



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MORFOLOGIA DOS
NEURÔNIOS DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL L5 DE RATOS MACHOS
ADULTOS DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado

Patrícia Severo do Nascimento

Porto Alegre
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MORFOLOGIA DOS
NEURÔNIOS DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL L5 DE RATOS MACHOS
ADULTOS DIABÉTICOS**

Patrícia Severo do Nascimento

Orientadora
Prof^ª. Dr^ª. Matilde Achaval
Co-Orientadora
Prof^ª. Dr^ª. Beatriz D'Agord Schaan

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre
2008

AGRADECIMENTOS

- À Professora Matilde Achaval Elena por toda a ajuda, carinho, amizade, e paciência.
- Ao grande amigo e colega Jocemar Ilha pelo apoio em todos os momentos.
- À Taís Malysz pelos material cedido e pela amiga que se tornou.
- À Simone Marcuzzo pela amizade, risos, brincadeiras e xingamentos nas horas que eu mais precisei.
- Ao Pedro Ivo Kalil-Gaspar, pelas conversas, sugestões e paciência.
- À Rafaela Trois de Araújo pela amizade.
- À Igna Raffaelli, pelo apoio e compreensão.
- Aos meus irmãos, sobrinhos e pais por toda a estrutura familiar.
- Ao meu anjinho, Vinícios Bataglin Severo do Nascimento, que em 7 anos me ensinou coisas que em 27 anos eu não fui capaz de aprender.
- À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências pela oportunidade.
- À CAPES pela bolsa de estudo.

OBRIGADA!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico em esteira sobre a morfologia dos neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) L5 de ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Ratos machos foram divididos em 4 grupos: grupo controle (C; n = 5; ratos não-diabéticos), controle treinado (TC; n = 5; ratos não-diabéticos que realizaram exercício físico), diabético (D; n = 5; ratos diabéticos que não realizaram exercício físico) e diabético treinado (TD; n = 5; ratos não-diabéticos que realizaram treinamento físico). O treinamento em esteira foi realizado a partir de um protocolo de treinamento para ratos diabéticos, o qual durou 10 semanas (5 dias/semana, duas vezes/dia). A glicemia foi avaliada a cada duas semanas. Então, os animais foram sacrificados e o GRD L5 foi removido. A análise histológica e morfométrica consistiu de uma avaliação dos volumes nucleares e dos somas das células B e A. Os dados da glicemia foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, enquanto que os dados dos volumes nucleares e dos somas das células B e A foram analisados por ANOVA de duas vias, com teste *post-hoc* de Tukey. Os resultados mostraram que os ratos diabéticos, treinados e não-treinados apresentaram valores glicêmicos aumentados quando comparados aos ratos não-diabéticos. O diabetes reduziu o volume do núcleo e do soma das células B e A. No volume nuclear das células A do GRD houve uma interação entre diabetes e exercício físico, e o teste *post-hoc* mostrou que os ratos diabéticos tiveram o volume nuclear menor que os ratos controles ($3630,68 \pm 240,36$; $2796,24 \pm 508,17$; $2269,36 \pm 221,97$; $2915,84 \pm 209,67 \mu\text{m}^3$ para grupo controle, controle treinado, diabético, e diabético treinado respectivamente, $P = 0.03$). O exercício aumentou o volume nuclear das células A dos ratos diabéticos. Em conclusão, diabetes causou alterações patológicas nas células do GRD, e algumas das quais foram modificadas pelo exercício físico, como evidenciado pela melhora dos padrões morfológicos das células do GRD encontradas no presente

estudo. Além disso, o exercício físico foi capaz de aumentar o volume nuclear das células A dos ratos diabéticos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistema somatossensorial	2
1.2. Gânglio da raiz dorsal.....	7
1.3. Diabetes	11
1.4. Modelos experimentais de indução do diabetes	15
1.5. Exercício físico	17
2. HIPÓTESE DE TRABALHO	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MÉTODOS E RESULTADOS.....	21
4.1. Artigo: <i>Improvement in morphological and morphometric aspects of L5 dorsal root ganglion neurons of diabetic rats in response to treadmill training</i>	21
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	Produtos finais da glicação avançada
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
GLUT-4.....	Transportadores de glicose do tipo 4
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GS	Glicogênio sintase
GSK-3	Glicogênio sintase cinase-3
IGF-I	Fator de Crescimento do tipo insulina-I
IRS-1	Substrato-1 do receptor da insulina
SNC.....	Sistema nervoso central
NGF.....	Fator de crescimento nervoso
NVPL	Núcleo ventral posterior lateral
NVPM	Núcleo ventral posterior medial
PI3-K.....	Fosfoinosítídeo-3 cinase
PKC.....	Proteína cinase C
PIP-2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP-3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
STZ	Estreptozotocina

ARTIGO

BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bv.....	Blood vessel

C.....	Control rats
CGRP	Calcitonin gene related peptide
D.....	Diabetic rats
DRG	Dorsal root ganglia
IGF-I	Insulin like growth factor-I
IGF-II	Insulin like growth factor-II
MET	Maximal exercise test
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NGF.....	Nerve growth factor
nuc.....	Nucleus
nf	Nerve fibre
PB.....	Phosphate buffer
sc	Satellite cell
STZ	Streptozotocin
TC	Non-diabetic rats submitted to treadmill training
TD	Diabetic rats submitted to treadmill training
VEGF	Vascular endothelial growth factor

