

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

Juliana Netto Maia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A
INSTALAÇÃO DA NEUROPATIA PERIFÉRICA EM RATOS COM
DIABETES EXPERIMENTAL**

**Recife
2009**

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DA MESTRANDA JULIANA NETTO MAIA**

No dia 02 de JULHO de 2009, às 9h, no Auditório do 2º andar do Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os Professores: Paloma Lys de Medeiros, Doutora Professora do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco; Maria do Amparo Andrade, Doutora Professor do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco e Otávio Gomes Lins, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüiram a Mestranda JULIANA NETTO MAIA, sobre a sua Dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DO FEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A INSTALAÇÃO DA NEUROPATIA PERIFÉRICA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL". Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da Mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros

Profª. Drª. Maria do Amparo Andrade

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

Paloma Lys de Medeiros (Aprovada)
Maria do Amparo Andrade (Aprovada)
Otávio Gomes Lins (Aprovada)

Otávio Gomes Lins

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins
Presidente da Banca Examinadora

Maria do Amparo Andrade

Profª. Drª. Maria do Amparo Andrade

Paloma Lys de Medeiros

Profª Drª Paloma Lys de Medeiros

Juliana Netto Maia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A INSTALAÇÃO
DA NEUROPATIA PERIFÉRICA EM RATOS COM DIABETES
EXPERIMENTAL**

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

Orientadora:

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

Co-orientador:

Prof. Dr. Otávio Gomes Lins

**Recife
2009**

Maia, Juliana Netto

Avaliação do efeito do exercício físico sobre a instalação da neuropatia periférica em ratos com diabetes experimental / Juliana Netto Maia. – Recife : O Autor, 2009.

80 folhas ; il., quadro, graf., fig., tab.

Tese (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Neurociências , 2009.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Ratos. 2. Neuropatia diabética. 3. Nervo ciático. 4. Condução nervosa. I. Título.**

616.85

CDU (2.ed.)

UFPE

616.87

CDD (22.ed.)

CCS-03/2010

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

Dedicatória

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

Agradecimentos Especiais

- À Deus por nos momentos de maior desespero sempre me mostrar um caminho e por todas as graças que por toda minha vida Ele me dá;
- Aos meus amados pais Maurício e Dolores por sempre acreditarem em mim e mostrarem o quanto é importante corrermos atrás dos nossos sonhos. Aguentaram meu mau humor e me mostram, sempre, que unidos e com amor vencemos tudo;
- A meu pai por usar toda sua engenharia para construir nosso material de estudo e todos seu inglês para ajudar nas traduções;
- À minha mãe pela paciência em me ouvir e me inspirar sempre;
- Aos meus irmãos Vic e Dan, pela paciência com meus estresses e o amor e carinho que sempre tem comigo.
- À Romerinho que nunca me deixou desistir, até nos momentos em que tudo parecia não dá certo, estava lá com carinho e palavras para que eu continuasse seguindo. E mesmo um tempo longe sempre foi presente;
- À meu avô Edson e minhas avós Jandira e Evelina, verdadeiros exemplos de vida, luta e coragem e que sempre me mostraram o quanto é importante a família crescer unida pois assim ganhamos força para enfrentar tudo na vida;
- A toda minha família, tios, tias, primos, primas que nunca deixaram de me incentivar e mostrar o quanto estão felizes com as minhas conquistas;
- Às minhas cunhadas e cunhados por me agüentarem, pela força, reza e traduções;
- A todos os meus amigos que torceram por mim, de longe ou de perto sempre rezando para tudo correr bem, desde a seleção até agora. Tendo paciência e compreendendo meus sumiços. Em especial a uma grande amiga que Deus colocou na minha vida Celina, pois sem ela com certeza não estaria aqui;
- À minha orientadora Silvia Moraes, a quem sei que deixei muitas noites sem dormir, e que me recebeu de braços abertos e me inspira na orientadora que pretendo ser, pela competência, carinho e responsabilidade. Um grande exemplo;
- Ao meu co-orientador Otávio Lins que surgiu de repente em minha vida e que foi sempre solícito e bastante atencioso, sem falar na grande paciência para todas as minhas dúvidas;
- Aos amigos que fiz no anexo que me ajudaram a descobrir o mundo dos ratos, em especial Anderson, Marina, Carine, Kamilla, Rodrigo, sem vocês nada disso estaria acontecendo, muito obrigada pela paciência e atenção sempre que precisei, e olhe que não foram poucas vezes!;

- À Mel e Martinha do laboratório de eletromiografia que se entregaram de corpo e alma a nossa pesquisa. Atenção, amor, carinho infinitas qualidades que só Deus poderia colocar pessoas tão maravilhosas assim no meu caminho;
- Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA – UFPE por toda paciência em fazer e refazer nosso material até que estivesse perfeito!!!.
- Ao pessoal do departamento de fisioterapia da UFPE pela força e coragem que sempre me deram;
- Aos colegas da Faculdade Maurício de Nassau que sempre me apoiaram e me deram força para eu chegar até aqui;
- Aos meus alunos queridos que sempre me apoiaram e torceram por mim!

"Aceita as surpresas que transforma teus planos, derrubam teus sonhos, dão rumo
totalmente diferente ao teu dia e quem sabe a tua vida.
Não há acaso,
Dá liberdade ao Pai, para que Ele mesmo conduza a trama dos teus dias".
Dolores Netto Maia

Resumo

Neste estudo avaliou-se o efeito do exercício físico sobre a instalação da neuropatia periférica em ratos com diabetes experimental. Foram utilizados 40 ratos machos, adultos, da linhagem *Wistar*. Estes foram divididos em 4 grupos: controle sedentário (GCS), controle exercitado (GCE), diabético sedentário (GDS), diabético exercitado (GDE). 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 natação durante 6 semanas. Na primeira semana os animais começavam com 10 minutos e a cada dia ocorria um acréscimo de mais 10 minutos, terminando a primeira semana com treino 50 minutos. Nas cinco semanas seguintes o treino era realizado por 60 minutos, 5x/sem. Semanalmente eram registrados a glicemia, o peso, a velocidade de condução nervosa (VCN) e a amplitude do potencial de ação do nervo caudal. Após as 6 semanas os animais foram anestesiados com solução de Cloridrato de ketamina (50 mg) e de Xilasina a 2% (20 mg) (0,2 mL/100g), em seguida o nervo ciático, foi dissecado e cortado proximalmente, seguindo para uma pré-fixação realizada com solução Karnowsky por 24h a 4°C, depois pós-fixado com solução de tetróxido de ósmio e processado para obtenção de cortes semi-finos (0,5µm), corados com azul de toluidina. Foram avaliadas a área de secção transversa do nervo ciático, a quantidade, densidade e o tipo de fibras nervosas mielínicas de 4 animais de cada grupo, escolhido aleatoriamente. A análise estatística foi realizada utilizando a média dos valores $\pm$ desvio-padrão e o teste T *Student* para dados paramétricos, e valores da mediana $\pm$ erro-padrão e teste Teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos, sendo $p < 0,05$; para análise dos valores eletrofisiológicos utilizou-se ANOVA, confiabilidade de 0,05. Ao final do experimento podemos perceber que os animais do GDS apresentaram peso significativamente mais baixo que os do GCS. Após a indução do diabetes os níveis glicêmicos dos animais diabéticos mostraram-se significativamente maior que os do grupo controle. Ao final do experimento o grupo diabético exercitado apresentou glicemia significativamente menor em relação ao grupo diabético não exercitado. A VCN demonstrou não diferir entre os grupos diabéticos, porém quando comparamos grupo diabético com sedentários os primeiros apresentaram VCN mais baixas. Em relação aos parâmetros avaliados: número de fibras mielínicas, área de secção transversa do nervo ciático e densidade de fibras mielinizadas, ao se comparar os valores entre os grupos diabéticos, controle, sedentários e exercitados não encontramos nenhuma diferença. As fibras estudadas foram classificadas em pequenas, intermediárias e grandes. Ao se comparar o número de fibras intermediárias entre os grupos sedentários houve uma diferença significativa nos valores de suas médias. A comparação entre os grupos com os demais tipos de fibras não apresentou diferença. Diante destes resultados, pode-se concluir que o tempo do experimento foi suficiente para causar uma neuropatia periférica nos ratos diabéticos, contudo por ser a neuropatia uma patologia de origem multifatorial, neste estudo percebemos que o processo de mielinização não foi comprometido.

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

Abstract

This study evaluated the effect of the physical exercise on the installation of peripheral neuropathy in rats with experimental diabetes. We used 40 male adult rats, of the *Wistar* lineage. These were divided into 4 groups: sedentary control (SCG), exercised control (ECG), sedentary diabetic (SDG), exercised diabetic (EDG). The induction of diabetes was carried through in animals, with 60 days of life, by intraperitoneal administration of streptozotocin, a single dose of 60 mg / kg. The protocol of exercises consisted of swimming during 6 weeks. The first week the animals began with 10 minutes and occurred every day an increase of 10 more minutes. In the five weeks following, the training was conducted for 60 minutes, five times a week. Weekly they were registered the blood glucose, the weight, the nervous conduction velocity (NVC) and the amplitude of action potential of tail nerve. After 6 weeks the animals had been anesthetized with a solution of chloride of ketamine (50 mg) and Xilasina to 2% (20 mg) (0.2 mL/100g), after that the sciatic nerve was dissected and cut proximally, following for a pre-fixation performed with Karnowsky solution for 24h at 4 ° C, then post-fixed with solution of osmium tetroxide and processed to obtain semi-thin slices (0.5 µm), stained with toluidine blue. We evaluated the cross-sectional area of the sciatic nerve, the quantity, the density and the type of myelin nerve fibers of 4 animals in each group, chosen randomly. The analysis statistics was carried through using the mean values $\pm$ standard deviation and Student T test for parametric data and median values of $\pm$ standard error and test Mann-Whitney U Test for non parametric data, for $p < 0.05$; values for analysis of electrophysiological ANOVA was used, reliability of 0.05. At the end of the experiment we can see that the animals of the GDS group showed weight significantly lower than those of the GCS. After induction of diabetes, the glucose level of the diabetic animals had revealed significantly higher than those in the control group. At the end of the experiment exercised diabetic group showed significantly lower glucose level in the diabetic group not exercised. The VCN demonstrated not to differ between the diabetic groups, however when we compare diabetic group with sedentary the first ones had presented lower VCN. In relation to the evaluated parameters: number of myelin fibers, cross-sectional area of the sciatic nerve and myelinated fiber density, when comparing the values between the diabetic, control, sedentary and trained group, we do not find any difference. The studied fibers had been classified in small, intermediate and large. Comparing the intermediate fiber number between the sedentary groups it had a significant difference in the values of its averages. The comparison between groups with other types of fibers showed no difference. Ahead of these results, it can be concluded that the time of the experiment was enough to cause a peripheral neuropathy in the diabetic rats, however for being the neuropathy a pathology of multifactorial origin, in this study we perceive that the myelin did not come to be damaged.

