figura 1. α DT X DS, $p \leq 0,02$; $\S$ CT X DT, $p \leq 0,002$; # CT X CS, $p \leq 0,03$;

* CS X DS, $p \leq 0,05$

Figura 2. Perfil glicêmico dos animais dos quatro grupos estudados, durante todo o experimento. Valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

Legenda Figura 1. α DT X DS; $\S$ CT X DT; # CT X CS; * CS X DS, $p \leq 0,05$

Tabela 1. Valores da velocidade de condução nervosa sensitiva (m/seg) do nervo caudal durante todo o experimento, expressos em médias e desvio padrão.

Semana/Grupo	GCS	GCE	Média	GDS	GDE	Média
S0	33,85±3,28	33,69±1,78	33,77±0,11	35,87±2,02	35,59±1,76	35,73±0,19
S1	35,02±1,89	38,14±2,75	36,58±2,20	---	---	---
S2	36,66±1,97	39,29±1,96	37,97±1,85	35,93±3,03	40,84±2,73	38,38±3,47
S3	40,62±2,67	41,67±3,10	41,14±0,74	36,73±3,24	39,13±1,87	37,93±1,69
S4	38,97±3,58	39,62±1,90	39,29±0,45	40,03±3,00	40,67±2,39	40,35±0,45
S5	41,91±1,94	42,56±3,13	42,23±0,45	38,57±2,03	38,27±2,37	38,42±0,21
S6	42,20±2,55	40,00±2,71	41,1±1,55	39,52±2,43	41,07±2,13	40,29±1,09
S7	44,30±1,85	47,47±4,01	45,88±2,24	39,25±2,17	38,61±3,16	38,93±0,45
Média	39,20±3,72	40,31±3,93	39,75±0,78	37,99±1,76	39,17±1,94	38,58±0,83

S= semana; GCS - grupo controle sedentário; GCE – grupo controle treinado; GDS: grupo diabético sedentário; GDE – grupo diabético treinado.

--- dados não coletados

Tabela 2. Valores da amplitude do potencial de ação (mV), pico a pico, do nervo caudal, durante todo o experimento, expressos em médias e desvio padrão.

Semana/Grupo	GCS	GCE	Média	GDS	GDE	Média
S0	29,29±4,36	30±7,27	29,64±0,50	32,97±8,43	32,40±6,25	32,68±0,40
S1	38,02±10,77	37,47±6,79	37,74±0,38	---	---	---
S2	45,81±10,77	46,04±7,35	45,92±0,16	57,35±12,14	58,37±11,94	57,86±0,72
S3	57,15±9,79	57,96±7,19	57,55±0,57	62,70±14,79	80,03±12,00	71,36±12,25
S4	66,65±18,68	61,57±9,22	64,11±3,59	82,16±13,64	84,53±14,36	83,34±1,67
S5	70,93±10,96	68,80±7,14	69,86±1,50	72,28±15,94	98,31±16,60	85,29±18,40
S6	77,31±12,04	81,66±16,89	79,48±3,07	89,64±25,39	93,57±24,67	91,60±2,77
S7	87,87±17,41	85,28±10,39	86,57±1,83	103,12±24,89	110,59±21,00	106,85±5,28
Média	57,92±19,41	59±19,84	58,46±0,76	69,25±18,26	76,41±21,93	72,83±5,06

S= semana; GCS - grupo controle sedentário; GCE – grupo controle treinado; GDS: grupo diabético sedentário; GDE – grupo diabético treinado.

--- Dados não coletados

Tabela 3. Comparação do número de fibras mielínicas, área de secção transversa do nervo ciático e densidade das fibras nervosas mielínicas, presentes nos grupos Controle Sedentário (GCS), controle treinado (GCE), diabético sedentário (GDS), Diabético Treinado (GDE).

Valores expressos em média e desvio padrão

Parâmetro	Grupos			
	GCS	GCE	GDS	GDE
Número de fibras mielínicas	7584,75±416,05	6862,25±1337,92	6868±1635,62	6008,5±1589,11
Área de secção Transversa	128,62±30,59	99,10±44,71	90,96±18,25	78,95±15,27
Densidade das fibras mielínicas	60,80±10,33	82,45±45,90	77,09±19,82	75,83±10,83

Tabela 4. Classificação das fibras mielínicas presentes no nervo ciático, de acordo com seu diâmetro, em Fibras Pequenas (FP), Fibras Intermediárias (FI) e Fibras Grandes (FG), presentes nos grupos Controle Sedentário (GCS), controle treinado (GCE), diabético sedentário (GDS), Diabético Treinado (GDE). Valores expressos em média e desvio padrão.

Tipo de Fibras	Grupos			
	GCS	GCE	GDS	GDE
FP	403,5±146,4	447±209,01	451,5±114,13	439,25±96,90
FI	280±29,68	286,25±54,90	362,5±39,11	339,5±71,28
FG	24±27,99	30,75±23,76	21±6,83	21,25±20,13

Carta de envio do artigo Original à Revista Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

[ABEM] Agradecimento pela Submissão

De:  **ABE&M - editores** (abem-editoria@endocrino.org.br)

 Você pode não conhecer este remetente. [Marcar como confiável](#) | [Marcar como lixo](#)

Enviada: segunda-feira, 29 de junho de 2009 0:56:28

Para: Juliana Netto Maia (juliananettomaia@hotmail.com)

Prezado Dr. (Dra.) Juliana Netto Maia:

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "ABEM-681 - AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO NERVO CIÁTICO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL SUBMETIDOS À NATAÇÃO" para os Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Através da interface de administração do sistema utilizado nesta submissão, será possível acompanhar o progresso da avaliação editorial.

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EFEITO DO TREINO DE NATAÇÃO SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL¹

EFFECT OF SWIMMING TRAINING ON BONE TISSUE OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES¹

Marina Hazin Galvão², Celina Cordeiro de Carvalho³, Sílvia Regina Arruda de Moraes⁴.

Resumo: O presente estudo investigou as repercussões do nado livre na remodelagem do tecido ósseo em ratos diabéticos. Foram utilizados quarenta ratos machos albinos, da linhagem *Wistar*, com 60 dias de idade, sendo distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=10): controle sedentário (GCS), controle exercitado (GCE), diabético sedentário (GDS) e diabético exercitado (GDE). Aos 60 dias de vida induziu-se o diabetes pela administração de estreptozotocina (60 mg/kg). Após a confirmação do diabetes foi realizada semanalmente a verificação, em todos os grupos, do peso corpóreo e da glicemia e os grupos de animais exercitados foram submetidos a um protocolo de treinamento físico composto por 6 semanas de natação, sendo realizado 5 dias por semana. Após esse período os animais foram anestesiados e houve coleta dos fêmures direitos. O peso do fêmur foi aferido através de uma balança de precisão, e o comprimento estimado com um paquímetro (0,02mm). Foi realizada a análise estatística dos dados através do teste t-Student ($p \leq 0,05$). Foi observada redução no peso corpóreo, no peso do fêmur e no comprimento do fêmur dos animais do GDS em relação aos do GCS; e dos animais do GDE em relação aos do GCE. Os achados sugerem que o diabetes provocou uma redução no peso corpóreo dos animais e no peso e comprimento do fêmur e o protocolo de exercício físico com natação aplicado aos animais não foi eficaz para reverter esse déficit no tecido ósseo.

Palavras-chave: Diabetes experimental, Natação, Tecido ósseo.

Abstract: This study was carried out to investigate the consequences of swimming activities on remodeling diabetic rats bone tissues. Forty 60 days old albino male rats of the *Wistar* strain were randomly divided into four groups (n=10): sedentary control (SCG), exercised control (ECG) sedentary diabetic (SDG) and exercised diabetic (EDG). Diabetes was induced by injecting them with 60mg/kg body weight streptozotocin. Upon confirmation of diabetes, all animals were weekly weighed and glycemia level measured and groups of exercised animals were submitted to an exercise training protocol for six weeks/five days a week. After this period the animals were anesthetized to have their right femurs collected. The Femoral bones were weighted with a precision scale and length measured with a pachymeter (0,02mm). An statistical t-Student ($p \leq 0,05$) test was used to asses the data. There was a reduction in body weight and femoral weight and length of the GDS animals in relation to the GCS ones, and GDE animal as compared to GCE ones. The findings suggest that diabetes resulted in a reduced animal body weight and femoral weight and length. The swimming training protocol was not effective in restoring bone tissue deficit on animals.

Keywords : Experimental diabetes, Swimming, Bone tissue.

¹ Trabalho de conclusão do Curso de Fisioterapia - UFPE, desenvolvido no Departamento de Anatomia/UFPE .

² Graduanda do curso de Fisioterapia – UFPE.