LISTA DE TABELAS**Artigo**

Table 1. Glycemic values of diabetic and non-diabetic rats.....	40
Table 2. Average volumes of B and A cell somata and nuclei.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da seção transversal da medula espinal.....	4
Figura 2: Desenho esquemático das vias somatossensoriais.....	6
Figura 3: Fotomicrografia do GRD.....	7
Figura 4: Desenho esquemático de Santiago Ramón y Cajal demonstrando os tipos de glomérulos dos neurônios do GRD.....	8
Figura 5: Imagem digitalizada do GRD.....	9
Figura 6: Fotomicrografia eletrônica digitalizada de célula do GRD.....	10
Figura 7: Desenho esquemático representando os mecanismos de ação da insulina na expressão gênica.....	13
Figura 8: Desenho esquemático mostrando as ações da insulina sobre o transporte de glicose e síntese de glicogênio.....	14
Figura 9: Desenho esquemático das ações da STZ nas células β -pancreáticas.....	16

Artigo

Figure 1. Digitalized images of transverse-semithin sections (1 μ m) obtained from L5 DRG.

1. INTRODUÇÃO

Toda informação somatossensorial é conduzida até o sistema nervoso central pelos neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD), esses neurônios têm a capacidade de responder seletivamente a tipos específicos de estímulos (calor, frio, pressão, dor) devido a especializações morfológicas e moleculares dos seus terminais nervosos (KANDEL et al., 2003). Devido à localização desses neurônios no GRD, onde há ausência de uma barreira sangue-nervo bem definida como no sistema nervoso central (SNC), estas células tornam-se mais susceptíveis às variações plasmáticas de glicose, a qual quando em níveis elevados causa danos celulares (ALLEN et al., 1994).

O diabetes do tipo 1 é caracterizado pela destruição de células β -pancreáticas resultando na não-produção de insulina, ocorrendo hiperglicemia crônica, a qual causa aumento do fluxo na via do poli-ol, aumento da formação de produtos finais da glicação avançada (AGE; *advanced glycation end-products*), ativação das isoformas da proteína cinase C (PKC; *protein kinase C*) e aumento do fluxo da via da hexosaminase (BROWNLEE, 2001), causando danos celulares e complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia (BROWNLEE, 2005).

A neuropatia diabética é caracterizada pela perda progressiva de fibras nervosas de nervos periféricos e a neuropatia sensorio-motora é a mais comum das complicações de longo tempo do diabetes, afetando mais de 50% dos pacientes que apresentam diabetes (BOULTON et al., 2004).

Além da lesão nas fibras nervosas, o diabetes causa alterações fisiopatológicas nos somas dos neurônios do GRD, tais como redução do volume celular (SIDENIUS et al., 1980; NOORAFSHAN et al., 2001), apoptose dessas células (SCHMEICHEL et al., 2003), presença de lipofuscina, um indicativo de envelhecimento precoce; déficit de fatores de crescimento

(HELLWEG et al., 1994; ISHII, 1995), além de haver uma redução no fluxo sanguíneo no GRD, causando hipóxia, contribuindo para a lesão dos neurônios do GRD (SASAKI et al., 1997).

Embora estudos em humanos e em animais tenham demonstrado efeitos benéficos da atividade física sobre a frequência cardíaca (HOWARTH et al., 2005), disfunção autonômica e do miocárdio (DE ANGELIS et al., 2000; TAKEDA et al., 1988), transportadores musculares de glicose (RODNICK et al., 1992; SLENTZ et al., 1992), síntese de ácidos graxos livres (FIEBIG et al., 2001) e metabolismo do glicogênio (TAN et al., 1984), estes não avaliam a influência do exercício físico sobre a morfologia dos neurônios do GRD em indivíduos diabéticos.

1.1. Sistema somatossensorial

Os sistemas sensoriais são encarregados de recolher informações tanto do meio que nos rodeia quanto do interior do organismo e de transmiti-las ao SNC para seu processamento e análise. A informação do meio externo é utilizada para a regulação da função dos órgãos internos; manutenção da vigília e para o controle dos movimentos. Por sua vez, a informação que provém do interior do organismo (vísceras, vasos sanguíneos, músculos e articulações) é utilizada para a regulação da temperatura corporal, pressão arterial, frequência cardíaca, respiração, produção de movimentos reflexos, isto é, fundamentalmente está relacionada com a manutenção de parâmetros fisiológicos do organismo, ou seja, homeostase (PAZO, 2004).

O processamento sensorial de estímulos externos inicia-se pela ativação de uma população diversificada de receptores cutâneos e subcutâneos. Esses são classificados como mecanorreceptores, nociceptores e termorreceptores. Quatro tipos de receptores encapsulados transmitem ao SNC informações relacionadas ao tato, pressão e vibração, são os corpúsculos de

Meissner, os corpúsculos de Paccini, os discos de Merkel e os corpúsculos de Ruffini, que são inervados por axônios mielinizados, relativamente largos, classificados como fibras A β , os quais possuem seus grandes corpos celulares localizados no GRD. Essas fibras apresentam uma velocidade de condução entre 30 e 70 m/s. Além disso, os fusos musculares e órgãos tendinosos de Golgi, os proprioceptores, enviam informações acerca de forças mecânicas originadas no próprio corpo, como a posição dos membros no espaço. Esses receptores são inervados por fibras do tipo Ia e II, cuja velocidade de condução é de cerca de 70 e 120 m/s (PURVES et al., 2005; PARENT, 1996.).

Especializações como nociceptores e termocetores são denominadas terminações nervosas livres, pois a região receptora é o próprio terminal axonal que se ramifica na derme e epiderme (PURVES et al., 2005). Essas fibras são classificadas como fibras A δ , pouco mielinizadas, e C, não-mielinizadas, as quais apresentam uma velocidade de condução de 20 e 2 m/s respectivamente, estão distribuídas por toda a pele e transduzem informações sobre dor, temperatura e tato grosseiro. Essas fibras apresentam corpos celulares pequenos, localizados no gânglio da raiz dorsal (discutido mais adiante; PARENT, 1996).

