

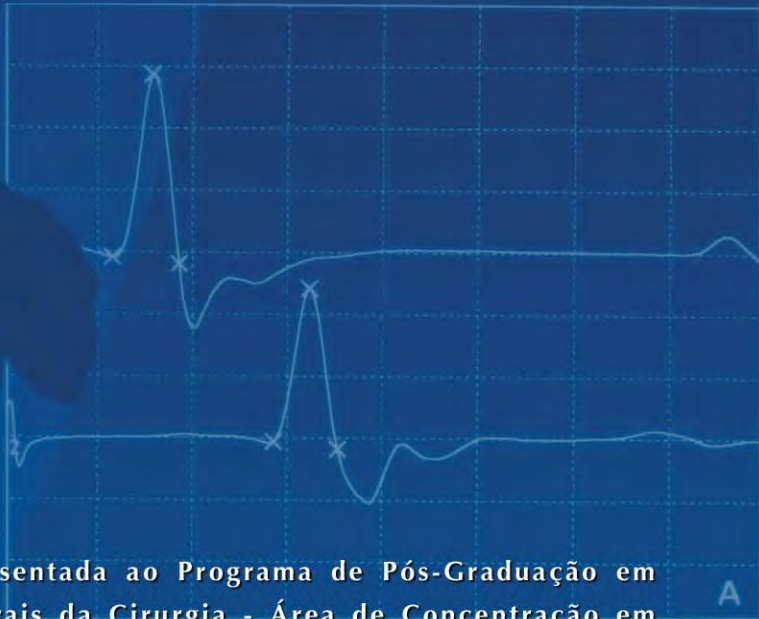



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Sandra Alberti

NEUROPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL

Estudo da condução nervosa motora dos nervos ciático e caudal em ratos com diabetes induzido pela aloxana



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia - Área de Concentração em "Agressão, Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e de Órgãos", da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para obtenção do título de Doutor.



Orientador: Prof. Adjunto César Tadeu Spadella

BOTUCATU - SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Alberti, Sandra.

Neuropatia diabética experimental: estudo da condução nervosa motora dos nervos ciático e caudal em ratos com diabetes induzido pela aloxana / Sandra Alberti. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,

Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: César Tadeu Spadella
Assunto CAPES: 40900002

1. Diabetes - Estudos experimentais 2. Neuropatia - Estudos Experimentais

CDD 616.462

CDD 616.8

Palavras chave: Diabetes; Condução nervosa motora; Nervo caudal; Nervo ciático; Ratos

*“o músculo e o nervo constituem
uma espécie de condensador de
uma própria e peculiar eletricidade
que existe em todos animais vivos”*

Luigi Galvani

*“nos músculos se reúne o fluído elétrico,
que logo se difunde pelo corpo
mediante a rede de nervos,
os quais são condutores naturais
do fluído elétrico e que
se insinuam com suas extremidades
dentro dos músculos”*

Luigi Galvani

DEDICATÓRIA

Ao meus pais,

***ANTONIO ALBERTI e GUIOMAR DOS SANTOS ALBERTI, instrumentos da fé em Deus,
que orientam e iluminam meu caminho.***

Ao meus filhos,

DANTE e ENZO ALBERTI BARREIRA, minhas grandes fontes de amor e esperança.

e

Às minhas irmãs,

***ERSÍLIA e ANDRÉA ALBERTI e suas famílias, que completam com
alegria minha vida.***

DEDICO ESTE TRABALHO

HOMENAGENS

HOMENAGEM I

*Ao Professor **CÉSAR TADEU SPADELLA**, que através da orientação desprendida, criteriosa e séria deste trabalho, não só me transmitiu conhecimentos, mas me fez saber o quanto agradável é a produção científica*

HOMENAGEM II

*Ao Professor **LUIZ ANTONIO DE LIMA RESENDE**, pela padronização do exame eletroneuromiográfico nos nervos ciático e caudal de ratos, imprescindível a realização deste trabalho.*

MEU ETERNO OBRIGADO

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Doutor **FAUSTO VITERBO**, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, pelo exemplo enquanto profissional e incentivo à mim conferida;

Ao Doutor **JOSÉ ANTONIO GARBINO**, da Divisão de Reabilitação do Hospital Lauro de Souza Lima, pela realização do Estágio na área de Neurofisiologia Experimental, e pelos ensinamentos concedidos neste período;

À Profa. Dra. **ELISA APARECIDA GREGÓRIO**, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu- UNESP, pelo aprendizado durante o Estágio Docência;

Ao Prof. Dr. **PAULO ROBERTO RODRIGUES RAMOS**, do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências- UNESP, pela oportunidade de realização do Estágio Docência;

Ao Consultor Estatístico **HÉLIO RUBENS DE CARVALHO NUNES** do Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP) do Campus de Botucatu-UNESP, pela análise estatística dos dados obtidos neste estudo;

Ao Biomédico **MARCELO FERNANDO ZEUGNER BERTOTTI**, do Departamento de Neurologia e Psiquiatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pela oportunidade de acompanhamento dos exames eletroneuromiográficos realizados na clínica do Hospital, e orientações técnicas que contribuíram na realização deste trabalho;

Aos Integrantes do Grupo de Pesquisa em Diabetes Experimental, da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, Profs. Drs. **MAURO MASSON LERCO**, **ÉRIKA VERUSKA DE OLIVEIRA PAIVA ORTOLAN**, **JOSÉ LÚCIO MARTINS MACHADO**, **CÉLIA SPERANDÉO DE MACEDO** e **ELISA APARECIDA GREGÓRIO**, pelo apoio logístico à realização deste estudo;

À Profa. Dra. **SHEILA CANEVESE RAHAL**, do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu-UNESP, pela concessão do espaço físico necessário para realização do exame eletroneuromiográfico nos animais experimentais utilizados neste trabalho;

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, na pessoa do Diretor Prof. Dr. **JOEL SPADARO** e Vice-Diretor Prof. Dr. **SÉRGIO SWAN MÜLLER**;

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, na pessoa do coordenador do Programa de Bases Gerais da Cirurgia Prof. Dr. **ANTÔNIO JOSÉ MARIA CATÂNEO**;

À Comissão Permanente de Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, na pessoa da Presidente Prof^ª. Dr^ª. **CELIA REGINA NOGUEIRA** e da Vice-Presidente Prof^ª. Dr^ª. **LIGIA MARIA SUPPO DE SOUZA RUGOLO**;

À Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, na pessoa do seu Presidente, regente na época do envio do protocolo de pesquisa deste estudo, Prof. Dr. **ANTERO F. MACEDO MIRANDA**, pela avaliação e apreciação do projeto de pesquisa atinente a este trabalho;

Ao Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, na pessoa do chefe Prof. Dr. **LUIZ EDUARDO NARESSE** e do vice-chefe **PAULO ROBERTO A. SILVARES**;

Ao Departamento de Neurologia e Psiquiatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, na pessoa do chefe Prof. Dr. **ARTHUR OSCAR SCHELP** e do vice-chefe **MARCO ANTONIO ZANINI**;

Ao Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu-UNESP, na pessoa do chefe Prof. Dr. **JOSÉ JOAQUIM T. RANZANI** e do vice-chefe **ANA LIZ G. ALVES**;

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida em grande parte do período de Doutorado;

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão dos Fomentos que viabilizaram a execução deste trabalho;

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, em especial à Sra. **IRENE SPAGO**, Srta. **SÔNIA MARIA CAPELETTI**, Sra. **MARIA CECÍLIA SALGADO MERCADANTE**, pelo suporte técnico em relação aos procedimentos necessários para o estudo do diabetes experimental; e aos Srs. **DANILO CHAGURI**, **ARLINDO SÉRGIO GABRIEL** e **DANILO BORSATTO**, pelos cuidados com os animais utilizados neste trabalho, e higienização de seus alojamentos;

À todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em particular, a Sra. **JANETE APARECIDA HERCULANO NUNES SILVA**, Sr. **NATHANAEL PINHEIRO SALLES**, Sra. **LÍLIAN CRISTINA NADAL BIANCHI NUNES** e Srta. **REGINA CÉLIA SPADIN**, pelos serviços prontamente prestados;

À Sra. **LUZIA BELVER FERNANDES**, Sra. **MARIA DAS GRAÇAS MARTINS**, Sr. **OSWALDO CLARO DE OLIVEIRA**, Sr. **JOAQUIM GARCIA JÚNIOR**, funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação do Campus de Botucatu- UNESP, pela atenção e orientação bibliográfica;

À Sra. **SELMA MARIA DE JESUS**, funcionária da Divisão de Biblioteca e Documentação do Campus de Botucatu- UNESP, pela montagem da Ficha Catalográfica deste trabalho;

À Sra. **MARIA HELENA MORENA**, técnica do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu- UNESP, pelos ensinamentos dos recursos técnicos acrescidos à minha formação profissional;

À Sra. **SIMONE BARROSO CORVINO CAMARGO**, da Seção de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, pelas orientações técnicas e convívio neste período;

Ao Sr. **ALTINO DANTAS BASILIO NETO**, funcionário do Departamento de Neurologia e Psiquiatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pelo respeito e ajuda irrestrita.

Ao Sr. **ADEMIR PADILHA**, funcionário do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru- USP, pela atenção e obtenção da maioria dos artigos utilizados neste estudo;

À Srta. **ÉRIKA CAROLINA ROSSETTO**, pela contribuição na realização dos gráficos e tabelas deste trabalho;

Às amigas **CLAUDIA QUINTELLA**, **SELMA LOUTFI** e **TIANA KNOURI**, pela amizade sincera e palavras de constante incentivo;

Às Pós-Graduandas **SANDRA TORELLI** e **ANA CAROLINA MORTARI**, do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu-UNESP, pela colaboração na realização dos exames eletroneuromiográficos nos animais experimentais utilizados neste trabalho;

A **TODOS ANIMAIS** utilizados neste trabalho.

A TODOS, MEUS AGRADECIMENTOS SINCEROS

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- NEUROPATIA DIABÉTICA	5
2.1. Revisão	5
2.2. Conceito	8
2.3. Aspectos Históricos	8
2.4. Classificação	9
3. O ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA	11
4. OBJETIVOS	13
5. MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1. Animais Utilizados	14
5.2. Grupos Experimentais	14
5.3. Momentos de Avaliação e Sacrifício	15
5.4. Indução do Diabetes Experimental	17
5.5. Delineamento do Experimento	19
5.5.1. Adaptação, indução do diabetes, seleção e sorteio dos grupos	19
5.6. Parâmetros Analisados	20
5.7. Metodologia e Técnicas Utilizadas	20
5.7.1. Anestesia	20
5.7.2. Protocolo utilizado na avaliação clínica e laboratorial dos grupos experimentais	21
5.7.3. Metodologia utilizada para a coleta de parâmetros clínicos e laboratoriais em gaiolas metabólicas	21
5.7.4. Metodologia empregada para o estudo da condução nervosa motora (amplitudes, latências e velocidades) dos nervos ciático e caudal	25
5.7.4.1. Nervo ciático	25
5.7.4.2. Nervo caudal	26
5.7.5. Sacrifício	29
5.7.6. Métodos utilizados para as dosagens laboratoriais	29
5.7.7. Métodos estatísticos	30

6. RESULTADOS	31
6.1. Método de Indução do Diabetes	31
6.2. Evolução Clínica	31
6.2.1. Grupo não diabético (GND)	31
6.2.2. Grupo diabético (GD)	32
6.3. Exames Laboratoriais	38
6.3.1. Grupo não diabético (GND)	38
6.3.2. Grupo diabético (GD)	38
6.4. Condução Nervosa Motora	41
6.4.1. Grupo não diabético (GND)	41
6.4.2. Grupo diabético (GD)	41
6.5. Descrição de Necropsia	49
6.5.1. Grupo não diabético (GND)	49
6.5.2. Grupo diabético (GD)	49
7. DISCUSSÃO	52
7.1. Quanto aos Animais Utilizados	52
7.2. Quanto ao Tempo de Observação dos Animais	53
7.3. Quanto às Técnicas Utilizadas	53
7.3.1. Anestesia	53
7.3.2. Indução do Diabetes Experimental	54
7.4. Quanto à Evolução Clínica	56
7.5. Quanto aos Exames Laboratoriais	57
7.6. Quanto ao Estudo da Condução Nervosa Motora	58
8. CONCLUSÕES	64
9. RESUMO	65
10. SUMMARY	66
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
12. ANEXOS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Complicações vasculares do diabetes	6
Figura 2	Aspecto físico dos animais do grupo não diabético (a) e diabético (b)	14
Figura 3	Distribuição dos animais nos grupos e subgrupos, segundo os momentos de avaliação funcional dos nervos e sacrifício	16
Figura 4	Indução do diabetes experimental: (A) animais em caixa aquecida com luzes incandescentes para vasodilatação venosa, (B) imobilização da cauda do animal e (C) inoculação da droga diabetogênica por punção da veia caudal	18
Figura 5	Ficha elaborada para anotação dos parâmetros clínicos e laboratoriais	22
Figura 6	Ficha individual, elaborada para registro dos parâmetros clínicos, laboratoriais e necropsia	23
Figura 7	Gaiola metabólica individual (A) e coleta da amostra de sangue por secção da ponta da cauda do animal (B)	25
Figura 8	Estímulo proximal no trajeto do nervo ciático, adjacente à crista ilíaca, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados sobre o ventre do músculo flexor superficial dos dedos (G1) e uma zona neutra (G2). O eletrodo terra (seta) está em região intermediária entre os pontos de estímulo e captação	27
Figura 9	Estímulo distal no trajeto do nervo ciático, próximo ao joelho, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados sobre o ventre do músculo flexor superficial dos dedos (G1) e uma zona neutra (G2). O eletrodo terra (seta) está em região intermediária entre os pontos de estímulo e captação	27

Figura 10	Estímulo proximal, sobre o nervo caudal, nos dois primeiros centímetros da cauda, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados à 6cm do ponto de estímulo distal (G1), à 3cm do mesmo ponto (G2), e o eletrodo terra (seta) está em uma região intermediária entre os pontos de estímulo e captação	28
Figura 11	Estímulo distal, sobre o nervo caudal, distante 10cm do ponto de estímulo proximal, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados à 6cm do ponto de estímulo distal (G1), à 3cm do mesmo ponto (G2), e o eletrodo terra (seta) está em uma região intermediária entre os pontos de estímulo e captação	28
Figura 12	Aparelho Nicolet, modelo <i>Compass Meridien</i> , de 1 canal. No centro, o amplificador (seta)	29
Figura 13	Estado geral dos animais do grupo não diabético (A) e diabético (B), da mesma espécie e idade, em um seguimento de 6 meses	33
Figura 14	Médias e desvios-padrão do peso corporal (g) dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação	34
Figura 15	Médias e desvios-padrão da ingestão hídrica (ml/24h) dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação	35
Figura 16	Médias e desvios-padrão da ingestão alimentar (g/12h), dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação	36
Figura 17	Médias e desvios-padrão da diurese (ml/24h), dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação	37
Figura 18	Médias e desvios-padrão da glicemia de jejum (mg/dl), dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação	39
Figura 19	Médias e desvios-padrão da glicosúria do grupo não diabético (G1) em $[(\text{mg/dl}) \times 10^{-1}]$ e do diabético (G2) em $[(\text{mg/dl}) \times 10]$, nos cinco momentos de avaliação	40
Figura 20	Exame eletroneuromiográfico: no nervo ciático (A) e no nervo caudal (B) de ratos não diabéticos, respectivamente, com 6 e 12 meses de seguimento	43

Figura 21	Exame eletroneuromiográfico: no nervo ciático (A) e no nervo caudal (B) de ratos diabéticos, respectivamente, com 6 e 12 meses de seguimento	44
Figura 22	Médias e desvios-padrão da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo ciático, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação	45
Figura 23	Médias e desvios-padrão da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo caudal, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação	46
Figura 24	Médias e desvios-padrão da latência motora distal (ms) do nervo ciático, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação	47
Figura 25	Médias e desvios-padrão da latência motora distal (ms) do nervo caudal, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação	48
Figura 26	Ratos diabéticos com 3 meses de seguimento: (A) aspecto macroscópico da catarata bilateral, e (B) necropsia com lesão visceral (teníase)-seta	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da neuropatia diabética	10
Tabela 2	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação do peso corporal (g) nos grupos e momentos de avaliação	34
Tabela 3	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da ingestão hídrica (ml/24h) nos grupos e momentos de avaliação	35
Tabela 4	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da ingestão alimentar (g/12h) nos grupos e momentos de avaliação	36
Tabela 5	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da diurese (ml/24h) nos grupos e momentos de avaliação	37
Tabela 6	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da glicemia (mg/dl) nos grupos e momentos de avaliação	39
Tabela 7	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da glicosúria (mg/dl) nos grupos e momentos de avaliação	40
Tabela 8	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo ciático nos grupos e momentos de avaliação	45
Tabela 9	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo caudal nos grupos e momentos de avaliação	46
Tabela 10	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da latência motora distal (ms) do nervo ciático nos grupos e momentos de avaliação	47

Tabela 11	Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da latência motora distal (ms) do nervo caudal nos grupos e momentos de avaliação	48
Tabela 12	Análise macroscópica do megacólon nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação, obtidas pela classificação em scores: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado e (+++) grave	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SI - Sistema Internacional de Unidades

% - porcentagem

Na⁺ - íon sódio

K⁺ - íon potássio

Na, K- ATPase – sódio, potássio- adenosina trifosfatase

DCCT – Diabetes Control and Complications Trial

UKPDS – UK Prospective Diabetes Study

EURODIAB – European Diabetes

ROS – espécies reativas do oxigênio

ARIs – inibidores da aldose redutase

α - alfa, primeira letra do alfabeto grego

γ - gama, terceira letra do alfabeto grego

NGF – fator de crescimento neural

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

MGUS – gamopatia monoclonal de significância desconhecida

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

GAP – Grupo de Apoio à Pesquisa do Campus de Botucatu

g – o grama, unidade de medida de massa

°C – grau Celsius, unidade de temperatura

GND – grupo não diabético

GD – grupo diabético

mg – miligrama, milésima parte do grama, unidade de medida de massa

kg – quilograma, unidade fundamental de medida de massa

mm – milímetro, milésimo do metro, unidade de medida de comprimento

dl – decilitro, unidade de medida de capacidade

x – por, exprime relações de medida

i.p. – via de administração intraperitoneal

e.v. – via de administração endovenosa

(-), (+), (++) e (+++) – relativo à ausência, ou intensidade do achado, respectivamente, leve, moderado ou grave

E.U.A – Estados Unidos da América

M1, M2, M3, M4 e M5 – relativo aos momentos de avaliação e sacrifício, respectivamente, com 1, 3, 6, 9 e 12 meses de seguimento

® - Marca registrada

rpm – rotações por minuto, velocidade angular

ms - o microsegundo é uma unidade de tempo do SI igual a um milionésimo (10^{-6}) de segundo. É freqüentemente usado para medir coisas como reações químicas e atômicas, que ocorrem normalmente em intervalos imperceptíveis de tempo

k Ω - o ohm é a unidade de medida da resistência elétrica, padronizada pelo SI. Corresponde à resistência de um condutor quando percorrido por uma corrente de 1 ampère sob uma tensão de 1 volt. O ohm é simbolizado pela letra grega ômega maiúsculo (Ω) e seus múltiplos mais usados são o quilo-ohm (k Ω) = 1.000 ohms; e o megaohm ou "megohm" (M Ω) = 1.000.000 ohms

G1 – ponto de captação sobre o ventre muscular, eletrodo ativo

G2 – ponto de captação sobre o tendão do músculo correspondente, eletrodo de referência

CMAP – potencial de ação muscular composto

Hz - o hertz é a unidade derivada do SI para frequência, a qual é expressa em termos de oscilações por segundo (s^{-1} ou 1/s)

mv – o volt é a unidade SI de tensão elétrica (diferença de potencial elétrico), a qual denomina o potencial de transmissão de energia, em Joules, por carga elétrica, em Coulombs, entre dois pontos distintos no espaço. Foi batizada em honra ao físico italiano Alessandro Volta.

nm – o nanometro vale $1,0 \times 10^{-9}$ metros – ou um milionésimo de milímetro. Tem como símbolo nm. É uma unidade de comprimento do SI, comumente usada para medição de comprimentos de onda de luz visível (400 nm a 700 nm), radiação ultravioleta radiação infra-vermelha e radiação gama, entre outras coisas

et al. – e colaboradores

DLAT – latência distal

ANOVA – Análise de Variância

h - horas

NCV – velocidade de condução nervosa

AMPL – amplitude da onda M

AREA – área da onda M

min - minutos

SNC – sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* se constitui em um problema de saúde pública mundial, com altos índices de morbidade e mortalidade prematura, que afeta milhões de pessoas em países de todos os níveis de desenvolvimento (NATIONAL DIABETES DATA GROUP, 1985; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2001; NATHAN, 2002). Nos Estados Unidos, a doença atinge cerca de 16 milhões de americanos, aproximadamente 2 a 4% da população, com mais de 700.000 novos casos diagnosticados todos os anos (MORRIS *et al.*, 2000; VERNILLO, 2001; NATHAN, 2002). Neste país, o diabetes é a terceira causa de mortalidade e morbidade, com uma média de 40.000 mortes e de 20.000 amputações por ano (VERNILLO, 2001). Estima-se que mais de 100 bilhões de dólares são gastos, anualmente, pelo governo americano no tratamento do diabetes e de suas complicações (NATHAN, 2002).

O Brasil apresenta uma prevalência de indivíduos diabéticos semelhante aos países mais desenvolvidos, com o agravante de que 46% dos enfermos não são diagnosticados precocemente e 22% não possuem qualquer tipo de tratamento (MALERBI & FRANCO, 1992; ASSUNÇÃO *et al.*, 2001). Dados do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988), de levantamentos regionais (SILVESTRE, 1997) e de registros de associações de pacientes diabéticos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2001) revelam que o diabetes é a sexta causa de internação hospitalar, contribuindo de forma significativa para outras causas de internação como: cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatia, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial. Desta forma, 30% dos pacientes internados em Unidades Coronarianas e 26% dos indivíduos que ingressam em programas de diálise são diabéticos. A retinopatia diabética, descrita por Duke-Elder (apud GRAZIANO *et al.*, 1992), como “uma das maiores tragédias da Oftalmologia da nossa geração”, figura, hoje, entre as principais causas de cegueira em adultos (GRAZIANO *et al.*, 1992).

O *Diabetes Mellitus* também é responsável por uma das mais freqüentes alterações dos nervos periféricos, a neuropatia diabética, que se acompanha de uma alta morbidade, associada à ulcerações dos membros inferiores, incapacitação física para o trabalho, e uma relação custo/produzividade desproporcionalmente favorável aos gastos necessários para o seu controle (KRÓLEWSKI & WARRAM, 1985; DICK *et al.*, 1987).

Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes e suas complicações (DEFRONZO & FERRANNINI, 1991; NERUP *et al.*, 1994; McGARRY & DOBBINS, 1999; REIS & VELHO, 2002). A base das anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas é a ação inadequada da insulina nos tecidos alvos, como resultado de uma secreção deficiente de insulina e/ou uma resposta tecidual diminuída à insulina, em um ou mais pontos dos complexos sítios de sua ação hormonal (LeROITH, 2002; THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2002). Normalmente, estas duas alterações estão presentes em indivíduos diabéticos, porém, não está comprovado se é a resistência à insulina ou sua secreção deficiente, ou ambas, a causa primária da hiperglicemia (PRATLEY & WEYER, 2001; LeROITH, 2002; THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2002).