³ Co-Orientadora, Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento – UFPE.

⁴ Orientadora, Professora Doutora do Departamento de Anatomia – UFPE.

INTRODUÇÃO

O osso é um tecido extremamente ativo. No esqueleto em desenvolvimento, as atividades metabólicas estão voltadas, primariamente, para o crescimento e a modelação óssea, processos pelos quais o osso atinge sua forma e seu tamanho, enquanto que no adulto, há envolvimento predominante da remodelação (SZEJNFELD, 2000; AMADEI et al, 2006).

O crescimento compreende o desenvolvimento de toda estrutura esquelética, tanto na largura quanto no comprimento, fenômeno controlado principalmente pelo sistema endócrino. Por sua vez, a modelagem é responsável pelo aumento da resistência óssea, pelo ganho de massa e corresponde principalmente ao tamanho ósseo (BARROS et al, 2008). Esta fase se caracteriza pela intensa osteogênese e as atividades das células osteoblásticas e osteoclásticas são independentes (GENESER, 2004). Já o processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), as quais são caracterizadas pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos, com o objetivo de promover a remoção localizada do osso antigo (reabsorção) e substituição por osso recentemente formado, respectivamente (AMADEI et al, 2006). Esse evento continua por toda a vida adulta do indivíduo, sendo responsável pela renovação do esqueleto e manutenção de sua integridade anatômica e estrutural (AMADEI et al, 2006; ERIKSEN, FATOURECHI, KHOSLA, 2007; BARROS et al, 2008).

A remodelação óssea deve ser regulada rigorosamente por fatores locais e sistêmicos, pois desvios significativos do equilíbrio entre reabsorção e formação implicariam perda ou ganho ósseo com possíveis consequências em termos de aumento do risco de fraturas (ERIKSEN, FATOURECHI, KHOSLA, 2007).

O Diabetes Mellitus é um distúrbio crônico que afeta o metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, resultante, de forma geral, da diminuição da ação insulínica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008). O desequilíbrio metabólico consequente do Diabetes Mellitus insulino-dependente (DMID) afeta vários sistemas que tem relações de interdependência. No sistema ósseo, compromete seu metabolismo, seu crescimento e seu desenvolvimento (SOUZA e LUCIANO, 2005).

O hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento do tipo insulina I (IGF-I) desempenham um papel importante na manutenção da massa muscular, agindo também como um fator anabolizante do osso. Além disso, os níveis circulantes de IGF-I desempenham um papel importante na remodelação óssea, e mantém uma relação direta sobre o crescimento ósseo linear (GOMES et al, 2006).

Os mecanismos fisiopatológicos relacionados à perda óssea no DMID parecem incluir redução da atividade osteoblástica, alteração do metabolismo fosfocálcico, diminuição da síntese colágena ou produção reduzida do fator de crescimento do tipo insulina I (IGF-I) e insulina (VARGAS et al, 2003). Os baixos níveis de insulina no diabetes tipo I podem causar uma redução da densidade mineral óssea (ROSHOLT, HEGARTY, 1981; SCHWARTZ, 2003; DOMINGUEZ, 2004; GOMES et al, 2006).

Por outro lado, são conhecidos os efeitos osteogênicos dos exercícios sobre o sistema esquelético (SOUZA et al, 2005). As forças mecânicas induzidas pelo exercício físico agem sobre os osteoblastos para formar novo tecido, adaptando-o aos estímulos externos. De forma similar, a ação muscular resulta em estresse mecânico no osso gerando potenciais elétricos que afetam o equilíbrio da atividade osteoblástica e osteoclástica, induzindo-o a novas modificações (VERHAEGHE et al, 2000; BARROS et al, 2008).

A redução da glicemia e o aumento dos pulsos basais nos níveis de GH e IGF-I nos indivíduos treinados podem atuar na promoção do desenvolvimento ósseo (SOUZA et al, 2005). Além disso, exerce um papel importante na remodelação óssea, e tem uma relação direta com o crescimento linear do osso (GOMES et al, 2006).

Gomes et al. (2003) e Souza e Luciano (2005) ao utilizarem carga de 2,5 e 5% do peso corporal, respectivamente, não encontraram diferenças expressivas no crescimento ósseo como resultado do treinamento entre os animais diabéticos.

Contudo, as informações sobre a influência do nado livre sobre a remodelação óssea em ratos diabéticos ainda são insuficientes. Assim, o objetivo do trabalho é esclarecer os efeitos da natação no tecido ósseo, sem carga, considerando os potenciais efeitos anabólicos da atividade física sobre o sistema esquelético.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

No estudo, foram utilizados 40 ratos machos albinos da linhagem *Wistar*, com idade de 60 dias, provenientes da colônia de criação do biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia em gaiolas coletivas (máximo, 5 animais/gaiola). Permaneceram

em um ciclo claro/escuro de 12:12 horas (claro das 6 às 18 horas e escuro das 18 às 6 horas), submetidos à temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ com livre acesso à ração (Purina®) e à água filtrada.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (ofício nº 59/08).

Grupos

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais, cada um composto por 10 animais: Grupo Controle Sedentário (GCS) constituído por animais saudáveis, não diabéticos, não submetidos ao treinamento de natação; Grupo Controle Treinado (GCT) constituído por animais saudáveis, não diabéticos, submetidos ao treinamento de natação; Grupo Diabético Sedentário (GDS) constituído por animais com diabetes experimental, sem qualquer tipo de tratamento, não submetidos ao treinamento; e Grupo Diabético Treinado (GDT) constituído por animais portadores de diabetes experimental, sem qualquer tipo de tratamento, submetidos ao treinamento de natação.

Indução do Diabetes

Aos 60 dias de idade, com os animais pesando em torno de 250g, foi realizada a indução do diabetes através da administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 12 horas. A estreptozotocina (STZ) foi diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal. O grupo controle recebeu, da mesma forma, doses equivalentes de solução tampão citrato de sódio, e decorridos 30 minutos do tratamento todos os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO et al., 2002).

Verificação da glicemia e do peso

A verificação da glicose sanguínea foi realizada antes da indução do diabetes após um jejum de 12 horas e no terceiro dia após a administração de STZ, por punção na cauda do rato para obtenção de uma gota de sangue que foi depositada em glicofita (Accu-Chek – Roche®),

para leitura em glicosímetro específico (Glicosímetro Accu-Chek – Roche®). Apenas os animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dl foram incluídos nos grupos diabéticos. Após a confirmação do diabetes foi realizada semanalmente a verificação, em todos os grupos, da glicemia (após jejum de 12h) e do peso corpóreo (balança Filizola BP6).

Protocolo de exercício

Os grupos de animais treinados foram submetidos ao protocolo de treinamento físico composto por 6 semanas de natação, 5 dias por semana. A primeira semana (semana de condicionamento) foi caracterizada por treinos que começaram com 10 minutos e a cada dia ocorreu um acréscimo de mais 10 minutos, de forma que ao final do quinto dia da semana o animal havia nadado durante 50 minutos. Nas outras cinco semanas foram realizados treinos com duração de 60 minutos, de segunda a sexta (NAKAO et al, 2000).

O treino foi realizado em um tanque de natação com 60 cm de diâmetro e 60cm de profundidade. A temperatura da água foi controlada por um termostato que a manteve em 32°C (± 1).



Após o treinamento os ratos permaneceram, por 20 minutos, em uma câmara de aquecimento para a secagem dos pêlos, e em seguida retornaram ao biotério (KIRÁLY et al, 2007). Os animais dos grupos não treinados se limitaram em atividades dentro da própria gaiola.



Coleta e Análise do material

Após completar as seis semanas de treinamento, os animais de todos os grupos, foram pesados (balança Filizola BP6) e anestesiados, via intramuscular, com uma solução de xilazina (Rompum[®] – Bayer) (0,05ml/100g peso) e cloridrato de quetamina (Ketalar[®]) (0,25ml/100g peso).

Em seguida, procedeu-se uma incisão desde a região abdominal inferior direita até o terço inferior da coxa para evidenciação e desarticulação do fêmur. Após coletado, o osso foi totalmente dissecado para remoção das partes moles e realização das mensurações. Para aferição do peso do fêmur, utilizou-se uma balança de precisão (Denver Instrument Company AA-160). O comprimento do fêmur foi aferido com auxílio de um paquímetro (Dial Calipers - Western, acurácia: 0,02mm), desde a cabeça do fêmur até a superfície articular dos côndilos femorais.

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados encontrados, utilizou-se o programa Bioestat 5.0 (disponível gratuitamente na internet), onde foi usado o Teste t-Student. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, utilizando 95% como nível de significância.