Uma vez que um estímulo mecânico tenha causado um potencial de ação em um receptor, a fibra nervosa do neurônio de primeira ordem, que traz a informação dos mecanocetores, ao entrar no corno dorsal da medula espinal, bifurca-se em ramos ascendentes e descendentes, os quais enviam ramos colaterais para um ou dois segmentos espinais. Alguns desses ramos penetram no corno dorsal da medula espinal e estabelecem sinapse com neurônios localizados principalmente nas lâminas III e IV de Rexed (Figura 1). Estas sinapses medeiam, principalmente, reflexos segmentais, tal como o reflexo miotático. No entanto, o principal ramo dos axônios que chegam à medula espinal ascende ipsilateralmente ao longo das colunas dorsais

da medula espinal até atingir o bulbo, onde estabelece contato com neurônios de segunda ordem dos núcleos grácil e cuneiforme. Os axônios dos núcleos da coluna dorsal projetam-se na porção dorsal de cada lado da parte inferior do tronco encefálico, onde formam o trato interno arqueado, que cruza a linha média, formando o lemnisco medial. Os axônios do lemnisco medial alcançam o núcleo ventral posterior lateral (NVPL) do tálamo, cujas células são os neurônios de terceira ordem do sistema coluna dorsal – lemnisco medial, os quais enviam as informações ao córtex sensorial, que por sua vez, integrará as informações (PURVES et al., 2005; KANDEL et al., 2003).

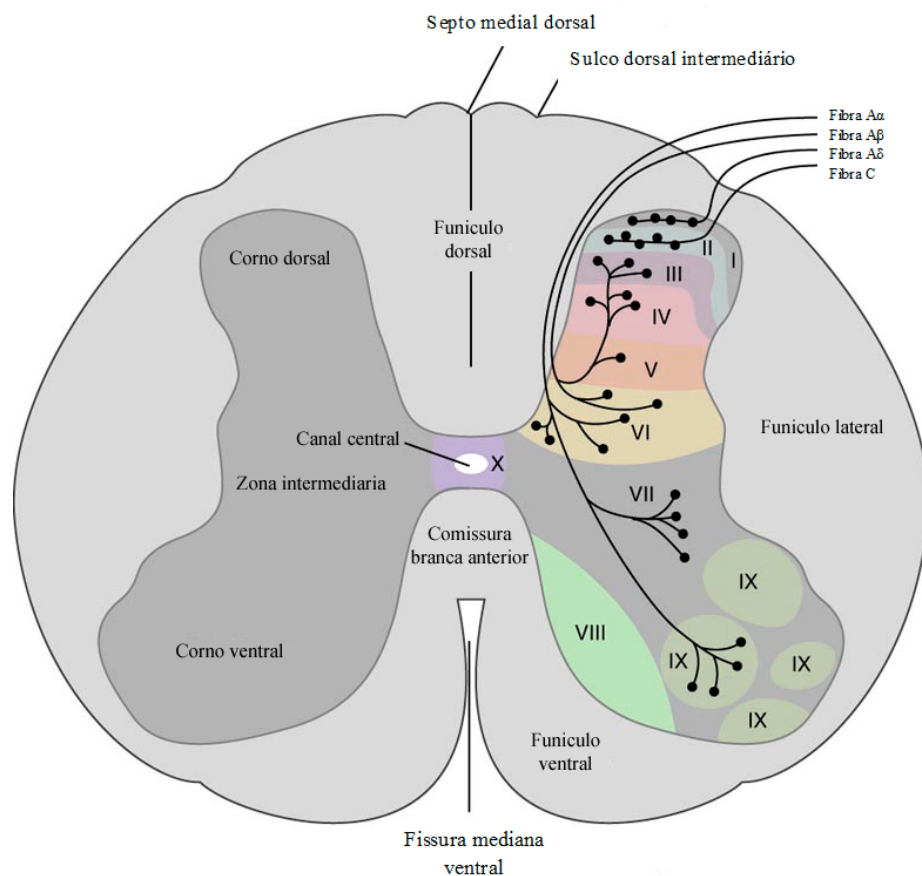


Figura 1: Desenho esquemático da seção transversal da medula espinal, mostrando as lâminas de Rexed nas quais os neurônios de primeira ordem fazem sinapse (adaptado de Squire et al., 2002).

Assim como os outros neurônios sensoriais nos gânglios da raiz dorsal, os axônios das células nervosas nociceptivas entram na medula espinal através das raízes dorsais. Ao atingirem o corno dorsal da medula espinal, os axônios se ramificam em colaterais ascendente e descendente, constituindo o trato de Lissauer, que interconecta diferentes segmentos medulares. Ao penetrarem na substância cinzenta as fibras A δ e C fazem sinapse com neurônios na lâmina I de Rexed (zona marginal) e lâmina II (substância gelatinosa). A informação da lâmina II de Rexed é transmitida a neurônios de projeção de segunda ordem nas lâminas IV, V e VI. Os axônios desses neurônios de segunda ordem nas lâminas IV – VI cruzam a linha média e ascendem até o tronco encefálico e o tálamo. Essas fibras, juntamente com os axônios dos neurônios de segunda ordem da lâmina I, formam o trato espinotalâmico, a principal via ascendente para informação sobre dor e temperatura. No tálamo, essas fibras fazem sinapse com neurônios do núcleo ventral posterior medial (NVPM) e NVPL. Neurônios no NVPM recebem informação nociceptiva da face, enquanto que os neurônios do NVPL recebem informações nociceptivas do resto do corpo. Então, a informação é transmitida ao córtex somatossensorial primário, o qual realizará o processamento da informação nociceptiva (Figura 2; PURVES et al., 2005; KANDEL et al., 2003).