A hiperglicemia crônica do diabetes, por sua vez, leva a alterações estruturais, falhas funcionais e/ou falência de vários órgãos, especialmente os olhos, os rins, os nervos, o coração e os vasos sanguíneos (GRAZIANO *et al.*, 1992; LANGER *et al.*, 1992; PESTALOZZI *et al.*, 1992; SARAIVA, 1992; ROTH *et al.*, 1996; MEALEY, 1998). Nos nervos periféricos, os quais não dependem de insulina para a captação da glicose (KAHN, 1996; SHEPHERD & KAHN, 1999), o excesso deste substrato é convertido em sorbitol, pela ação da aldose redutase, gerando mudanças bioquímicas significativas (KENNEDY *et al.*, 1990; HIRATA & OKADA, 1990; SARAIVA, 1992). O aumento da concentração de frutose e sorbitol nas células do tecido nervoso tem sido correlacionado ao movimento anormal de líquidos e ao desequilíbrio das concentrações celulares de Na^+ e K^+ (HIRATA & OKADA, 1990; SARAIVA, 1992). A base das anormalidades eletrolíticas teciduais parece ser uma enzima de membrana, a sódio, potássio- adenosina trifosfatase (Na, K- ATPase), responsável pelo controle e manutenção dos níveis celulares de Na^+ e K^+ (COPPEY *et al.*, 2001; HIRATA & OKADA, 1990). A atividade da Na, K- ATPase é regulada, em parte, pelo metabolismo do mioinositol, cuja concentração está reduzida em pacientes diabéticos (GREENE *et al.*, 1975; FUKUMA *et al.*, 1978; CLEMENTS & STOCKARD., 1980; BELL & HYE, 1983).

Estas alterações metabólicas presentes no estado hiperglicêmico comprometem diretamente os axônios e o complexo célula de Schwann-mielina, podendo envolver tanto os axônios mielinizados quanto os não mielinizados (BROWN *et al.*, 1976; YAGIHASHI *et al.*,

1979; SAID et al., 1983; THOMAS & TOMLINSON, 1993). O efeito da doença na função das células de Schwann são as desmielinizações segmentares e paranodais, encontradas mais distalmente no sistema nervoso periférico (BROWN *et al.*, 1980; BESTETTI *et al.*, 1981; THOMAS & TOMLINSON, 1993). O comprometimento do processo de mielinização nos nervos periféricos parece ter como causa primária as degenerações axonais (JAKOBSEN, 1976; THOMAS & TOMLINSON, 1993), uma vez que são os axônios os responsáveis pelos estímulos para produção de mielina, além de terem influência determinante sobre o número de lamelas mielínicas produzidas (THOMAS *et al.*, 1993).

No processo de desmielinização segmentar ou durante a remielinização parcial, a fina camada de mielina aumenta a capacitância e a condutância internodal, gerando uma perda ou diminuição da corrente local (FUKUMA *et al.*, 1978; KIMURA, 1984). A condução através dos segmentos desmielinizados se torna possível após o início da remielinização, embora, em média, apenas 60% da velocidade de condução nervosa seja recuperada (KIMURA, 1984; BOSTOCK, 1993). Uma condução microsaltatória pode ser observada após a remielinização de focos internodais de corrente interna, considerados precursores de novos nódulos de Ranvier (BOSTOCK, 1993).

Em indivíduos diabéticos, sem tratamento e sem sintomas de neuropatia, têm sido observado uma maior frequência de desmielinizações e remielinizações segmentares; ao passo que, nos pacientes sem tratamento, porém, com neuropatia sintomática, têm sido demonstrado tanto uma desmielinização e remielinização segmentar quanto uma degeneração axonal. Nos pacientes tratados, porém, com longo tempo de doença, a degeneração axonal das fibras nervosas é a anormalidade mais comumente relatada (THOMAS & TOMLINSON, 1993). Portanto, se consideradas as anormalidades na condução neural, mesmo nos pacientes com ausência dos sinais e sintomas, a prevalência da neuropatia diabética seria igual a 100% (THOMAS & TOMLINSON, 1993; GREENE *et al.*, 1975).

Outro fator determinante das mudanças biofísicas no sistema nervoso periférico é a insuficiência da *vasa vasorum* (LANGER *et al.*, 1992), demonstrada por meio de exames anatomopatológicos, e descrita pelas mudanças microvasculares, como a formação de trombos e a hiperplasia das células endoteliais, suficientes para causar uma oclusão luminal (THOMAS & TOMLINSON, 1993). Este quadro de alterações vasculares tem sido demonstrado em biópsias de nervos de pacientes com fraqueza difusa em membros inferiores

e, acompanhado por evidências eletromiográficas de denervação (THOMAS & TOMLINSON, 1993).

A terapia convencional do *Diabetes Mellitus*, realizada com aplicações repetidas de insulina, dieta e o freqüente monitoramento dos níveis de glicose no sangue e na urina, restaura consideravelmente o controle metabólico, porém não impede a progressão da neuropatia diabética em longo prazo (ORLOFF *et al.*, 1990). Conseqüentemente, há grande interesse no estudo do transplante pancreático e de outras terapias de substituição do pâncreas endócrino (SIMA *et al.*, 1988; ORLOFF *et al.*, 1990; ALLEN *et al.*, 1997), uma vez que parecem restaurar a função das células β danificadas e destruídas, e o controle metabólico “fisiológico”, prevenindo, estabilizando e, o mais importante, revertendo as lesões crônicas do diabetes (SCHMIDT *et al.*, 1983; KENNEDY *et al.*, 1990; SPADELLA *et al.*, 1998).

Neste contexto, este estudo tem como objetivo a avaliação da condução nervosa (latências, amplitudes e velocidades) nos nervos ciático e caudal de ratos com diabetes induzido pela aloxana, como preâmbulo de uma investigação funcional da neuropatia diabética. Ao final do experimento, espera-se obter dados importantes, que forneçam os subsídios para a realização de avaliações terapêuticas das outras terapias convencionais e alternativas do diabetes, incluindo o transplante de pâncreas e de ilhotas de Langerhans, e a suplementação de substratos enzimáticos envolvidos no metabolismo do mioinositol.

2. NEUROPATIA DIABÉTICA

2.1. Revisão

A neuropatia diabética compreende um grupo heterogêneo e complexo de alterações que envolvem diferentes partes do sistema nervoso somático e autônomo, podendo ser focal ou difusa, proximal ou distal. A patogênese também é heterogênea, com diferentes fatores causais, incluindo: a hiperglicemia persistente, a insuficiência microvascular, o estresse oxidativo, o estresse nitrosativo, o neurotropismo deficiente e a destruição dos nervos mediada por processos autoimunes (BOULTON *et al.*, 2005; CASELLINI & VINIK, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado uma estreita relação entre a hiperglicemia e o desenvolvimento e/ou o agravamento da neuropatia diabética (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP, 2002; LeROITH *et al.*, 2005; TESFAYE *et al.*, 2005). Segundo os grupos de pesquisa The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) (1993) e UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998), o controle glicêmico rigoroso está associado com uma redução de 40 a 60% no desenvolvimento e/ou progressão da neuropatia.

Tesfaye *et al.* (2005) em um estudo multicêntrico na Europa [para o grupo de pesquisa European Diabetes (EURODIAB) Prospective Complications Study Group], incluindo 3250 pacientes, constataram que a incidência de neuropatia está, também, associada com fatores de risco cardiovasculares potencialmente modificáveis, como os níveis de triglicérides e o índice de massa corporal aumentados, o fumo e a hipertensão. Muitos dos fatores de risco encontrados neste estudo são componentes da síndrome metabólica.

Assim, o tratamento da neuropatia diabética deve incluir medidas para uma redução dos fatores de risco macrovasculares (Figura 1), como o controle da hiperglicemia, pressão sanguínea e lipídeos, e modificações no estilo de vida, incluindo a prática de atividade física, a redução da massa corporal; a eliminação do fumo e do álcool; e o incremento à adoção de uma dieta rica em ácidos graxos Omega-3 (CASELLINI & VINIK, 2006).

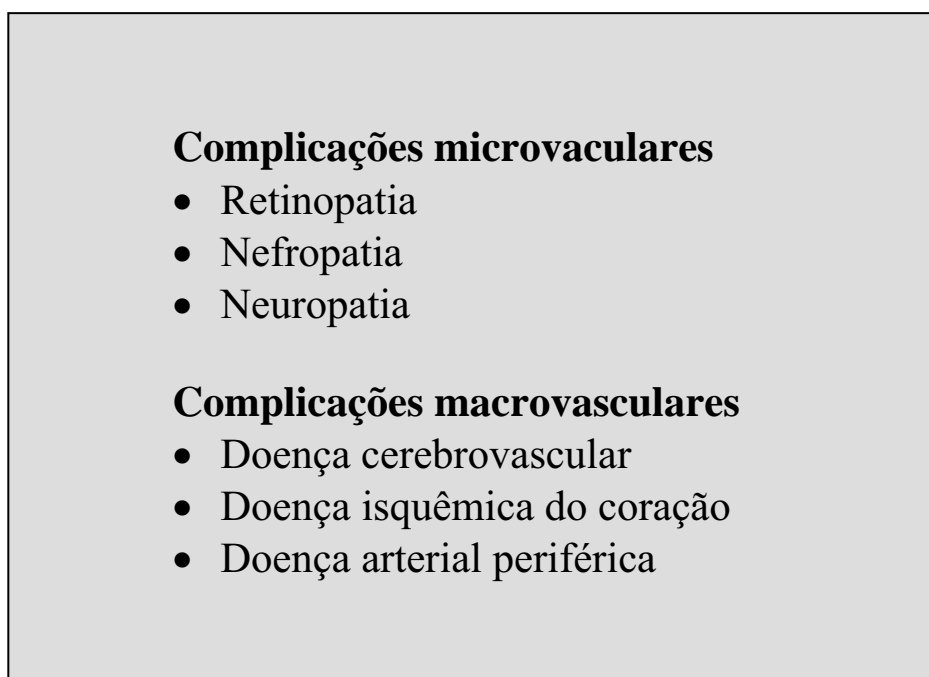


Figura 1. Complicações vasculares do diabetes

A hiperglicemia crônica também é fator causal do estresse oxidativo e nitrosativo em tecidos que são suscetíveis as complicações do *Diabetes Mellitus*. O estresse oxidativo no diabetes é gerado por um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e por uma redução das enzimas antioxidantes, conseqüentes aos processos de auto-oxidação da glicose, glicosilação não enzimática de proteínas e produção mitocondrial de superóxidos (JACHEC *et al.*, 2002; ANJANEYULU & CHOPRA, 2004; VINCENT *et al.*, 2004).

A produção aumentada de ROS no diabetes pode afetar os lipídios presentes nas estruturas mielinizadas dos nervos. A hiperglicemia acarreta um aumento de íons superóxido e peroxinitrito, e uma redução da defesa antioxidante. Assim, os nitratos, produzidos em excesso, reagem com ROS, resultando na formação de peroxinitrato, que são altamente lesivos para o sistema nervoso periférico (VINCENT *et al.*, 2004; ZIEGLER *et al.*, POP-BUSUI *et al.*, 2006).

Diversas terapias são estudadas com o objetivo de reduzir o estresse oxidativo e nitrosativo no diabetes. Os principais agentes terapêuticos incluem: inibidores da aldose redutase (ARIs), ácido α -lipóico, ácido γ -linolênico, benfotiamina e proteína quinase C (PKC). Novos ARIs estão sendo testados, mas os resultados, embora promissores, mostram

que estes agentes *per se* não são suficientes, necessitando da combinação de tratamentos para se obter melhores resultados (VINCENT *et al.*, 2004; CASELLINI & VINIK, 2006).

Os produtos finais da glicosilação (AGEs) resultam no desenvolvimento da neuropatia diabética, por se ligarem à receptores específicos, iniciando uma cascata de eventos que culminam em danos ao sistema nervoso. A benfotiamina, um análogo da vitamina B1, e inibidor da formação de AGEs, mostrou bons resultados em testes com animais de experimentação. Já, os testes com os inibidores da PKC, precisam de novos delineamentos, uma vez que a ativação da PKC está correlacionada às complicações microvasculares (Figura 1) em pacientes diabéticos (CAMERON *et al.*, 2005; VINIK & KLES, 2005).

Outro fator causal da neuropatia diabética é a deficiência de fatores de crescimento. No diabetes, a carência do fator de crescimento neural (NGF), bem como da substância P e da calcitonina, está relacionada à alteração funcional de fibras nervosas menores. Trabalhos experimentais realizados em animais diabéticos mostram que uma redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente estimulador da angiogênese, resulta na falha de neovascularização em tecidos dos membros inferiores, após hipóxia. Novos trabalhos com o NGF e a neurotropina três guardam melhores perspectivas para a neuropatia sensorial e autonômica. Já, a injeção intramuscular de um vetor adenoviral codificante para VEGF mostrou bons resultados ao induzir uma neovascularização normal em membros inferiores. (RIVARD *et al.*, 1999; VEVES & KING, 2001; VINIK *et al.*, 2001).

A terapia imune é outra alternativa terapêutica que está despertando grande interesse. Os anticorpos antineurais circulantes em pacientes diabéticos podem representar neurotoxinas. Nos testes com imunoeletroforese do soro, onde há a presença de anticorpos para neurônios ou gamopatia monoclonal de significância desconhecida (MGUS), a aplicação de uma terapia imune tem provido bons resultados (KRENDEL *et al.*, 1995; MILICEVIC *et al.*, 1997).

Em pacientes com neuropatia diabética, a degeneração e a regeneração de fibras nervosas, principalmente as de menor calibre, estão presentes simultaneamente, sugerindo um processo altamente dinâmico. Ao longo do tempo, o balanço entre a degeneração e a regeneração é alterado, pendendo mais para o processo degenerativo. Os diversos regimes terapêuticos acima apresentados objetivam restaurar o equilíbrio, dando maior destaque para o processo regenerativo. A habilidade regenerativa de fibras nervosas está relacionada ao grau

da neuropatia, sugerindo que as diversas terapias fornecerão melhores resultados se implementadas nos estágios iniciais da doença (APFEL, 1999; POLYDEFKIS *et al.*, 2003).

2.2. Conceito

Neuropatia diabética é a presença de sintomas e/ou sinais da disfunção nervosa periférica em indivíduos diabéticos, depois de excluídas outras causas. A confirmação diagnóstica poderá incluir anormalidades nos estudos de condução nervosa, nos testes quantitativos da função sensorial ou autonômica, ou igualmente na histologia de nervos intraepidermais em biópsias da pele (CASELLINI & VINIK, 2006).

A neuropatia periférica é uma freqüente complicação do *Diabetes Mellitus*. A polineuropatia diabética é comumente uma mistura de anormalidade sensorial, motora e autonômica. Atualmente, os estudos mostram dados surpreendentes do envolvimento de fibras nervosas menores nos estágios iniciais do diabetes ou nos casos de intolerância a glicose. Em pacientes diabéticos adultos, a prevalência de neuropatia é freqüentemente alta, dentro de uma faixa de 0-93%. A incidência é ainda maior quando critérios neurofisiológicos são utilizados (KARSIDAG *et al.*, 2005).

Um recente estudo da American Diabetes Association, com 8.119 indivíduos, mostrou que somente um de cada quatro indivíduos com neuropatia diabética discutiu a doença com seus médicos, revelando um indício pavoroso de falha do sistema de saúde e/ou da relação médico-paciente. Os exames clínicos mais simples, como o reflexo patelar, são usados menos de 10% das vezes por médicos. Estes dados estatísticos demonstram uma enorme falha na formação de clínicos com relação ao diagnóstico e tratamento da neuropatia diabética (BOULTON *et al.*, 2005; CASELLINI & VINIK, 2006).

2.3. Aspectos Históricos

A elevada freqüência com o qual o sistema nervoso é afetado no *Diabetes Mellitus* foi a responsável, no passado, pela idéia de que a doença do sistema nervoso era a causa do diabetes. Esse pensamento foi alterado, em 1864, por Marchal de Calvi, ao reconhecer a veracidade do inverso, ou seja, ser o diabetes a causa do comprometimento do sistema nervoso (apud THOMAS & TOMLINSON, 1993).

Nas décadas subseqüentes, outros pesquisadores foram contribuindo para o delineamento dos padrões clínicos da neuropatia diabética. Assim, em 1884, Bouchard descreveu a perda dos reflexos de tendão nas pernas de pacientes diabéticos. No ano seguinte, Althaus fez uma correlação de alguns casos de *tabes dorsalis* em diabéticos, e no ano de 1904, Pavy salientou a ocorrência da dor espontânea, particularmente no período noturno, e da hiperestesia no diabetes.

As manifestações do comprometimento motor nas pernas de diabéticos foram documentadas por Buzzard, Bruns e Charcot, no ano de 1890. O envolvimento dos nervos cranianos em pacientes diabéticos foi estudado por Ogle, um pouco antes, na década de 60. Porém, somente em 1893, Leyden e Pryce, baseados na gama de manifestações neuropáticas no diabetes, propuseram uma classificação para a neuropatia diabética.

As divisões e subdivisões propostas por Leyden e Pryce serviram, posteriormente, de alicerce para novas classificações, por tentar agrupar as diferentes patologias neurais do *Diabetes Mellitus*. Na seqüência, Williamson conduziu uma extensa investigação da neuropatia diabética entre os anos de 1894 e 1924. Porém, somente anos depois, a freqüência com a qual a função autonômica está alterada no diabetes ficou conhecida.

2.4. Classificação

O *Diabetes Mellitus* é responsável por uma das mais freqüentes alterações dos nervos periféricos, a neuropatia diabética (KRÓLEWSKI & WARRAM, 1985; POWELL et al., 1985; DICK et al., 1987). Esta pode se manifestar desde sintomas e/ou sinais isolados, como parestesias e/ou dores, arreflexia profunda nos membros superiores e inferiores, ou alterações da sensibilidade palestésica até comprometimento sensitivo, motor e trófico graves, que podem levar à invalidez (SARAIVA, 1992; KRIZ & PADJEN, 2003). Thomas, 1973 (apud THOMAS & TOMLINSON, 1993) classificou a neuropatia diabética em três categorias: as polineuropatias simétricas, as neuropatias focal e multifocal, e as formas mistas (Tabela 1). A primeira categoria envolve manifestações do tipo sensitivo, motor e autonômico, enquanto o segundo grupo inclui as lesões isoladas dos nervos cranianos e, as neuropatias que afetam os nervos do tronco e dos membros. A polineuropatia simétrica e distal é uma das formas mais comum de manifestação da neuropatia diabética (GREENE et al., 1975; SARAIVA, 1992).

Tabela 1. Classificação da neuropatia diabética

Polineuropatias simétricas

Polineuropatia sensorial ou sensomotor

Neuropatia autonômica

Neuropatia motora de membro inferior proximal simétrica

Neuropatias focal e multifocal

Neuropatia cranial

Mononeuropatia de tronco e membro

Neuropatia motora de membro inferior assimétrica

Formas mistas

3. O ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA

Em 1791, Luigi Galvani, um anatomista italiano, ao fixar as patas de uma rã recém-morta em um gancho, cujo suporte foi posteriormente pendurado sobre uma grade de ferro, observou que as patas do animal se contraíam. Ao descrever um relato de suas observações, Galvani, efetivamente, foi o responsável pelo primeiro estudo de condução nervosa (HILBURN, 1996).

A partir deste momento, os médicos da época foram motivados a encontrar aplicações clínicas para a descoberta de Galvani. Em 1795, Humboldt aplicou corrente elétrica nos músculos de seu ombro, e concluiu que o nervo deve estar intacto para alcançar a contração muscular. Nobili, em 1827, registrou os potenciais elétricos dos músculos com um galvanômetro de agulha (HILBURN, 1996).

No início da década de 50, Hermann von Helmholtz fez as primeiras mensurações da velocidade de condução nervosa motora. Hermann utilizou-se da resposta mecânica do músculo para realizar as mensurações e, em 1867, chegou a conclusão que a velocidade de condução motora do nervo mediano do antebraço era de $61,0 \pm 5,1$ m/s. O surpreendente é que a média e o desvio padrão encontrados por este pesquisador, há mais de um século, não diferem dos padrões de referência atuais (FALCK & STALBERG, 1995).

Durante experimentos adicionais, Von Helmholtz e seu assistente Baxt concluíram que velocidade de condução nervosa era exatamente 31,5289 m/s. Como os últimos experimentos foram realizados durante o inverno, os pesquisadores concluíram que as discrepâncias de valores entre estes testes e os primeiros eram em decorrência da interferência da temperatura (FALCK & STALBERG, 1995).

Com o aprimoramento dos equipamentos eletrônicos, Piper, em 1908, registrou o potencial de ação motor composto (CMAP), com o auxílio de um galvanômetro. Este encontrou um velocidade de condução de 117 m/s no nervo mediano, sugerindo também que as diferenças entre suas mensurações e as realizadas previamente eram devidas à temperatura (FALCK & STALBERG, 1995).

O posicionamento ventre-tendão dos eletrodos de superfície para registro do CMAP foi introduzido por Harvey e Masland, em 1941, tendo sido adotado como método padrão por muitos laboratórios de estudo eletroneuromiográfico. Nesta técnica, o eletrodo de registro é posicionado sobre o ventre muscular, também chamado ponto motor; enquanto, o eletrodo de

referência situa-se no correspondente tendão do músculo, considerado até pouco tempo atrás como uma localização eletricamente inativa ou indiferente (KINCAID et al., 1993).

A utilidade clínica do estudo da condução nervosa motora foi primeiramente demonstrada por Hodes e co-autores, em 1948. Hoje, o estudo da condução nervosa motora é extensivamente usado no diagnóstico das neuropatias local e difusa. Os achados eletroneuromiográficos refletem o estado funcional dos axônios mielinizados, da transmissão neuromuscular e das fibras musculares (STALBERG & FALCK, 1993; FALCK & STALBERG, 1995).

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Visando elucidar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese do *Diabetes Mellitus* e suas complicações, o presente estudo teve como objetivos:

- a) Avaliar a sensibilidade do método eletroneuromiográfico e caracterizar o padrão de condução nervosa motora (amplitudes, latências e velocidades) dos nervos ciático e caudal de ratos com diabetes induzido pela aloxana, tendo como referência os dados encontrados em ratos não diabéticos da mesma espécie e idade, com o mesmo período de seguimento.

- b) Caracterizar a evolução clínica e laboratorial de ratos com diabetes induzido pela aloxana, pareados com ratos não diabéticos da mesma espécie e idade, em um seguimento de 12 meses; e

- c) Descrever os achados macroscópicos de necropsia em ratos com diabetes induzido pela aloxana, pareados com ratos não diabéticos da mesma espécie e idade, em um seguimento de 12 meses.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais Utilizados

No presente trabalho foram utilizados inicialmente um total de 232 ratos alogênicos da raça Wistar, adultos, machos, sadios ao exame clínico, pesando em torno de 230-300g, com aproximadamente 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu. Estes animais foram transferidos para o Biotério do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, onde permaneceram durante todo o período de estudo, à temperatura de 22°C, umidade relativa de 70%, e período claro-escuro de 12 horas. Deste total de ratos, 50 animais foram sorteados para compor o grupo não diabético, sendo os 182 ratos restantes submetidos à indução do diabetes experimental, conforme metodologia e critérios de seleção descritos no item 5.4, a seguir.

5.2. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos por sorteio em dois grupos experimentais (Figura 2), sendo assim caracterizados:

Grupo não diabético (GND) – constituído de 50 ratos sadios não diabéticos.

Grupo diabético (GD) – constituído de 50 ratos diabéticos graves, sem tratamento terapêutico.