Keywords: Rats, sciatic nerve, peripheral nerve regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Animais em exercício físico	33
Figura 2. Registro eletrofisiológico	35
Figura 3. Procedimento para retirada do nervo ciático	36
Figura 4. Fotomicrografia da secção transversa do nervo ciático	37

LISTA DE SIGLAS

CS – Grupo controle sedentário
DS – Grupo diabético sedentário
CE – Grupo controle exercício
DE – Grupo diabético exercício
C – grupo animais controle
E – Grupo animais sadios treinados
D – Grupo animais diabéticos não treinados
DEx – Grupo animais diabéticos treinados
ExD – Grupo animais sadios treinados induzidos o diabetes
NCV – Nerve conduction velocity
SNAP – Sensory nerve action potencial
GCS – Grupo controle sedentário
GCE – Grupo controle treinado
GDS – Grupo diabético sedentário
GDE – Grupo diabético treinado
STZ – Estreptozotocina
VCN – Velocidade de condução nervosa
NP – Neuropatia periférica
PACM – potencial de ação concreto muscular

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	13
2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
3. OBJETIVOS	16
a. Geral	16
b. Específicos	16
4. REVISÃO DA LITERATURA	17
a. Artigo de Revisão	18
5. METODOLOGIA	31
a. Animais	31
a. Grupos de Estudo	31
b. Indução do Diabetes	32
c. Verificação da Glicemia e do Peso	32
d. Protocolo de Exercício	32
e. Estudo da velocidade de condução nervosa e amplitude do potencial de ação do nervo sensitivo	34
f. Coleta do Material e Processamento Histológico	35
g. Análise Histomorfométrica	36
h. Análise Estatística	38
6. RESULTADOS	39
a. Artigo Original 1	40
b. Artigo Original 2	46
7. DISCUSSÃO GERAL	66
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	69
9. REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	77
Anexo 1 - Carta de aceitação do artigo enviado à Revista Acta Cirúrgica Brasileira	78
Anexo 2 – Carta de envio do artigo submetido à Revista Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia.	79
Anexo 3 - Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.	80

1. APRESENTAÇÃO

Esta dissertação 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. Objetivos do trabalho;
4. Revisão da literatura: consta de um **artigo de revisão sistemática** (intitulado: Pode o exercício aeróbico influenciar na instalação do quadro de neuropatia periférica em animais de experimentação?) que avalia o papel do exercício aeróbico, em animais de experimentação, sobre a instalação da neuropatia diabética periférica. Será submetido ao Jornal of Diabetes and its Complications e está redigido segundo as normas de elaboração da referida revista
5. Metodologia;
6. Resultados: o capítulo de resultados está estruturado sob a forma de dois artigos originais: O primeiro (**Artigo Original 1**) descreve os resultado de um experimento realizado no intuito de associar, através da utilização de uma técnica de estudo de velocidade de condução nervosa, com uso de eletrodos tipo “jacaré”, os valores referentes da velocidade de condução nervosa às fases de crescimento do rato. Foi submetido e aceito para publicação na revista Acta Cirúrgica Brasileira (anexo 1). O segundo artigo (**Artigo Original 2**) refere-se aos resultados obtidos do estudo experimental desenvolvido durante o mestrado, em que submetemos ratos com diabetes experimental a um protocolo de exercício natação e avaliou-se a velocidade de condução nervosa e a morfometria do nervo ciático. Este artigo foi submetido à publicação na Revista Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (anexo 2).
7. Discussão Geral;
8. Perspectivas;
9. Referências

2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O diabetes mellitus é caracterizado por um grupo heterogêneo de distúrbios onde existe uma elevação da glicose sanguínea, resultante de uma diminuição da capacidade corpórea em responder à insulina e/ou decorrente de uma diminuição ou ausência da insulina produzida pelas células β -pancreáticas, levando a alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (FREGONESI et al, 2004).

Decorrente dessa alteração primária os pacientes portadores de diabetes mellitus ficam expostos ao desenvolvimento, a longo prazo, de uma série de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (isquemia cardíaca, patologias cerebrovasculares, pé diabético) (FLORES, GUTIÉRREZ e VELÁSQUEZ, 2007).

Dentre estas alterações a neuropatia periférica se destaca clinicamente por se caracterizar pela anormalidade sensório-motora encontrada ao exame neurológico em regiões periféricas do corpo (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993) afetando componentes do sistema nervoso periférico e autonômico e abrangendo um conjunto de síndromes com variadas manifestações clínicas e subclínicas (GAGLIARD, 2003)

O que leva ao aparecimento deste quadro ainda não foi completamente entendido e esclarecido (AFZAAL, SING, SALEEM, 2002). Dentre as possíveis causas podemos destacar que o aumento da glicemia sanguínea poderia provocar hiperatividade da via dos polióis, glicolização não enzimática das proteínas estruturais, comprometimento da ação de fatores tróficos e de crescimento nervoso, alterações vasculares e hipóxia endoneural, mecanismos imunológicos, estresse oxidativo, comprometimento do metabolismo dos lipídeos, e, estes fatores, isolados ou em conjunto, acabariam resultando no desenvolvimento da neuropatia diabética (FREGONESI et al, 2004).

Por questões óbvias os estudos visando compreender a neuropatia diabética mostram-se bastante limitados em seres humanos. Uma das formas de tentar se investigar melhor esta condição é através de estudos com animais de experimentação e já são relatados na literatura diversos estudos sobre a reprodução da neuropatia diabética periférica em ratos por indução química (SULLIVAN et al, 2007). Apesar do custo mais elevado, a estreptozotocina possui um efeito menos

tóxico e mais específico nas células beta do pâncreas, quando comparado a aloxana; além do que modelos experimentais decorrentes desta indução química parecem promover inicialmente anormalidades funcionais e bioquímicas semelhantes à neuropatia diabética em humanos (JUNOD et al, 1969; SIMA e SUGIMOTO, 1999).

Há evidências que os exercícios físicos ajudam a controlar os níveis glicêmicos (CAMBRI et al, 2007, HIYANE et al, 2008, GOMES et al, 2008, VANCEA et al, 2009). Acredita-se que isto ocorra pelo fato do exercício físico regular, possa aumentar a captação e o metabolismo da glicose pelo músculo, assim como, incrementar a síntese e translocação de GLUT 4, que são os transportadores de glicose no tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco (PEIRCE, 1999).

Uma vez que a hiperglicemia parece ser a grande precursora das alterações que desencadearão uma neuropatia e que o exercício físico se mostra eficaz para controlar esse alto nível glicêmico, este trabalho teve como proposta avaliar como o exercício aeróbico pode interferir na instalação do quadro de neuropatia periférica diabética experimental.

3. OBJETIVOS

a. Geral

- Analisar o efeito do exercício físico aeróbico (natação) na instalação da neuropatia diabética periférica experimental.

b. Específicos

- Determinar os valores da velocidade de condução nervosa e o comportamento da amplitude do potencial de ação do nervo caudal;
- Quantificar o número de fibras mielínicas do nervo ciático;
- Verificar a densidade de fibras mielínicas do nervo ciático;
- Determinar a área de secção transversa do nervo ciático;
- Classificar as fibras do nervo ciático segundo o diâmetro;

4. REVISÃO DA LITERATURA

a. ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA**PODE O EXERCÍCIO AERÓBICO INFLUENCIAR NA INSTALAÇÃO DO
QUADRO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA EM ANIMAIS DE
EXPERIMENTAÇÃO?**

Juliana N. Maia^{a*}; Kamilla D.S. de Lira^b; Celina C. Carvalho^a; Silvia R.A. de Moraes^b.

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

^b 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

Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre a influência do exercício aeróbico na instalação da neuropatia periférica em ratos com diabetes experimental. Incluímos artigos que apresentassem ensaios randomizados obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão. A busca foi realizada a partir de pesquisas na LILACS, SciELO, MEDLINE, bases de dados PubMed e Cochrane Library, por dois revisores independentes. Foram selecionados 773 artigos, publicados entre 1976 e 2009 que abordassem a questão pesquisada nos parâmetros do nosso estudo. Dentre eles, apenas dois artigos foram incluídos na pesquisa. O primeiro apresenta omissões de alguns procedimentos metodológicos e relata que não houve diferenças entre os valores eletrofisiológicos (velocidade de condução nervosa e amplitude do potencial de ação) entre os grupos diabéticos treinados e não treinado, apesar de ambos demonstrarem valores inferiores aos animais dos grupos controle. O segundo, com metodologia bastante detalhada, descreve que o exercício físico desempenhou um papel protetor na instalação da neuropatia diabética periférica, utilizando como dados, análise de parâmetros eletrofisiológicos e a espessura da bainha de mielina. Pela escassez de estudos na área, concluímos que não há ainda estudos suficientes para esclarecer qual o papel que o exercício físico pode desempenhar na instalação da neuropatia diabética periférica em ratos com diabetes experimental.

Palavras-Chave: Revisão. Ratos. Diabetes. Exercício.

Introdução

Estudos com animais de experimentação sempre foram uma boa alternativa para se realizar pesquisas científicas que buscam conhecer mais sobre a evolução de patologias e observar o comportamento de determinado tipo de tratamento. Estudos reproduzindo, em animais de experimentação, o quadro do diabetes tipo 1, através de drogas que destroem as células β do pâncreas, conseguiram reproduzir alterações

micro e macrovasculares que acontecem a longo prazo e são observadas no paciente portador de diabetes (Prabhakar et al, 2007; Arora et al, 2008; Morrison et al, 2008; Cherian et al, 2009).