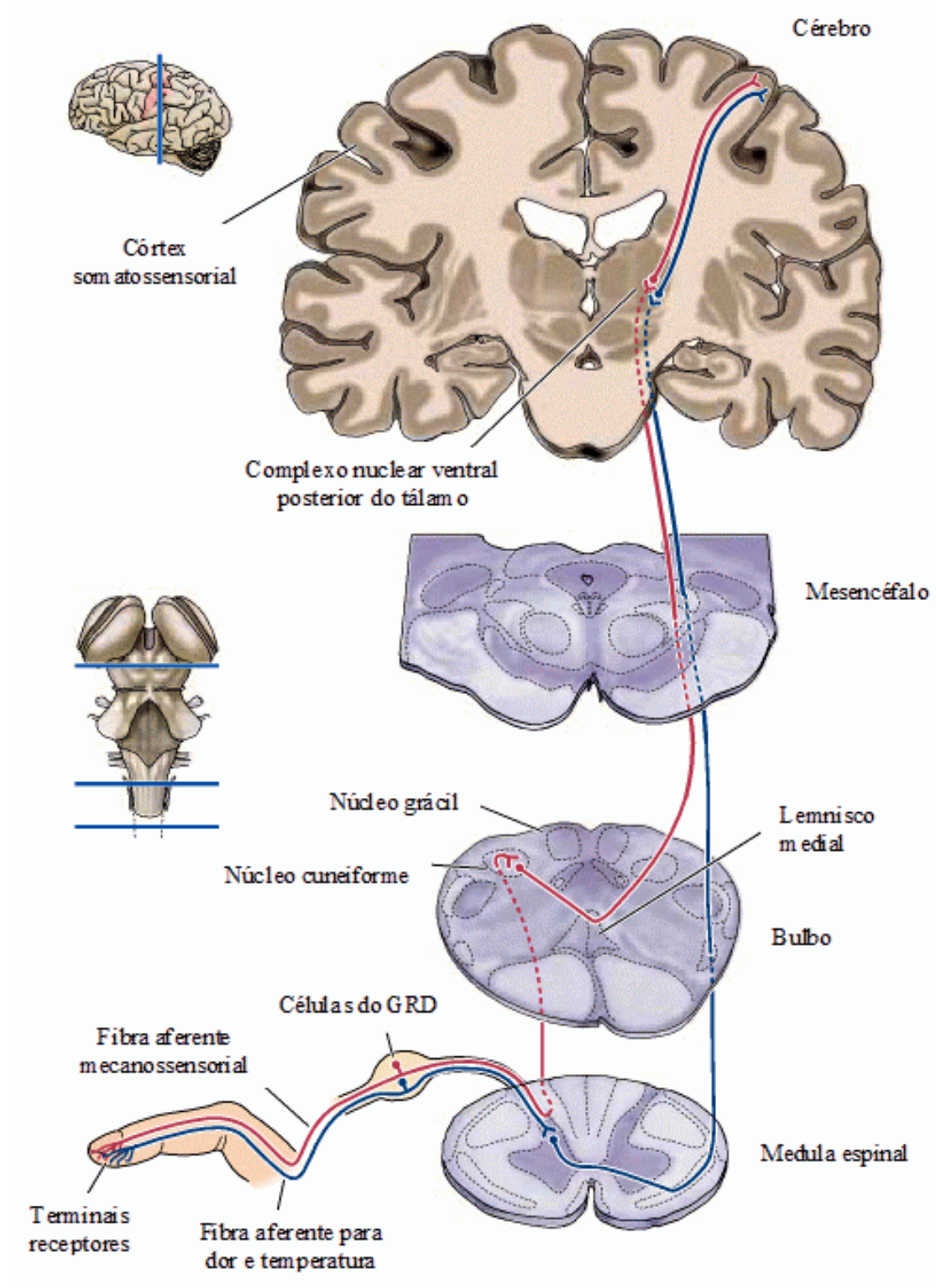


Figura 2: Desenho esquemático das vias somatossensoriais. Em azul via espinotalâmica, em vermelho, a via da coluna dorsal, lemnisco medial (modificado de Purves et al., 2005).

1.2. Gânglio da raiz dorsal

Denomina-se gânglio o acúmulo de corpos celulares nervosos localizados fora do SNC. Os gânglios das raízes dorsais dos nervos espinais contêm células satélites, vasos sanguíneos, células de Schwann e corpos dos neurônios sensitivos (PARENT, 1996). Estes se apresentam envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo que é contínua ao epineuro e perineuro dos nervos periféricos adjacentes. A cápsula emite trabéculas do tecido conjuntivo para o interior do gânglio e forma um estroma muito vascularizado que, junto com os feixes de fibras nervosas, divide os corpos das células nervosas em grupos de diferentes tamanhos (Figura 3; DEVOR, 1999).