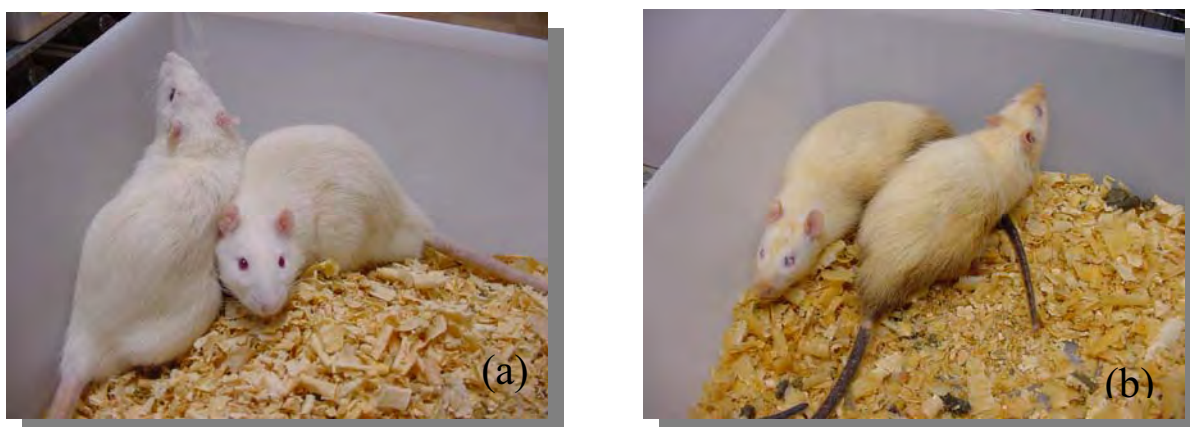


Figura 2. Aspecto físico dos animais do grupo não diabético (a) e diabético (b)

Cada grupo experimental, por sua vez, foi subdividido, por sorteio, em cinco subgrupos de animais cada um, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, com 1 mês (M1), 3 meses (M2), 6 meses (M3), 9 meses (M4) e 12 meses (M5) de seguimento.

5.3. Momentos de Avaliação e Sacrifício

Todos os animais colocados em seguimento nos respectivos grupos experimentais foram avaliados do ponto de vista clínico, laboratorial e anatomopatológico, contudo, somente 25 animais não diabéticos e 25 animais diabéticos foram efetivamente estudados para avaliação funcional do nervo ciático e caudal (Figura 3), obedecendo a seguinte distribuição, segundo os momentos de avaliação e sacrifício:

M1= cinco animais não diabéticos e cinco animais diabéticos, avaliados e sacrificados com 1 mês de seguimento;

M2= cinco animais não diabéticos e cinco animais diabéticos, avaliados e sacrificados com 3 meses de seguimento;

M3= cinco animais não diabéticos e cinco animais diabéticos, avaliados e sacrificados com 6 meses de seguimento;

M4= cinco animais não diabéticos e cinco animais diabéticos, avaliados e sacrificados com 9 meses de seguimento;

M5= cinco animais não diabéticos e cinco animais diabéticos, avaliados e sacrificados com 12 meses de seguimento.

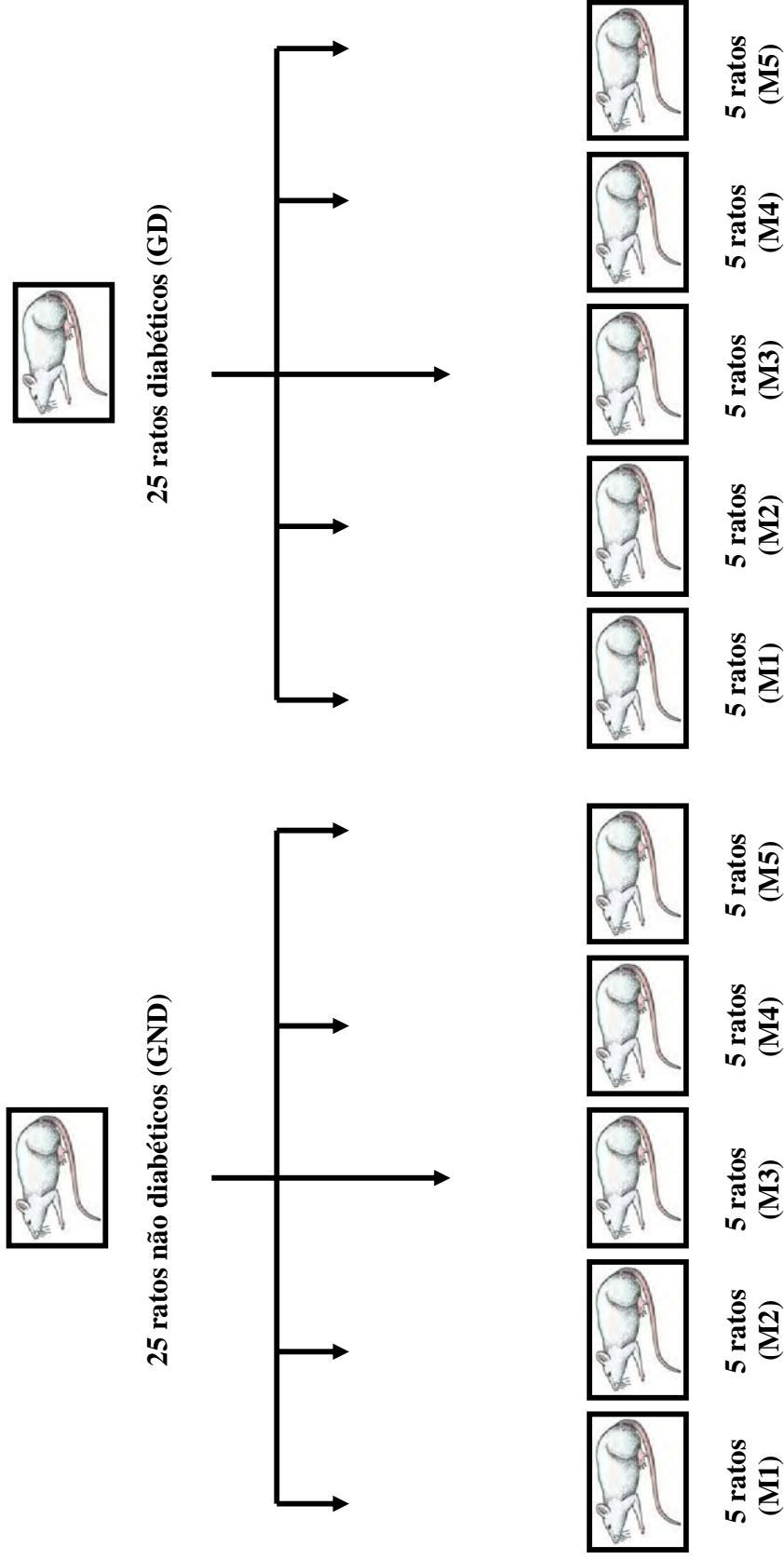


Figura 3. Distribuição dos animais nos grupos e subgrupos, segundo os momentos de avaliação funcional dos nervos e sacrifício

5.4. Indução do Diabetes Experimental

O diabetes experimental foi induzido quimicamente pela administração de uma solução aquosa de aloxana a 2% (2,4,5,6 tetra oxihexahidropirimida)¹, injetada por via endovenosa (e.v.), na dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando uma das veias da cauda do animal. Para isto, na véspera da indução, os animais foram deixados em jejum alimentar de 12 horas, com fornecimento de água *ad libitum*. No dia da indução, os ratos foram colocados previamente em uma caixa aquecida com luzes incandescentes, durante um tempo aproximado de 10 minutos, visando a dilatação das veias da cauda (Figura 4A). Os ratos foram, então, contidos em pequenas caixas individuais, com a cauda exposta, tendo sido esta imobilizada com fita crepe (Figura 4B). A aloxana foi inoculada por punção na veia caudal (Figura 4C), diluída em solução aquosa a 2%, com agulhas de calibre 13x4,5mm. Após 30 minutos da injeção, os animais foram alimentados normalmente. No presente estudo, somente foram utilizados animais diabéticos graves, sem qualquer tratamento terapêutico.

Nos critérios adotados para a classificação da gravidade da doença foram considerados relevantes os seguintes parâmetros: perda de peso, aumento da ingestão hídrica (H.I.), da ingestão alimentar (H.A.) e da diurese, acompanhados de alterações nas dosagens laboratoriais, obtidas em duas determinações sucessivas, no sétimo e no décimo quarto dia após a indução do diabetes, e representadas por glicemia de jejum acima de 200mg/dl, glicose urinária maior ou igual a 3000mg/dl e glicosúria positiva (+++) no teste de fitas reagentes (Gluketur Test)².

Os animais cujos valores glicêmicos foram menores que 120mg/dl, ou que apresentaram glicemias intermediárias entre 120 e 200mg/dl, com ou sem sinais clínicos de diabetes, nas duas determinações sucessivas (no sétimo e no décimo quarto dia após injeção de aloxana), foram excluídos da pesquisa. Todos os animais diabéticos graves, que vieram à óbito, foram repostos por seguimento tardio nos seus respectivos subgrupos.

¹Alloxan – Sigma Chemical Co – St. Louis – USA

²Boehringer Mannheim – M.B. Bioquim. Ltda. - RJ

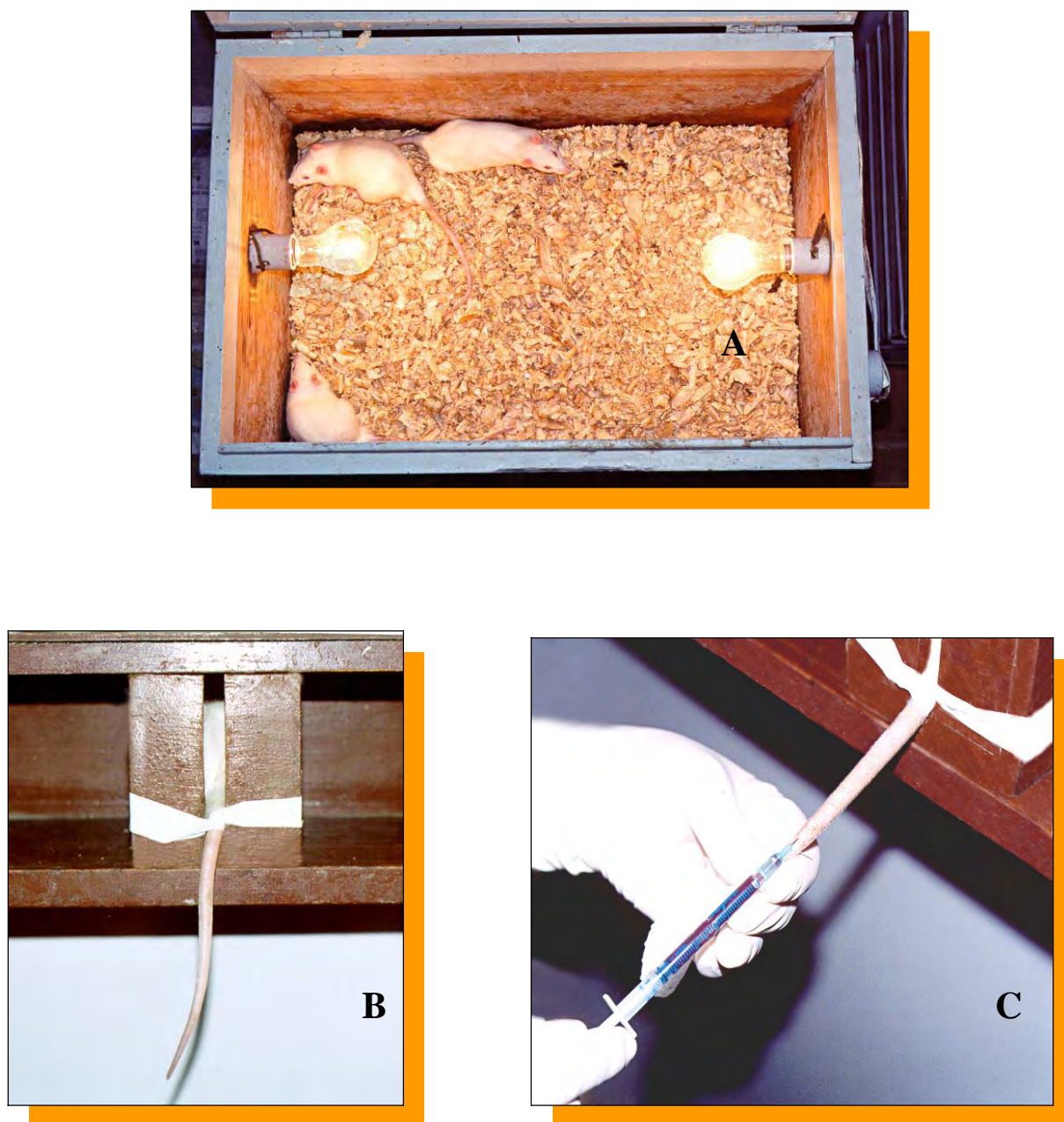


Figura 4. Indução do diabetes experimental: (A) animais em caixa aquecida com luzes incandescentes para vasodilatação venosa, (B) imobilização da cauda do animal e (C) inoculação da droga diabetogênica por punção da veia caudal

5.5. Delineamento do Experimento

5.5.1. Adaptação, indução do diabetes, seleção e sorteio dos grupos

Oriundos do Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu, os animais foram identificados, e transferidos para o Biotério do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP. Os ratos foram, então, acomodados em caixas de poliuretano, em grupos de quatro animais por caixa, sendo oferecido ração e água *ad libitum*. Nestas condições permaneceram por um período de adaptação de 7 dias, período em que foram tratados profilaticamente de verminoses com Mebendazol³ (25mg/kg de peso/dia), adicionado na água ingerida durante três dias. Os animais também foram tratados profilaticamente de pediculose, com banhos de dimetilciclopropano carboxilato (Butox-P)⁴, durante mesmo período (três dias).

Terminado o período de adaptação, os animais foram sorteados em dois grupos experimentais: o grupo de animais não diabéticos (GND) e o grupo destinado à indução do diabetes experimental (GD).

Os animais sorteados para a indução do diabetes receberam a droga diabetogênica imediatamente após o sorteio, sendo então acompanhados durante 14 dias. Visando o pareamento da amostra, os animais que foram sorteados para compor o grupo não diabético, também foram acompanhados pelo mesmo período. Passados 7 dias da injeção de aloxana, foi realizada uma pré-seleção dos animais diabéticos através de glicofitas. No 14^o dia após administração da droga diabetogênica, ou do seguimento (GND), os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas visando a seleção dos animais diabéticos graves, segundo os critérios de inclusão da amostra, previamente estabelecidos.

Após a definição dos animais com diabetes grave, no 14^o dia após a indução do diabetes, houve um segundo sorteio para definir a alocação de todos os ratos do experimento (não diabéticos e diabéticos) nos subgrupos experimentais, sendo avaliados e sacrificados, respectivamente, após 1, 3, 6, 9 e 12 meses de seguimento, conforme definido anteriormente.

³ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Ltda – Itapira/SP

⁴Quimo S.A.

5.6. Parâmetros Analisados

Na presente investigação foram analisadas as variáveis relacionadas ao diabetes e à condução nervosa motora, sendo que nesta última, a avaliação foi realizada nos animais sem qualquer intervenção cirúrgica. Assim, os parâmetros estudados estão abaixo discriminados:

- Clínicos: observação da atividade, tônus muscular, evolução da curva ponderal e medidas da ingestão hídrica (H.I.), ingestão alimentar (H.A.) e diurese.
- Laboratoriais: dosagens da glicemia de jejum e glicose urinária.
- Estudo da condução nervosa motora dos nervos ciático e caudal: amplitudes, latências e velocidades.
- Macroscópico: necropsia de todos os órgãos abdominais e torácicos, com ênfase à presença de infecção pulmonar, megacólon e catarata. O estudo do megacólon se fez através da classificação por scores em ausente (-), leve (+), moderado (++) e grave (+++).

5.7. Metodologia e Técnicas Utilizadas

5.7.1. Anestesia

Os procedimentos para o estudo da condução nervosa motora dos nervos ciático e caudal, bem como a necropsia e o sacrifício dos animais, foram realizados sob anestesia geral utilizando-se o pentobarbital sódico⁵, na dosagem de 30mg/kg de peso corporal, administrado por via intraperitoneal (i.p.), injetado no quadrante inferior esquerdo do abdome.

⁵Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – Itapira/SP

5.7.2. Protocolo utilizado na avaliação clínica e laboratorial dos grupos experimentais

Após a indução química do diabetes experimental, cada animal, de cada grupo experimental, foi avaliado individualmente nos seguintes períodos: 7^o e 14^o dia após a administração da droga diabetogênica ou do seguimento (GND) e, após 1, 3, 6, 9 e 12 meses de estudo.

Visando o controle e a seleção dos animais com diabetes grave e, do seguimento (GND), uma ficha foi elaborada para registro dos parâmetros clínicos e laboratoriais (Figura 5).

Os dados clínicos dos animais nos subgrupos de ambos os grupos experimentais (GND e GD), incluindo peso corporal, ingestão hídrica (H.I.), ingestão alimentar (H.A.) e diurese, bem como os laboratoriais referentes às dosagens de glicemia e glicosúria, foram registrados em fichas individuais, elaboradas para organizar e controlar as variáveis estudadas, e facilitar a análise estatística (Figura 6).

5.7.3. Metodologia utilizada para a coleta de parâmetros clínicos e laboratoriais em gaiolas metabólicas

Para a coleta dos dados clínicos e laboratoriais, tanto no 14^o dia após a indução do diabetes, como antes do sacrifício nos momentos estudados, cada animal, de cada grupo experimental, foi submetido a um esquema padronizado de avaliação. A metodologia utilizada foi a seguinte:

- a) colocação dos animais em gaiolas metabólicas individuais (Figura 7A) durante 24 horas;
- b) fornecimento de volume conhecido de água durante todo o período de 24 horas;



Programa de Pós-Graduação em Cirurgia
Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental
 Botucatu, SP - CEP 18.618-970 - Caixa Postal 530 - Tel. (14) 6802-6269/6802-6092 - Fax: (14) 6821-7428

DIABETES EXPERIMENTAL			
Rato n°: _____	Data de Nascimento: ____/____/____	Grupo: _____	
Seguimento: _____	Início do seguimento: ____/____/____	<input type="checkbox"/> O	<input type="checkbox"/> S

PARÂMETROS	SEGUIMENTO					
	Início (14° dia) ____/____/____	1 mês ____/____/____	3 meses ____/____/____	6 meses ____/____/____	9 meses ____/____/____	12 meses ____/____/____
Peso						
Ingestão hídrica						
Ingestão alimentar						
Diurese						
Glicofita						
Glicemia						
Glicose urinária						

OBSERVAÇÕES:

Figura 6. Ficha individual, elaborada para registro dos parâmetros clínicos, laboratoriais e necropsia

- c) fornecimento de quantidade conhecida de ração durante o período noturno de 12 horas, sendo que após este, foi retirada toda alimentação por um período diurno de 12 horas (jejum de 12 horas);
- d) determinação ao final do procedimento, do peso do animal em gramas, do volume de água ingerida em 24 horas (ingestão hídrica de 24 horas em mililitros), da quantidade de alimento consumido em 12 horas (ingestão alimentar de 12 horas) e do volume de diurese de 24 horas em mililitros;
- e) coleta de uma amostra de 10 ml de urina obtida em 24 horas, para a dosagem de glicose urinária (mg/dl);
- f) coleta de uma amostra inicial de 1,5ml de sangue (14^o dia após a indução do diabetes) para a dosagem da glicemia (mg/dl), após jejum de 12 horas.

Para a realização do item (f), os animais foram colocados em uma caixa aquecida com lâmpada incandescente (Figura 4A), a uma temperatura de 39-45°C, por um período de 10 minutos. A seguir foram sangrados, sob anestesia, por secção da ponta da cauda, com retirada do volume de sangue necessário para a dosagem de glicose (Figura 7B). Posteriormente, a cauda seccionada foi amarrada, com finalidade hemostática, com fio de algodão 2-0.

Após coleta das amostras para as mensurações dos parâmetros clínicos e laboratoriais, no 14^o dia após administração da droga diabetogênica ou do seguimento (GND), os animais foram acomodados em caixas de poliuretano, em grupos de quatro ratos, recebendo ração e água *ad libitum.*, por sorteio.

Nos momentos de sacrifício (M1, M2, M3, M4 e M5), a amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca a céu aberto. O soro foi separado por centrifugação a

3000 rpm em centrífuga FAMEN® modelo 215, e utilizado para a determinação da concentração de glicose.

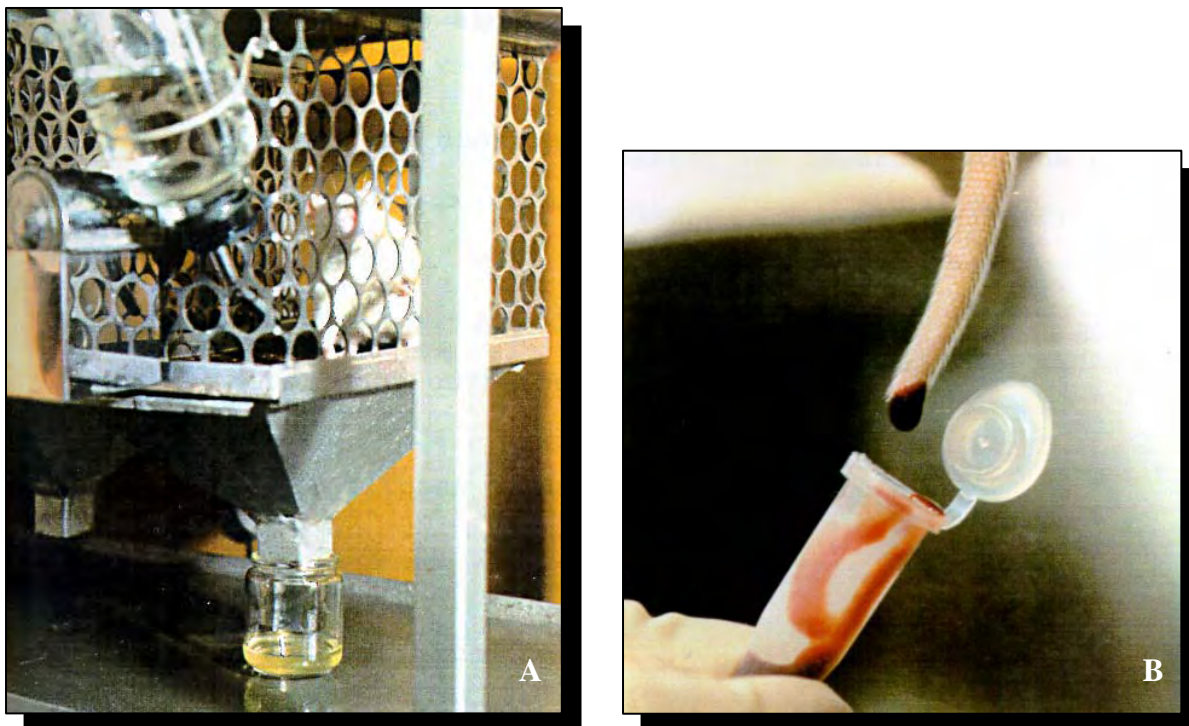


Figura 7. Gaiola metabólica individual (A) e coleta da amostra de sangue por secção da ponta da cauda do animal (B)

5.7.4. Metodologia empregada para o estudo da condução nervosa motora (amplitudes, latências e velocidades) dos nervos ciático e caudal

5.7.4.1. Nervos ciático

Estímulo: foram aplicados sobre o nervo ciático direito, em dois pontos, em sua passagem, proximal, adjacente à crista ilíaca (Figura 8), e distal, próximo ao joelho (Figura 9), estímulos elétricos supra-máximos, de pulsos quadrados, e corrente contínua com 0,2ms de duração. O catodo e o anodo do estimulador, eletrodos de agulha monopolares com 30mm de comprimento, foram posicionados sobre o trajeto do nervo, à uma distância de 5mm entre si, com o catodo distal, e o anodo proximal.