RESULTADOS

O peso corpóreo dos grupos Diabéticos permaneceu menor quando comparado ao grupo Controle sedentário. Não houve diferença no peso corpóreo dos grupos Diabéticos sedentário e treinado (Fig. 1).

A partir da 1ª semana de treino observou-se uma diminuição do peso corpóreo nos animais do grupo Diabético sedentário quando comparado ao grupo Controle sedentário. A partir da 2ª semana do treinamento físico o peso corpóreo do grupo Diabético exercitado apresentou-se menor que o grupo Controle exercitado (Fig. 1).

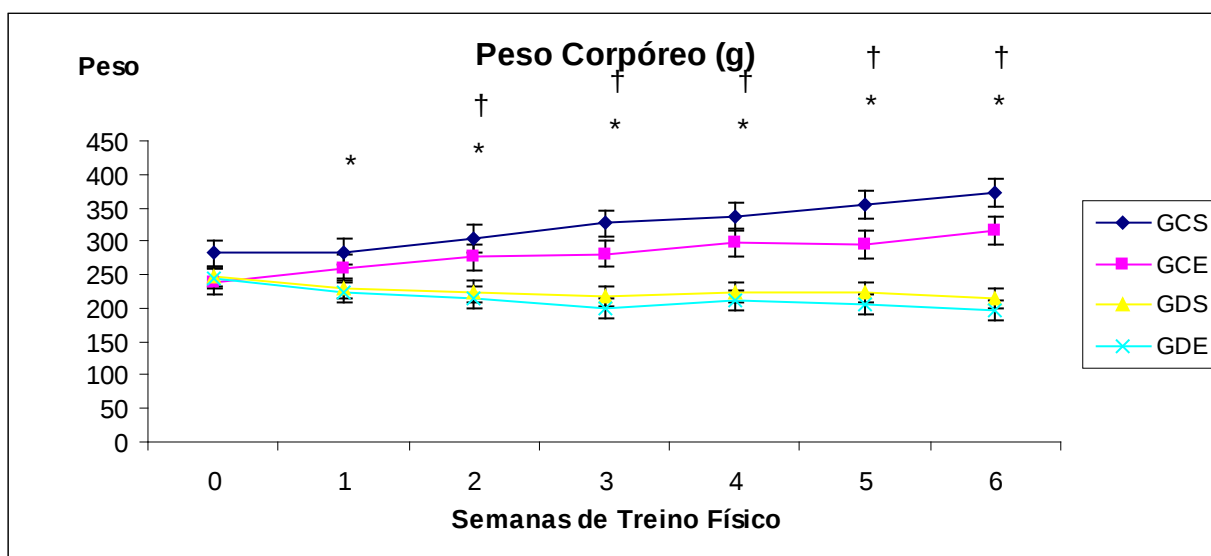


Figura 1 – Efeito do Diabetes experimental e do exercício de nado livre sobre o peso corpóreo dos animais. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão, utilizando teste t-Student. GCS= grupo controle sedentário; GCE= grupo controle exercitado; GDS= grupo diabético sedentário e GDE= grupo diabético exercitado. * $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCS x GDS e † $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCE x GDE.

Não houve diferença nos níveis glicêmicos dos animais dos grupos Controle sedentário e exercitado. Verificou-se a partir da 1ª semana de treinamento físico um aumento da glicemia dos animais dos grupos Diabético sedentário e Diabético exercitado quando comparado com os animais dos grupos Controle sedentário e Controle exercitado,

respectivamente. Na 3ª, 5ª e 6ª semana de treino houve uma diminuição da glicemia dos animais do grupo Diabético exercitado em relação aos do grupo Diabético sedentário (Fig. 2).

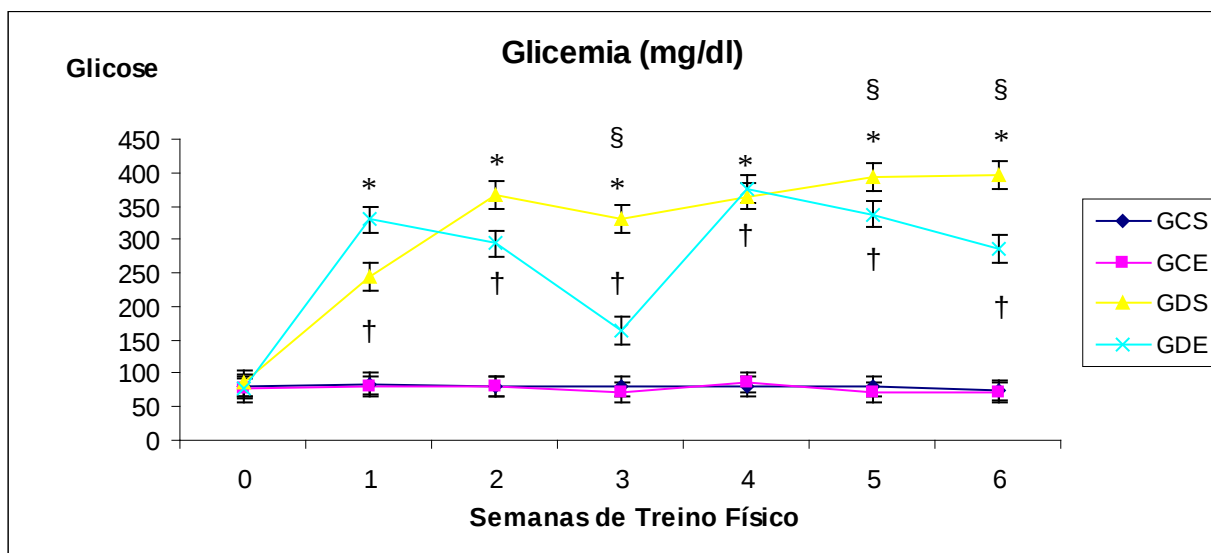


Figura 2 – Efeito do Diabetes experimental e do exercício de nado livre sobre glicemia dos animais. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão, utilizando teste t-Student. GCS= grupo controle sedentário; GCE= grupo controle exercitado; GDS= grupo diabético sedentário e GDE= grupo diabético exercitado. * $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCS x GDS; † $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCE x GDE e § $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GDS x GDE.

Houve redução de 34,77% do peso do fêmur dos animais do grupo diabético sedentário em relação aos do grupo controle sedentário e de 28,72% nos animais do grupo diabético exercitado em relação ao grupo controle exercitado. Não houve diferenças expressivas no peso absoluto como resultado do treinamento entre os diabéticos (GDS, GDE), tampouco entre os controles (GCS, GCE), (Fig. 3).

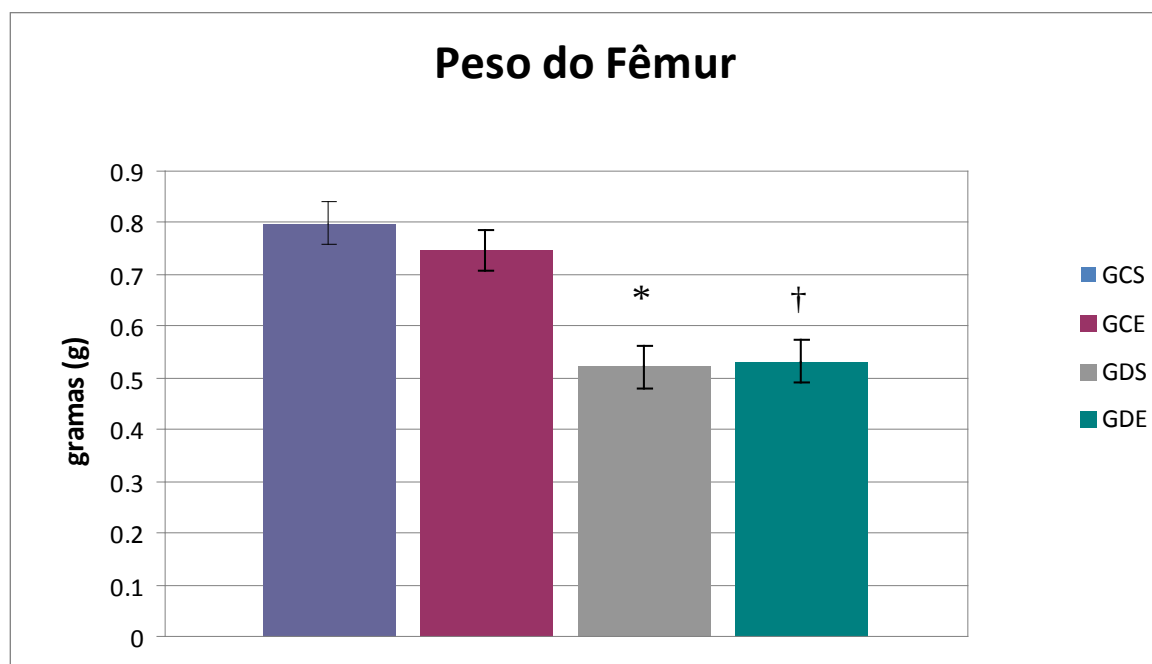


Figura 3 – Efeito do Diabetes experimental e do exercício de nado livre sobre o peso do fêmur dos animais. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão, utilizando teste t-Student. GCS= grupo controle sedentário; GCE= grupo controle exercitado; GDS= grupo diabético sedentário e GDE= grupo diabético exercitado. * $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCS x GDS e † $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCE x GDE.