O diabetes é caracterizado por altos índices de glicose no sangue decorrente da insuficiência ou até ausência da insulina (Fregonesi et al, 2004). Este acúmulo de glicose gera várias complicações dentre elas as neuropatias (autonômicas e periféricas) (Prabhakar et al, 2007; Arora et al, 2008; Morrison et al, 2008; Cherian et al, 2009). A neuropatia periférica é definida como um grupo heterogêneo de transtornos no qual um ou todos os elementos do sistema nervoso periférico estão danificados, afetando principalmente a mielina, o axônio, ou uma combinação de ambos (White, Pritchard, & Turner-Stokes, 2008). De causa multifatorial (Gagliard, 2003) estudos sobre sua etiopatogenia encontram muitas resistências éticas para serem estudadas em humanos.

Uma das formas terapêuticas preconizadas para diminuir os índices glicêmicos é o exercício físico. O exercício físico de forma geral caracteriza-se por uma atividade que eleva significativamente à necessidade energética do organismo, exigindo, portanto, alterações agudas expressivas tanto no metabolismo celular como no controle neuroendócrino (Kemmer & Berger, 1983). Acredita-se que durante a atividade física a diminuição da glicose sanguínea, possa estar relacionada à atenuação da produção da glicose hepática, quando considerado um aumento normal da utilização de glicose pelo músculo (Minuk et al, 1981). O efeito do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina tem sido demonstrado entre 12 a 48 horas após a sessão de exercício, retornado aos níveis pré-atividade em três a cinco dias após a última sessão de exercício (Eriksson, Taimela, & Koivisto, 1997).

Estes benefícios parecem acontecer tanto na modalidade aeróbia como em exercícios resistidos (Ciolac & Guimarães, 2002; Ciolac & Guimarães, 2004).

Estudos utilizando atividades ou exercícios físicos em seres humanos portadores de neuropatia diabética apresentam uma série de variáveis as quais o investigador não pode controlar plenamente, resultando possível viés na pesquisa. Desta forma, o objetivo do estudo foi realizar uma revisão sistemática da literatura para avaliar os estudos que utilizaram o exercício físico em animais induzidos com diabetes experimental.

Metodologia

Para realização desta revisão foram selecionados, no período de março a abril de 2009, artigos publicados a partir de periódicos indexados na base de dados LILACS, SciELO, PubMed / MEDLINE e Cochrane publicados durante o período de 1976 a 2009.

As palavras-chave utilizadas foram baseadas na lista do MeSH, e os seguintes termos foram escolhidos: neural conduction, diabetic neuropathies, exercise, diabetes mellitus/chemically induced, Ranvier's nodes, nerve fibers/myelinated. Pela lista do Decs os termos selecionados foram: diabetes induzida por estreptozotocina, exercício aeróbico, neuropatias diabéticas, condução nervosa, nervos periféricos. Foram também escolhidas palavras-chave sobre o tema, para realização da busca: diabetes, neuropathy, exercise, velocity conduction, nerves. Apenas no pubmed foi utilizado como limite de assunto estudos com animais. Todas essas combinações foram utilizadas para todos os bancos de dados. As referências dos artigos selecionados também foram verificadas para identificar outros estudos que pudessem ter sido omitidos na busca eletrônica.

Título e resumos identificados através de pesquisas foram examinados independentemente por dois investigadores (JNM, KDSL) na tela do computador para selecionar os estudos potencialmente relevantes. Casos de discordâncias, quando presente, foram solucionados por um terceiro avaliador (SRAM).

Para seleção do estudo os seguintes critérios de inclusão foram considerados: estudos com ratos machos, submetidos à indução química do diabetes e estudos que utilizassem como forma de avaliação da neuropatia periférica avaliação da velocidade de condução nervosa, amplitude do potencial de ação e/ou estudo morfológicos e morfométricos de nervos periféricos. Foram utilizados também os que utilizaram grupo controle e grupo experimental, treinamento em esteira ou natação. Estudos com seres humanos, com exercícios anaeróbicos ou que avaliaram apenas neuropatia autonômica foram excluídos. Foi considerado como desfecho primário as repercussões morfofuncionais do nervo periférico. Como desfecho secundário evolução ponderal e comportamento glicêmico.

Resultados

Dentre os 773 artigos inicialmente identificados através da busca

eletrônica, 5 foram totalmente recuperados para a avaliação mais detalhada, três deles foram então excluídos, pois a neuropatia não era decorrente de indução do diabetes. Apenas dois estudos preencheram os critérios de inclusão: Snow et al (2005) e Selagzi et al (2008) (Fig. 1).

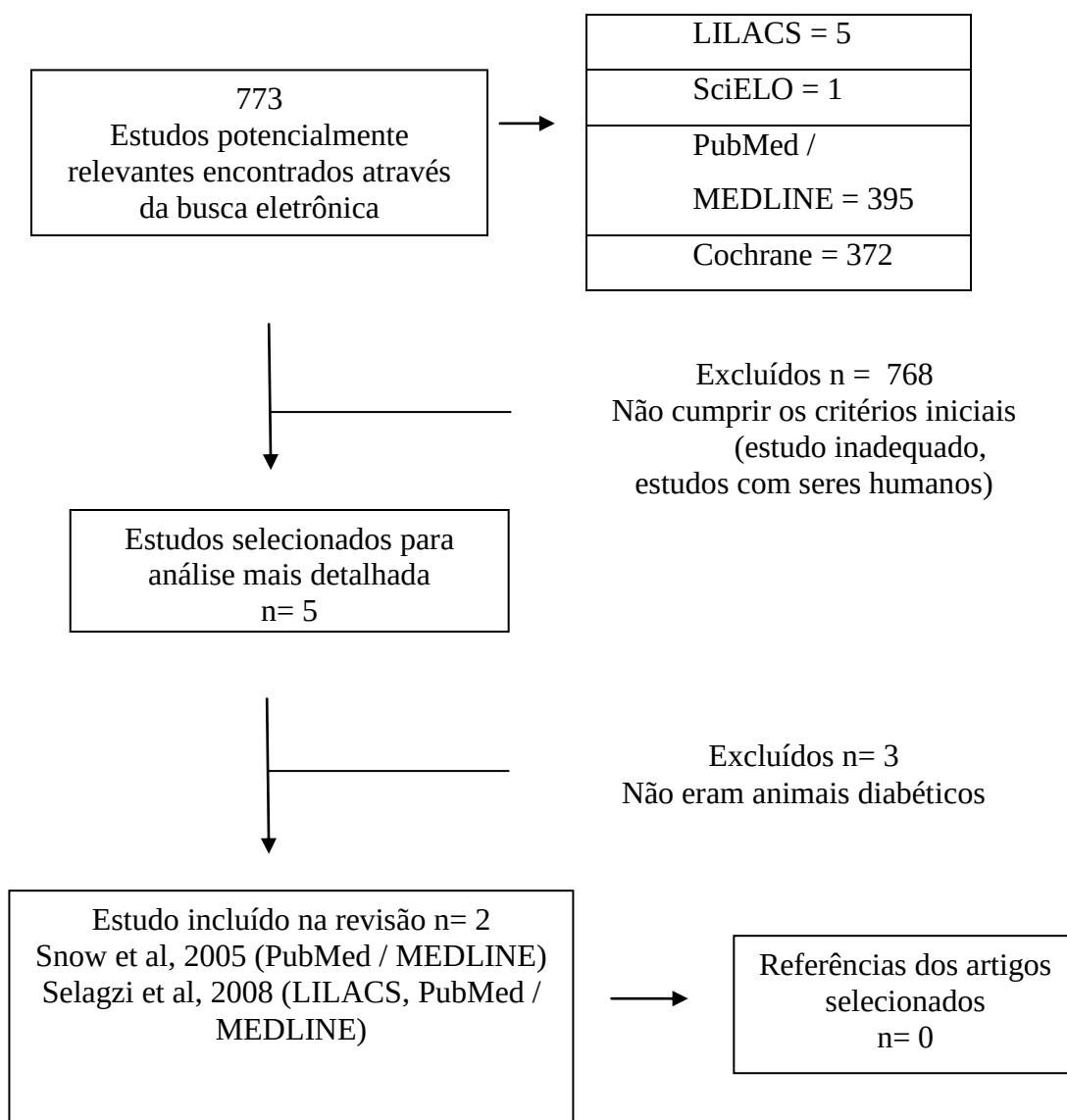


Fig 1. Busca e seleção dos artigos para revisão sistemática.

Dentre os estudos selecionados o de Snow et al (2005) teve como objetivo avaliar a expressão da cadeia pesada de miosina em ratos com neuropatia diabética

experimental submetido ao exercício e Selagzi et al (2008) procurou determinar o efeito protetor e terapêutico do exercício físico em ratos com neuropatia diabética periférica experimental.

Para avaliação destes parâmetros Snow et al (2005) utilizaram 32 ratos Sprague Dawley, com peso inicial de 200-250g, que foram randomicamente escolhidos para compor os grupos diabéticos e controle. Selagzi et al (2008) utilizaram 70 ratos da linhagem Wistar, com peso inicial em média de $241g \pm 29,99$, com 12 semanas de idades (tabela 1). Ambos mantiveram os animais em ciclo invertido, Selagzi et al (2008) especifica o horário - ciclo escuro 9h às 21h.

Snow et al (2005) dividiram seus animais randomicamente, sem especificar como, em 4 grupos: controle sedentário (CS); diabético sedentário (DS); controle exercício (CE) e diabético exercício (DE), todos os grupos com 8 animais. Os animais do estudo de Selagzi et al, 2008, foram divididos randomicamente, também não especifica como, em 5 grupos: C (n=10) animais controle; E (n=15) grupo de animais sadios treinados; D (n=15) animais diabéticos não treinados; DEx (n=15) animais diabéticos submetidos a treinamento; ExD (n=15) animais inicialmente sadios que começam treinamento físico e após 4 semanas de treino, induz o diabetes e continuam por mais 4 semanas o treinamento.

A indução do diabetes, dos dois estudos, foi realizada através de injeção peritoneal de estreptozotocina, sendo a dose do estudo de Snow et al (2005) 50-60mg/Kg e no de Selagzi et al (2008) 45mg/Kg. Para confirmação do diabetes Snow et al (2005) verificou a glicemia 5 dias após o procedimento e considerou como ratos diabético aqueles que apresentavam glicemia ≥ 250 mg/dl. Selagzi et al (2008) obtiveram confirmação após 2 dias da indução, e aqueles que apresentavam níveis de glicose sanguínea ≥ 200 mmol/dl, foram considerados diabéticos. Nos animais de grupo ExD o diabetes só foi induzido quando os animais completaram 16 semanas.