Captação: foram empregados eletrodos de anel⁶, especialmente confeccionados para este estudo, colocados sobre o ventre do músculo flexor superficial dos dedos (G1) e uma zona neutra (G2), para obtenção do potencial de ação muscular composto (CMAP) deste músculo (onda M). O eletrodo terra (seta) foi posicionado em uma região de melhor conveniência, entre os pontos de estímulo e captação. A impedância dos eletrodos foi mantida abaixo de 5kΩ. Após obtenção dos CMAPs, proximal e distal, foram determinados a latência motora distal, as amplitudes dos potenciais e a velocidade de condução nervosa motora entre os dois pontos de estímulo (Figuras 8 e 9).

5.7.4.2. Nervos caudal

Estímulo: foram aplicados sobre o nervo caudal, estímulos similares aos acima descritos para o nervo ciático, em posição proximal, nos dois primeiros centímetros da cauda (Figura 10), e distal, 10cm abaixo (Figura 11), também com o catodo em posição distal

Captação: foram utilizados eletrodos de anel, sendo o eletrodo ativo (G1) posicionado à 6cm do ponto de estímulo distal, e o eletrodo de referência (G2) colocado à 3cm do mesmo ponto. O eletrodo terra (seta) foi posicionado, convenientemente, de acordo com o espaço, entre os pontos de estímulo e captação (Figuras 10 e 11).

Para os estudos de condução nervosa foram utilizados filtros com banda passante de 20 a 3000hz, base de tempo de 1ms/cm e sensibilidade de 1mV/cm. Os exames foram realizados no Laboratório de Eletroneumigrafia do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu-UNESP

Todos os exames foram obtidos em um aparelho Nicolet®, modelo *Compass Meridien*, de 1 canal (Figura 12), com a temperatura corporal dos animais mantida, aproximadamente, em 37°C (RUTKOVE, 2001).

⁶RITEC Ltda – Novo Horizonte/SP

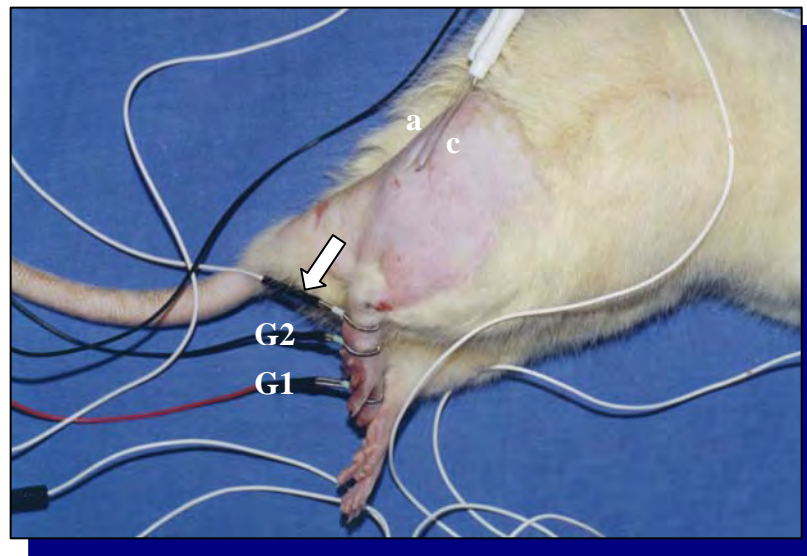


Figura 8. Estímulo proximal no trajeto do nervo ciático, adjacente à crista ilíaca, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados sobre o ventre do músculo flexor superficial dos dedos (G1) e uma zona neutra (G2). O eletrodo terra (seta) está em região intermediária entre os pontos de estímulo e captação

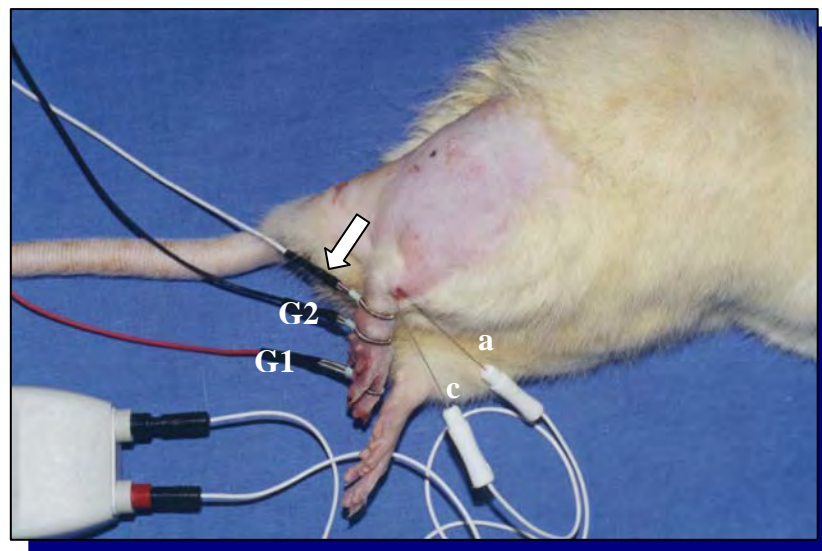


Figura 9. Estímulo distal no trajeto do nervo ciático, próximo ao joelho, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados sobre o ventre do músculo flexor superficial dos dedos (G1) e uma zona neutra (G2). O eletrodo terra (seta) está em região intermediária entre os pontos de estímulo e captação

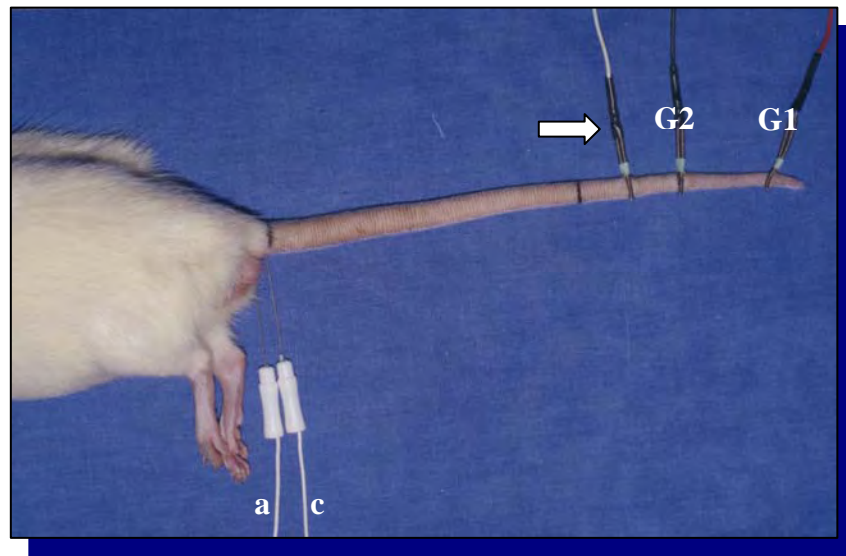


Figura 10. Estímulo proximal, sobre o nervo caudal, nos dois primeiros centímetros da cauda, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados à 6cm do ponto de estímulo distal (G1), à 3cm do mesmo ponto (G2), e o eletrodo terra (seta) está em uma região intermediária entre os pontos de estímulo e captação

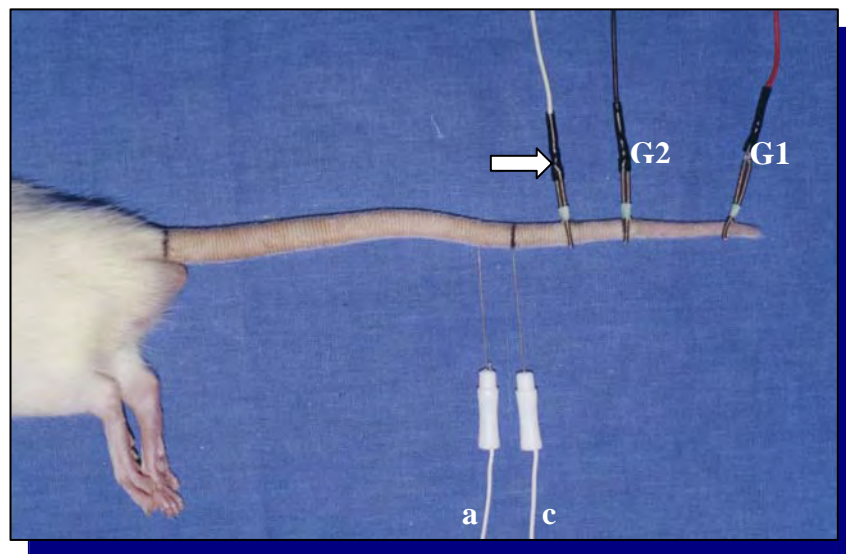


Figura 11. Estímulo distal, sobre o nervo caudal, distante 10cm do ponto de estímulo proximal, através de eletrodos de agulha monopolares, com o catodo distal (c) e o anodo proximal (a). Os eletrodos de anel estão posicionados à 6cm do ponto de estímulo distal (G1), à 3cm do mesmo ponto (G2), e o eletrodo terra (seta) está em uma região intermediária entre os pontos de estímulo e captação



Figura 12. Aparelho Nicolet, modelo *Compass Meridien*, de 1 canal. No centro, o amplificador (seta)

5.7.5. Sacrifício

Nos períodos definidos para o sacrifício, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, administrado por via i.p., na dose de 30mg/kg de peso corporal. Após a realização dos exames eletroneuromiográficos, amostras de sangue para análise foram obtidos por punção cardíaca, através de abertura do tórax, até a exsangüinação. A necropsia foi completada com abertura da cavidade abdominal, e exame macroscópico de todos os órgãos.

5.7.6. Métodos utilizados para as dosagens laboratoriais

As dosagens de glicose plasmática e urinária foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.

A quantificação de glicose foi realizada pelo método enzimático⁷ da glicose-oxidase (HENRY *et al.*, 1974). A quantidade de cor formada foi proporcional à concentração de glicose na amostra. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 510 nm.

5.7.7. Métodos estatísticos

Foi utilizado ANOVA para grupos independentes, seguido do teste de comparações múltiplas de Duncan, para comparar os momentos (M1, M2, M3, M4 e M5) dentro de cada grupo (GND e GD), e teste t de Student para comparar os grupos GND e GD dentro de cada momento, com relação às variáveis: velocidade de condução nervosa (NCV) do nervo ciático, NCV do nervo caudal, latência distal (DLAT) do nervo ciático e DLAT do nervo caudal.

Com relação à análise estatística das variáveis clínicas (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese) e laboratoriais (glicemia e glicosúria) foi empregada a seguinte metodologia: para comparar os momentos (M1, M2, M3, M4 e M5) dentro de cada grupo (GND e GD) foram utilizados ANOVA e, teste de Kruskal-Wallis para grupos independentes, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Dunn. Os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn foram utilizados quando as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias não foram atendidas. As pressuposições referidas foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Para comparar os grupos experimentais (GND e GD) dentro de cada momento foram utilizados o teste t de student e o teste de Wilcoxon quando as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variáveis não foram atendidas. Todos os testes de comparação e de verificação das pressuposições foram realizados ao nível de significância $\alpha=0,05$.

⁷CELM Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos – Barueri/SP

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Método de Indução do Diabetes

O grau evidente de vasodilatação proporcionado pelo aquecimento dos animais, aliado ao treinamento técnico, tornou a indução do diabetes experimental um procedimento exeqüível com relativa facilidade.

Dos 182 animais submetidos à injeção de aloxana por via e.v., 30 ratos (16,5%) não ficaram diabéticos ou desenvolveram doença de gravidade leve ou moderada, sendo desprezados; 74 animais (40,6%) morreram durante a 1ª semana após a administração de aloxana, em decorrência dos efeitos tóxicos da droga; 78 animais (42,9%) diabéticos graves permaneceram vivos, sendo acompanhados nos seus respectivos subgrupos, até o sacrifício.

6.2. Evolução Clínica

6.2.1. Grupo não diabético (GND)

Todos os 50 animais sorteados para compor os cinco subgrupos (10 animais em cada subgrupo) deste grupo experimental apresentaram evolução clínica dentro do padrão de normalidade, sendo sacrificados em bom estado geral (Figura 13A), nas cinco avaliações estabelecidas (1^o, 3^o, 6^o, 9^o, 12^o mês de seguimento). Não houve óbitos (0%) no GND. Os parâmetros clínicos representados pela evolução do peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese mantiveram-se dentro dos níveis médios esperados para ratos sadios de mesma idade. Os valores encontrados estão representados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, e Figuras 14, 15, 16 e 17, com as respectivas análises estatísticas e comentários.

6.2.2. Grupo diabético (GD)

Todos os 78 animais colocados em seguimento no GD evoluíram com parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com diabetes grave, e apresentaram, ao longo do seguimento, progressivo declínio do estado geral (Figura 13B), perda inicial de peso após a indução do diabetes, e ganho significativamente menor de peso em relação ao grupo não diabético, com declínio progressivo da curva ponderal próximo ao sacrifício.

Também foram observadas alterações na pelagem, aumento palpável da circunferência abdominal, devido ao intestino grosso distendido, além de catarata

bilateral, episódios freqüentes de pediculose e piodermite. Estas últimas alterações foram controladas, respectivamente, com banhos de “dimetilciclopropano carboxilato” (Butox-P), diluído em solução aquosa na proporção de 1/6000ml, e higiene local das feridas com compressas de gaze embebidas em solução fisiológica. Neste grupo, dos 78 animais diabéticos colocados em seguimento, 28 (35,9%) morreram em decorrência de anormalidades metabólicas tardias, pneumonia e/ou caquexia, respectivamente com: 1 mês (14,3%), 3 meses (15,9%), 6 meses (19,9%), 9 meses (28,5%) e 12 meses (21,4%). Os demais, 50 animais, permaneceram vivos até o seguimento. A medida da ingestão alimentar, obtida pela subtração entre a pesagem do alimento oferecido e o alimento restante na gaiola, ao final de 12 horas, foi maior no GD, com diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, em todos os momentos de avaliação (M1, M2, M3, M4 e M5). Da mesma forma, a ingestão hídrica e a diurese de animais diabéticos apresentaram valores significativamente elevados, quando comparados com os observados em ratos não diabéticos de mesma idade de sacrifício. Os dados obtidos, gráficos, análises estatísticas e comentários do GD encontram-se representados, juntamente com o GND, nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, e Figuras 14, 15, 16 e 17, já mencionadas.

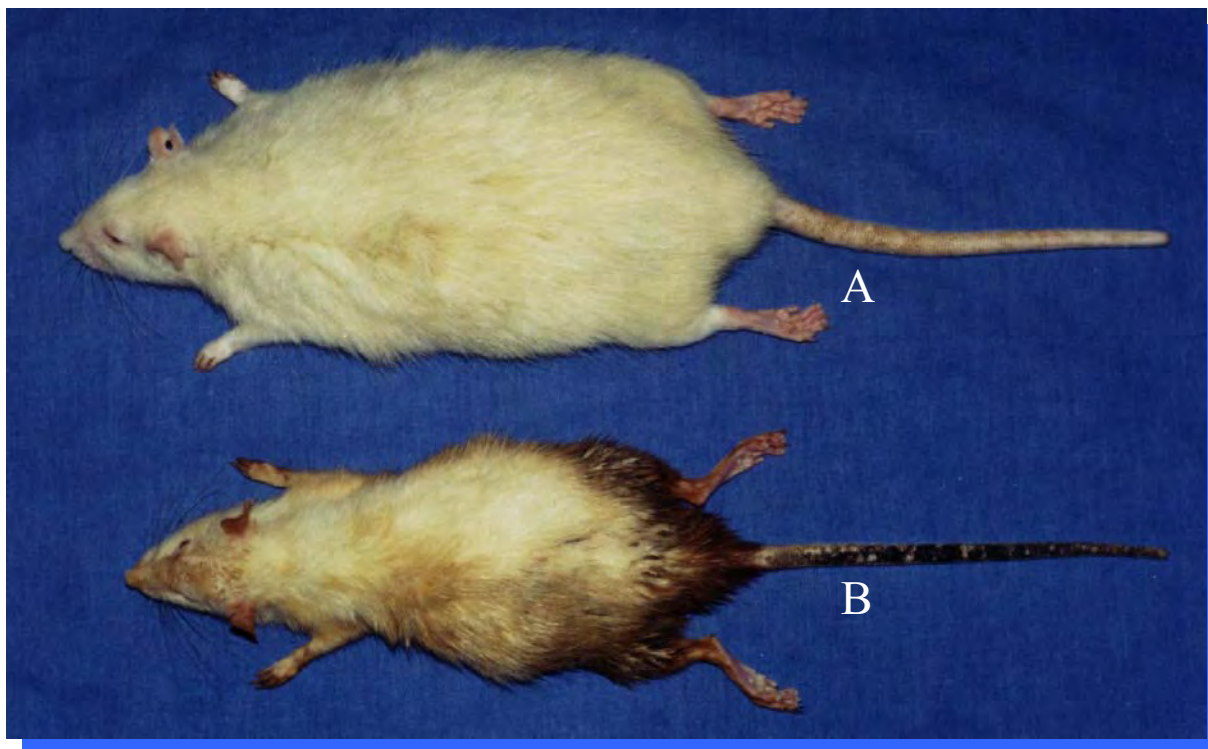


Figura 13. Estado geral dos animais do grupo não diabético (A) e diabético (B), da mesma espécie e idade, em um seguimento de 6 meses

Tabela 2. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação do peso corporal (g) nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p (1)
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	378,00±27,74 ^a	464,00±57,70 ^a	542,00±19,23 ^b	568,00±82,28 ^b	542,00±72,59 ^b	< 0,001 (*)
GD	232,00±27,06	202,00±45,49	248,00±48,16	272,00±76,94	245,00±51,47	0,343
p (2)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

(1) Análise de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

(*) Teste de Bonferroni com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: o GD apresentou valores de peso corporal (g) significativamente menores em todos os momentos de avaliação quando comparado com os apresentados pelo GND. Houve variação significativa entre os momentos do GND.

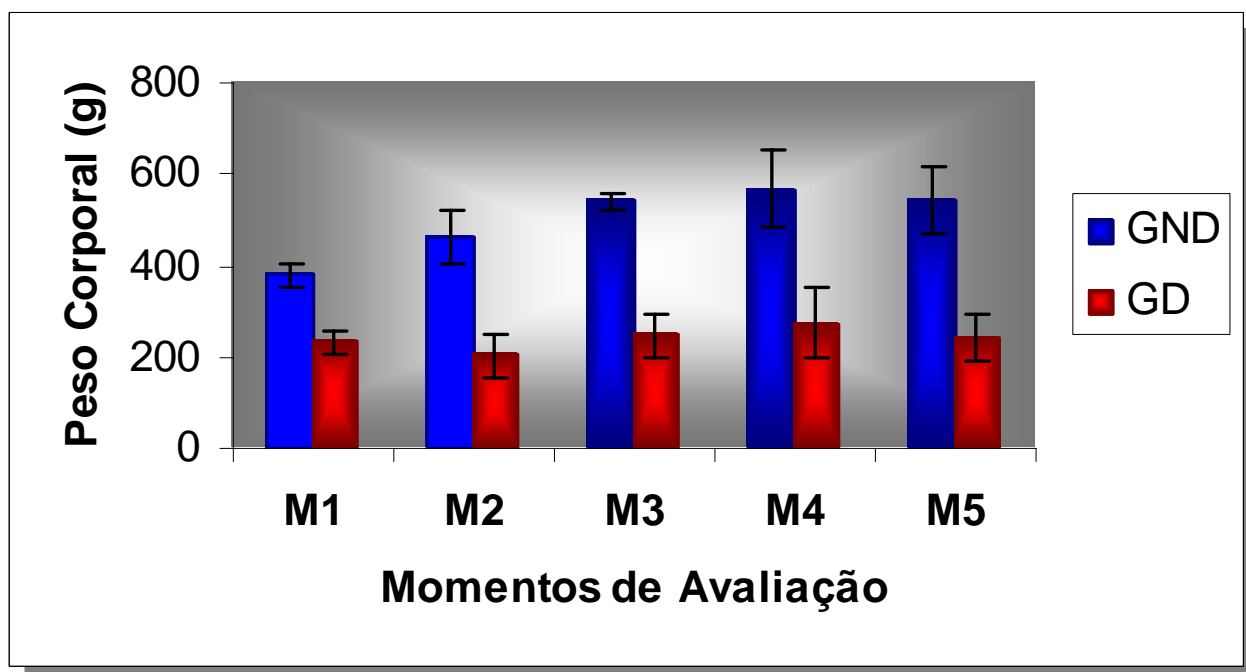


Figura 14. Médias e desvios-padrão do peso corporal (g) dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação

Tabela 3. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da ingestão hídrica (ml/24h) nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p (1)
	M1	M2	M ₃	M4	M5	
GND	45,00±10,00	34,00±4,18	43,00±13,03	58,00±17,88	39,00±7,41	0,084
GD	202,00±50,69	250,00±0,00	240,00±22,36	232,00±60,58	158,00±16,43	0,021(*)
p (2)	0,002	< 0,001	0,007(**)	0,009	< 0,001	

(1) Teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

(*) Teste de Dunn não identificou nenhuma diferença significativa

(**) Teste de Wilcoxon com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: o GD apresentou valores ingestão hídrica (ml/24h) significativamente maiores em todos os momentos de avaliação quando comparado com os apresentados pelo GND. Não houve variação significativa entre os momentos de cada grupo.

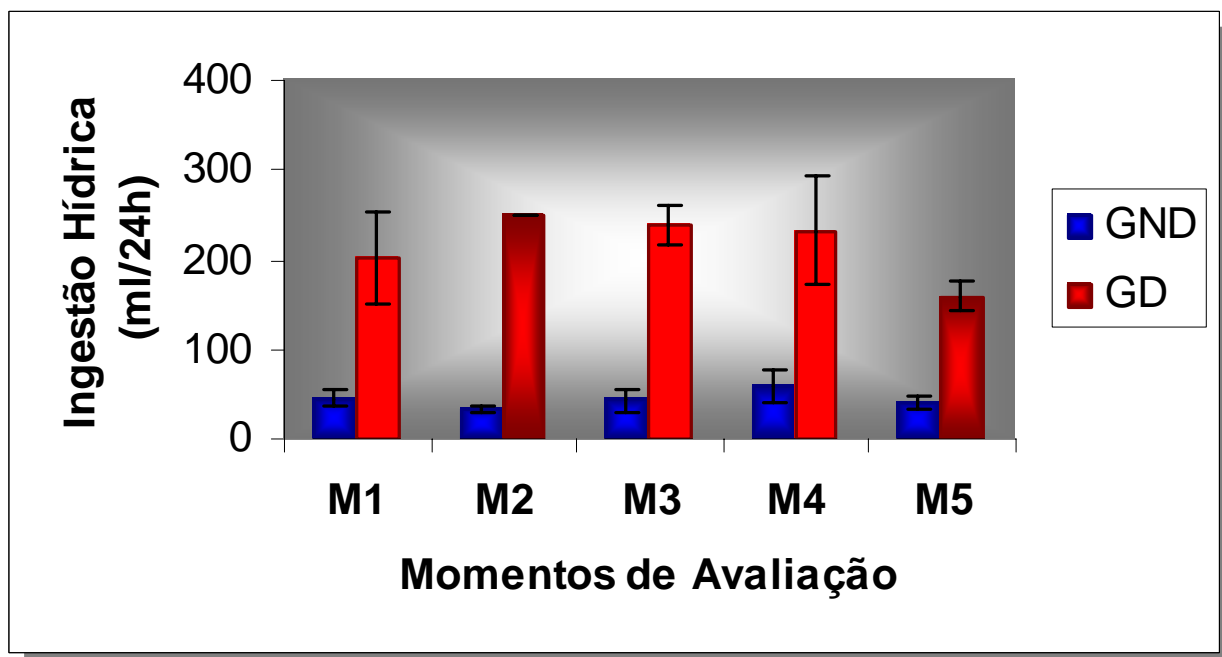


Figura 15. Médias e desvios-padrão da ingestão hídrica (ml/24h) dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação

Tabela 4. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da ingestão alimentar (g/12h) nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p (1)
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	23,00±4,47	27,00±2,73	19,00±2,23	23,00±9,08	17,00±5,70	0,064
GD	31,00±7,41	35,00±8,66	35,00±6,12	33,00±2,73	23,00±9,74	0,104
p (2)	0,081	0,107	0,007	0,08	0,283	

(1) Teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste de Wilcoxon com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: os valores da variável ingestão alimentar (g/12h) foram maiores no GD em relação ao GND, com diferença estatisticamente significativa no M3 (subgrupo do 6^o mês de seguimento). Não houve variação significativa entre os momentos de cada grupo.