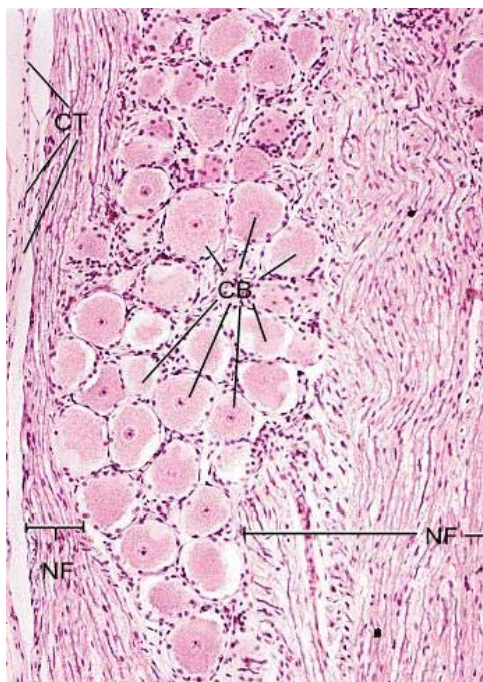


Figura 3: Fotomicrografia do GRD, mostrando corpos celulares (CB), tecido conjuntivo (CT) e fibras nervosas (NF). HxE, 160X (ROSS et al., 2006).¹

Cada célula ganglionar é envolta por uma camada de células achatadas, as células satélites, localizadas junto à superfície do neurônio. Sendo assim, neurônios do GRD são separados entre si por duas camadas de citoplasma das células satélites. A superfície de muitos

neurônios, particularmente os maiores, apresenta grande quantidade de interdigitações, ou projeções do citoplasma, que são envoltas por lamelas das células satélites. Essas projeções aumentam a área de superfície do neurônio (DEVOR, 1999). Além disso, uma lâmina externa separa a camada de células satélites do tecido conjuntivo circundante (GENESER, 2003).

Uma característica do GRD é a presença de capilares fenestrados, diferentemente do SNC, o qual apresenta capilares contínuos, caracterizando a barreira hemato-encefálica, a qual forma uma barreira para a difusão de moléculas grandes dos vasos para o espaço extracelular (ALLEN et al., 1994). Dessa forma, o envelope de células satélites ao redor dos neurônios desempenha uma função de barreira, protegendo os neurônios de substâncias circulantes (HANANI, 2005).

As células ganglionares, ou neurônios pseudounipolares apresentam um prolongamento em forma de T, cujo ramo central penetra no tronco encefálico ou no corno dorsal da medula espinal, enquanto o ramo periférico entra no nervo periférico e forma as terminações nervosas livres, ou inerva receptores sensoriais. Em alguns neurônios, o ramo inicial do axônio segue um curso convoluto, tortuoso ou “enrolado”, algumas vezes se espiralando ao redor do soma, o chamado glomérulo, aumentando a extensão do axônio inicial (Fig 4; DEVOR, 1999; PARENT, 1996).

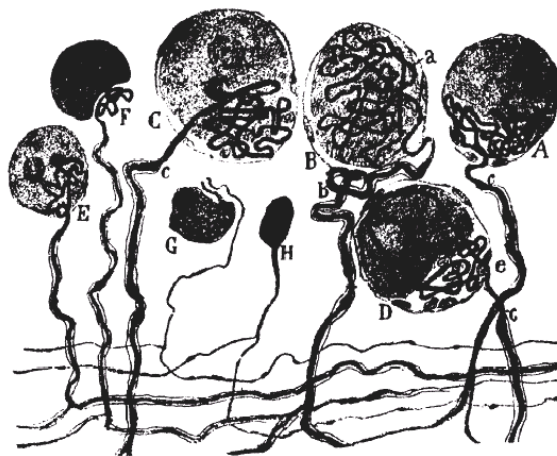


Figura 4: Desenho esquemático de Santiago Ramón y Cajal demonstrando os tipos de glomérulos dos neurônios do GRD (Cajal, 1995).

Os corpos celulares variam de tamanho (entre 15 e 100 μm de diâmetro), são arredondados com um núcleo redondo, grande e de localização central. Além disso, os corpos dos neurônios dos gânglios sensitivos não apresentam dendritos e também não recebem sinapses, motivo pelo qual o gânglio sensitivo é dito como um acúmulo de corpos de células nervosas com seus prolongamentos centrais e periféricos (GENESER, 2003; PARENT, 1996).

Sob a microscopia óptica, as células do GDR podem ser classificadas como células do tipo A e B. As células do tipo A possuem citoplasma claro, e a substância de Nissl é arranjada em ilhas. O núcleo da célula A é grande e claro e contém apenas um grande nucléolo localizado centralmente. Por sua vez, as células do tipo B são menores que as células A, e sob a microscopia de luz, essas células apresentam seu citoplasma escuro, o núcleo é claro e contém entre dois e três nucléolos (Figura 5; SCHMALBRUCH, 1987; TANDRUP, 1995).