Snow et al (2005) aplicou insulina nos animais, quando a glicemia apresentava-se maior que 200 mg/gl, para evitar hiperglicemias. Para os animais treinados a dose administrada era de 2,3 unidades e para os sedentários, aplicava-se 2,5 unidades.

Os protocolos de exercícios dos estudos de Snow et al (2005) e Selagzi et al (2008) estão descritos na tabela 1. Para avaliação da neuropatia ambos os estudos

utilizaram o registro eletrofisiológico. A metodologia e os resultados estão apresentados na tabela 2.

A análise morfológica foi realizada por Selagzi et al (2008) no segmento do nervo ciático. A análise histológica aconteceu de forma mascarada, no entanto os autores não relatam como. Para preparo do material os fragmentos dos tecidos nervosos foram imediatamente fixados em solução neutra de formol a 10% e embebidos em parafina. Em seguida foram obtidos cortes transversais (4 μ m) e corados com hematoxilina e eosina para avaliação da degeneração da mielina. Cem bainhas de mielina de cada lâmina tiveram sua espessura mensurada por micrômetro ocular, acoplado a um microscópio ótico com 1000x de aumento.

Snow et al (2005) comparam os índices glicêmicos e o peso dos animais e observaram que nestes dois parâmetros houve diferença significativa entre os animais diabéticos e controles, aumento da glicemia e diminuição do peso.

A avaliação dos resultados do estudo de Selagzi et al (2008) ocorreu através da quantificação dos níveis glicêmicos; dos efeitos do diabetes e da natação sobre o peso dos animais; dos efeitos do diabetes e da natação sobre os parâmetros da eletromiografia; efeitos do diabetes e da natação sobre a espessura da bainha de mielina. Estes autores observaram que a natação não apresentou efeitos sobre os níveis glicêmicos dos animais.

Em relação ao peso do animal Selagzi et al (2008) observou um rápido aumento nos grupos controle (C) e exercitado (E). Quando comparado os grupos controle (C), diabéticos (D) e exercitados e depois induzidos diabetes (ExD) houve diminuição significativa do peso, assim como entre os grupo exercitado (E), diabéticos (D) e exercitados e depois induzido diabetes (ExD) No entanto o grupo exercitados e depois induzido diabetes (ExD) ganhou mais peso que os outros grupos diabéticos. Assim eles concluíram que o exercício mostrou ser uma prevenção efetiva contra a perda de peso.

Na avaliação da espessura da bainha de mielina dos animais estudados, o valor médio do grupo controle (C) foi significativamente maior quando comparados ao grupo diabético (D). Um significativo aumento nos valores médios foi encontrado entre os grupos exercitados e depois induzido diabetes (ExD) e diabéticos treinados (DEx) quando comparados ao grupo diabético (D). Os autores concluem que o exercício antes e após à indução, previnem danos à mielina. Além,

disso eles também observaram diferenças significantes entre os grupos controle (C) e exercitado (E).

Discussão

A presente revisão demonstrou existir uma escassez de estudos com animais de experimentação que avalie os efeitos do exercício físico sobre a neuropatia diabética.

No estudo de Snow et al (2005) observa-se que a metodologia para obtenção dos resultados não foi bem descrita. Eles não deixam claro se compararam ou não os parâmetros eletrofisiológicos, glicemia e peso entre os animais diabéticos. No estudo de Selagzi et al (2008) a metodologia foi descrita detalhadamente.

O tamanho total da amostra nos dois estudos foi de cento e dois animais, no entanto Selagzi et al (2008) relatam que dois animais do grupo diabético (D), três animais do grupo diabético exercitado (DEx) e quatro animais do grupo exercitado e induzido diabetes (ExD) morreram antes do final do estudo. Totalizando assim uma amostra final para os dois estudos de noventa e três animais.

Em ambos os estudos foram descritas escolhas randômicas dos grupos, no entanto, não especificadas. Porém os dois utilizaram grupos controle, classificando o estudo em randômico controlado.

Para indução do diabetes, utilizando-se da estreptozotocina, a literatura descreve várias dosagens. A dose descrita varia de 40mg/kg a 70mg/Kg (Tancredi, Rousseau-Migneron, & Nadeau 1982; Wright & Nukada, 1994; Kato et al, 2005; Heidarianpour et al, 2007) mostrando assim que a dosagem por eles administrada está coerente com as empregadas em outros estudos.

A idade de indução para avaliar a instalação da neuropatia diabética varia muito entre os estudos e parece influenciar nos resultados das pesquisas. Snow et al (2005) não descreve a idade dos animais, apenas o peso corporal. Selagzi et al (2008) induziu o diabetes com animais de 12 semanas de idade. Um dado importante descrito na literatura é o tempo em que ocorre a maturação nervosa. Acredita-se que ela aconteça por volta da 26ª a 30ª semana de idade, tornando assim a idade de indução um fator importante nas alterações nervosas decorrente do aumento dos níveis glicêmicos, assim tal informação é de bastante utilidade para comparação com outros estudos (Malone et al, 1996).

O estudo de Selagzi et al (2008) informa fazer de forma mascarada a análise das lâminas. No entanto não descreve como foi o mascaramento. Isto é um dado importante para se avaliar a interferência do pesquisador na análise dos resultados.

O treinamento em esteira utilizado no estudo de Snow et al (2005), apresenta-se condizente com os descritos na literatura que variam de 6 semanas a 2 meses de treinamento, com velocidades em média de 20m/min. Os dias de treinamento também variam entre os protocolos de 3 a 7 vezes por semana, assim como a duração 30 a 90 minutos (Lamontagne et al, 2007; Lemos et al, 2007; Park et al, 2007; Hsieh et al, 2008; Hung et al, 2008; Park, Hong, & Sung, 2008). O protocolo de exercício utilizado por Selagzi et al (2008) também está compatível com os apresentados em outros experimentos com ratos diabéticos. Os treinamentos variam de 4 a 12 semanas, geralmente com duração de 1 hora de natação por dia durante 5 dias por semana (Oliveira et al, 2007; Lemos et al, 2007; Gomes et al, 2008).

Os métodos de avaliação por propostos por Snow et al (2005) e Salagzi et al (2008): amplitude, e latência do potencial de ação concreto muscular, velocidade de condução nervosa, parecem ser uma boa opção para avaliar comprometimento em estrutura nervosa. Estudos demonstram que alterações nos parâmetros eletrofisiológicos podem ser percebidas após 3 semanas da indução (Kato et al, 2005). No entanto Snow et al (2005) não descrevem se observaram os valores de base a pico ou de pico a pico, o que pode dificultar comparações com outros estudos, assim como a temperatura do segmento no momento do registro, dado este que também pode influenciar nos valores.

Selagzi et al (2008) também utilizam como método de avaliação a mensuração da espessura da bainha de mielina. Outros autores também apresentam como parâmetro de avaliação análise desta estrutura, mostrando que ela tende a diminuir em animais com diabetes (Bestetti, Rossi, & Zemp, 1981; Malone et al, 1996).

Ficou claro que estudos sobre a interferência do exercício físico na instalação da neuropatia periférica em ratos com diabetes experimental ainda são escassos e com resultados divergentes, por isso, não se pode apontar para um benefício ou não dessa intervenção. Com relação ao aspecto metodológico observa-se que as metodologias avaliadas estão condizentes com a literatura (indução do

diabetes, protocolos de treinamento, avaliação eletrofisiológica) embora os critérios de avaliação da qualidade dos artigos (cálculo e forma de randomização da amostra; mascaramento da análise dos resultados, etc) não tenha sido explicitado e um dos estudos apresente omissões importantes na metodologia. Esse campo de intervenção necessita assim de um maior respaldo científico, tendo em vista a necessidade do melhor conhecimento das respostas da estrutura nervosa periférica no quadro diabético frente ao exercício físico. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de outros estudos com metodologia similar à descrita por Salagzi et al (2005) porém considerando também outras idades para indução assim como diferentes protocolos de exercícios.

Referências

- 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.

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.

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.

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-Mignerou, 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

Tabela 1 – Descrição dos dados incluídos nos estudos e avaliação da qualidade dos artigos.

Autor	Animal Model	Tamanho total da amostra	Randomização	Mascaramento da análise dos resultados
Snow et al, 2005	Sprague Dawley - machos	32 animais	sim	não
Selagzi et al 2008	Wistar - machos	70 animais	sim	sim

5. METODOLOGIA

a. Animais

Foram utilizados 40 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, pesando em torno de 250g, adultos jovens com idade aproximada de 60 dias de vida. Os animais, oriundos da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia em gaiolas plásticas de propileno (49x34x16cm), com no máximo cinco animais por gaiola, em temperatura ambiente de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro 12/12 horas, água e ração *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (anexo 3), estando de acordo com as normas internacionais estabelecida pelo National Institute of Health Guide for care and use of Laboratory Animals.

b. Grupos de Estudo

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 saudáveis restritos a movimentação dentro da própria gaiola; grupo controle exercitado (GCE) animais saudáveis 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.

c. Indução do Diabetes Experimental

O diabetes foi induzido através da administração intraperitoneal de solução de streptozotocina (Sigma Chemical Co, USA) após jejum alimentar dos animais de 12 horas. A streptozotocina (STZ) foi diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos receberam, da mesma forma, doses equivalentes de solução tampão citrato de sódio, e após decorridos 30 minutos do tratamento os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO et al., 2002).

d. Verificação da glicemia e do peso

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

e. Protocolo de exercício

Os grupos de animais exercitados foram submetidos a um protocolo de exercício físico moderado de natação durante seis semanas, cinco dias na semana. A primeira semana - semana de condicionamento, foi composta por exercícios 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. Nas cinco semanas seguintes foram realizados exercícios durante 60 minutos nos cinco dias da semana (NAKAO et al, 2000).

O exercício foi realizado em um tanque de natação 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°C (± 1), (Figura 1).