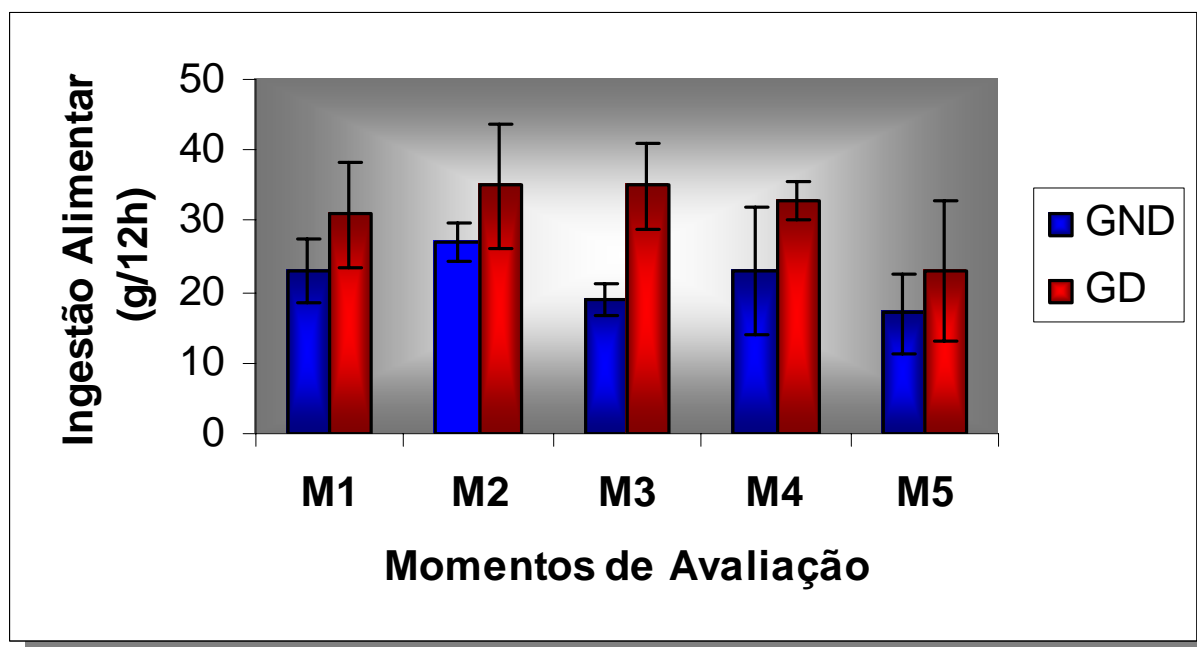


Figura 16. Médias e desvios-padrão da ingestão alimentar (g/12h), dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação

Tabela 5. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da diurese (ml/24h) nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p (1)
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	2,80±1,30	9,00±4,18	7,60±5,59	7,40±2,79	9,20±5,35	0,145
GD	121,20±36,70 ^a	159,60±17,12 ^a	182,80±30,01 ^a	156,80±48,75 ^a	109,40±21,59 ^b	0,013
p (2)	0,002	< 0,001	< 0,001	0,002	0,002	

(1) Teste de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: o GD apresentou valores diurese (ml/24h) significativamente maiores em todos os momentos de avaliação quando comparado com os apresentados pelo GND. Houve variação significativa entre os momentos do GD.

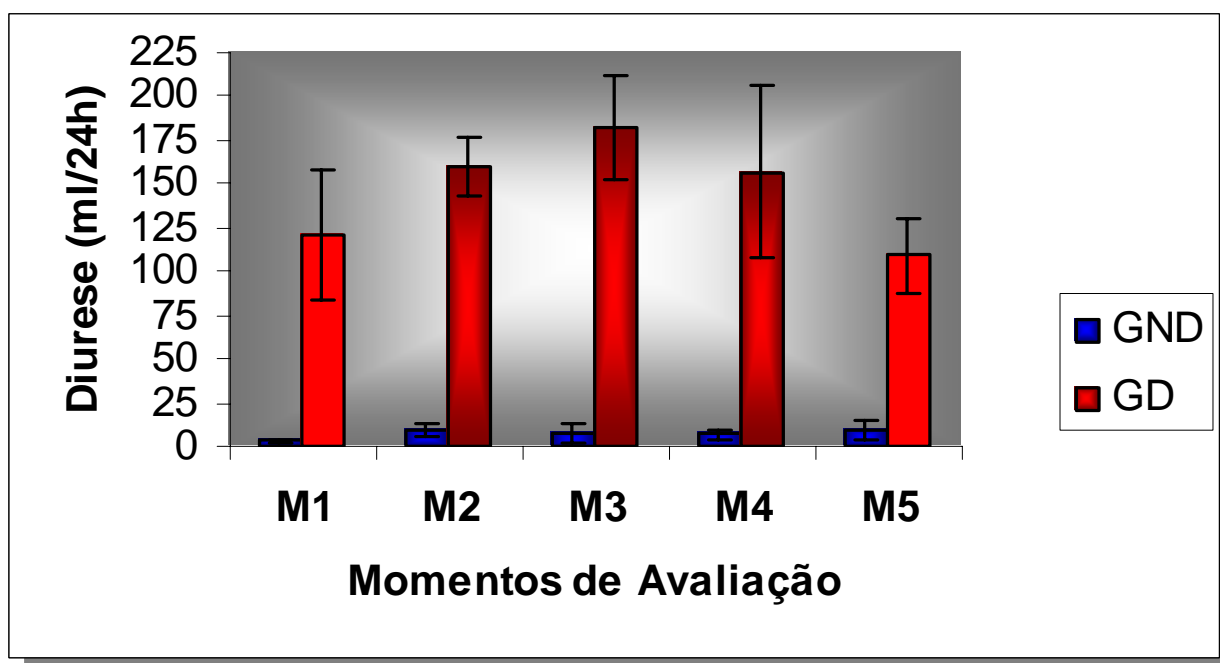


Figura 17. Médias e desvios-padrão da diurese (ml/24h), dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação

6.3. Exames Laboratoriais

6.3.1. Grupo não diabético (GND)

Os animais do GND não apresentaram quaisquer alterações nas dosagens laboratoriais realizadas durante todo o experimento, mantendo os valores de glicemia de jejum e glicosúria compatíveis com os apresentados por ratos saudáveis da mesma espécie e idade. A análise da presença de glicose e corpos cetônicos na urina, por meio de fitas reagentes, revelou-se negativa em todos os animais deste grupo, durante todo o experimento.

Os dados relativos à dosagem de glicose plasmática e urinária dos 50 animais do GND, acompanhados durante o período de 12 meses, nos cinco momentos de avaliação, constam das Tabelas 6 e 7, juntamente com seus respectivos gráficos (Figuras 18 e 19) e comentários estatísticos.

6.3.2. Grupo diabético (GD)

Neste grupo, todos os 50 animais acompanhados apresentaram alterações laboratoriais representadas por glicemia de jejum acima de 200mg/dl, glicose urinária maior ou igual a 3000mg/dl, glicemia (+++) nos testes com fitas reagentes. Esses parâmetros foram compatíveis com o estado diabético grave, em cujas alterações apresentadas, ao longo dos seis meses de avaliação, observamos diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao GND. Os dados do GD, incluindo suas ilustrações gráficas e comentários, encontram-se nas Tabelas e Figuras já mencionadas, juntamente com os dados do GND.

Tabela 6. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da glicemia (mg/dl) nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	108,31±27,56	104,96±11,92	87,86±8,95	107,15±12,06	100,22±19,81	0,417 (1)
GD	389,96±30,76	351,39±45,81	391,53±53,10	402,98±68,03	433,52±43,66	0,178 (2)
p (3)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,009 (*)	

(1) Teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(3) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

(*) Teste de Wilcoxon com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: os valores de glicemia de jejum (mg/dl) foram significativamente superiores no GD em relação ao GND em todos os momentos de avaliação. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os momentos nos dois grupos experimentais.

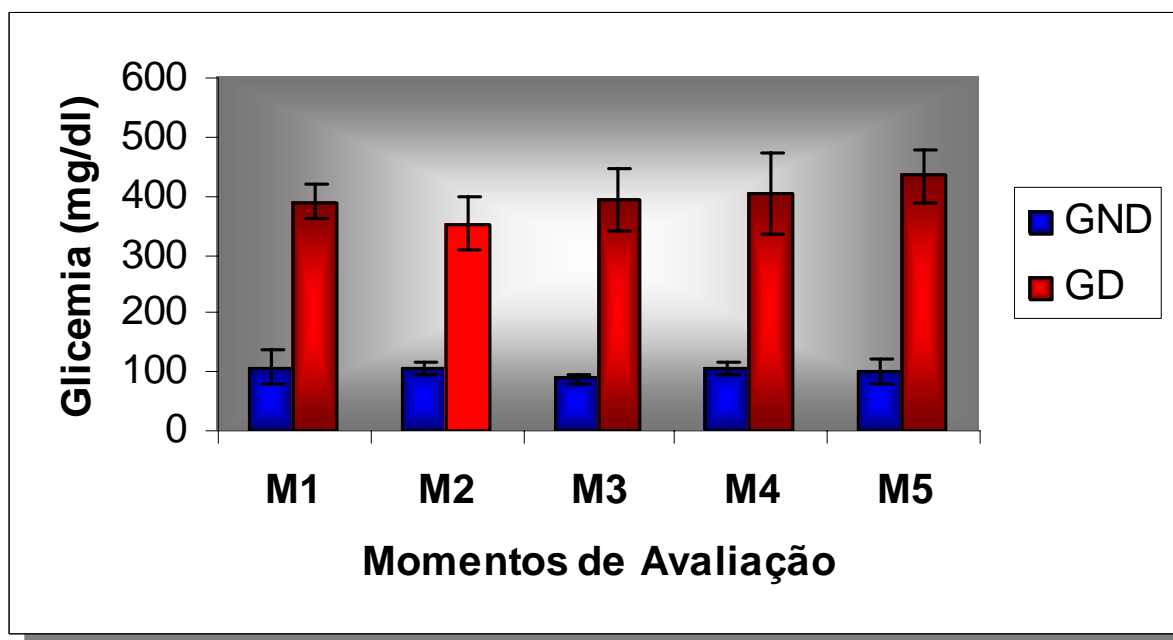


Figura 18. Médias e desvios-padrão da glicemia de jejum (mg/dl), dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação

Tabela 7. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da glicosúria (mg/dl) nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	29,72±17,38	10,24±2,74	8,62±4,72	8,06±5,63	13,13±3,19	0,027 (1) (*)
GD	6932±1114	5767±1014	6434±696	5028±1256	6948±666	0,024 (2) (**)
p (3)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

(1) Teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(3) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

(*) Teste de Dunn não identificou nenhuma diferença significativa

(**) Teste de Bonferroni não detectou nenhuma diferença entre os meses

Comentários: o GD apresentou valores de glicosúria (mg/dl) significativamente maiores em todos os momentos de avaliação quando comparado com os apresentados pelo GND. Não houve variação significativa entre os momentos nos dois grupos experimentais.

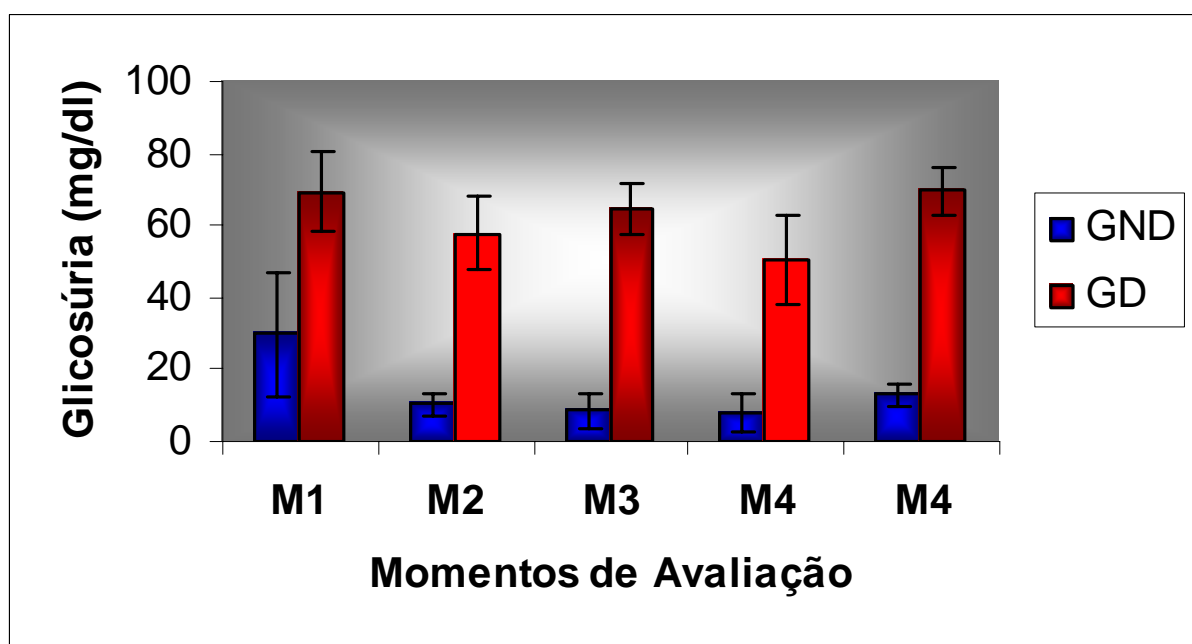


Figura 19. Médias e desvios-padrão da glicosúria do grupo não diabético (G1) em [(mg/dl) $\times 10^{-1}$] e do diabético (G2) em [(mg/dl) $\times 10$], nos cinco momentos de avaliação

6.4. Condução Nervosa Motora

6.4.1. Grupo não diabético (GND)

No estudo de condução nervosa motora, os 25 animais do GND apresentaram, quando da análise dos nervos ciático e caudal, nos momentos de avaliação (M1, M2, M3, M4 e M5), velocidade de condução nervosa (NCV) e latência distal (DLAT) compatíveis com os apresentados por ratos saudáveis da mesma espécie e idade. Uma variação significativa da NCV do nervo caudal foi observada entre os cinco momentos deste grupo.

A amplitude (AMPL) e a área (AREA) do potencial de ação muscular composto (CMAP) relativos aos nervos estudados, em cada momento do GND, estavam dentro dos padrões de normalidade, com uma redução de AMPL da onda M não superior à 20% (Figura 20 A e B).

Os dados obtidos, gráficos, análises estatísticas e comentários deste grupo encontram-se representados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11, e nas Figuras 22, 23, 24 e 25.

6.4.2. Grupo diabético (GD)

As mensurações relativas aos exames eletroneuromiográficos dos 25 ratos acompanhados no GD mostraram, NCV e DLAT alteradas nos nervos ciático e caudal. Foi observado na análise do nervo ciático, uma redução da NCV, e um aumento da DLAT, estatisticamente significativos, no M3 (subgrupo do 6^o mês de seguimento), quando comparado ao mesmo momento do GND. Já, o estudo do nervo caudal revelou uma diferença estatisticamente significativa, entre grupos, no M5 (subgrupo do 12^o mês de seguimento), com uma redução da NCV, e um aumento da DLAT, para os animais diabéticos. Ainda, com relação à análise do nervo caudal, os valores das variáveis NCV e DLAT mostraram variação significativa entre os cinco momentos estudados no GD.

Porém, os achados mais relevantes estão relacionados à interpretação dos traçados eletroneuromiográficos, onde foram encontradas alterações do formato da onda M, caracterizadas por um aumento da dispersão temporal, e uma redução da AMPL dos potenciais de ação evocados distalmente. A AMPL da onda M, no exame de alguns animais do GD, apresentou uma redução superior à 40% (Figura 21 A e B).

Os resultados referentes aos valores das variáveis NCV e DLAT, para os nervos ciático e caudal, nos cinco momentos do GD, encontram-se nas Tabelas de números 8 a 11 e Figuras de 22 a 23, já mencionadas, juntamente com os dados do GND.

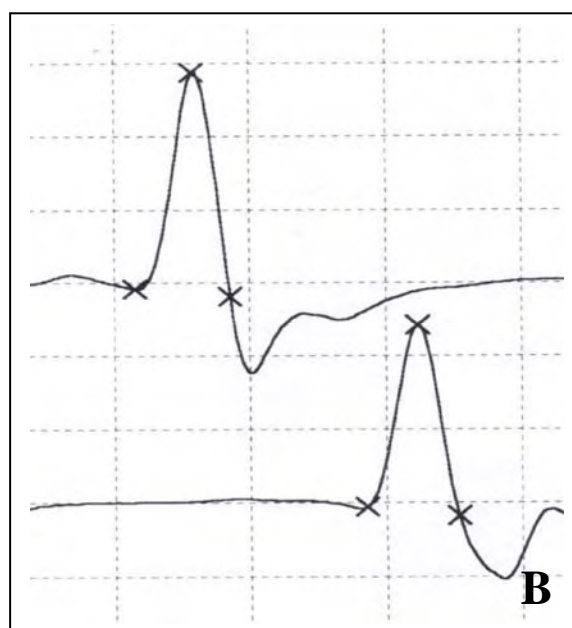
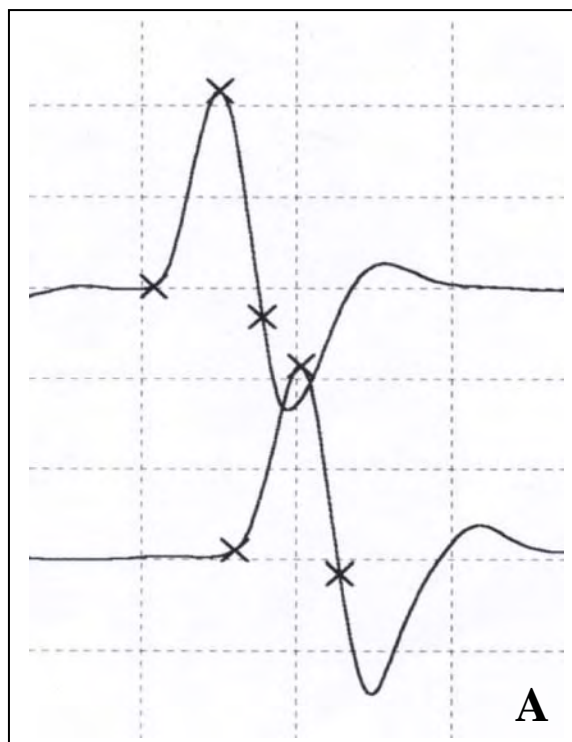


Figura 20. Exame eletroneuromiográfico: no nervo ciático (A) e no nervo caudal (B) de ratos não diabéticos, respectivamente, com 6 e 12 meses de seguimento

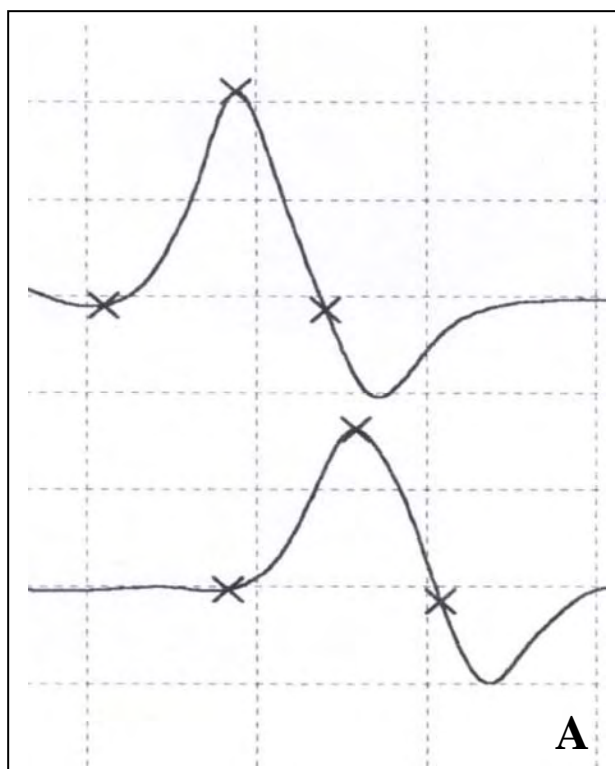


Figura 21. Exame eletroneuromiográfico: no nervo ciático (A) e no nervo caudal (B) de ratos diabéticos, respectivamente, com 6 e 12 meses de seguimento

Tabela 8. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo ciático nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					P (1)
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	50,40±9,28	51,00±7,77	55,80±9,60	58,40±22,50	42,00±9,02	0,344
GD	42,20±12,00	44,40±10,54	40,60±8,44	44,60±6,22	37,60±7,79	0,739
P (2)	0,262	0,293	0,029	0,248	0,433	

(1) Análise de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: os valores da variável NCV (m/s) do nervo ciático foram menores no GD em relação ao GND, com diferença estatisticamente significativa no M3 (subgrupo do 6º mês de seguimento). Não houve variação significativa entre os momentos de cada grupo.

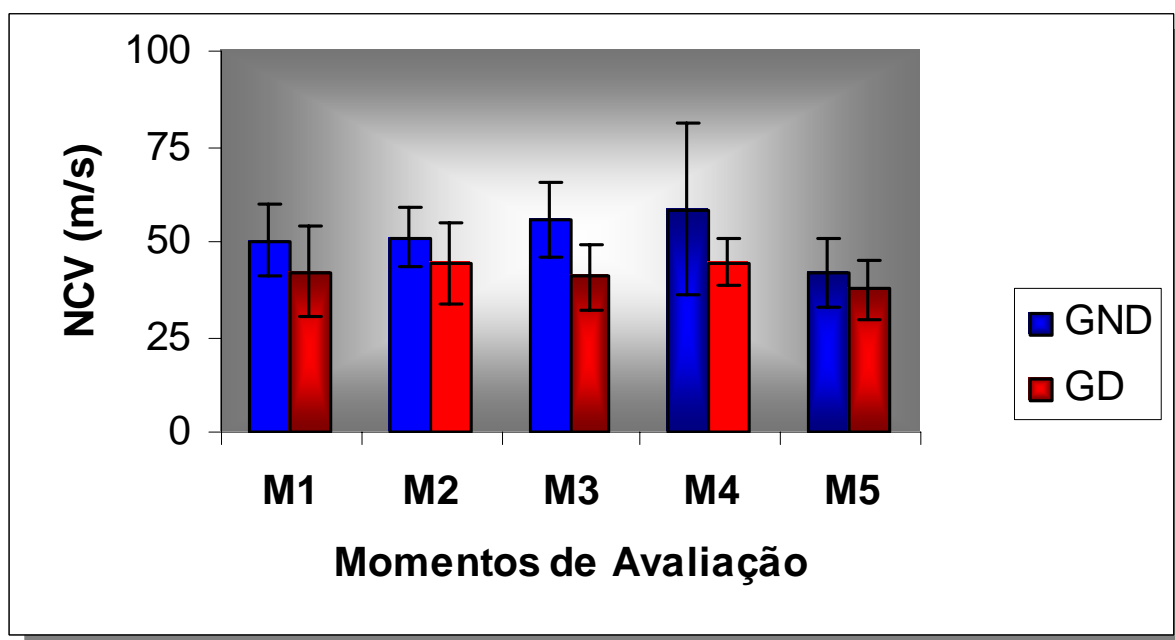


Figura 22. Médias e desvios-padrão da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo ciático, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação

Tabela 9. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo caudal nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p (1)
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	24,40±3,20a	25,00±2,34a	30,60±3,91b	30,80±3,63b	29,20±1,30b	0,005
GD	22,20±2,94a	22,20±1,78a	26,60±1,94b	27,80±1,64b	22,80±1,64a	0,001
p (2)	0,292	0,067	0,075	0,147	0,001	

(1) Análise de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: os valores da variável NCV (m/s) do nervo caudal foram menores no GD em relação ao GND, com diferença estatisticamente significativa no M5 (subgrupo do 12^o mês de seguimento). Houve variação significativa entre os momentos de cada grupo.