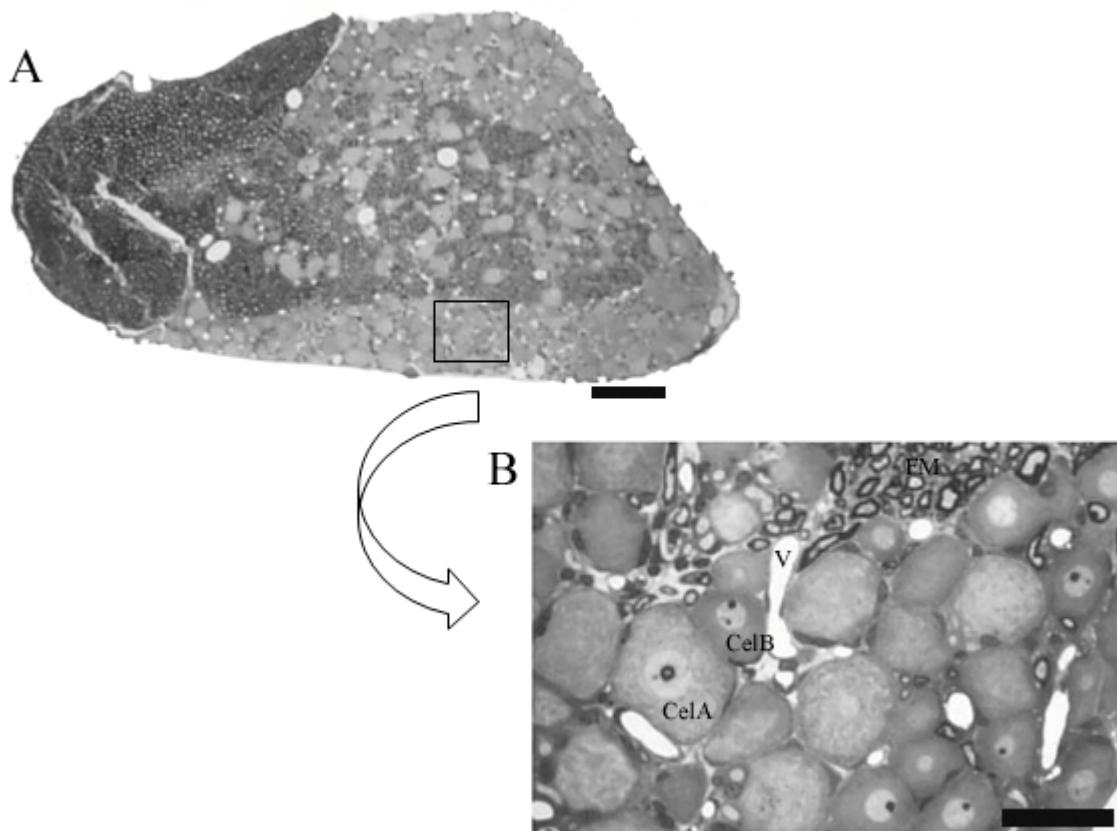


Figura 5: Imagem digitalizada do GRD (A). Detalhe de A em maior aumento (B), mostrando célula A (Cel A), célula B (Cel B), fibras mielínicas (FM) e vaso sanguíneo (V). Barras: 100 μm (A), 50 μm (B).

Ultra-estruturalmente, as células do GRD são subdivididas em seis subtipos, conforme o arranjo e organização tridimensional da substância de Nissl e aparelho de Golgi no citoplasma. As células do tipo 1A são grandes e claras, nas quais as substâncias de Nissl são separadas entre si por feixes de citoplasma que contém aparelhos de Golgi e mitocôndrias. Nas células do tipo 2A, a substância de Nissl assume distribuição similar, mas são mais amplamente separadas por feixes de citoplasma. As células do tipo 3A são as menores células classificadas como A, apresentam a substância de Nissl arranjada densamente e aparelhos de Golgi que formam um anel perinuclear. As células do tipo B são menores e apresentam organização concêntrica das organelas. No tipo 1B, corpos de Nissl são localizados na região periférica do citoplasma na forma de cisternas paralelas interrompidas por aparelhos de Golgi. O tipo celular 2B é caracterizado pela presença de aparelho de Golgi na forma de anel que separa o pericário em uma zona cortical composta principalmente de substância de Nissl e uma zona justanuclear contendo mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. As células do tipo C são as menores células do GRD e contém poucos e pobremente demarcados corpos de Nissl e um aparelho de Golgi justanuclear (Figura 6; RAMBOURG et al., 1983).

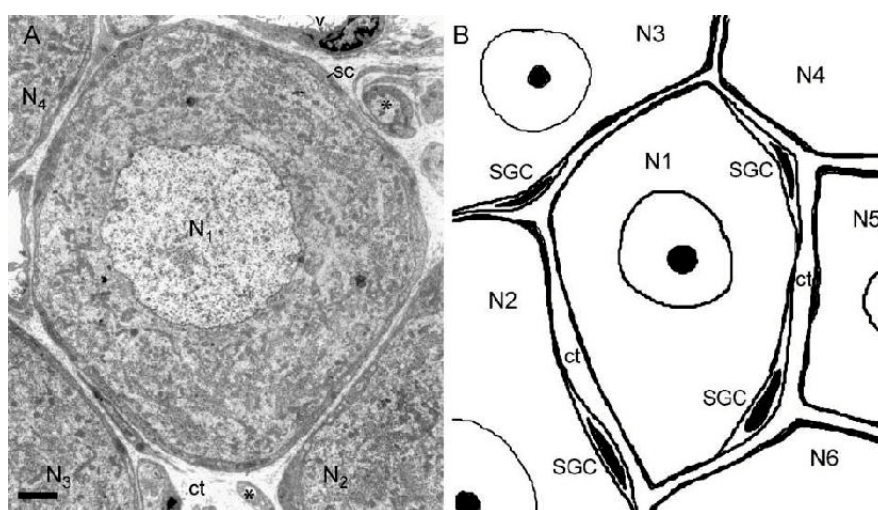


Figura 6: Fotomicrografia eletrônica digitalizada de célula do GRD (A), mostrando núcleo (N1), célula satélite (SC), tecido conjuntivo (ct). Desenho esquemático (B) de uma célula do GRD (N1) e suas relações com células adjacentes (N2, N3, N4, N5, N6). SGC: célula satélite; ct: tecido conjuntivo (HANANI, 2005).