Após o exercício os ratos permaneciam, durante 20 minutos, em uma câmara de aquecimento para realizar a secagem dos pêlos (KIRÁLY et al, 2007). Os demais animais se limitaram a atividades dentro da própria gaiola.



Figura 1. Exercício físico dos animais. Tanque de natação (A); Câmara de aquecimento (B); Animais nadando (C); animais secando na câmara de aquecimento (D)

f. 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. Nos animais do grupo controle esse registro foi realizado ao completarem 60 dias de vida (semana 0) e durante mais sete semanas consecutivas (semana 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).

Para a verificação da velocidade de condução nervosa 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 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 2).

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

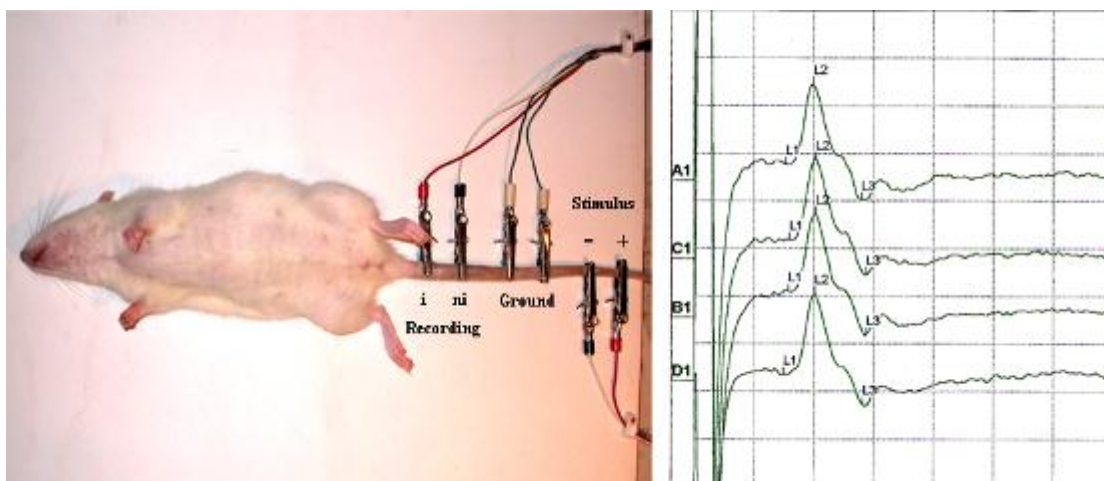


Figura 2. Demonstração do procedimento de avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos.

g. Coleta do Material e Processamento Histológico

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

Após a anestesia, foi realizada tricotomia das regiões glútea e posterior da pata direita. Foi realizada uma incisão sobre os músculos glúteos e isquitibiais para exposição do nervo ciático. Após a exposição do nervo ciático, uma pré-fixação (*in situ*) 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 nervo foi seccionado transversalmente um centímetro anteriormente à bifurcação dos nervos tibial posterior e fibular comum e encaminhado para processamento histológico (Figura 3).

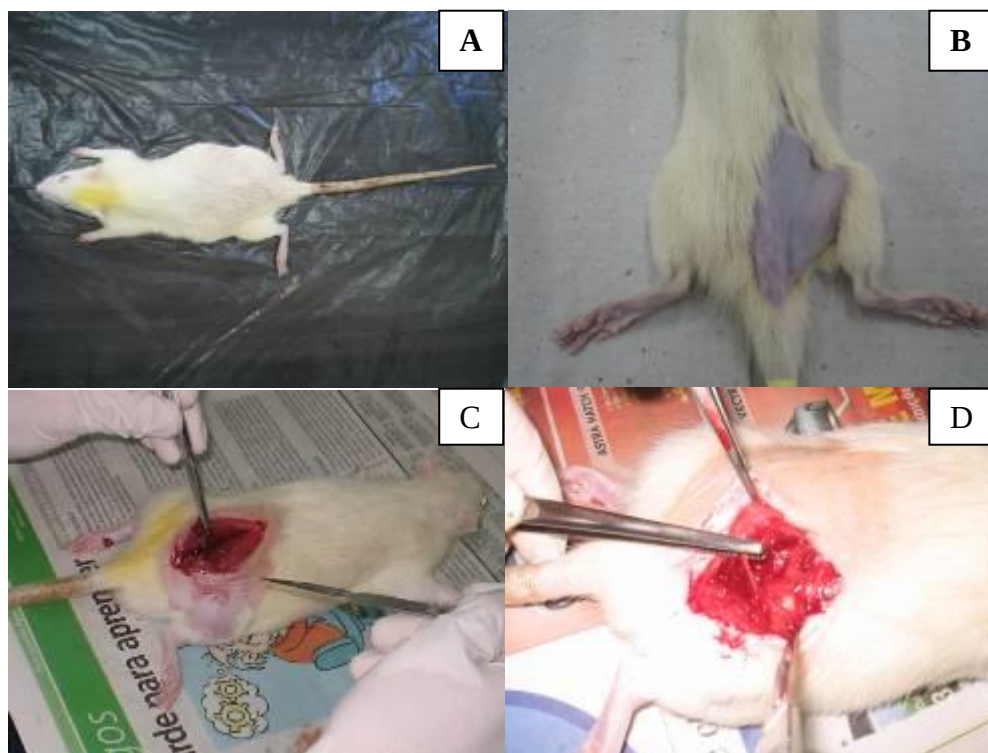


Figura 3. Procedimento para retirada do nervo ciático. Animal anestesiado (A); Tricotomia do local (B); Rebatimento da musculatura glútea e isquio (C); Exposição do nervo ciático (D)

O processamento histológico dos cortes semi-finos baseou-se no método de Chen *et al.* (2007). 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 durante uma hora e trinta minutos, em temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado em concentrações crescentes de solução aquosa de acetona, (50%, 70%, 90% e 100%), sendo embebido em resina Epon 812 (Polysciences®). Para a realização dos cortes semi-finos (espessura de 0,5 μm) nos fragmentos de nervo ciático emblocados, foi utilizado o ultramicrotomo (ULTRACUP, LEICA). Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina (1%), corante específico para estruturas ricas em lipídios, como a bainha de mielina.

h. Análise Histomorfométrica

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. Através das imagens capturadas, foi realizada a quantificação do número de fibras mielínicas utilizando o programa Mesurim Pro 08 (disponível gratuitamente na internet) através da mensuração de todos os campos microscópicos obtidos a partir do corte semi-fino do fragmento de nervo ciático (Figura 4).

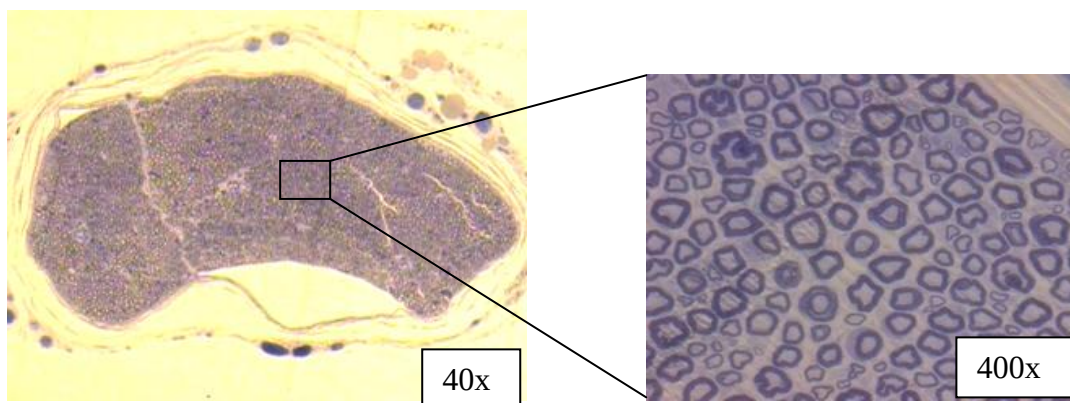


Figura 04. Fotomicrografia da secção transversa do nervo ciático utilizada para a análise histomorfométrica. Azul de toluidina, aumento de 40x e 400x.

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 *et al.*, (1986), 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) (ENDO, 2002). Para a análise dos diâmetros das fibras nervosas mielínicas, foram escolhidas aleatoriamente, cinco imagens de campos microscópicos para cada animal, sendo consideradas para análises todas as fibras presentes nos campos microscópicos analisados.

i. Análise Estatística

Para a realização da análise estatística dos resultados utilizou-se o programa Bioestat 5.0 (disponível gratuitamente na internet). Foi aplicado o teste de normalidade e a partir do resultado foi aplicado o Teste t de Student para os valores paramétricos, enquanto que para os valores que não passaram no teste de normalidade, 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 dos resultados da velocidade de condução nervosa e da amplitude do potencial de ação, utilizamos o programa Xlstat. Aplicou-se uma análise de variância - ANOVA modelo misto 2 x 2 x 7 (grupo, condição, tempo), com comparações *a posteriori* com teste de Tukey com nível de confiabilidade de 0,05.

6. RESULTADOS

a. ARTIGO ORIGINAL 1

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 Biophysic, 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 $29 \pm 6 \mu\text{V}$ to $85 \pm 13 \mu\text{V}$ and from $34 \pm 3 \text{ m/s}$ to $44 \pm 4 \text{ m/s}$, 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 $29 \pm 6 \mu\text{V}$ para $85 \pm 13 \mu\text{V}$ e de $34 \pm 3 \text{ m/s}$ para $44 \pm 4 \text{ m/s}$, respectivamente, entre a 8^o e a 15^o 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^{11,1,2}. 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.