Observou-se redução no comprimento do fêmur dos animais do grupo diabético sedentário em relação aos do grupo controle sedentário, de 9,75%; e dos animais do grupo diabético exercitado em relação aos do grupo controle exercitado, de 7,78%. Não houve diferenças expressivas no comprimento como resultado do treinamento entre os diabéticos (GDS, GDE), tampouco entre os controles (GCS, GCE), (Fig. 4).

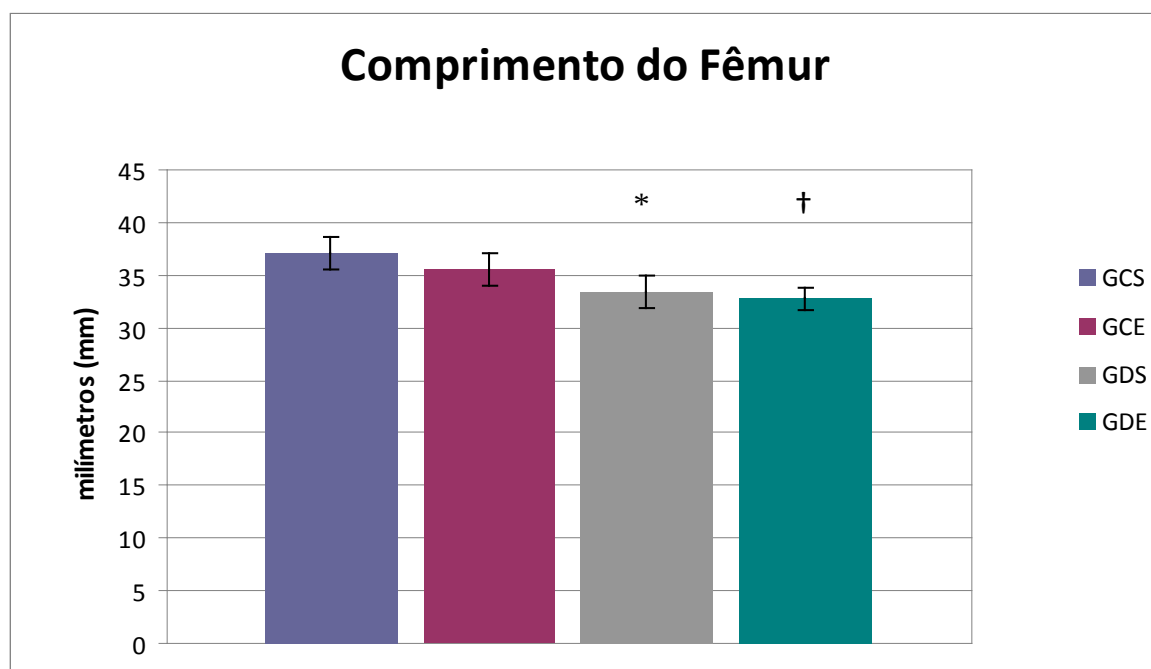


Figura 4 – Efeito do Diabetes experimental e do exercício de nado livre sobre o comprimento do fêmur dos animais. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão, utilizando teste t-Student. GCS= grupo controle sedentário; GCE= grupo controle exercitado; GDS= grupo diabético sedentário e GDE= grupo diabético exercitado. * $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCS x GDS e † $p \leq 0,05$ para a comparação entre os grupos GCE x GDE.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos do peso corpóreo dos animais diabéticos quando comparados aos controles estão de acordo com o esperado do quadro de Diabetes Mellitus, ou seja, menor ganho de peso corporal. Semelhante a este estudo, Reddy et al. (2001), Lerco et al. (2003) e Duarte et al. (2005) confirmaram a redução do aumento do peso dos animais em estado diabético. Não foram encontrados estudos que relatem a relação de perda de peso corporal e diabetes mellitus tipo 1. Supõe-se que essa redução do peso seja devido às alterações provocadas pela doença no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras (SOUZA e LUCIANO, 2005).

No presente estudo, a indução do diabetes, pela administração da droga estreptozotocina, promoveu elevação dos níveis glicêmicos, reproduzindo um quadro já descrito pela literatura (SZKUDELSKI, 2001). Esta elevação da glicemia está diretamente

relacionada à destruição das células betas pancreáticas, que provoca uma redução da produção de insulina. Sem este hormônio, a captação de glicose pelos tecidos periféricos é diminuída, resultando, assim, em hiperglicemia, que é uma das principais características da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

O grupo diabético submetido ao treinamento físico mostrou redução da glicemia em relação ao grupo diabético sedentário. Esses achados corroboram aos de Luciano e Mello (1998); Souza e Luciano (2005); Gomes et al. (2006); Gomes et al. (2008) que ao compararem animais diabéticos sedentários e treinados, observaram redução significativa das concentrações séricas de glicose nos grupos que praticaram exercício físico.

O protocolo de treinamento físico imposto no presente estudo aumentou a captação periférica de glicose, dada pelo aumento do fluxo sanguíneo muscular. Estudos apontam que em indivíduos treinados há uma maior sensibilidade à insulina das células musculares, pois há aumento no número de transportadores de glicose insulino-sensíveis (GLUT 4) para as membranas celulares e túbulos T nos músculos, aumentando, conseqüentemente, a captação dessa hexose, além do aumento da ligação da insulina ao seu receptor (IR) (HARDIN, DOMINGUEZ e GARVEY, 1993; GOMES et al., 2003; SOUZA e LUCIANO, 2005; GOMES et al., 2009).

No presente estudo foi observado ainda um aumento da glicemia do grupo Diabético exercitado ao final da 4ª semana de treino, explicado pelo fato de diferentes estados insulinêmicos poderem interferir nas respostas metabólicas durante e após o exercício físico, fazendo com que o exercício melhore ou, até, deteriore o controle glicêmico do indivíduo diabético. Na ausência de insulina ou numa condição de controle inadequado do diabetes, mesmo o exercício leve a moderado pode provocar aumento da glicemia de indivíduos diabéticos. Nessa situação, apesar da captação de glicose aumentar durante o exercício, os baixos níveis de insulina levam ao aumento exagerado da produção hepática de glicose resultando no aumento da glicemia (FORJAZ et al., 1998).

O peso do fêmur apresentou-se significativamente menor nos grupos dos animais diabéticos corroborando com os achados de Duarte et al. (2005) e Botolin e McCabe (2007) que observaram perda progressiva da massa óssea em ratos diabéticos, com diminuição da espessura trabecular, aumento dos espaços intertrabeculares, aumento da adiposidade na medula óssea e redução do conteúdo e densidade mineral óssea, respectivamente.

Evidências sugerem que o desenvolvimento de osteopenia em pacientes diabéticos pode estar relacionado com uma série de fatores, tais como a inibição da formação da matriz do colágeno, alterações na síntese protéica, diminuição da síntese de proteoglicanas no

desenvolvimento da cartilagem e do osso, e diminuição da deposição óssea de cálcio (BROWNLEE, 2001; DUARTE et al., 2005). O diabetes tem um efeito deletério sobre o volume ósseo devido à redução da remodelação óssea, pela menor ação da insulina sobre os osteoblastos e uma menor porcentagem de superfície osteóide e síntese de osteocalcina, bem como o aumento do tempo para a mineralização do osteóide (HERRERO et al. 1998).

Thrailkill et al. (2005) estudaram a influência do diabetes tipo 1 sobre a formação óssea em ratos submetidos a distração osteogênica da tíbia e verificaram através de análise radiográfica e histológica que houve uma redução da formação óssea e mineralização das lacunas na distração no grupo composto por animais diabéticos. A inibição da formação óssea no grupo diabético tratado foi impedida pelo tratamento com insulina. Houve também diminuição dos níveis séricos de osteocalcina no grupo diabético, confirmando a diminuição da atividade osteoblástica, uma vez que essa funciona como marcador do metabolismo ósseo.