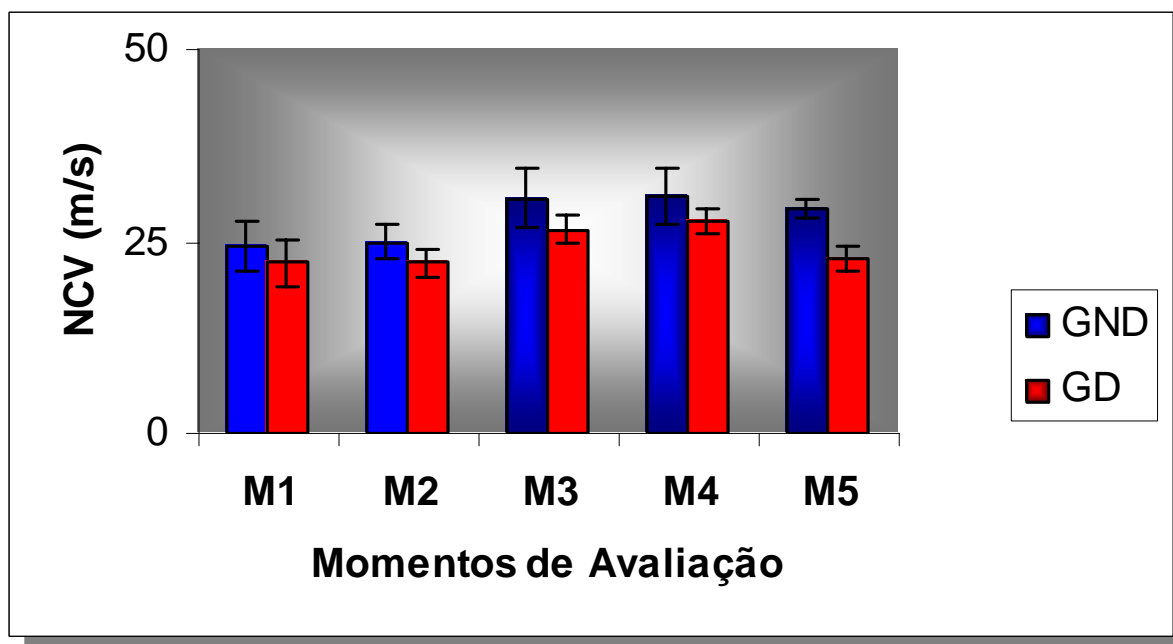


Figura 23. Médias e desvios-padrão da velocidade de condução nervosa motora (m/s) do nervo caudal, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação

Tabela 10. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da latência motora distal (ms) do nervo ciático nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					<i>p</i>
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	2,02±0,28	2,06±0,66	1,92±0,13	1,94±0,42	2,06±0,29	0,969 (1)
GD	2,32±0,46	2,60±0,47	2,32±0,22	2,22±0,37	2,18±0,27	0,456 (2)
<i>p</i> (3)	0,255	0,179	0,009	0,297	0,527	

(1) Teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Análise de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(3) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: os valores da variável DLAT (ms) do nervo ciático foram maiores no GD em relação ao GND, com diferença estatisticamente significativa no M3 (subgrupo do 6^o mês de seguimento). Não houve variação significativa entre os momentos de cada grupo.

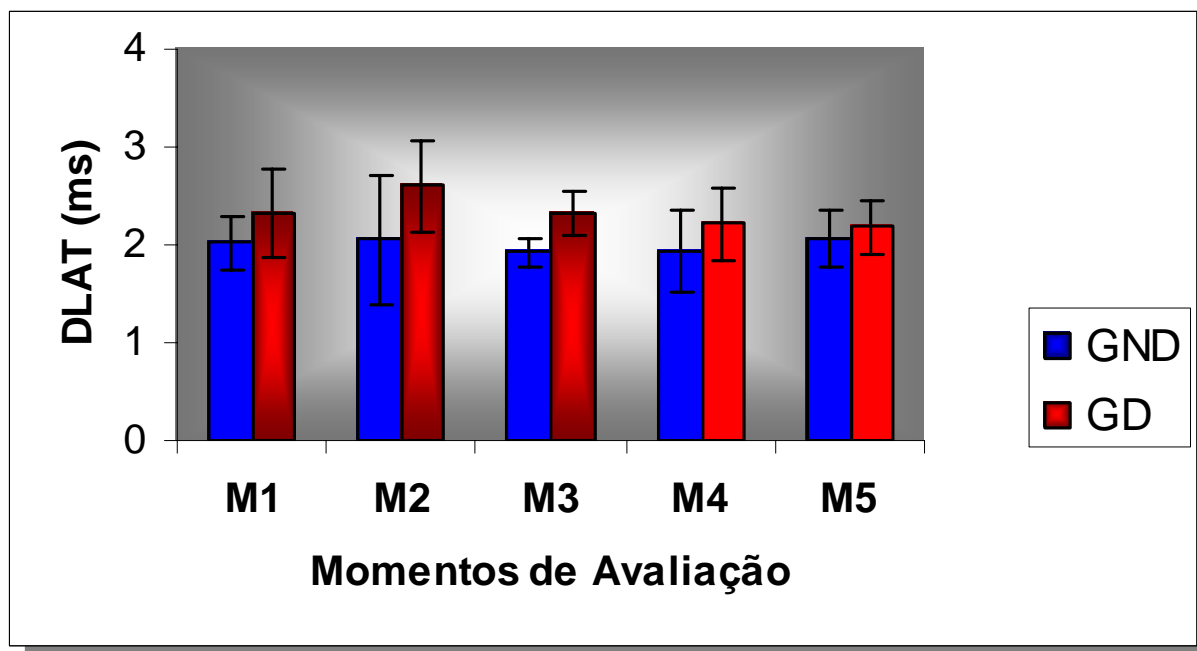


Figura 24. Médias e desvios-padrão da latência motora distal (ms) do nervo ciático, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação

Tabela 11. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da latência motora distal (ms) do nervo caudal nos grupos e momentos de avaliação

GRUPOS	MOMENTOS					p
	M1	M2	M3	M4	M5	
GND	2,66±0,46	2,80±0,44	2,18±0,30	2,32±0,44	2,30±0,12	0,109 (1)
GD	2,96±0,27 ^a	3,00±0,12 ^a	2,34±0,32 ^b	2,24±0,27 ^b	2,74±0,19 ^a	0,001 (2)
P (3)	0,257	0,363	0,441	0,740	0,003	

(1) Teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $\alpha=0,05$

(2) Análise de Variância com nível de significância $\alpha=0,05$

(3) Teste t de Student com nível de significância $\alpha=0,05$

Comentários: os valores da variável DLAT (ms) do nervo caudal foram maiores no GD em relação ao GND, com diferença estatisticamente significativa no M5 (subgrupo do 12^o mês de seguimento). Houve variação significativa entre os momentos do GD.

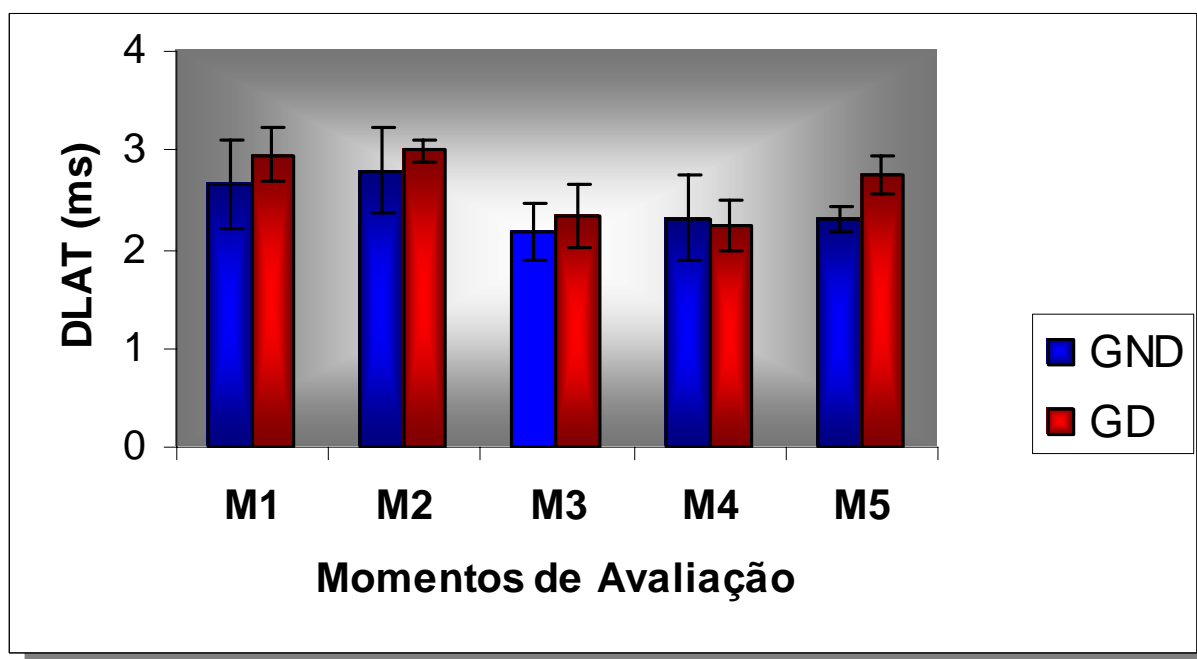


Figura 25. Médias e desvios-padrão da latência motora distal (ms) do nervo caudal, nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação

6.5. Descrição de Necropsia

6.5.1. Grupo não diabético (GND)

Não foram evidenciadas alterações macroscópicas na necropsia dos 50 animais deste grupo, com ênfase à ausência de catarata, de megacólon (Tabela 12) e de sinais de infestação por parasitas.

6.5.2. Grupo diabético (GD)

Nos 50 animais do GD foram observados diminuição significativa da massa muscular e do tecido adiposo. As infecções de pele e as infestações por piolho foram observadas em 32% dos animais. Os sinais de pneumonia estavam presentes em 40% dos ratos.

Quase 100% dos animais deste grupo apresentaram catarata bilateral (Figura 26A), sendo que 76% dos animais, no 1^o mês de seguimento, apresentaram catarata classificada como discreta ou moderada; 94% dos ratos, no 3^o mês de seguimento, mostraram catarata de intensidade grave; e, todos os animais avaliados com 6, 9 e 12 meses de seguimento, apresentaram catarata bilateral de intensidade grave.

Outro achado significativo no GD, foi a presença de megacólon, representada na Tabela 12, juntamente com os ratos do GND. Além do megacólon, também foram observadas infestações por teníase hepática (Figura 26B).

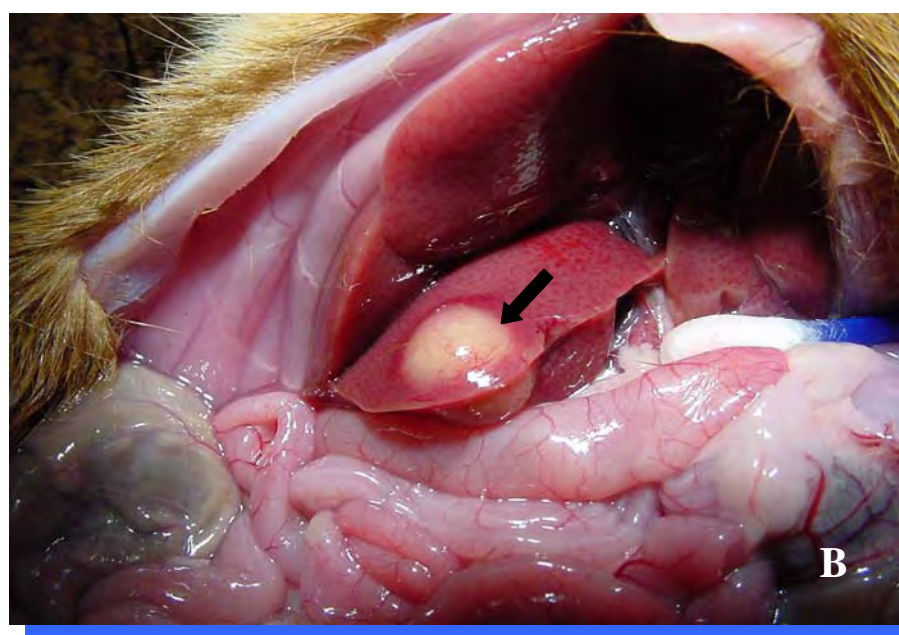


Figura 26. Ratos diabéticos com 3 meses de seguimento: (A) aspecto macroscópico da catarata bilateral, e (B) necropsia com lesão visceral (teníase)-seta

Tabela 12. Análise macroscópica do megacólon nos dois grupos experimentais e cinco momentos de avaliação, obtidas pela classificação em scores: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado e (+++) grave

MOMENTOS	GRUPOS	
	G1 (GND)	G2 (GD)
M1	(-)	(+)
M2	(-)	(+)
M3	(-)	(++)
M4	(-)	(+++)
M5	(-)	(++)

Comentários: os animais do GND não manifestaram o megacólon em nenhum dos períodos estudados. Já nos animais do GD, esta patologia se manifestou em graus variados, com uma correlação entre evolução de intensidade do megacólon e os momentos de avaliação do trabalho.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

7.1. Quanto aos Animais Utilizados

Considerando-se os diversos animais de experimentação utilizados para o estudo da neuropatia diabética, como os ratos, os coelhos, os camundongos, os hamsters, os cães e os gatos, optou-se no presente trabalho pela utilização do rato (Wistar), devido às suas inúmeras vantagens em relação aos outros animais de maior porte. Dentre essas incluem-se:

- a) fácil manuseio (alimentação, higiene e acomodação);
- b) permitem o trabalho simultâneo com vários grupos experimentais sem a necessidade de grande espaço físico;
- c) elevada resistência às infecções, dispensando o uso profilático de antibióticos;
- d) ciclo biológico curto, tornando possível o estudo de processos degenerativos e crônicos em um menor espaço de tempo;
- e) possibilitam a padronização da amostra, graças às facilidades de uniformização das variáveis idade, peso, linhagem e grau de nutrição do animal;
- f) facilidade de manuseio e instalação do animal para a realização do exame eletroneuromiográfico;
- g) menor custo do projeto, conseqüente à soma dos itens anteriormente citados.

Além destes fatores, o modelo experimental do diabetes induzido em ratos tem sido amplamente utilizado por pesquisadores de todas as partes do mundo (GREENE *et al.*, 1975; JAKOBSEN, 1976; FUKUMA *et al.*, 1978; CLEMENTS & STOCKARD, 1980; BESTETTI *et al.*, 1981; SIMA *et al.*, 1988; HIRATA & OKADA 1990; SPADELLA *et al.*, 1998; CAMERON *et al.*, COPPEY *et al.*, 2001; KRIZ & PADJEN, 2003), devido às suas semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes do homem.

7.2. Quanto ao Tempo de Observação dos Animais

No presente trabalho optou-se pelo estudo da neuropatia diabética experimental, tendo como base a análise de dois grupos experimentais (GND e GD), acompanhados por um período de 12 meses.

Como citado no tópico anterior (“Quanto aos Animais Utilizados”), os ratos apresentam um ciclo de vida curto, permitindo assim, que neste estudo, os efeitos deletérios da hiperglicemia crônica do diabetes, em relação à função motora dos nervos periféricos, pudessem ser correlacionados ao tempo de doença e à evolução biológica dos animais.

Além disso, o acompanhamento dos animais por períodos variados do ciclo de vida, permitiu a análise dos efeitos crônicos do diabetes, no tempo e no espaço, mediante à evolução natural de animais saudáveis da mesma espécie e idade.

Outro fator considerado, é que a maioria dos trabalhos existente na literatura, abordando o diabetes experimental, se utiliza de períodos variáveis de tempo, indo de alguns dias até poucas semanas de seguimento (JAKOBSEN, 1976; FUKUMA *et al.*, 1978; CLEMENTS & STOCKARD, 1980; BESTETTI *et al.*, 1981; COPPEY *et al.*, 2001; KRIZ & PADJEN, 2003). Raros são os trabalhos com acompanhamento por longo período (SIMA *et al.*, 1988; SPADELLA *et al.*, 1998).

7.3. Quanto às Técnicas Utilizadas

7.3.1. Anestesia

O pentobarbital sódico, administrado via i.p. na dose de 30mg/kg de peso corporal, foi o agente anestésico utilizado, neste trabalho, para a coleta de sangue, realização do exame eletroneuromiográfico e subsequente sacrifício dos animais. Além do baixo custo desta droga em relação aos outros agentes anestésicos, também, podemos citar outras vantagens no emprego do pentobarbital sódico: facilidade na indução anestésica, manutenção do plano anestésico durante todo o procedimento e maior disponibilidade no mercado. Esta técnica anestésica é padronizada no Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, com seu emprego em vários estudos (SPADELLA, 1989; BREIM, 1990; SCHELLINI, 1992; PAIVA, 2001).

7.3.2. Indução do Diabetes Experimental

O *Diabetes Mellitus* é uma síndrome metabólica com conseqüências diretas ou indiretas para o sistema de saúde, em todas as partes do mundo. Neste contexto, um grande número de centros de pesquisa tem investido em trabalhos direcionados ao estudo da causa, do diagnóstico e do tratamento desta doença.

Diversas pesquisas já foram conduzidas na busca pelo método de indução do diabetes experimental capaz de reproduzir, integralmente, a fisiologia do diabetes humano. Assim, os principais métodos para a indução do diabetes experimental são: pancreatectomia (MERING & MINKOWSKI, 1889), lesões do sistema nervoso central (SNC) (HETHERINGTON & RANSON, 1940), uso de hormônios anti-insulínicos (MORDES & ROSSINI, 1985), exposição à hidrocortisona ou ACTH (CAVALLERO & MOSCA, 1953; LAZARUS & BENCOSME, 1955), indução por vírus (YOON *et al.*, 1979; BELL & HYE, 1983), e o uso de agentes químicos betacitotóxicos (DUNN *et al.*, 1943; RAKIETEN *et al.*, 1963).

Dentre as técnicas acima citadas, a indução do diabetes experimental utilizando-se de substâncias químicas que destroem seletivamente as células β do pâncreas é extremamente conveniente, e de fácil manuseio. As drogas mais comumente utilizadas para indução do diabetes no rato são a aloxana e a estreptozotocina. A ação citotóxica destes agentes diabetogênicos é mediada por espécies reativas do oxigênio (ROS), entretanto, o mecanismo pelo qual são gerados as ROS é diferente no caso dos dois compostos (SZKUDELSKI, 2001).

A aloxana (2,4,5,6 tetra oxihexahidropirimida) foi primeiramente descrita por Brugnatelli em 1818 (apud SZKUDELSKI, 2001). Wöhler e Liebig usaram o nome “aloxana” e descreveram sua síntese a partir da oxidação do ácido úrico (apud LENZEN & PANTEN, 1988). Porém, as propriedades diabetogênicas desta droga foram relatadas muitos anos depois, em 1943, por Dunn, Sheehan e McLetchie, os quais estudando os efeitos de sua administração em coelhos, relataram uma necrose específica das ilhotas pancreáticas (DUNN *et al.*, 1943). Deste então, a aloxana tem sido utilizada para indução do diabetes em modelos animais (LENZEN & PANTEN, 1988; SZKUDELSKI *et al.*, 1998; SZKUDELSKI, 2001).

A aloxana exerce sua ação diabetogênica quando administrada parenteral, intravenosa, intraperitoneal ou subcutaneamente. A dose requerida para indução do diabetes depende da espécie animal, da via de administração, e do estado nutricional. Desta forma, as ilhotas pancreáticas humanas, quando comparadas as do rato e do camundongo, são consideradas

mais resistentes à ação da aloxana (EIZIRIK et al., 1994). O aumento da glicose sangüínea, também, interfere no mecanismo de ação da droga, protegendo parcialmente (BANSAL et al., 1980; SZKUDELSKI et al., 1998). Nos ratos, a dose intravenosa freqüentemente utilizada para indução do diabetes é de \pm 42-45mg/kg de peso corporal (GRUPPUSO et al., 1990; BOYLAN et al., 1992), porém é duplicada ou triplicada quando administrada subcutâneamente (KATSUMATA et al., 1992, 1993). Outro aspecto a ser considerado é a maior susceptibilidade que animais em jejum têm a aloxana (KATSUMATA et al., 1992; SZKUDELSKI et al., 1998).

Em estudos onde a aloxana foi testada em ilhotas de Langerhans isoladas (WEAVER et al., 1978b) ou através da perfusão do pâncreas de rato (KLIBER et al., 1996) foi demonstrado um aumento súbito na secreção de insulina. Este fenômeno ocorre logo após o tratamento com a aloxana, e não se repete em aplicações sucessivas do agente diabetogênico (WEAVER et al., 1978b). Uma elevação rápida na concentração da insulina sangüínea foi também observada *in vivo* imediatamente após injeção de aloxana em ratos. (SZKUDELSKI et al., 1998). A insulina liberada após indução pela aloxana é, entretanto, de curta duração, e seguida por uma supressão de resposta das ilhotas à glicose, mesmo com o uso de altas doses do açúcar (KLIBER et al., 1996).

A aloxana é uma substância hidrofílica e instável, e tem uma meia-vida, em pH neutro e a temperatura de 37°C, de aproximadamente 1,5min, porém com tempo de decomposição suficiente para alcançar o pâncreas em quantidade nociva (WEAVER et al., 1978a; LENZEN & MUNDAY, 1991). Seu modo de ação é por inibição da glicoquinase, bloqueando a secreção de insulina induzida pela glicose. A aloxana reage com dois grupos -SH no local de ligação do açúcar na glicoquinase, resultando na inativação desta enzima (LENZEN & MUNDAY, 1991; SZKUDELSKI, 2001). A glicose pode ter um efeito protetor contra a inativação da glicoquinase, impedindo o acesso da aloxana aos grupos -SH da enzima (LENZEN & PANTEN, 1988).

No processo de redução da aloxana são geradas ROS, com efeito lesivo sobre o DNA das ilhotas pancreáticas (LENZEN & MUNDAY, 1991). A aloxana provoca ,também, um aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico (Kim et al., 1994). A concentração exagerada deste íon contribui para a liberação de insulina acima da fisiológica e, juntamente com as ROS, causam danos as células β pancreáticas (WEAVER et al., 1978b; KIM et al., 1994).

No presente trabalho, o método de indução do diabetes experimental foi através do emprego do agente químico aloxana, preferencialmente à estreptozotocina, em decorrência do menor custo em relação à esta última, e disponibilidade da droga no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.