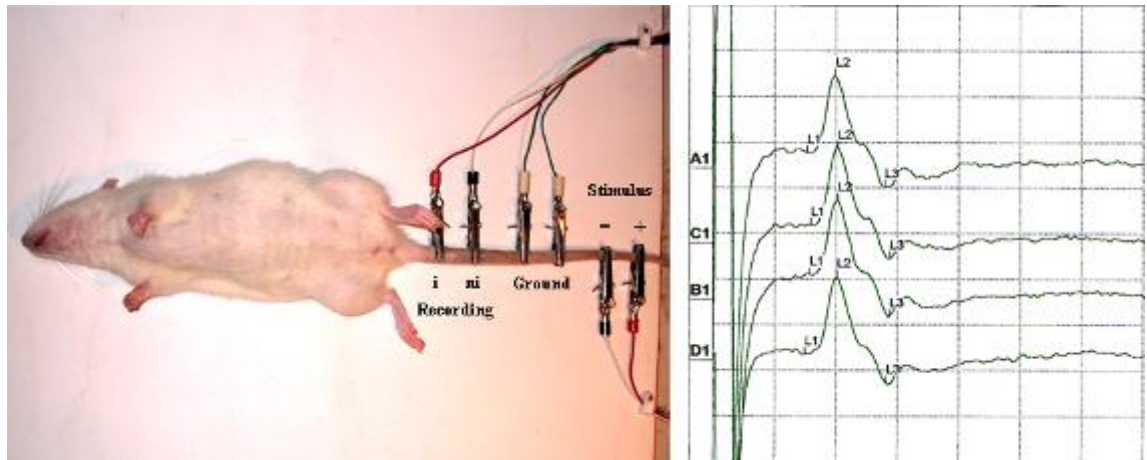


FIGURE 1 - The experimental setting is shown on the left side and the recording on the right side (ni). Non-inverting recording electrode (i) Inverting recording electrode.

(-) 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 $29 \pm 6 \mu\text{V}$ to $85 \pm 13 \mu\text{V}$ and from $34 \pm 3 \text{ m/s}$ to $44 \pm 4 \text{ m/s}$, respectively (Figures 2 and 3). The equations of linear regressions were as followed: Amplitude (μV) = $8.1 \times \text{weeks} - 34$ ($R^2 = 0.99$) and NCV (m/s) = $1.2 \times \text{weeks} + 25$ ($R^2 = 0.86$).

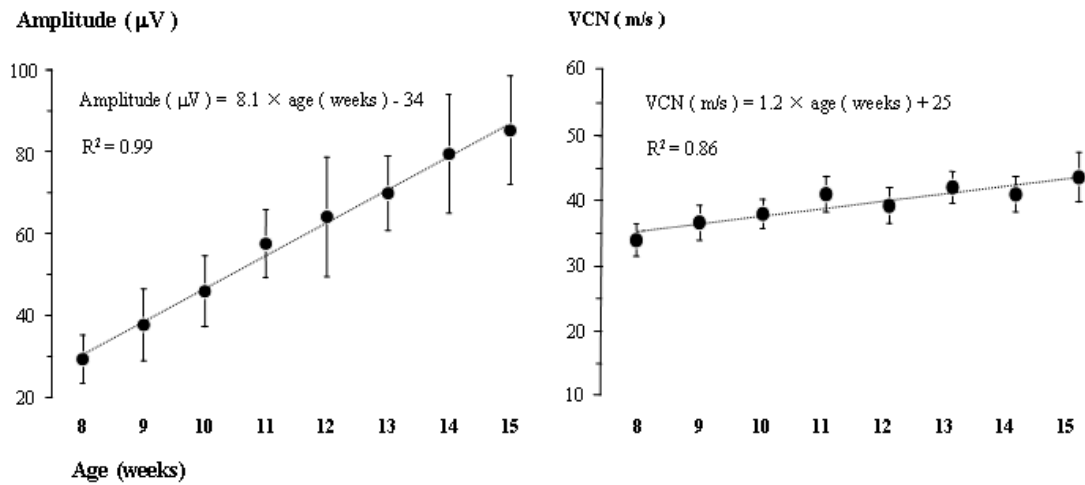


FIGURE 2 – Mean $\pm$ standard deviation of the SNAP amplitudes (left side) and NCV (right side) between the 8th and the 15th week of animal life. The equation of linear regression relating amplitude (μV) or NCV (μV) and age (weeks) and the squared correlation coefficient (R^2) is shown

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 events ¹.

There are not many electrophysiological studies of the caudal nerve of developing rats. Schmelzer and Low ¹, 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 Low ¹ 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 °C ¹² the difference in temperature fairly predicts the difference found in NCV.

Schmelzer and Low ¹ amplitudes were about 50% smaller than our amplitudes. Amplitude decreases about 0.04 μV per °C ¹², 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 as 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 saudáveis, 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 estrangle on the compound action potential 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 using suture of both techniques. *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).

b. ARTIGO ORIGINAL 2**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 resulta em 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 exercitados; 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 Institute 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 caudal

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 desengorduramento 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 (mm²) (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 caudal

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 frequentes 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 diabetes. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 1998;5:981-90.
18. Oliveira CAM, Luciano E, Marcondes MCCG, 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, Fujikawa 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

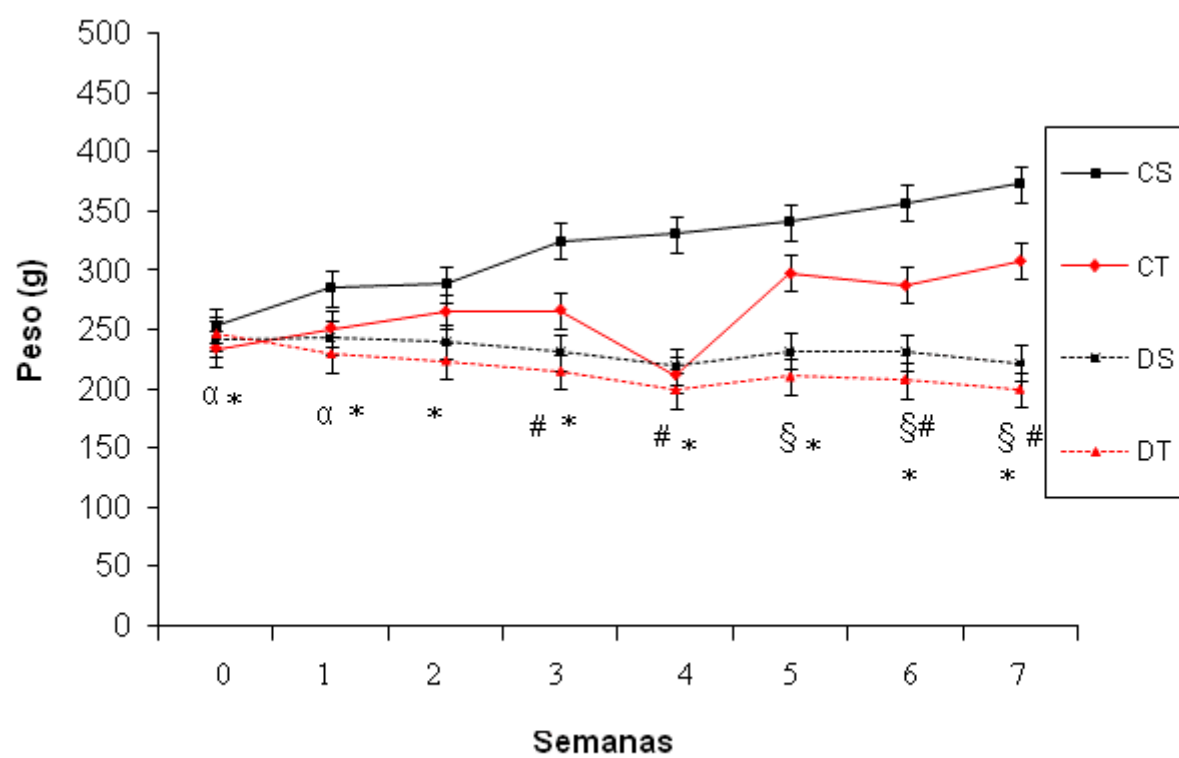
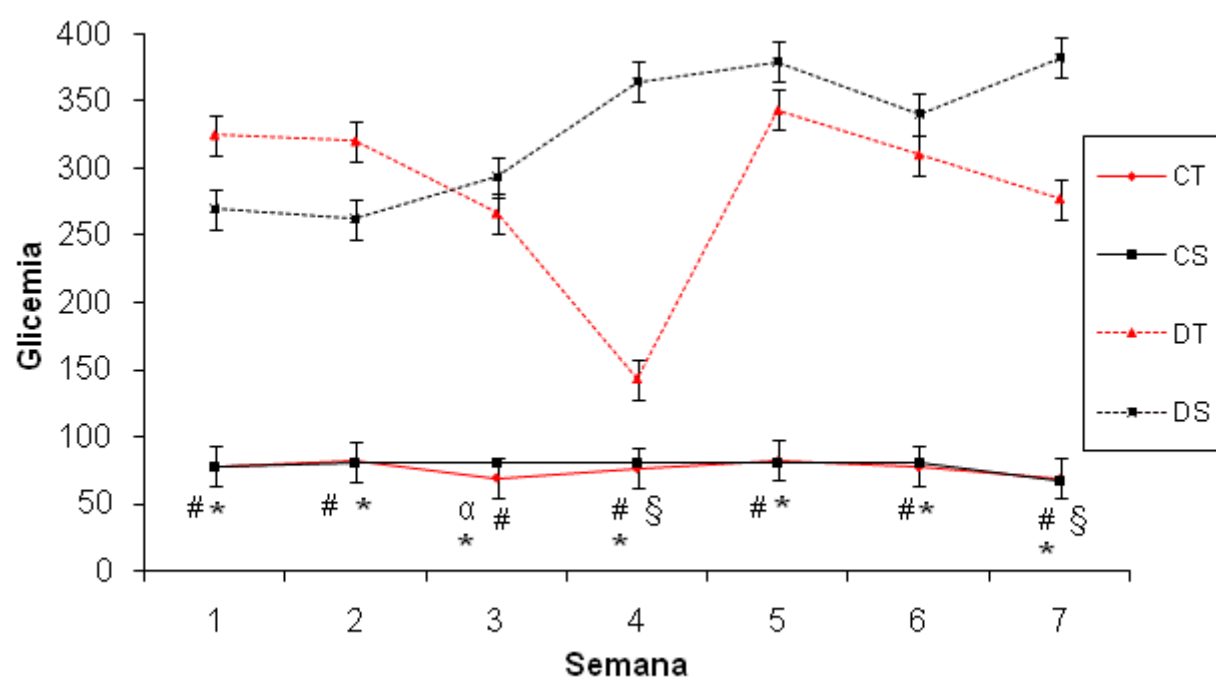


Figura 2.