1.3. Diabetes

Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*) no ano de 2000 cerca de 171 milhões de pessoas possuíam diabetes no mundo e se estima que no ano de 2030 esse número chegue a 366 milhões (*World Health Organization*, 2008). Nos Estados Unidos da América (EUA) no ano de 2005 a prevalência do diabetes foi de 20,8 milhões de pessoas, o que corresponde a 7% da população americana, dessas, 14,6 milhões de pessoas apresentavam diabetes diagnosticado, no entanto, cerca de 6,2 milhões de pessoas possuíam diabetes não-diagnosticado. A incidência do diabetes do tipo 1 entre pessoas menores de 20 anos é entre 1:400 e 1:600, cerca de 176.500 pessoas têm diabetes do tipo 1 nessa faixa etária. O custo anual com o diabetes no ano de 2002 nos EUA foi de 132 bilhões de dólares, desses, 92 bilhões foram gastos diretamente e 40 bilhões foram gastos indiretamente (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2005). No Brasil, o último censo nacional realizado foi entre 1986 e 1989, no qual foi constatada uma prevalência do diabetes de 7,6 % em pessoas entre 30 e 69 anos de idade.

O diabetes do tipo 1 é classificado como deficiência absoluta de insulina resultante da destruição das células β -pancreáticas. Os critérios para o diagnóstico do diabetes incluem: sintomas de diabetes e glicose plasmática casual maior ou igual a 200 mg/dL (casual é definido como em qualquer hora do dia sem considerar o tempo desde a última refeição), os sintomas clássicos incluem poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicável; ou glicose plasmática em jejum maior ou igual a 126 mg/dL (jejum é definido como ausência de ingesta calórica por pelo menos 8 h); ou durante o teste de tolerância à glicose, os níveis de glicose plasmática devem estar maior ou igual a 200 mg/dL (11,1 mmol/L), após 2 horas da ingesta de 75 gramas de glicose dissolvida em água (*American Diabetes Association*, 2007).

A sinalização pela insulina tem como objetivos a expressão gênica e a facilitação da entrada da glicose nos tecidos muscular e adiposo. O receptor da insulina, uma proteína tirosina-cinase específica, possui um domínio ligando-dependente na superfície extracelular da membrana plasmática e uma enzima ativa no lado citosólico, com os dois domínios conectados por um simples segmento transmembrana. O domínio extracelular do receptor possui duas subunidades α que são sítios de ligação para a insulina. Entretanto, seu domínio citosólico apresenta duas subunidades β que contém atividade tirosina-cinase, as quais, quando a insulina se liga às subunidades α , têm a capacidade de se autofosforilarem. Essa autofosforilação torna a enzima capaz de fosforilar resíduos tirosina de outras proteínas-alvo. Uma dessas proteínas-alvo é o substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1; *insulin receptor substrate-1*), o qual, uma vez fosforilado se torna ponto de nucleação para um complexo de proteínas que carregam a informação do receptor da insulina até os alvos-finais no citoplasma e núcleo, através de uma série de proteínas intermediárias. O resíduo P-Tyr do IRS-1 é ligado pelo domínio SH2 da proteína Grb2. Por sua vez, Grb2 se liga a Sos, a qual quando é ligada pela Grb2 catalisa a substituição da ligação de um GDP por GTP na proteína Ras, uma proteína da família das proteínas-G. Quando o GTP é ligado a Ras, essa pode ativar uma proteína cinase, Raf-1, a primeira de três proteínas cinases – Raf1, MEK e ERK, as quais formam uma cascata na qual cada proteína cinase ativa a próxima por fosforilação. Quando a proteína cinase ERK é ativa pela fosforilação ela medeia alguns dos efeitos biológicos da insulina, devido ao fato desta atingir o núcleo fosforilando proteínas tais como a Elk1, a qual modula a transcrição de cerca de 100 genes regulados pela insulina (Figura 7; NELSON et al., 2005).

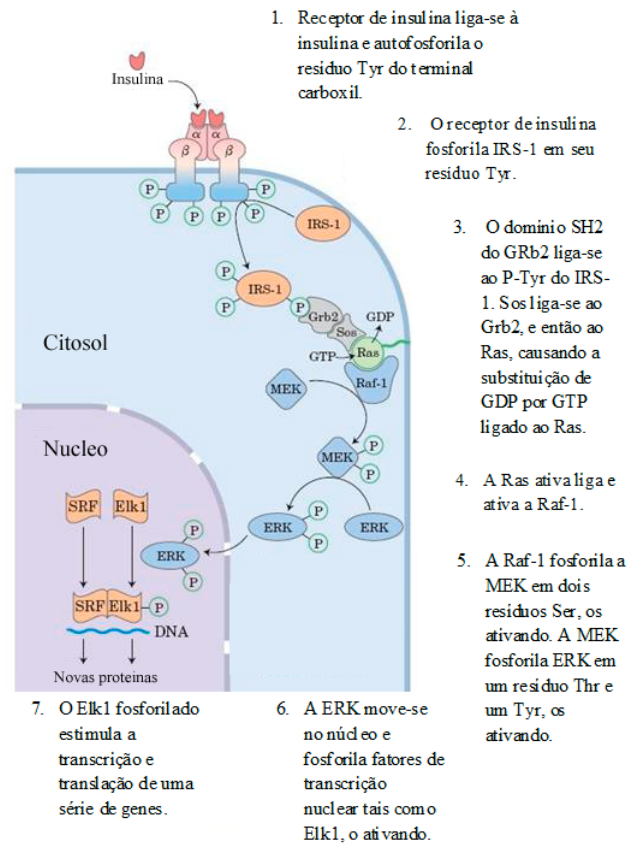


Figura 7: Desenho esquemático representando os mecanismos de ação da insulina na expressão gênica (modificado de NELSON et al., 2005).