De acordo com a farmacodinâmica da aloxana, acima descrita, esta droga foi administrada nos ratos, por via e.v, na dose única de 42mg/kg de peso corporal, após jejum de 12h; tendo produzido nos animais diabetes franco, com alterações clínicas e laboratoriais bem definidas, incluindo: perda de peso, aumento da ingestão hídrica e alimentar, poliúria, valores glicêmicos acima de 200mg/dl, glicose urinária maior ou igual a 3000mg/dl, e glicosúria positiva (+++) nos testes com fitas reagentes.

7.4. Quanto à Evolução Clínica

Os parâmetros utilizados na avaliação clínica dos animais estudados foram: estado geral, peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese.

No GND, os ratos mostraram-se em perfeitas condições, ao longo de todo período experimental, com bom apetite, tônus e reflexos conservados. Os 50 animais deste grupo apresentaram curva evolutiva normal, em relação à espécie, e às condições ambientes em que se realizou o experimento; tendo sido registrados, ganho progressivo de peso, manutenção da ingestão hídrica, da ingestão alimentar e da diurese.

Os ratos do GD, por sua vez, apresentaram um perfil bem diferente aos do GND, contando, inclusive, com a possibilidade de diagnóstico da doença pela simples observação do péssimo estado físico dos animais deste grupo.

Na análise do peso corporal (g) entre estes dois grupos experimentais, observou-se que o peso corporal dos ratos do GD foi significativamente menor, quando comparado ao GND. A perda de massa corporal em animais diabéticos, resultante do aumento do catabolismo, foi relatada em outros estudos (SPADELLA, 1989; BREIM, 1990; SCHELLINI, 1992; PAIVA, 2001), e em trabalhos recentemente publicados (NAKAE *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2006).

Outra variável clínica alterada nos animais do GD foi a ingestão hídrica. A hiperosmolaridade, resultante dos altos níveis de glicose circulante, tem como consequência a passagem de água do ambiente intracelular para o meio extracelular. Esta perda excessiva de

água pelas células é sinalizada ao centro da sede no SNC, resultando na ingestão aumentada de água. Esse mecanismo, decorrente da hiperglicemia, parece ser o responsável pelo aumento significativo da ingestão hídrica nos animais do GD, em todos os momentos estudados neste trabalho.

A hiperglicemia, também é responsável pela chamada diurese osmótica. Neste mecanismo fisiopatológico, a concentração elevada de glicose no filtrado glomerular ultrapassa o limiar de reabsorção das células tubulares renais, resultando na produção de grande volume de urina de elevada osmolaridade (BONDY, 1973). Neste trabalho, também, os valores da diurese estavam significativamente elevados no GD, em relação aos animais não diabéticos, reproduzindo, assim, as características do estado hiperglicêmico.

Não diferente das demais variáveis, as mensurações da ingestão alimentar estavam alteradas no GD. A polifagia, produzida em resposta à diminuição relativa ou absoluta de glicose no interior das células, em decorrência da redução na produção e/ou ação da insulina (COSTA & ALMEIDA NETO, 2004), é outro sinal detectado nos ratos diabéticos utilizados neste estudo. Nos animais do GD, os valores da variável ingestão alimentar foram maiores que os apresentados pelo GND, com diferença estatisticamente significativa no M3 (subgrupo de 6 meses de seguimento).

Além dos parâmetros clínicos alterados, os ratos diabéticos apresentaram ainda outros sinais característicos da alteração metabólica, como queda de pêlos, distensão abdominal, catarata bilateral, quadros de infestação visceral, bem como, episódios freqüentes de pediculose e piodermites. Esses achados foram previamente relatados por Spadella *et al.* (1996, 1998, 2000, 2002, 2005) e Lerco *et al.* (2006).

7.5. Quanto aos Exames Laboratoriais

As mensurações das variáveis laboratoriais, glicemia de jejum (g) e glicose urinária (ml/24h), e o resultado da glicosúria com fitas reagentes, justificam, de modo geral, os valores dos parâmetros clínicos encontrados nos dois grupos experimentais (GND e GD).

Os animais do GND apresentaram níveis de glicemia de jejum compatíveis com o metabolismo normal da glicose na espécie, não sendo encontrado glicosúria ou cetonúria, em todo período experimental. Já, os ratos do GD mostraram níveis glicêmicos significativamente elevados, decorrentes do diabetes grave induzido pela aloxana (SPADELLA *et al.*, 1996, 1998, 2000, 2002, 2005; LERCO *et al.*, 2006).

Os valores da glicose urinária foram significativamente maiores no GD quando comparados aos do GND, em todos os momentos estudados. A diferença entre as mensurações foi tão exacerbada, que o gráfico representativo dos valores da variável glicosúria (ml/24h) dos dois grupos experimentais, nos cinco momentos de avaliação, teve que ser confeccionado na seguinte escala: no GND em $[(\text{mg/dl}) \times 10^{-1}]$ e no GD em $[(\text{mg/dl}) \times 10]$.

Todos os dados obtidos da análise dos parâmetros clínicos e laboratoriais, neste trabalho, foram importantes para caracterização dos dois grupos experimentais, e sua evolução ao longo do tempo.

7.6. Quanto ao Estudo da Condução Nervosa Motora

O *Diabetes Mellitus* é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia, como resultado da deficiente produção de insulina, da sua ação ou de ambas (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2002). Também definido como síndrome metabólica, o diabetes reduz a expectativa de vida em 5-10 anos, devido, principalmente, ao comprometimento macrovascular. As doenças microvasculares específicas do diabetes, como a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia, também contribuem para a morbidade e a mortalidade prematura (Figura 1) (TESFAYE *et al.*, 2005; MARSHALL & FLYVBJERG, 2006).

A neuropatia diabética é uma das mais frequentes complicações microvasculares do *Diabetes Mellitus*, e se constitui em um complexo e heterogêneo grupo de desordens que envolvem diferentes partes do sistema nervoso somático e autonômico, podendo ser focal ou difusa, e ainda, proximal ou distal (BOULTON *et al.*, 2004,2005; CASELLINI & VINIK, 2006). Sua prevalência em pacientes diabéticos adultos tem valores bastante discrepantes, dependendo do método diagnóstico usado. Assim, entre os diversos estudos, os dados variam desde menos de 5% até próximo de 60%, e igual a 100% se pacientes com anormalidades de condução nervosa, sem acompanhamento de sinais e sintomas, são incluídos (THOMAS & TOMLINSON, 1993; BOULTON *et al.*, 2004,2005; ZIEGLER, *et al.*, 2004; MARSHALL & FLYVBJERG, 2006).

A polineuropatia diabética, por sua vez, é a forma mais comum de neuropatia diabética, incluindo manifestações do tipo sensitivo, motor e autonômico (BROWN *et al.*, 1976; SARAIVA, 1992; KARSIDAG *et al.*, 2005). A prevalência deste grupo, também, é bastante

diversa, e está relacionada aos critérios diagnósticos, clínico e eletrofisiológico, empregados (KARSIDAG *et al.*, 2005). Segundo Pastore *et al.* (1999), em pacientes diabéticos do tipo II, a polineuropatia diabética já pode estar presente no momento de diagnóstico, contrário ao diabetes do tipo I, onde é incomum a manifestação precoce desta complicação neuropática.

Não existem conclusões definitivas sobre a patogenia da neuropatia diabética. A maioria dos autores considera a hiperglicemia como causa determinante da neuropatia diabética (HALAR *et al.*, 1982; ZIEGLER, *et al.*, 2004; KARSIDAG *et al.*, 2005). Os valores elevados de glicemia produzem alterações metabólicas principais, as quais podem conduzir à disfunção celular. Uma destas mudanças é a glicolização não enzimática de proteínas, que pode produzir alterações estruturais e funcionais da célula. A inibição competitiva da absorção de mioinositol, conseqüente a alterações em seu transporte, é outra mudança, que interfere no mecanismo de ligação dos fosfolipídios e, provavelmente, em fatores neutróficos do sistema nervoso periférico. Outra conseqüência da hiperglicemia é o aumento dos níveis de sorbitol e frutose intracelular. A elevação dos níveis de sorbitol é fator de diminuição do fluxo sanguíneo no nervo, podendo acarretar a hipoxia endoneural (SARAIVA, 1992).

A hiperglicemia pode ainda ser responsável pelo estresse oxidativo, resultante do aumento na produção de radicais livres e/ou da diminuição de defesas antioxidantes (VINCENT *et al.*, 2004; ZIEGLER *et al.*, 2004). Diversos trabalhos têm mostrado uma diminuição de agentes antioxidantes, principalmente da vitamina E, e um aumento de produtos da peroxidação dos lipídios, em nervos de ratos diabéticos (LOW & NICKANDER, 1991; VINCENT *et al.*, 2004; ZIEGLER, *et al.*, 2004). Ziegler *et al.* (2004) mostraram que o estresse oxidativo é mais pronunciado em pacientes diabéticos com polineuropatia, quando comparado com aqueles sem esta complicação.

Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a sensibilidade do método eletroneuromiográfico, e caracterizar o padrão de condução nervosa motora (velocidades, latências e amplitudes) dos nervos ciático e caudal de ratos com diabetes induzido pela aloxana, tendo como referência os dados encontrados em ratos não diabéticos da mesma espécie e idade, com o mesmo período de seguimento.

Os nervos ciático e caudal foram escolhidos por três motivos:

a) No diabetes, os nervos motor e sensitivo das extremidades inferiores são mais freqüentemente afetados (KARSIDAG *et al.*, 2005);

b) Facilidade de padronização da técnica no exame do nervo caudal, pois apesar da diferença de tamanho e peso corporal entre os animais diabéticos e não diabéticos, o comprimento da cauda é o mesmo;

c) Diversos trabalhos experimentais utilizaram-se dos nervos caudal e ciático para avaliação da neuropatia diabética (MIYOSHI & GOTO, 1973; BROWN *et al.*, 1980; HIRATA & OKADA, 1990, ORLOFF *et al.*, 1990; CAMERON *et al.*, 2001; NAKAE *et al.*, 2006).

O estudo da condução nervosa é útil para avaliar alterações dos nervos periféricos. Atualmente, esta técnica está sendo usada não somente para localização de uma lesão nervosa, mas também para caracterização precisa da função nervosa periférica. A técnica consiste na estimulação supra-máxima do nervo, causando a despolarização simultânea de todos os seus axônios, e resultando na formação de um potencial de ação, que atravessa ortodromicamente o nervo. O impulso é transmitido quimicamente através da junção neuromuscular, o que produz um potencial de ação muscular composto (CMAP) ou onda M, registrado pelo eletrodo ativo na superfície do músculo correspondente, e tendo como referência um eletrodo posicionado em uma região eletricamente neutra (KIMURA, 1984; STALBERG & FALK, 1993; HILBURN, 1996)

A latência motora distal (DLAT) é o tempo (ms) mensurado a partir do ponto de estímulo até o início da onda M. Subtraindo-se a latência motora distal da latência motora proximal, e dividindo-se o resultado pelo valor da distância (mm) entre os dois pontos de estimulação, obtém-se o valor da velocidade de condução nervosa (NCV) em m/s (KIMURA, 1984; STALBERG & FALK, 1993; HILBURN, 1996).

Neste trabalho, os valores da NCV dos nervos ciático e caudal foram, de um modo geral, menor no grupo diabético (GD) em relação aos do grupo não diabético (GND), com diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos experimentais (GND e GD), no 6^o mês de seguimento (M3) para o nervo ciático, e no 12^o mês de seguimento (M5) para o nervo caudal. Uma variação entre os momentos de avaliação de cada grupo estudado (GND e GD) foi notada apenas na análise do nervo caudal, sem contudo, ser possível realizar uma correlação desta variável (NCV) com o tempo de doença e a evolução natural dos animais.

Karsidag *et al.* (2005) em um estudo com 30 pacientes diabéticos do tipo I, entre as idades de 12 e 38 anos, encontraram uma correlação positiva entre os níveis de HbA1c e a velocidade de condução nervosa (NCV). Entretanto, a alteração de condução nervosa das

extremidades superiores não foi correlacionada com os valores de HbA1c. Os autores também não encontraram uma correlação nem de duração da doença nem de idade dos pacientes com as mudanças no sistema nervoso.

Malone *et al.* (1996) encontraram uma diminuição do diâmetro da fibra nervosa, da espessura da bainha de mielina, e do número de fibras mielinizadas de maior calibre, em animais com diabetes induzido na 6^a semana de vida. Os animais em processo de maturação, tanto estrutural quanto funcional, do nervo periférico, e expostos à hiperglicemia crônica, apresentaram maiores alterações patológicas quando comparados aos ratos com nervos já maduros, e submetidos às mesmas condições experimentais. Os autores sugerem que modelos-animais de neuropatia diabética que utilizem ratos com o sistema nervoso ainda imaturo podem não ser apropriados para compreender o processo que comumente ocorrem em humanos, os quais tornam-se diabéticos após a maturação dos nervos periféricos.

Os nervos mielinizados apresentam uma condução saltatória do potencial de ação, pois a excitabilidade destes nervos está localizada nos nódulos de Ranvier. A mielina age como um conjunto de resistores e capacitores em paralelo, sem participação direta na geração do potencial de ação (FALK & STALBERG, 1995). Nos segmentos desmielinizados, ou durante a remielinização parcial, a diminuição da espessura de mielina resulta em um aumento da capacitância e condutância internodal, resultando na perda ou diminuição de corrente local. As falhas para se ativar o nódulo de Ranvier subsequente resultam em bloqueio de condução, porém quando há um retorno da função, os impulsos se propagam mais lentamente do que o normal, porque a corrente dissipada depende um maior tempo para gerar um potencial de ação (KIMURA, 1984).

Diversos trabalhos (FUKUMA *et al.*, 1978; Bestetti *et al.*, 1981) avaliaram morfometricamente a bainha de mielina em nervos motores de animais com diabetes induzido quimicamente, e encontraram uma diminuição substancial da espessura de mielina dos nervos periféricos estudados. No presente estudo, as alterações funcionais detectadas nos nervos ciático e caudal de ratos com diabetes induzido pela aloxana, refletem as alterações estruturais encontradas por estes autores.

Outra variável que apresentou valores alterados no estudo de condução nervosa motora foi a latência motora distal (DLAT). As mensurações da DLAT foram maiores no GD em relação ao GND, também com diferenças estatisticamente significativas no M3, quando da análise do nervo ciático, e no M5, quando da análise do nervo caudal. Houve variação

significativa dos valores de DLAT do nervo caudal entre os momentos estudados, mas apenas no GD. Esta variável (DLAT) não apresentou correlação com o tempo de doença ou a idade dos animais.

As anormalidades eletrofisiológicas dependem do tipo e grau de dano individual das fibras nervosas de um nervo (KIMURA, 1984). A degeneração axonal e/ou desmielinização das fibras nervosas de condução rápida repercutem no tempo de propagação do impulso nervoso (HILBURN, 1996). Assim, há um aumento da DLAT, e conseqüentemente uma diminuição da NCV.

A NCV em um nervo saudável depende do diâmetro da fibra nervosa, da relação entre o diâmetro do axônio e da bainha de mielina, e da distância entre os nódulos de Ranvier (FALK & STALBERG, 1995). A desmielinização segmentar das fibras nervosas, comum no diabetes, produz um bloqueio do impulso nervoso, o qual é restabelecido após o início do processo de remielinização. No processo de remielinização das fibras nervosas é gerado novos nódulos de Ranvier, os quais apresentam uma menor distância entre si, resultando em uma mudança das características funcionais do nervo correspondente (FALK & STALBERG, 1995; HILBURN, 1996).

Tradicionalmente, existe uma tendência em se enfatizar os valores calculados das variáveis quantitativas na interpretação dos estudos de condução nervosa. A análise da forma e da amplitude da resposta registrada é essencial para se distinguir os vários padrões dos processos patológicos. As alterações de forma da onda M, representadas por uma diminuição de sua área, reflete uma dispersão temporal, decorrente do processo de desmielinização. Já, uma redução da amplitude (AMPL) do potencial de ação está correlacionada à perda de elementos condutivos, ou seja, à degeneração axonal.

No presente trabalho, a AMPL da onda M, no exame de alguns animais do GD, apresentou uma redução superior à 40% , já registrada no 1º mês de seguimento (Figura 21). Foi observada, também, uma diminuição da área do potencial de ação no exame dos animais do GD. Todas estas alterações qualitativas foram mais expressivas quando da análise do nervo caudal no GD. Este resultado pode ser explicado pelo posicionamento padronizado dos eletrodos em distâncias pré-determinadas na cauda, o que possibilitou uma relação espacial estável entre os eletrodos de estímulo e captação, resultando em uma melhor expressão das alterações estruturais presentes nos ratos diabéticos examinados.

Estes achados eletroneuromiográficos estão de acordo com os resultados encontrados por Karsidag *et al.* (2005) em um estudo das alterações sub-clínicas em pacientes diabéticos com tempo de doença inferior a um ano. O autor encontrou um comprometimento eletrofisiológico em 96,6% dos pacientes com menos de um ano de doença.

Ainda segundo Karsidag *et al.* (2005) as alterações de condução nervosa são mais freqüentes nas fibras mielinizadas de maior diâmetro nos estágios iniciais do diabetes, embora também haja um envolvimento das fibras desmielinizadas e mielinizadas de menor calibre, especialmente nas extremidades inferiores.

A expressão das alterações qualitativas nos exames eletroneuromiográficos dos ratos diabéticos, utilizados neste estudo, foram proeminentes em relação às mudanças quantitativas nos primeiros meses da doença, sugerindo, assim, um comprometimento inicial das fibras mielinizadas de menor diâmetro nos estágios iniciais do diabetes. As alterações qualitativas, no 1º mês (anexos), tanto na análise do nervo ciático quanto no estudo do nervo caudal, foram sugestivas de degeneração axonal.

Assim, podemos inferir que nos estágios iniciais do *Diabetes Mellitus*, para o modelo experimental proposto no presente trabalho, ocorre a degeneração axonal das fibras mielinizadas de menor diâmetro, sem alterações quantitativas significantes, e no estágio tardio da doença ocorre a desmielinização das fibras mielinizadas de maior diâmetro, com mudanças quantitativas significantes.

Com essas considerações, é necessário salientar-se que o estudo da condução nervosa motora (velocidades, amplitudes e latências) dos nervos ciático e caudal nos animais experimentais foi importante para a caracterização da neuropatia diabética.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, concluímos que:

- a) O exame eletroneuromiográfico mostrou-se sensível em detectar alterações sub-clínicas, representadas por mudanças quantitativas e qualitativas da condução nervosa motora dos nervos ciático e caudal em ratos com diabetes induzido pela aloxana.
- b) A anatomia da cauda e a padronização da técnica para o estudo eletroneuromiográfico do nervo caudal favoreceram a obtenção de melhores resultados, tanto na realização do exame, como nas respostas registradas.
- c) A aloxana a 2%, administrada via e.v., na dose de 42mg/kg de peso corporal, após jejum de 12 horas, induziu diabetes grave no rato, demonstrado por alterações dos exames clínicos, laboratoriais e macroscópicos.

RESUMO

9. RESUMO

A neuropatia motora distal é uma das freqüentes complicações do *Diabetes Mellitus*, e sua prevalência pode ser considerada igual a 100%, se pacientes com alterações de condução nervosa, sem acompanhamento de sinais ou sintomas, são incluídos. Neste contexto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de obter informações relacionadas às polineuropatias periféricas em animais com diabetes induzido pela aloxana. Os grupos experimentais foram formados por 50 ratos diabéticos (GD) sem tratamento, da raça Wistar, machos, e 50 ratos não diabéticos (GND) da mesma espécie e idade. As avaliações eletrofisiológicas foram obtidas após 1, 3, 6, 9 e 12 meses de seguimento, respectivamente, nos cinco subgrupos, cada um, com cinco animais. Os exames dos nervos ciático e caudal mostraram: (i) os potenciais de ação muscular composto (CMAPs) apresentaram diminuição da amplitude e aumento da dispersão temporal; (ii) a velocidade de condução nervosa (NCV) foi menor ($p < 0,05$) no GD, com diferença estatisticamente significativa na NCV do nervo caudal nos diferentes intervalos de tempo; (iii) a latência distal (DLAT) foi maior ($p < 0,05$) no GD, com diferença estatisticamente significativa na DLAT do nervo caudal entre os vários subgrupos do GD. Estes resultados demonstram que o modelo experimental proposto pode ser usado para o estudo funcional da neuropatia diabética. Os parâmetros obtidos fornecem subsídios para testes com as terapias convencionais, as cirúrgicas e as de suplementação no tratamento da neuropatia diabética motora distal.

SUMMARY

10. SUMMARY

Distal motor neuropathy is one of the most common complications of diabetes mellitus, and its prevalence can be considered as high as 100 percent if patients with abnormalities of nerve conduction without accompanying signs or symptoms are included. In this context, the present study was undertaken to obtain information concerning the peripheral polyneuropathies in alloxan-induced diabetic animals. Experiments were carried out on 50 untreated diabetic control (DG) Wistar male rats, and 50 age-matched nondiabetic controls (NDG). Electrophysiological assessments were obtained after 1, 3, 6, 9, and 12 months of follow-up, respectively, in the five subgroups with 5 animals each. Analysis of the recorded response from the right sciatic and caudal nerves showed: (i) diminished amplitude and increased temporal dispersion of the compound muscle action potentials (CMAPs) in the DG; (ii) nerve conduction velocity (NCV) lower ($p < 0.05$) in the DG, with statistically significant difference in NCV of the caudal nerve at different time intervals; (iii) distal latency (DLAT) higher ($p < 0.05$) in the DG, with statistically significant difference in DLAT of the caudal nerve among the several diabetic subgroups. These results demonstrate that the experimental model proposed can be used for a functional study of diabetic neuropathy. The parameters obtained supply assistance for tests with conventional therapies, with surgeries and those with supplementation in treatment of distal motor diabetic neuropathy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALLEN, R.D.M., AL-HARBI, I.S., MORRIS, J.G.L., CLOUSTON, P.D., O'CONNELL, P.J., CHAPMAN, J.R., NANKIVELL, B.J. Diabetic neuropathy after pancreas transplation: determinants of recovery. **Clin. Transplant.**, v.63, p.830-8, 1997.

ASSUNÇÃO, M.C.F., SANTOS, I.S., GIGANTE, D.P. Diabetes mellitus at the primary health care level in Southern Brazil: structure, course of action and outcome. **Rev. Saúde públ.**, v.35, p.88-95, 2001.

BANSAL, R., AHMAD, N., KIDWAI, J.R. Alloxan-glucose interaction: effect on incorporation of ¹⁴C-leucine into pancreatic islets of rat. **Acta Diabetol Lat.**, v.17, p.135-43, 1980.

BELL JR., R.H., HYE, R.J. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. **J. Surg. Res.**, v.35, p.433-60, 1983.

BESTETTI, G., ROSSI, G.L., ZEMP, C. Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. **Acta Neuropathol.**, v.54, p.129-34, 1981.

BONDY, P.K. Distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono. In: BEESON, P.B., Mcdermott, w. (Eds). **Tratado de medicina**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973, v.2, p.1627-43.

*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2001. 240p.

- BOSTOCK, H. Impulse propagation in experimental neuropathy. In: DYCK, P.J. (Ed). **Peripheral neuropathy**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. Cap.5, p.109-20.
- BOULTON, A.J.M., VINIK, A.I., AREZZO, J.C., BRIL, V., FELDMAN, E.L., FREEMAN, R., MALIK, R.A., MASER, R.E., SOSENKO, J.M., ZIEGLER, D. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v.28, p. 956-62, 2005.
- BOULTON, A.J.M., MALIK, R.A., AREZZO, J.C., SOSENKO, J.M. Diabetic somatic neuropathies. **Diabetes Care**, v.27, p.1458-86, 2004.
- BOYLAN, J.M., BRAUTIGAN, D.L., MADDEN, J., RAVEN, T., ELLIS, L., GRUPPUSO, P.A. Differential regulation of multiple hepatic protein tyrosine phosphatases in alloxan diabetic rats. **J. Clin. Invest.**, v.90, p.174-9, 1992.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Centro de documentação do Ministério da Saúde. **Doenças crônico-degenerativas: evolução e tendências atuais**. Brasília, 1988.
- BREIM, L.C. **Estudo comparativo entre o transplante total de pâncreas, transplante de ilhotas de Langerhans, e o tratamento convencional com insulina no controle das manifestações clínicas do diabetes aloxânico no rato**. Botucatu, 1990. 127p. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

BROWN, M.J., MARTIN, J.R., ASBURY, A.K. Painful diabetic neuropathy: a morphometric study. **Arch. Neurol.**, v.33, p.164-71, 1976.