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 GDT X GDS, $p \leq 0,02$; $\S$ GCT X GDT, $p \leq 0,002$; # GCT X GCS, $p \leq 0,03$;

* GCS X GDS, $p \leq 0,05$

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 GDT X GDS; $\S$ GCT X GDT; # GCT X GCS; * GCS X GDS, $p \leq 0,05$

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

7. DISCUSSÃO GERAL

Um Estudo Multicêntrico sobre a prevalência da Diabetes Mellitus no Brasil, de 1987/89, demonstra que 7,6% na população de 30 a 69 anos de idade tem a doença, e chega a 17,4% na população de 60 a 69 anos de idade. Esse mesmo estudo revelou um alto grau de desconhecimento em relação à doença. Quarenta e seis por cento dos diagnosticados não sabiam ser portadores de diabetes. Nos pacientes que conheciam seu diagnóstico, a análise do tipo de tratamento revelou que 22,3% não faziam nenhum tipo de tratamento (Ministério da Saúde, 2003).

O diabetes provoca uma série de complicações a longo prazo como retinopatia, nefropatia, alterações macro e microvasculares, dentre elas a neuropatia periférica (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993).

Como uma das complicações freqüentes no quadro diabético, neuropatia periférica contribui para um aumento da morbidade e mortalidade e severo impacto na qualidade de vida devido a parestesia, dor e lesões neuropáticas podendo progredir para uma amputação (SELAGZI et al, 2008). Um grande número de mecanismos está envolvido no surgimento da neuropatia diabética periférica: fatores metabólicos, vasculares, auto-imune, além de deficiências neuro-hormonais e fatores de crescimento. Entretanto a hiperglicemia persistente parece ser o fator causal primário mais importante (GAGLIARD, 2003).

Por tratar-se de uma complicação de causa multifatorial, o modelo animal acaba sendo um importante instrumento para elucidações sobre a neuropatia diabética. É sabido que drogas como a estreptozotocina é capaz de reproduzir um quadro de diabetes tipo 1 em ratos. 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 em 100% dos animais injetados (Delfino et al., 2002).

Outro cuidado que se deve ter para obter um bom modelo experimental da neuropatia diabética é quanto à idade do animal para indução do diabetes. Acredita-se que a maturação nervosa aconteça por volta da 26ª a 30ª semana de idade, tornando assim mais difícil perceber algumas alterações na estrutura nervosa

(MALONE et al 2006). 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 tempo em que o animal permanece diabético também parece ser crucial para instalação da neuropatia. Os estudos mostram que um dos sinais mais precoces da neuropatia é a velocidade de condução nervosa que a partir da 3ª semana pode apresentar valores diminuídos nos animais diabéticos (KATO et al, 2005), conforme podemos observar no presente estudo. Entretanto, para se evidenciar alterações nos componentes estruturais do nervo parece ser necessário um período um pouco maior de instalação da doença (WRIGT e NUKADA, 1994; MALONE et al 1996, MACHADO et al, 2000).

A dificuldade na interpretação dos resultados decorre que a literatura não apresenta uma metodologia semelhante nos estudos. A variação ocorre desde a escolha da idade do animal para a indução, no tipo e na quantidade da droga administrada para a indução, na espécie do animal e nos parâmetros avaliados. No presente estudo que avaliou o diabetes após seis semanas de indução não foram observadas alterações estruturais do nervo ciático. Semelhantemente Kato et al (2005) também não observaram haver alterações em relação ao diâmetro dos axônios em animais diabéticos após seis semanas de indução. Entretanto, outros estudos demonstraram atrofia axonal após oito semanas à indução do diabetes (Medori et al.,1988) e diminuição da bainha de mielina e fibras nervosas de menor calibre em animais diabéticos após vinte semanas de indução (Malone et al., 1996).

Estudos demonstram que uma boa alternativa para controlar os níveis glicêmicos dos portadores de diabetes é através do exercício físico (FORJAZ et al, 1998; BALDUCCI et al, 2006; OLIVEIRA et al, 2006; CAMBRI et al, 2007; GOMES et al, 2008; RAMALHO & SOARES, 2008; VANCEA et al, 2009). Isto foi demonstrado neste estudo em que os animais diabéticos exercitados apresentaram níveis glicêmicos menores que os animais diabéticos sedentários.

A despeito dos benefícios do exercício físico no controle do quadro diabético, os protocolos experimentais de exercícios variam bastante em relação a modalidade (esteira e natação), duração (curto prazo ou a longo prazo); frequência (dias alternados, 5x/semana; todos os dias), intensidade (moderada, exaustiva)

(LAMONTAGNE et al, 2007; LEMOS et al, 2007; PARK et al, 2007; GOMES et al, 2008; HSIEH et al, 2008; HUNG et al, 2008; PARK, HONG, SUNG, 2008, SELAGZI et al 2008)

Sobre a influência do exercício na instalação da neuropatia diabética periférica existe ainda uma grande lacuna na literatura. No presente estudo foi utilizado como método de avaliação o estudo da VCN e a análise histomorfométrica de alguns segmentos da estrutura do nervo. A partir destes parâmetros foi observado que o exercício físico não interferiu na instalação da neuropatia. A VCN dos animais dos grupos diabéticos (GDS e GDE) apresentaram valores menores em relação aos animais dos grupos controle (GCS e GCE), no entanto não houve diferença entre os valores apresentados pelos animais dos grupos diabéticos (GDS e GDE). As análises realizadas nas estruturas nervosas também não apresentaram diferenças entre os grupos estudados.

Diferente do presente estudo Salagzi et al. (2008) observaram em seu estudo um efeito protetor do exercício físico (natação) sobre a instalação da neuropatia diabética periférica, após oito semanas e quatro semanas de indução. Assim como em nosso estudo eles utilizaram como método de avaliação os parâmetros eletrofisiológicos e estudo da morfologia nervosa (espessura da bainha de mielina). Concordando com nossos achados por outro lado, Snow et al (2005) demonstraram que os valores de estudo eletrofisiológico ao final de um protocolo de exercício físico (esteira) não diferiu entre os animais diabéticos treinados e não treinados após doze semanas de indução.

Assim, devido às controvérsias do tema e sua relevância se faz necessário outros estudos experimentais que permitam elucidar o papel do exercício físico sobre a instalação da neuropatia diabética periférica.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante das questões ainda não esclarecidas, o presente estudo suscitou o interesse para as seguintes investigações complementares:

- Avaliar outras estruturas nervosas que possam estar relacionadas à instalação à neuropatia diabética periférica em animais com diabetes experimental;
- Avaliar parâmetros bioquímicos que interferem na condução nervosa;
- Avaliar a irrigação da estrutura nervosa periférica;
- Avaliar alterações na estrutura nervosa utilizando períodos diferentes de indução e instalação do quadro diabético;
- Avaliar as repercussões de idades diferentes para indução do diabetes;
- Utilizar outros protocolos de exercício físico para avaliar a influência destes sobre a instalação da neuropatia diabética periférica.

9. REFERÊNCIAS

- AFZAAL, S; SING, M; SALEEM, I. Aetiopathogenesis and management of neuropathy. J. Assoc. Physicians Índia, 50 (5):707-11, 2002.
- ALMEIDA, N ZH; RODRIGUES, KG; MIRANDA, NC; PERAZO, A; STELLA, LC; GOMES, LNL; VECCHIATTI, SM. Uso da gabapentina no tratamento da dor neuropática diabética. Rev. bras. clín. ter, 27(4):142-144, 2001.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Exercise and type 2 diabetes. Medicine & Science in Sports & Exercise, 32(7): 1354-1360, 2000.
- ARORA, M.; KUMAR, A.; KAUNDAL, R.K.; SHARMA, S.S. Amelioration of neurological and biochemical deficits by peroxynitrite decomposition catalysts in experimental diabetic neuropathy. Eur J Pharmacol, 596(1-3):77-83, 2008.
- 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, 20:216-223, 2006.
- BESTETTI, G.; ROSSI, G.L.; ZEMO, C. Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. Acta Neuropathol (Berl), 54:129-134, 1981.
- CAMBRI, L.T.; DECIMO, J.P.; SOUZA, M.; OLIVEIRA, F.R.; GEVAERD, M.S. Efeito agudo e crônico do exercício físico no perfil glicêmico e lipídico em diabéticos tipo 2. Motriz, 13(6):238-248, 2007.
- CHEN, C.J.; OU, Y.C.; LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; CHEN, S.Y.; WU, C.W.; WANG, C.C.; WANG, W.Y.; HUANG, Y.S.; HSU, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. Experimental Neurology, 204:443–453, 2007.
- CHERIAN, S.; ROY, S.; PINHEIRO, A.; ROY, S. Tight glycemic control regulates fibronectin expression and basement membrane thickening in retinal and glomerular capillaries of diabetic rats. Invest Ophthalmol Vis Sci, 50(2):943-949, 2009.
- CHOPRA, J.S.; DHAND, U.K.; MEHTA, S.; BAKSHI, V.; RANA, S.; MEHTA, J. Effect of protein calorie malnutrition on peripheral nerves. Brain, 109:307-323, 1986.
- CIOLAC, E. G., GUIMARÃES, G. V. Importância do exercício resistido para o idoso. Rev Soc Cardiol Est São Paulo, 12S:15-26, 2002.
- CIOLAC, E. G., GUIMARÃES, E. G. Exercício físico e síndrome metabólica. Rev Bras Med Esporte, 10:319-324, 2004.

CRUZ, M.W.; CORREA, R.S.; PUCCIONI-SOHLER, M.; NOVIS, S.A.P. Eletromiografia e potenciais evicados somatossensitivos na mielopatia pelo HTLV-I. Arq. Neuropsiquiatr, 56(4):756-762, 1998.

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

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

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.

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.

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

FEITOSA, M.M.; LARSSON, M.H.M.A.; USHIKOSHI, W.S.; PERRI, S.H.V. 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, 54(2), 2002.

FLORES, E.F.M.; GUTIÉRREZ, M.F.; VELÁSQUEZ, A. Complicaciones crônicas y factores asociados em diabéticos tipo 2. Salus online, 11(1):43-52, 2007.

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

FORJAZ, C.L.M.; TINUCCI, T.; ALONSO, D.O.; NEGRÃO, C.E. Exercício físico e diabete. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo, 5:981-90, 1998.

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

GOLD, G.; MANNING, M.; HELDT, A.; NOWLAIN, R.; PETTIT, J.R.; GRODSKY, G.M. Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin. Lack of protection by exogenous superoxide dismutase. Diabetes, 30:634-8, 1981.