Além disso, Lu et al. (2003) através da ablação da medula óssea, analisaram maior expressão dos genes que codificam a osteocalcina e o colágeno tipo I em ratos normais quando comparados a ratos diabéticos. E ainda verificaram maior expressão desses genes quando realizou tratamento com insulina em animais diabéticos, sendo evidenciada a eficácia do tratamento com insulina.

O crescimento ósseo longitudinal dos animais deste estudo, avaliado pela aferição do comprimento do fêmur demonstrou que os diabéticos apresentaram um déficit do crescimento longitudinal em relação aos controles. Esse resultado está de acordo com os achados de Souza e Luciano (2005) e Gomes et al. (2003) que verificaram atraso no crescimento esquelético dos animais, avaliado pela aferição da área das tíbias e Abbassy, Watari, Soma (2008) que observaram redução no crescimento craniofacial de ratos diabéticos através de cefalometria dos ossos do crânio e mandíbula.

O crescimento ósseo longitudinal é um fenômeno complexo que envolve diversos mecanismos regulatórios influenciados pelo GH. Sua ação sobre o crescimento é indireta, atuando no estímulo da diferenciação celular, síntese de colágeno e fornecimento energético, mediados pelos fatores de promoção do crescimento (Insulin-Like Growth Factors – IGF-I e IGF-II) (LUCIANO e MELLO, 1998; CHIARELLI, GIANNINI, MOHN, 2004). Estudos demonstraram que o hormônio do crescimento, em ratos diabéticos, encontra-se em um nível muito abaixo do normal, comparados com ratos não diabéticos (LUCIANO e MELLO, 1998; GOMES et al., 2003).

O treinamento físico em contrapartida, além de ser benéfico à saúde, pode elevar os níveis de GH, contribuindo assim para o desenvolvimento ósseo. Contudo, no presente

estudo, não foi encontrado alterações no crescimento ósseo influenciado pelo exercício. Nguyen et al. (1998) relata que a secreção de hormônios anabólicos parece estar mais relacionada aos exercícios de curta duração e alta intensidade.

A densidade mineral óssea (DMO) é um resultado do processo dinâmico entre formação e reabsorção do tecido ósseo chamado de remodelação. Sua manutenção é muito importante para a prevenção da osteoporose causada pelo diabetes, uma vez que este reduz a massa óssea pela diminuição da ação insulínica, no qual a matriz e os minerais ósseos são perdidos devido ao excesso de reabsorção óssea em relação à formação (DOMINGUEZ, 2004; CADORE, BROWN e SHARPLESS, 2004; BRENTANO e KRUEL, 2005). Numerosos estudos indicam que a atividade física está positivamente relacionada com a DMO, sendo um importante fator na sua conservação (JIMENEZ, 1997; DAVICCO et al., 1999; IWAMOTO, TAKEDA e SATO, 2005).

As respostas na remodelagem óssea ocorrem por meio de força gravitacional e pela ação intensa dos músculos ligados ao osso, ou seja, por cargas mecânicas (CREIGHTON et al., 2001). Conclui-se, então, que o estímulo osteoblástico (formação de osso) ocasionado pelo treinamento físico acontece por aplicação de carga mecânica sob a estrutura esquelética, podendo o estresse ser causado por tensão, compressão, torção ou cisalhamento do tecido ósseo (MOTTINI, CADORE e KRUEL, 2008).

Sugere-se que o aprimoramento da massa óssea em situação de exercício seja pelo efeito piezelétrico, na qual a deformação do osso provoca alteração no campo elétrico ósseo, estimulando a atividade celular e levando à deposição de minerais nos pontos de estresse (NUNES, DUARTE e OURIQUES, 2001; CADORE, BRENTANO e KRUEL 2005).

Estudos têm demonstrado que a atividade física com uso de carga (exercícios que exigem impacto) aumenta a massa óssea e estimula o crescimento ósseo longitudinal, quando comparados à natação. Fehling et al. (1995) observaram maior densidade mineral óssea em atletas que praticavam ginástica olímpica e vôlei quando comparadas as que nadavam. Exercícios caracterizados por alta força de compressão axial, como a corrida, exercem maior influência sobre a densidade mineral óssea, indicando o maior efeito da osteogênese induzido por estímulos mecânicos (DUNCAN et al., 2002; YUNG et al., 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, a prática de modalidades esportivas consideradas de alto impacto promovem maior deposição de minerais no tecido ósseo (GRIMSTON et al., 1993, CREIGHTON et al., 2001, GINTY et al., 2005, EGAN et al., 2006). Por outro lado, estudos que utilizaram exercícios sem carga, como o nado livre, demonstraram haver adaptações significativas na deposição de minerais (GINTY et al., 2005; DERMAN et al., 2008), sendo a natação importante para uma melhor composição corporal, aumento da massa magra e diminuição de gordura.

REFERÊNCIAS

ABBASSY, M.A.; WATARI, I; SOMA, K. Effect of experimental diabetes on craniofacial growth in rats. Archives of oral biology, v. 53, p. 819 - 825, 2008.

AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V.A.S; PEREIRA, A.C.; CARVALHO, Y.R.; ROCHA, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. J. Bras. Patol. Med. Lab., v.42, n.1, p. 5 -12, fev. 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, v. 31, supplement 1, jan/2008.

BAGI, C.M.; WILKIE, D.; GEORGELOS, K.; WILLIAMS, D.; BERTOLINI, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. Bone, 21(3): p. 261-267, 1997.

BARROS, R.V.; ABAD, C.C.C.; KISS, M.A.P.D.; SERRÃO, J.C. Massa óssea e atividade física na infância e adolescência. Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte, 7 (1): p. 109-118, 2008.

BOTOLIN, S.; McCABE, L.R. Bone Loss and Increased Bone Adiposity in Spontaneous and Pharmacologically Induced Diabetic Mice. Endocrinology, 148(1): p. 198–205, jan. 2007.

BROWN, S.A.; SHARPLESS, J.L. Osteoporosis: An Under appreciated Complication of Diabetes. Clinical Diabetes, v. 22, n. 1, 2004.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v.414, p. 813 - 820, dez. 2001.

CADORE, E.L.; BRENTANO, M.A.; KRUEL, L.F.M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. *Rev Bras Med Esporte*, v. 11, n. 6, nov/dez 2005.

CHIARELLI, F.; GIANNINI, C.; MOHN, A. Growth, growth factors and diabetes. *European Journal of Endocrinology* 151, p. 109 – 117, 2004.

CREIGHTON, D.L.; MORGAN, A.L.; BOARDLEY, D.; BROLINSON, G. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *J Appl Physiol*, v.90, p. 565–570, 2001.

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

DAVICCO, M.J.; MOLTENI, M.N.L.H.; MEUNIER, N.G.; LEBECQUE, P.; COXAM, V.; BARLET, J.P. Endurance training and bone metabolism in middle-aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 109, p. 83-96, 1999.

DERMAN, O.; CINEMRE, A.; KANBUR, N.; DOGAN, M.; KILIÇ, M.; KARADUMAN, E. Effect of swimming on bone metabolism in adolescents. *The Turkish Journal of Pediatrics*, v. 50, p. 149-154, 2008.

DOMINGUEZ, L.J.; MURATORE, M.; QUARTA, E.; ZAGONE, G.; BARBAGALLO, M. Osteoporosi e diabete mellito. *Reumatismo* 56(4): p. 235-24, 2004.

DUARTE, V.M.G.; RAMOS, A.M.O.; REZENDE, L.A.; MACEDO, U.B.O.; NETO, J.B.; ALMEIDA, M.G.; REZENDE, A.A. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab* v.23, p. 58 - 68, 2005.

DUNCAN, C.S.; BLIMKIE, C.J.R.; COWELL, C.T.; BURKE, S.T.; BRIODY, J.N.; HOWMAN-GILES, R. Bone mineral density in adolescent female athletes: relationship to exercise type and muscle strength. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 34, n. 2, 2002.

EGAN, E.; REILLY, T.; GIACOMONI, M.; REDMOND, L.; TURNER, C. Bone mineral density among female sports participants. *Bone*, v. 38, p. 227–233, 2006.

ERIKSEN, E.F.; FATOURECHI, G.Z.E; KHOSLA, S. Remodeling and Vascular Spaces in Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 22, n. 1, 2007.

FEHLING, P.C.; ALEKEL, L.; CLASEY, J.; RECTOR, A.; STILLMAN, R.J. A Comparison of Bone Mineral Densities Among Female Athletes in Impact Loading and Active Loading Sports. *Bone*, v. 17, n. 3, p. 205 – 210, set. 1995.

FORJAZ, C.L.de M.; TINUCCI, T.; ALONSO, D. de O.; NEGRÃO, C.E. Exercício Físico e Diabete. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paul*, v. 5, p. 981-990, 1998.