BROWN, M.J., SUMNER, A.J., GREENE, D.A., DIAMOND, S.M., ASBURY, A.K. Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. **Ann. Neurol.**, v.8, p.168-78, 1980.

CAMERON, N.E., TUCK, Z., McCABE, L., COTTER, M.A. Effects of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. **Diabetologia**, v.44, p.1161-9, 2001.

CASELLINI, C.M., VINIK, A.I. Recent advances in the treatment of diabetic neuropathy. **Curr. Opin. Endocrinol Diabetes**, v.13, p.260-6, 2006.

CAVELLERO, C., MOSCA, L. Mitotic activity in the pancreatic islets of the rat under pituitary growth hormone and adrenocortitropic hormone treatment. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.66, p.147-51, 1953.

CLEMENTS JR., R.S., STOCKARD, C.R. Abnormal sciatic nerve myo-inositol metabolism in the streptozotocin-diabetic rat: effect of insulin treatment. **Diabetes**, v.29, p.227-35, 1980.

COPPEY, L.J., GELLETT, J.S., DAVIDSON, E.P., DUNLAP, J.A., LUND, D.D., YOREK, M.A. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. **Diabetes**, v.50, p.1927-37, 2001.

- COSTA, A.A., ALMEIDA NETO, J.S. **Manual de diabetes**: educação, alimentação, medicamentos e atividades físicas. 4.ed. São Paulo: Savier, 2004. 204p.
- DeFRONZO, R.A., FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v.14, p.173-94, 1991.
- DICK, P.J., KARNES, J., O'BRIEN, P.C. Diagnosis, staging and classification of diabetic neuropathy and associations with other complications. In: DICK, P.J., THOMAS, P.K., ASBURY, A.K. (Eds). **Diabetic neuropathy**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1987. p.36-44.
- DUNN, J.S., SHEEHAN, H.L., McLETCHIE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, v.1, p.484-7, 1943.
- EIZIRIK, D.L. Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic β -cell injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.91, p.9253-6, 1994.
- FALCK, B., STALBERG, E. Motor nerve conduction studies: measurement principles and interpretation of findings. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v.12, p.254-79, 1995.
- FUKUMA, M., CARPENTIER, J.-L., ORCI, L., GREENE, D.A., WINEGRAD, A.I. An alteration in internodal myelin membrane structure in large sciatic nerve fibres in rats with acute streptozotocin diabetes and impaired nerve conduction velocity. **Diabetologia**, v.15, p.65-72, 1978.

- GRAZIANO, R.M., WAJCHENBERG, B.L., SILVA, V.P. Retinopatia diabética. In: WAJCHENBERG, B.L., (Ed). **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1992. Cap16, p.739-58.
- GRENNE, D.A., JESUS Jr., P.V., WINEGRAD, A.I. Effect of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. **J. clin. Invest.**, v.55, p.1326-36, 1975.
- GRUPPUSO, P.A., BOYLAN, J.M., POSNER, B.I., FAURE, R., BRAUTIGAN, D.L. Hepatic protein phosphotyrosine phosphatase. Dephosphorylation of insulin receptor and epidermal growth factor receptors in normal and alloxan diabetic rats. **J. Clin. Invest.**, v.85, p.1754-60, 1990.
- HALAR, E.M., GRAF, R.J., HALTER, J.B., BROZOVICH, F.V., SOINE, T.L. Diabetic neuropathy: a clinical, laboratory and electrodiagnostic study. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v.63, p.298-303, 1982
- HENRY, R.J., CANNON, D.C., WINKELMAN, J. **Clinical chemistry: principles and techniques**. 2 ed. New York: Harper& Row Publishers, 1974. 1288.
- HETHERINGTON, A.W., RANSON, S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.**, v.78, p.149-53, 1940.
- HILBURN, J.W. General principles and use of electrodiagnostic studies in carpal and cubital tunnel syndromes: with special attention to pitfalls and interpretation. **Hand Clinics**, v.12, p.205-21, 1996.

- HIRATA, Y., OKADA, K. Relation of Na⁺, K⁺-ATPase to delayed motor nerve conduction velocity; effect of aldose reductase inhibitor, ADN-138, on Na⁺, K⁺-ATPase activity. **Metabolism.**, v.39, p.563-7, 1990.
- JAKOBSEN, J. Axonal dwindling in early experimental diabetes: a study of isolated nerve fibres. **Diabetologia**, v.12, p.547-53, 1976.
- KAHN, B.B. Glucose transport: pivotal step in insulin action. **Diabetes**, v.45, p.1644-54, 1996.
- KARSIDAG, S., MORALI, S., SARGIN, M., SALMAN, K., KARSIDAG, K., US, O. The electrophysiological findings of subclinical neuropathy in patients with recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v.67, p.211-9, 2005.
- KATSUMATA, K. Potentiating effects of combined usage of three sulfonylurea drugs on the occurrence of alloxan diabetes in rats. **Horm. Metab. Res.**, v.25, p.125-6, 1993.
- KATSUMATA, K., KATSUMATA JR., K., KATSUMATA, Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. **Horm. Metab. Res.**, v.24, p.508-10, 1992.
- KENNEDY, W.R., NAVARRO, X., GOETZ, F.C., SUTHERLAND, D.E.R., NAJARIAN, J.S. Effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. **New Engl. J. Med.**, v.322, p.1031-7, 1990.

- KIM, H.R., RHO, H.W., PARK, B.H., PARK, J.W., KIM, J.S., KIM, U.H., CHUNG, M.Y. Role of Ca in alloxan-induced pancreatic β -cell damage. **Biochim. Biophys Acta**, v.1227, p.87-91, 1994.
- KIMURA, J Principles and pitfalls of nerve conduction studies. **Ann. Neurol.**, v.16, p.415-29, 1984.
- KINCAID, J.C., BRASHEAR, A., MARKAND, O.N. The influence of the reference electrode on CMAP configuration. **Muscle Nerve**, v.16, p.392-6, 1993.
- KLIBER, A., SZKUDELSKI, T., CHICHOŁOWSKA, J. Alloxan stimulation and subsequent inhibition of insulin release from in situ perfused rat pancreas. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.47, p.321-8, 1996.
- KRIZ, J., PADJEN, A.L. Intra-axonal recording from large sensory myelinated axons: demonstration of impaired membrane conductances in early experimental diabetes. **Diabetologia**, v.46, p.213-21, 2003.
- KRÓLEWSKI, A.S., WARRAM, J.H. Epidemiology of diabetes mellitus. In: MARBLE, A., KRALL, L.P., BRADLEY, R.F. *et al.* (Eds). **Joslin's diabetes mellitus**. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p.12-42.
- LANGER, B., AGUIAR, E.T., WOLOSKER, N. Complicações vasculares do diabetes. In: WAJCHENBERG, B.L., (Ed). **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1992. Cap16, p.787-97.

- LAZARUS, S.S., BENCOSME, S.A. Alterations of pancreas during cortisone diabetes in rabbits. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.89, p.114-9, 1955.
- LENZEN, S., MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its *n*-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochem. Pharmacol.**, v.42, p.1385-91, 1991.
- LENZEN, S., PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia.**, v.31, p.337-42, 1988.
- LERCO, M.M., MACEDO, C.S., SILVA, R.J., PINHEIRO, D.O., SPADELLA, C.T. The and slit number of podocyte diaphragm is decreased in experimental diabetic nephropathy. **Acta Cir. Bras.**, v.21, p.87-91, 2006.
- LeROITH, D. β -cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. **Amer. J. Med.**, v.113, p.3S-9S, 2002.
- LeROITH, D., FONSECA, V., VINIK, A.I. Metabolic memory in diabetes: focus on insulin. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v.21, p.85-90, 2005.
- LOW, P.A., NICKANDER, K.K. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. **Diabetes**, v.40, p.873-7, 1991.
- MALERBI, D.A., LAERCIO, J.F. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v.15, p.1509-16, 1992.

- MALONE, J.I., LOWITT, S., KORTHALS, J.K., SALEM, A., MIRANDA, C. The effect of hyperglycemia on nerve conduction and structure is age dependent. **Diabetes**, v.45, p. 209-15, 1996.
- MARSHALL, S.M., FLYVBJERG, A. Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. **BMJ**, v.333, p.475-80, 2006.
- McGARRY, J.D., DOBBINS, R.L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. **Diabetologia**, v.42, p.128-38, 1999.
- MEALEY, B.L. Impact of advances in diabetes care on dental treatment of the diabetic patient. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v.19, p.41-4, 46-8, 50 passim; quiz 60, 1998.
- MERING, J.V., MINKOWSKI, O. Diabetes mellitus nach pankreas x stirpation. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, v.26, p.371-87, 1889.
- MIYOSHI, T., GOTO, I. Serial *in vivo* determinations of nerve conduction velocity in rat tails: physiology and pathological changes. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, v.35, p. 125-31, 1973.
- MORDES, J.P., ROSSINI, A.A., Animal model of diabetes mellitus. In: MARBLE, A., KRALL, L.P., BRADLEY, R.F., CHRISTLIEB, A.R., SOELDNER, J.S. (Eds) **Joslin's diabetes mellitus**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p.110-37.
- MORRIS, H.F., OCHI, S., WINKLER, S. Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months. **Ann. Periodont.**, v.5, p.157-65, 2000.

NAKAE, M., KAMIYA, H., NARUSE, K., HORIO, N., ITO, Y., MIZUBAYASHI, Y., HAMADA, Y., NAKASHIMA, E., AKIYAMA, N., KOBAYASHI, Y., WATARAI, A., KIMURA, N., HORIGUCHI, M., TABATA, Y., OISO, Y., NAKAMURA, J. Effects of basic fibroblast growth factor on experimental diabetic neuropathy in rats. **Diabetes**, v.55. p.1470-7, 2006.

NATHAN, D.M. Initial management of glycemia in type 2 diabetes mellitus. **New Engl. J. Med.**, v.347, p.1342-9, 2002.

NATIONAL DIABETES DATA GROUP. **Diabetes in America**: diabetes data compiled 1984. United States, U.S. Department of Health and Human Services, 1985. /NIH Publication N. 85-1468/

NERUP, J., MANDRUP-POULSEN, T., HELQVIST, S., ANDERSEN, H.U., POCIOT, E., REIMERS, J.I., CUARTERO, B.G., KARLSEN, A.E., BJERRE, U., LORENZEN, T. On the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v.37, p.82S-89S, 1994. Supplement.

ORLOFF, M.J., GREENLEAF, G., GIRARD, B. Reversal of diabetic somatic neuropathy by whole-pancreas transplantation. **Surg.**, v.108, p.179-90, 1990.

PAIVA, E.V.O. **Avaliação de parâmetros de cicatrização em ratos normais e diabéticos**: estudo clínica, laboratorial, biomecânico e histopatológico do intestino delgado e intestino grosso. Botucatu, 2001. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

- PASTORE, C., IZURA, V., GEIJO-BARRIENTOS, E., DOMINGUEZ, J.R. A comparison of electrophysiological tests for the early diagnosis of diabetic neuropathy. **Muscle Nerve**, v.22, p.1667-73, 1999.
- PESTALOZZI, M.S.C. Nefropatia diabética. In: WAJCHENBERG, B.L., (Ed). **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1992. Cap16, p.778-87.
- PRATLEY, R.E., WEYER, C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.44, p.929-45, 2001.
- RAKIETEN, N., RAKIETEN, M.L., NADKARNI, M.V. Studies in the diabetogenic action of estreptozotocin. **Cancer Chemother. Res.**, v.29, p.91-4, 1963.
- REIS, A.F., VELHO, G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. **Arch. bras. Endocr.**, v.46, p.426-32, 2002.
- ROTH, J., KOMMINOTH, P., KLÖPPEL, G., HEITZ, P.U. Diabetes and endocrine pancreas. In: DAMJANOV, I; LINDER, J. eds. **Anderson's pathology**. 10 ed. St. Louis, Mosby, 1996. Cap.64, p.2042-70.
- RUTKOVE, S.B. Effects of temperature on neuromuscular electrophysiology. **Muscle Nerve**, v.24, p.867-82, 2001.
- SAID, G., SLAMA, G., SELVA, J. Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre type diabetic polyneuropathy: a clinical and pathological study. **Brain**, v.106, p.791-807, 1983.

SARAIVA, S. Neuropatia diabética. In: WAJCHENBERG, B.L., ed. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo, Livraria Roca Ltda, 1992. Cap16, p.758-78.

SCHELLINI, S.A. **Retinopatia diabética experimental: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados**. Botucatu, 1992. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

SCHMIDT, R.E., PLURAD, S.B., OLACK, B.J., SCHARP, D.W. The effect of pancreatic islet transplantation and insulin therapy on experimental diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes**, v.32, p.532-40, 1983.

SHEPHERD, P.R., KAHN, B.B. Glucose transporters and insulin action: implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **New Engl. J. Med.**, v.22, p.248-57, 1999.

SILVESTRE, J.A. **Hospitalizações SUS 1997**. Coordenadoria de Atenção à Saúde do Idoso. Ministério da Saúde, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2**. Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo, 2001

SPADELLA, C.T. **Avaliação funcional do transplante pancreato-duodenal no rato diabético: estudo clínico, laboratorial, anátomo-patológica e imunohistoquímico**. Botucatu, 1989. 221p. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

- SPADELLA, C.T., MACEDO, C.S., MACHADO, J.L., SCHELLINI, S.A., PADOVANNI, C.R. Comparative study among five different treatments on the clinical and laboratory changes in rats with alloxan-induced diabetes. **Acta Cir. Bras.**, v.20, p.46-54, 2005.
- SPADELLA, C.T., MACHADO, J.L., CARAMORI, C.A., GREGORIO, E.A. Successful islet transplantation does not prevent the development of neuropathy in alloxan-induced diabetic rats. **Transplant. Proc.**, v.34, p.1296-300, 2002.
- SPADELLA, C.T., MERCADANTE, M.C., SCHELLINI, S.A., MACHADO, J.L., OLIVEIRA, W.K., BACCHI, C.E. Effect of pancreas transplantation on the prevention of nephropathy in alloxan-induced rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1019-24, 1996.
- SPADELLA, C.T., SCHELLINI, S.A., CARAMORI, C.A., BACCHI, C.E. Relationship between endocrine function and digital image quantitation of the pancreatic-insulin, and glucagons positive cell masses in normal, alloxan-diabetic, and heterotopic pancreas transplantation rats. **Transplant. Proc.**, v.32, p.2820-23, 2000.
- SPADELLA, C.T.; SCHELLINI, S.A.; BACCHI, C.E. Pancreas transplantation versus islet transplantation versus insulin therapy in the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. **Transplant. Proceed.**, v.30, p.327-9, 1998.
- STALBERG, E., FALK, B. Clinical motor nerve conduction studies. **Methods in Clinical Neurophysiology.**, v.4, p.61-80, 1993.

STEVENS, M.J., LI, F., DREL, V.R., ABATAN, O.I., KIM, H., BURNETT, D., LARKIN, D., OBROSOVA, I.G. Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2006 (“epub ahead of print”).

SZKUDELSKI, T, KANDULSKA, K., OKULICZ, M. Alloxan in vivo does not exert deleterious effects on pancreatic β cells. **Physiol. Res.**, v.47, p.343-6, 1998.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v.50, p.536-46, 2001.

TESFAYE, S., CHATURVEDI, N., EATON, S.E.M., WARD, J.D., MANES, C., IONESCU-TIRGOVISTE, C., WITTE, D.R., FULLER, J.H. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. **N. Engl. J. Med.**, v.352, p.341-50, 2005.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS RESEARCH GROUP. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, V.287, P.2563-69, 2002.

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. J. Med.**, v.329, p.977-86, 1993.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.25, p.S5-S20, 2002. Supplement.

- THOMAS, P.K., BERTHOLD, C.-H.; OCHOA, J. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In: DYCK, P.J. (Ed). **Peripheral neuropathy**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. Cap.3, p.28-91.
- THOMAS, P.K., TOMLINSON, D.R. Diabetic and hypoglycemic neuropathy. In: DYCK, P.J. (Ed). **Peripheral neuropathy**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. Cap.64, p.1219-50.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). **Lancet**, v.352, p.854-65, 1998.
- VERNILLO, A.T. Diabetes mellitus: relevance to dental treatment. **Oral Surg.**, v.91, p.263-70, 2001.
- ZIEGLER, D., CHRISTOPH G.H., NOUROOZ-ZADEH, J. Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. **Diabetes Care**, v.27, p.2178-83, 2004.
- WEAVER, D.C., McDANIEL, M.L., LACY, P.E. Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. **Endocrinology**, v.102, p.1847-55, 1978a.
- WEAVER, D.C., McDANIEL, M.L., NABER, S.P., BARRY, C.D., LACY, P.E. Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans. **Diabetes**, v.27, p.1205-14, 1978b.

YAGIHASHI, S., KUDO, K., NISHIHARA, M. Peripheral nerve structures of experimental diabetes rats and the effect of insulin treatment. **Tohoku J. exp. Med.**, v.127, p.35-44, 1979.

YOON, J.W., AUSTIN, M., ONODERA, T., NOTKINS, A.L. Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. **N. Engl. J. Med.**, v.300, p.1173-7, 1979.

ANEXOS

12. ANEXOS

Segue em anexo o certificado emitido pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - FONE E FAX (014) 6802-6143

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 292, sobre o projeto de pesquisa intitulado “**Neuropatia diabética experimental: estudo da velocidade de condução nervosa no nervo ciático de ratos diabéticos induzidos pela aloxana**”, de autoria de Sandra Alberti, orientada pelo **Prof. Dr. César Tadeu Spadella**, com a colaboração dos profissionais médicos: Profª Érika Veruska de Oliveira Paiva, Prof. José Lúcio Martins Machado, Prof. Mauro Masson Lercó, Prof. Luiz Antonio de Lima Resende e Profª Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, e ainda com a colaboração dos profissionais biólogos e biomédicos: Profª Maria Cecília S. Mercadante, Profª Sônia Maria Capeletti, Prof. Carlos Roberto Padovan e Prof. Sílvio Fernando G. Marques, e os técnicos de laboratório: Irene Spago e Maria Clara Ferreira Chaguri, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Botucatu, em 25 de novembro de 2002

Projeto de Pesquisa aprovado em 25/11/2002


Prof. Dr. Antero F. Macedo Miranda
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Compass Meridian Version 1.1.4		Office / Hospital:			
		Examiner:			
Patient Data:		ID:			
Last Name:	Ratos - TESE	Gender:	Male		
First Name:	Sandra _ Spadella	Insurance Co.:			
Date of Birth:		Service for:			
Application: NCV		24/06/2003 4:24 pm			
		1\1)2mV/Div, 2ms/Div 1 mA, Avg: 1, Rej: 0 2\1)2mV/Div, 2ms/Div 1 mA, Avg: 1, Rej: 0			
Trace	Latency	Amplitude	Duration	Area	
1	TKOF 2.1 ms	TKOF-NPK 4.28 mV	TKOF-NPH 1.4 ms	TKOF-NPH 3.11 mVms	
2	TKOF 3.2 ms	TKOF-NPK 4.08 mV	TKOF-NPH 1.4 ms	TKOF-NPH 3.07 mVms	
Segment	Seg Lat	Distance	NCV	SkinTemp	Reference Values
0 - 1	2.1 ms				
1 - 2	1.1 ms	65 mm	61 m/s		
Comments: <p style="text-align: center;">RATO NÃO DIABÉTICO- 1 MÊS- NERVO CIÁTICO</p>					

Compass Meridian Version 1.1.4	Office / Hospital: Examiner:																		
Patient Data: ID:																			
Last Name: Ratos - TESE	Gender: Male																		
First Name: Sandra _ Spadella	Insurance Co.:																		
Date of Birth:	Service for:																		
Application: NCV	24/06/2003 5:51 pm																		
1\1)2mV/Div, 2ms/Div 1 mA, Avg: 1, Rej: 0 2\1)2mV/Div, 2ms/Div 3 mA, Avg: 1, Rej: 0																			
1\left cauda 2\left cauda																			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Trace</th> <th>Latency</th> <th>Amplitude</th> <th>Duration</th> <th>Area</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>TKOF 3.0 ms</td> <td>TKOF-NPK 3.76 mV</td> <td>TKOF-NPH 1.8 ms</td> <td>TKOF-NPH 3.55 mVms</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>TKOF 7.1 ms</td> <td>TKOF-NPK 3.65 mV</td> <td>TKOF-NPH 2.1 ms</td> <td>TKOF-NPH 4.08 mVms</td> </tr> </tbody> </table>	Trace	Latency	Amplitude	Duration	Area	1	TKOF 3.0 ms	TKOF-NPK 3.76 mV	TKOF-NPH 1.8 ms	TKOF-NPH 3.55 mVms	2	TKOF 7.1 ms	TKOF-NPK 3.65 mV	TKOF-NPH 2.1 ms	TKOF-NPH 4.08 mVms				
Trace	Latency	Amplitude	Duration	Area															
1	TKOF 3.0 ms	TKOF-NPK 3.76 mV	TKOF-NPH 1.8 ms	TKOF-NPH 3.55 mVms															
2	TKOF 7.1 ms	TKOF-NPK 3.65 mV	TKOF-NPH 2.1 ms	TKOF-NPH 4.08 mVms															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Segment</th> <th>Seg Lat</th> <th>Distance</th> <th>NCV</th> <th>SkinTemp</th> <th>Reference Values</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">0 - 1</td> <td style="text-align: center;">3.0 ms</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 - 2</td> <td style="text-align: center;">4.0 ms</td> <td style="text-align: center;">100 mm</td> <td style="text-align: center;">24 m/s</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Segment	Seg Lat	Distance	NCV	SkinTemp	Reference Values	0 - 1	3.0 ms					1 - 2	4.0 ms	100 mm	24 m/s			
Segment	Seg Lat	Distance	NCV	SkinTemp	Reference Values														
0 - 1	3.0 ms																		
1 - 2	4.0 ms	100 mm	24 m/s																
Comments: <p style="text-align: center;">RATO NÃO DIABÉTICO- 1 MÊS- NERVO CAUDAL</p>																			

Compass Meridian Version 1.1.4	Office / Hospital: Examiner:									
Patient Data: ID:										
Last Name: Ratos - TESE Gender: Male										
First Name: Sandra _ Spadella Insurance Co.:										
Date of Birth: Service for:										
Application: NCV										
24/06/2003 3:25 pm										
1\1) 2mV/Div, 2ms/Div 2 mA, Avg: 1, Rej: 0 2\1) 1mV/Div, 2ms/Div 2 mA, Avg: 1, Rej: 0										
1\left caudal 2\left caudal										
Trace	Latency	Amplitude	Duration	Area						
1	TKOF 3.3 ms	TKOF-NPK 7.80 mV	TKOF-NPH 2.0 ms	TKOF-NPH 7.47 mVms						
2	TKOF 7.8 ms	TKOF-NPK 2.52 mV	TKOF-NPH 1.7 ms	TKOF-NPH 2.25 mVms						
Segment	Seg Lat	Distance	NCV	SkinTemp	Reference Values					
0 - 1	3.3 ms									
1 - 2	4.5 ms	100 mm	22 m/s							
Comments:										
RATO DIABÉTICO- 1 MÊS- NERVO CAUDAL										