GOMES, R.J.; LEME, J.A.C.A.; MELLO, M.A.R.; LUCIANO, E.; CAETANO, F.H. Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. Motriz, 14 (3): 320-328, 2008.

GREENE, D.A.; CHAKRABARTI, S.; LATTIMER, A.S.; SIMA, A.A.F. 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, 79:1479-85, 1987.

HEIDARIANPOUR, A.; HAJIZADEH, A.; KHOSHBATEN, A.; NIAKI, A.G.; BIGDILI, M.R.; POURKHALILI, K. Effects of chronic exercise on endothelial dysfunction and insulin signaling of cutaneous microvascular in streptozotocin-induced diabetic rats. European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, 14(6): 746-752, 2007.

HIYANE, WC; SOUSA, MV; MOREIRA, SR; VALLE, G; OLIVEIRA, RJ; ARSA, G; FERREIRA, CES; CAMPBELL, CSG; SIMÕES HG. Blood glucose responses of type 2 diabetics during and after exercise performed at intensities above and below anaerobic threshold. Rev Bras Cineantropom desempenho hum, 10 (1), 8-11, 2008.

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

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

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.

HSIEH, Y.Y.; CHANG, C.C.; HSU, K.H.; TSAI, F.J.; CHEN, C.P.; TSAI, H.D. Effect of exercise training on calpain systems in lean and obese Zucker rats. Int J Biol Sci, 4(5):300-308, 2008.

HUNG, C.H.; CHEN, Y.W.; SHAO, D.Z.; CHANG, C.N.; TSAI, Y.Y.; CHENG, J.T. Exercise pretraining attenuates endotoxin-induced hemodynamic alteration in type I diabetic rats. Appl Physiol Nutr Metab, 33(5):976-983, 2008.

KEMMER FW; BERGER M. 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, 1983.

KIRÁLY, M.A.; BATES, H.E.; YUE, J.T.Y.; GOCHE-MONTES, D.; FEDIUC, S.; PARK, E.; MATTHEWS, S.G.; 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, 56:732-744, 2007.

LAMONTAGNE, J.; MASIELLO, P.; MARCIL, M.; DELGHINGARO-AUGUSTO, V.; BURELLE, Y.; PRENTKI, M.; NOLAN, C.J. Circulating lipids are lowered but pancreatic islet lipid metabolism and insulin secretion are unaltered in exercise-trained female rats. Appl Physiol Nutr Metab, 32(2):241-248, 2007.

LEANDRI, M.; LENADRI, S.; LUNARDI, G. Effect of temperature on sensory and motor conduction of the rat tail nerves. Neurophysiol Clin, 38:297-304, 2008.

LEAL-CARDOSO, J.H.; MATIS-BRITO, B.G.; LOPES-JUNIOR, J.E.G.; VIANA-CARDOSO, K.V.; SAMPAIO-FREITAS, A.B.; BRASIL, R.O.; COELHO-DE-SOUZA, N.A.; ALBUQUERQUE, A.A.C. Effects of estradiol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. Braz J Med Biol Res, 37(8):1193-1198, 2004.

LEMOS, E.T.; REIS, F.; BAPTISTA, S.; PINTO, R.; SEPODES, B.; VALA, H.; ROCHA-PEREIRA, P.; SILVA, A.S.; TEIXEIRA, F. Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. Med Sci Monit, 13(8):168-174, 2007.

LOW, P.A.; WARD, J.D.; SCHMELZER, J.D.; BRIMJOIN, S. Ischemic conduction failure and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. Am J Physiol, 248:457-462, 1985.

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 com aloxana. Acta Cirúrgica Brasileira, 15(2):86-93, 2000.

MALONE, J.I.; LOWITT, S.; KORTHALS, J.K.; SALEM, A.; MIRANDA, C. The Effect of Hyperglycemia on Nerve Conduction and Structure Is Age Dependent. American Diabetes Association, 45(2):209-215, 1996.

MALTA, J.; CAMPOLONGO, G.D.; BARROS, T.E.P.; OLIVEIRA, R.P. Eletromiografia aplicada aos músculos da mastigação. Acta Ortop Bras, 14(2):106-107, 2006.

MARTINS, R.S.; SIQUEIRA, M.G.; SILVA, C.F.; GODOY, B.O.; PLESE, J.P.P. Electrophysiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair using suture of both techniques. Arq Neuropsiquiatr, 63(3-A):601-604, 2005.

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

MAYER, J.H.; TOMLINSON, D.R. Prevention of defects of axonal transport and nerve conduction velocity by oral administration of myo-inositol or an ARI in streptozotocin-diabetic rat. Diabetologia, 25:433-438, 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dia mundial do diabetes, 2003. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/sas/cnhd/noticias/dia_mundial.htm (acesso em 17 jun 2009)

MINUK, H.L.; VRANIC, M.; MARLISS, E.B.; HANNA, A.K.; ALBISSER, A.M.; ZINMAN, B. Glucoregulatory and metabolic response to exercise in obese non-insulin-dependent diabetes. Am J Physiol, 240:458-464, 1981.

MORRISON, J.F.; SHEHAB, S.; SHEEN, R.; DHANASEKARAN, S.; SHAFFIULLAH, M.; MENSAH-BROWN, E. Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. Exp Physiol, 93(2):213-222, 2008.

MURADE, E.C.M.; NETO, J.S.H.; AVANZIO, O. Estudo da relação e da importância entre a semiologia clínica, tomografia axial computadorizada e eletroneuromiografia nas radiculopatias lombares. Acta Ortop Bras, 10(4):18-25, 2002.

NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZARI, 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, 88:649-654, 2000.

OBROSOVA, I.G.; HUYSSEN, C.V.; FATHALLAH, L.; CAO, X.; GREENE, D.A.; STEVENS, M.J. An aldose reductases inhibitor reverse early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. The FASEB Journal, 14, 2001.

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. Journal of Diabetes and its Complications, 21: 258-264, 2007.

PARK, S.; HONG, S.M.; LEE, J.E.; SUNG, S.R. 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(5):1764-1771, 2007.

PARK, S.; HONG, S.M.; SUNG, S.R. Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats. Life Sci, 82(9-10):503-511, 2008.

PEIRCE, N.S. Diabetes and exercise. British Journal Sports Medicine, 33:161-173, 1999.

PRABHAKAR, S.; STARNES, J.; SHI, S.; LONIS, B.; TRAN, R. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. J Am Soc Nephrol, 18(11):2945-2952, 2007.

RAMALHO, A.C.R.; SOARES, S. O papel do exercício no tratamento do diabetes melito tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metab, 52(2):260-267, 2008.

REDDING, R.W.; INGRAM, J.T.; COLTER, S.B. Sensory nerve conduction velocity of cutaneous afferents of the radial, ulnar, peroneal and tibial nerves of the dog: references values. Am J Vet Res, 43:145-162, 1983.

ROSA, M.P.; BARONI, G.V.; PORTAL, V.L. Potencial terapêutico para a prevenção e tratamento da nefropatia e neuropatia diabéticas: evidências do uso do cilostazol. Arq Bras Endocrinol Metab, 51 (9):1528-1532, 2007.

SANDRINI, F.A.L.; PEREIRA-JUNIOR, E.D.; GAY-ESCODA, C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. Rev Bras Otorrinolaringol, 73(2):196-201, 2007.

SCHMELZER, J.D.; LOW, P.A. Electrophysiological studies on the effect of age on caudal nerve of the rat. Experimental Neurology, 96:612-620, 1987.

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(11):971-978, 2008.

SIMA, A.A.F.; SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: an update. Diabetologia, 42:773-788, 1999.

SMITH, A.G.; SINGLETON, J.R. Idiopathic neuropathy, prediabetes and the metabolic syndrome. Journal of the Neurobiological Sciences, 242:9-14, 2006.

SNOW, L.M.; SANCHEZ, O.A.; McLOON, L.K.; SERFASS, R.C.; THOMPSON, L.V. Effects of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. Am J Phys Med Rehabil, 84(10):770-778, 2005.

STEVENS, M.J.; LATTIMER, A.S.; KAMIJO, M.; VAN HUYSEN, C.; SIMA, A.A.F.; GREENE, D.A. Osmotically induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. Diabetologia, 36:608-14, 1993.

SULLIVAN, K.A.; HAYNES, J.M.; WIGGIN, T.D.; BACKUS, C.; OH, S.S.; LENTZ, S.I.; BROSIUS, F.; FELDMAN, E. Mouse models of diabetic neuropathy. Neurobiology of Disease, 28:276-285, 2007.

TANCRÈDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. Diabetes, 31:406-409, 1982.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. N Engl Med, 329, 977-86, 1993.

VANCEA, D.M.M.; VANCEA, J.N.; PIRES, M.I.F.; REIS, M.A.; MOURA, R.F.; DIB, S.A. Efeito da frequência do exercício no controle glicêmico e composição corporal de diabéticos tipo 2. Arq Bras Cardiol, 92 (1):23-30, 2009.

VEVES, A.; SAOUAF, R.; DONAGHUE, V.M.; MULLOLY, C.A.; KISTLER, J.A.; GIURINIM J.M.; HORTON, E.S.; FIELDING, R.A. Aerobic exercise capacity remains normal despite impaired endothelial function in the micro and macrocirculation of physically active IDDM patients. Diabetes, 46(11):1846-52, 1997.

ZOLLMAN, P.J.; AWAD, O.; SCHMELZER, J.D.; LOW, P.A. Effect of ischemia and reperfusion *in vivo* on energy metabolism of rat sciatic-tibial and caudal nerves. Experimental Neurology, 114:315-320, 1991.

WALKER, S.C.; HELM, P.A.; LAVERY, L.A. Gait Pattern Alterations by functional sensory substitution in healt subjects and in diabetic subjects with peripheral neuropathy. Arch Phys Med Reahbil, 78:853- 857, 1997.

WHITE, C.M.; PRITCHARD, J.; TURNER-STOKES, L. Ejercicio para personas con neuropatía periférica. Revisión Cochrane, 2003.

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

ANEXOS

Anexo 1 – Aceite do artigo enviado à 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

Anexo 2 – Carta de envio do artigo Original 2 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.

Anexo 3– Parecer final 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