GENESER, F. *Histologia com Bases Biomoleculares*. 03 ed. Editorial Médica Panamericana: Guanabara Koogan, p. 212-230, 2003.

GINTY, F.; RENNIE, K. L.; MILLS, L.; STEAR, S.; JONES, S.; PRENTICE, A. Positive, site-specific associations between bone mineral status, fitness, and time spent at high-impact activities in 16- to 18-years-old boys. *Bone*, New York, v.36, p.101-110, 2005.

GOMES, R.J.; MELLO, M.A.R.; CAETANO, F.H.; SIBUYA, C.Y.;ANARUMA, C.A.; ROGATTO, G.P.; PAULI, J.R.; LUCIANO, E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Hormone & IGF Research* v.16, p. 326–331, 2006.

GOMES, R.J.; CAETANO, F. H.; HERMINI, H. A.; ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Effects of physical training on growth hormone (GH) and insuline – like growth factor (IGF-1) in diabetic rats. *R. bras. Ci. e Mov.*, 11(3): 57-62, jul./set. 2003.

GOMES, R.J.; LEME, J.A.C.de A.; MELLO, M.A.R. de; LUCIANO, E.; CAETANO, F.H. Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. Motriz, Rio Claro, v.14 n.3, p.320-328, jul./set. 2008.

GRIMSTON, S. K.; WILLOWS, N. D.; HANLEY, D. A. Mechanical loading regime and its relationship to bone mineral density children. Medicine and Science in Sports and Exercise, Hagerstown, v.25, n.11, p.1203 -10, 1993.

HARDIN, D.S.; DOMINGUEZ, J.H.; GARVEY, W.T. Muscle Group-Specific Regulation of GLUT 4 Glucose Transporters in Control, Diabetic, and Insulin-Treated Diabetic Rats. Metabolism, v. 42, n. 10, p. 1310-1315, out/1993.

HERRERO, S.; CALVO, O.M.; MORENO, C.G.; MARTIN, E.; ROMAN, J.I.S.; MARTIN, M.; TALAVERA, J.R.G.; CALVO, J.J.; MONTES, J.D.P. Low Bone Density with Normal Bone Turnover in Ovariectomized and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Calcif Tissue Int v.62, p. 260 - 265, 1998.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; SATO, Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. Exp. Anim., v. 54, n. 1, p. 1-6, 2005.

JIMENEZ, C.C. Diabetes and Exercise: The Role of the Athletic Trainer. Journal of Athletic Training, v. 32, n. 4, dez/1997.

KIRÁLY, M.A.; BATES, H.E.; YUE, J.T.Y.; GOCHÉ-MONTES, D.; FEDIUC, S.; PARK, E.; MATTHEWS, S.G.; VRANIC, M.; RIDDELL, M.C. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. Metabolism Clinical and Experimental, v. 56, p. 732 - 744, 2007.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 18, n. 2, 2003.

LU, H.; KRAUT, D.; GERSTENFELD, L.C.; GRAVES, .T. Diabetes Interferes with the Bone Formation by Affecting the Expression of Transcription Factor that Regulate Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*, 144(1): p. 346–352, 2003.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. *Rev. Paul. Educ. Fís.*, São Paulo, 12(2): p. 202-09, jul./dez. 1998.

MOTTINI, D.U.; CADORE, E.L.; KRUEL, L.F.M. Efeitos do exercício na densidade mineral óssea. *Motriz*, Rio Claro, v. 14, n. 1 p. 85-95, jan./mar. 2008.

NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S.; SATO, Y.; JI, L.L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J Appl Physiol* 88: p.649-654, 2000.

NGUYEN, U.N.; MOUGIN, F.; SIMON-RIGAUD, M.L.; ROUILLON, J.D.; MARGUET, P.; REGNARD, J. Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins in athletes. *Eur J Appl Physiol* 78: p. 533 - 537, 1998.

NUNES, J.F.; DUARTE, M.F.S.; OURIQUES, E.P.M. Relação entre força muscular e densidade mineral óssea em mulheres. *Rev Bras Reumatol*, v. 41, n. 2, mar/abr 2001.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; HAMADE, S.; ENWEMEKA, C.S. The biomechanical integrity of bone in experimental Diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 54, p. 1-8, 2001.

ROSHOLT, M.N.; HEGARTY, P.V. Mineralization of different bones in streptozotocin-diabetic rats: study on the concentration of eight minerals *Am. J. Clinical Nutrition*, v. 34: p. 1680 - 1685, set. 1981.

SCHWARTZ, A.V. Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone? *Calcif Tissue Int* 73: p. 515 - 519, 2003.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pâncreas. *Physiol. Res.*, v.50, p. 536-546, 2001.

SOUZA, M.Z; LUCIANO, E. Influências do treinamento físico sobre o crescimento ósseo de ratos diabéticos. *Saúde em Revista, Piracicaba*, 7(16): p. 27-35, 2005.

SZEJNFELD, V.L. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Editora Sarvier, p. 20-28, 2000.

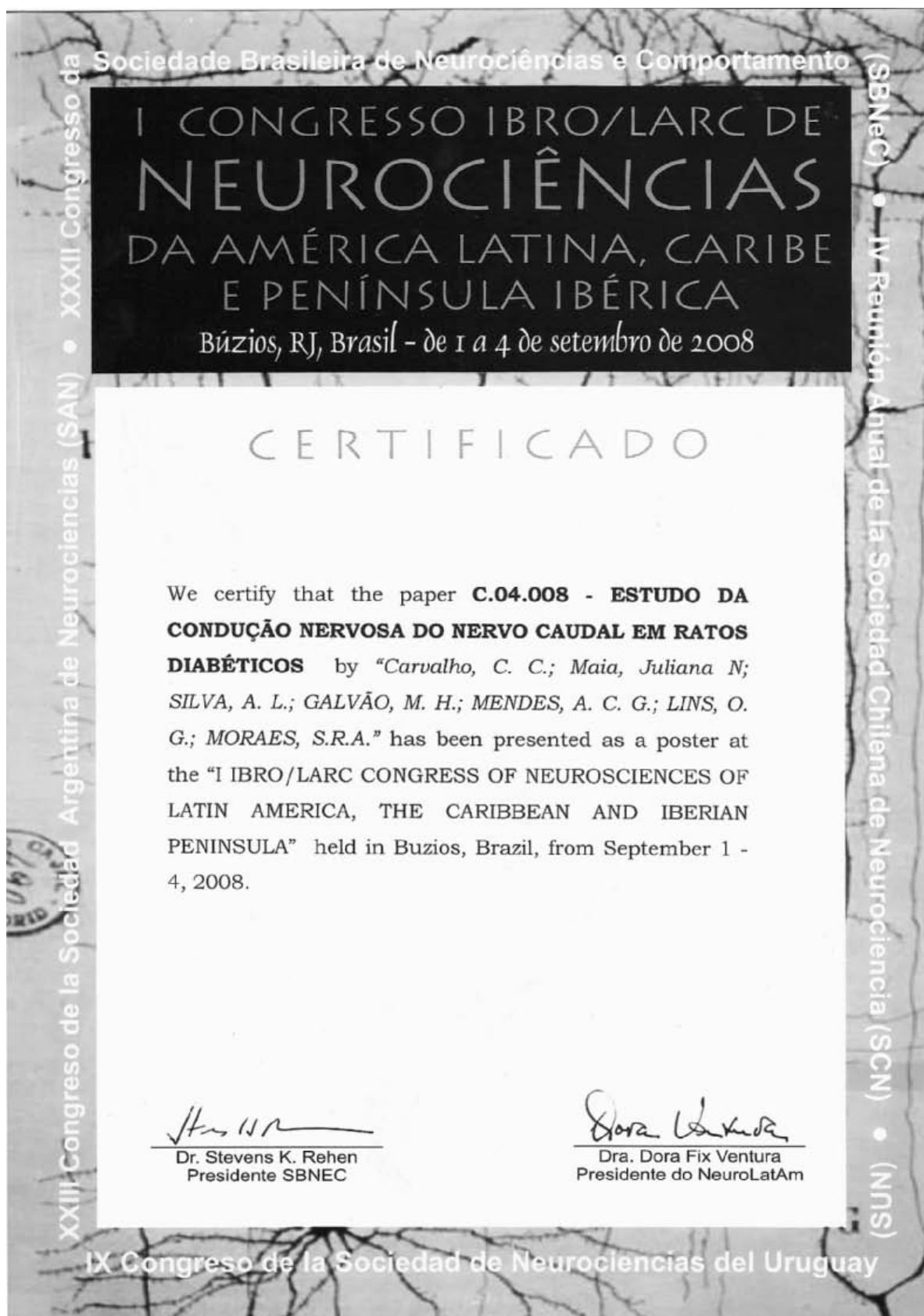
THRAILKILL, K.M.; LIU, L.; WAHL, E.C.; BUNN, R.C.; PERRIEN, D.S.; COCKRELL, G.E.; SKINNER, R.A.; HOGUE, W.R.; CARVER, A.A.; FOWLKES, J.L.; ARONSON, J.; LUMPKIN, C.K. Bone Formation Is Impaired in a Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 54, p. 2875 – 2881, out. 2005

VARGAS, D.M.; RIGOTTI, T.; GÜTZ, C.N.R.M.; LOBE, M.C.S; FERNANDES, J.A. Mineralização óssea em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. *J Pediatr Rio de Janeiro* 79(3): p. 253-8, 2003.

VERHAEGHE, J.; THOMSEN, J.S.; BREE, R.V.; HERCK, E.V.; BOUILLON, R.; MOSEKILDE, L. Effects of Exercise and Disuse on Bone Remodeling, Bone Mass, and Biomechanical Competence in Spontaneously Diabetic Female Rats. *Bone* v. 27, n. 2, p. 249 - 256, ago. 2000.

YUNG, P.S.; LAI, Y.M.; TUNG, P.Y.; TSUI, H.T.; WONG, C.K.; HUNG, V.W.Y.; QIN, L. Effects of weight bearing and non-weight bearing exercises on bone properties using calcaneal quantitative ultrasound. *Br J Sports Med*, v.39, p.547 - 551, 2005.

ANEXO E – Declarações de participação e publicação em anais de congressos



C.04.008

ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA DO NERVO CAUDAL EM RATOS DIABÉTICOS

Carvalho, C. C.¹; Maia, Juliana N.¹; SILVA, A. L.²; GALVÃO, M. H.²; MENDES, A. C. G.³; LINS, O. G.¹; MORAES, S.R.A.⁴ - ¹Universidade Federal de Pernambuco - Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento; ²Universidade Federal de Pernambuco - Fisioterapia; ³Universidade Federal de Pernambuco - Morfologia; ⁴UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - ANATOMIA

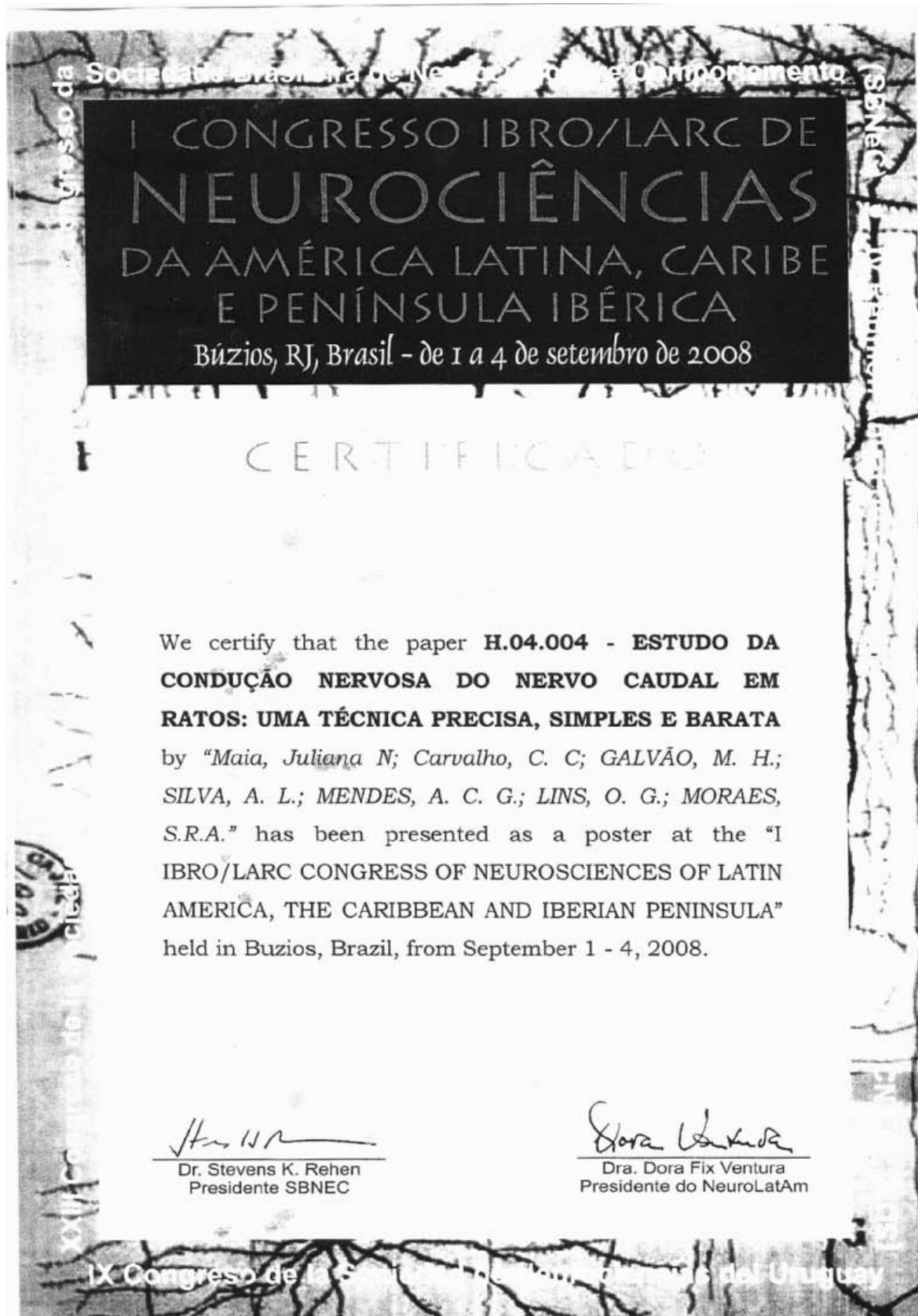
Objetivo: Avaliar uma técnica recentemente desenvolvida no nosso serviço utilizando garras "jacarés" comuns no estudo da condução nervosa do nervo caudal de ratos diabéticos.

Métodos: 40 Ratos *Wistar*, machos, com 60 dias foram utilizados, sendo o diabetes induzido em 20 ratos por dose única intraperitoneal (60 mg/kg de peso) de Streptozotocina (Sigma, tampão citrato de sódio 10mM, pH 4,5). Os outros 20 ratos constituíram o grupo controle. A velocidade de condução (VC) e a amplitude do potencial de nervo sensitivo foram determinadas 5 dias antes da indução e semanalmente durante 6 semanas consecutivas 10 dias após a indução. Após ser anestesiado, o animal era posicionado ventralmente, de forma que sua cauda ficasse livre. O estudo da condução nervosa foi registrada na cauda do animal com técnica ortodrômica. A inserção da distância foi mantida constante em 8cm entre os eletrodos. Para a estimulação utilizaram-se dois eletrodos de superfície do tipo garras "jacaré". Durante todo o procedimento a temperatura da cauda foi mantida em uma média de 31,5°. A análise estatística foi realizada por uma análise de variância (ANOVA). As comparações *post-hoc* foram feitas com teste de Tukey. O *p* crítico para ambos os testes foi de 0,05.

Resultados: Antes da indução tanto a VC (diabéticos 36±2m/s versus controles 34±3m/s) como a amplitude (33±7µV versus 29±6µV) não foi significativamente diferente. Após a indução a VC foi menor (39±3m/s versus 44±4m/s na 6ª semana pós-indução) e a amplitude maior (107±23µV versus 85±13µV) nos ratos diabéticos. A menor VC nos ratos diabéticos era esperada e é sugestiva de uma disfunção da bainha de mielina. A maior amplitude nos ratos diabéticos foi um achado inesperado. Isto provavelmente se deveu ao menor diâmetro da cauda dos ratos diabéticos, fazendo com que o nervo caudal ficasse mais próximo ao eletrodo de captação de superfície.

Conclusão: Nossos achados sugerem que quando se utiliza eletrodo de captação de superfície para o estudo da condução nervosa do nervo caudal em ratos diabéticos, a velocidade de condução é mais útil que a amplitude, pois não é influenciada pelo diâmetro da cauda.

Palavras-Chave: Diabetes experimental, Condução nervosa, Nervo caudal



H.04.004

ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA DO NERVO CAUDAL EM RATOS: UMA TÉCNICA PRECISA, SIMPLES E BARATA

Maia, Juliana N³; Carvalho, C. C²; GALVÃO, M. H.³; SILVA, A. L.³; MENDES, A. C. G.⁴; LINS, O. G.¹; MORAES, S.R.A.⁵ - ¹Universidade Federal de Pernambuco - Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento; ²Faculdade Integrada do Recife - Fisioterapia; ³Universidade Federal de Pernambuco - Fisioterapia; ⁴Universidade Federal de Pernambuco - Morfologia; ⁵UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - ANATOMIA

Objetivos: Desenvolver uma técnica precisa, simples e barata para o estudo da condução nervosa do nervo caudal em ratos. Os métodos para o estudo da condução nervosa no rato variam com o nervo estudado e a metodologia utilizada para o estímulo do nervo e o registro dos potenciais. Os nervos estudados incluem o safeno, o ciático e o nervo caudal. O nervo caudal é de acesso mais fácil e seu longo percurso o torna adequado ao estudo de neuropatias. As técnicas que usam eletrodos de superfície são mais simples e baratas que as que usam eletrodos de agulha.

Métodos: 20 Ratos *Wistar*, machos, com 60 dias foram utilizados. O sistema de estimulação e registro era constituído por uma tábua com 6 garras "jacaré" fixadas em linha a cada 3 centímetros. Os 2 eletrodos distais foram utilizados para estimulação, os 2 proximais para registro e os 2 centrais como terra. Os ratos foram anestesiados e posicionados ventralmente, de forma que sua cauda ficasse livre. A pele da cauda foi limpa, desengordurada e fixada nas garras "jacaré". A temperatura do terço médio da cauda foi mantida em uma média de 31,5°. Os potenciais foram registrados e analisados com um eletroneuromiógrafo clínico convencional na cauda do animal através de técnica ortodrômica. A velocidade de condução (VC) e a amplitude pico-a-pico do potencial de nervo sensitivo foram determinadas durante 7 semanas consecutivas. As equações das retas de regressão linear e seus coeficientes de correlação foram calculados.

Resultados: A VC e a amplitude cresceram linearmente entre a 8ª e a 15ª semana de vida do animal de 34 ± 3 m/s a 44 ± 4 m/s e de 29 ± 6 μ V a 85 ± 13 μ V, respectivamente. As equações de regressão linear foram: $VCN(m/s) = 1,2 \text{ semanas} + 25$ ($R^2 = 0.86$) e $Amplitude(\mu V) = 8.1 \text{ semanas} - 34$ ($R^2 = 0.99$).

Conclusão: O estudo da condução nervosa do nervo caudal de ratos pode ser realizado de modo preciso, fácil e barato utilizando garras comuns "jacaré" como eletrodos de superfície.

Palavras-Chave: Condução nervosa, Nervo caudal, Eletrodos de superfície



FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 01.024

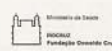
**AValiação DOS EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO
SOBRE OS MICROVASOS ENDONEURAIIS DE RATOS COM
DIABETES EXPERIMENTAL**

Carvalho, C. C. ¹, Maia, J. N. ¹, Galvão, M. H. ², Silva, A. L. ², Mendes,
A. C. G. ², Lins, O. G. ³, Moraes, S. R. A. ²

¹ Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportament,
UFPE ² Depto de Anatomia, UFPE ³ Depto de Neuropsiquiatria, UFPE
foi apresentado sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora



Área: Neuromorfologia e desenvolvimento neural

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE OS MICROVASOS ENDONEURAIS DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL

Celina Cordeiro Carvalho (UFPE); Juliana Netto Maia (UFPE); Marina Hazin Galvão (UFPE); Anderson Lima Silva (UFPE); Ana Carine Gouveia Mendes (UFPE); Otávio Gomes Lins (UFPE); Sílvia Regina Arruda de Moraes (UFPE)

Resumo

OBJETIVOS:

Verificar se o treinamento físico aeróbio exerce algum estímulo sobre os microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental.

MÉTODO:

20 Ratos Wistar, machos com 60 dias de idade. O diabetes foi induzido em 10 ratos por dose única intraperitoneal (60mg/kg) de streptozotocina (STZ, Sigma; tampão citrato de sódio 10mM, pH4,5) e o grupo controle recebeu dose equivalente da mesma solução tampão. Formou-se aleatoriamente 04 grupos experimentais: Controle Sedentário(CS); Controle Treinado(CT); Diabético Sedentário(DS); e Diabético Treinado(DT); constituídos de cinco animais cada grupo. Após jejum alimentar de 12 horas para a determinação da diabetes (glicose sanguínea $\geq 200\text{mg/dl}$), os animais do grupo CT, e o grupo DT, foram submetidos ao treinamento físico aeróbio que consistiu de nado forçado em tanque cilíndrico com diâmetro 50cm e altura de 80cm, com água a uma profundidade de 35 a 40 cm ($32 \pm 1^\circ\text{C}$), 1h/dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas. Vinte e quatro horas após o término do período de treinamento físico, os animais dos quatro grupos experimentais, foram anestesiados para a coleta do nervo ciático. Do material recolhido foram obtidos cortes semi-finos ($0,38 \mu\text{m}$) corados com azul de toluidina. A análise histomorfométrica dos vasos endoneurais e da área do nervo de cada animal foi realizada através da técnica de varredura de todos os campos microscópicos e, a contagem e captura das imagens foi realizada utilizando-se uma videocâmara acoplada a um microscópio óptico (aumento 200x). As comparações entre os grupos foram realizadas com o teste t de Student, para amostras independentes adotando-se um nível de confiabilidade de 0,05.

RESULTADOS:

Não foram encontradas diferenças significativas no número de microvasos endoneurais entre os animais do grupo diabético (treinado $41,4 \pm 11,9$ vs sedentário $39,2 \pm 3,6$; $p = 0,70$). Houve diferença apenas entre os animais do grupo controle (treinado $33,8 \pm 6,1$ vs sedentário $48,0 \pm 6,2$; $p = 0,01$), e entre os animais do grupo sedentário (diabético $39,2 \pm 3,6$ vs controle $48,0 \pm 6,2$; $p = 0,03$). A densidade dos microvasos não diferiu entre os grupos, apesar dos animais do grupo diabético (sedentário $436,9 \pm 61,2$ vs treinado $538,8 \pm 124,3$; $p = 0,139$) apresentarem valores médios maiores em relação aos animais do grupo controle (sedentário $393,89 \pm 116,7$ vs treinado $394,9 \pm 157,8$; $p = 0,992$).

CONCLUSÃO:

O treinamento físico aeróbio, no período que foi implementado não alterou o número nem a densidade de microvasos endoneurais de ratos com diabetes experimental.

Área: Ciências em Animais de Laboratório

AVALIAÇÃO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL.

Marina Hazin Galvão (UFPE); Anderson de Lima Silva (UFPE); Ana Carine Gouveia Mendes (UFPE); Juliana Netto Maia (UFPE); Celina Cordeiro Carvalho (UFPE); Otávio Gomes Lins (UFPE); Silvia Regina Arruda de Moraes (UFPE)

Resumo

OBJETIVOS:

Investigar o comportamento do tecido ósseo em ratos diabéticos submetidos ao exercício físico aeróbio de natação.

MÉTODO:

Quarenta ratos machos albinos, da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, pesando em torno de 250g, foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=10): controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), diabético sedentário (DS) e diabético exercitado (DE). Induziu-se o diabetes pela administração de streptozotocina (60 mg/kg). Após a confirmação do diabetes foi realizada semanalmente a verificação, em todos os grupos, do peso corpóreo (balança Filizola) e os grupos de animais exercitados foram submetidos a um protocolo de treinamento físico moderado composto por 6 semanas de natação, sendo realizado 5 dias por semana. Após esse período os animais foram anestesiados e coletando os fêmures direitos. O peso do fêmur foi aferido através de uma balança de precisão e o comprimento foi estimado com um paquímetro (0,02mm).

RESULTADOS:

Houve diferença no peso corpóreo dos animais entre os grupos (CS= 374g e DS= 211g, $p \leq 0,001$); CE= 334g e DE= 183g, $p \leq 0,001$); ao peso do fêmur (CS=0,804g e DS=0,511g; CE=0,787g e DE=0,535g, $p \leq 0,001$); e ao comprimento do fêmur (CS=37,455mm e DS=33,385mm, CE=36,590mm e DE=32,445mm, $p \leq 0,001$). Já entre os grupos DS/DE não houve diferença em relação ao peso corpóreo do animal (DS=211g e DE=183g, $p \leq 0,001$); peso do fêmur (DS=0,511g e DE=0,535g, $p \leq 0,001$); e comprimento do fêmur (DS=33,385mm e DE= 32,445mm, $p \leq 0,001$).

CONCLUSÃO:

O diabetes provocou uma redução no peso corpóreo dos animais e no peso e comprimento do fêmur e o protocolo de exercício físico com natação aplicado aos animais não foi eficaz para reverter esse déficit no tecido ósseo.