Além disso, IRS-1 fosforila PI-3K (fosfoinositídeo 3-cinase), o qual converte o lipídeo de membrana PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) em PIP_3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). Quando se liga ao PIP_3 , a PKB (proteína cinase B) é fosforilada e ativa. Uma vez que PKB é ativa, ela causa a fosforilação da proteína GSK3 (glicogênio sintase cinase 3), inativando-a. A proteína GSK3 na sua forma não-fosforilada é ativa e causa a fosforilação da enzima glicogênio sintase (GS), que por sua vez, quando fosforilada é inativa. Portanto, a inativação da GSK3 pela fosforilação não pode converter a GS em sua forma inativa, permanecendo essa na forma ativa, contribuindo para a síntese de glicogênio a partir da glicose. Além disso, a PKB no músculo causa o movimento dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) de estoques vesiculares

internos em direção à membrana plasmática, estimulando a entrada de glicose na célula (Figura 8; NELSON et al., 2005).

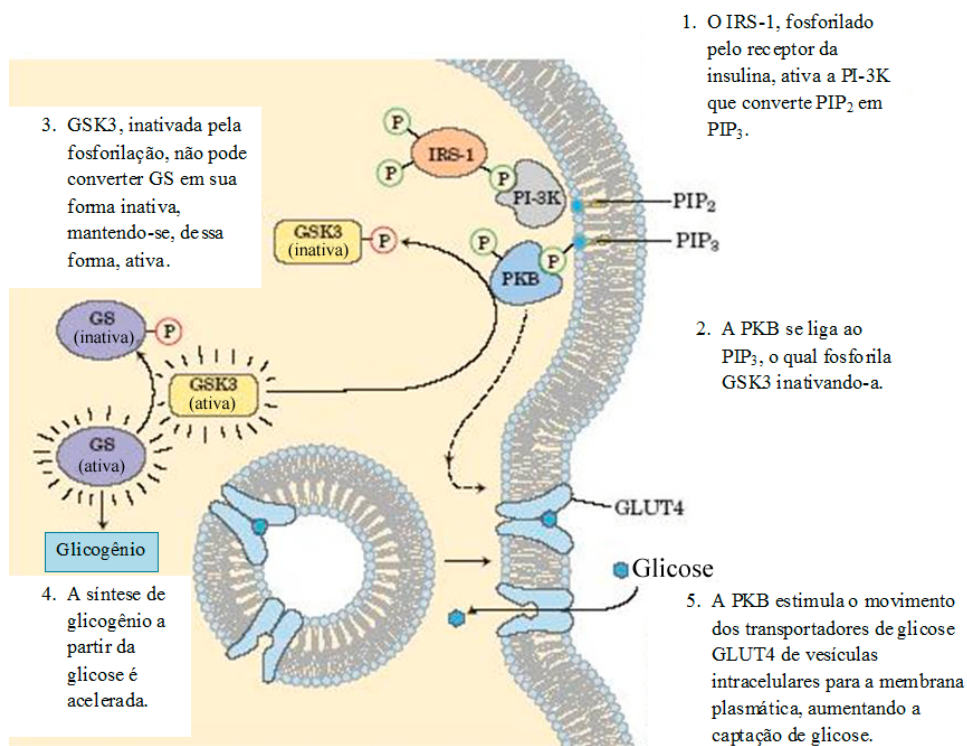


Figura 8: Desenho esquemático mostrando as ações da insulina sobre o transporte de glicose e síntese de glicogênio (modificado de Nelson et al., 2005).

Com a ausência da insulina, causada pela destruição das células β -pancreáticas, ocorre uma hiperglicemia crônica, sendo esta a principal causadora das complicações do diabetes, tais como retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética (BROWNLEE, 2005). Os danos celulares causados pela hiperglicemia são atribuídos a quatro principais fatores: aumento do fluxo na via do polioliol, aumento da formação AGE's, ativação das isoformas da PKC e aumento do fluxo da via da hexosaminase (BROWNLEE, 2001).

A neuropatia diabética é definida com exame neurológico anormal consistente com a presença de neuropatia periférica sensorio-motora e/ou condução nervosa anormal em pelo menos dois nervos periféricos (*The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*,

1993), e pode ser classificada como sensório-motora e vegetativa. A neuropatia sensorial pode ser ainda classificada como polineuropatia distal simétrica ou focal; a neuropatia motora pode ser identificada pelo músculo ou grupo muscular afetado, enquanto que a neuropatia vegetativa pode ser classificada conforme o sistema afetado (endócrino, genito-urinário, cardiovascular; ARING et al., 2005).

Além disso, a neuropatia é caracterizada pela perda progressiva de fibras nervosas de nervos periféricos e a neuropatia sensório-motora está entre as mais comuns das complicações de longo tempo do diabetes, afetando mais de 50% dos pacientes que apresentam diabetes (BOULTON et al., 2004). Os sintomas da neuropatia sensório-motora incluem dor em queimação, sensações de “choque” ou “facada”, parestesia, hiperestesia e dores profundas. O exame dos membros inferiores normalmente revela a perda da sensação de vibração, pressão, dor, temperatura e ausência de reflexos dos tornozelos, que são mediados por fibras de pequeno e grande calibres (BOULTON et al., 2005).

1.4. Modelos experimentais de indução do diabetes

Como modelo experimental para o estudo do diabetes do tipo 1 em animais têm-se utilizado a aplicação de drogas como estreptozotocina (STZ; KISHI et al., 2002) e aloxano (LINO et al., 2004).

A aplicação STZ, um antibiótico derivado do *Streptomyces acromogenes*, resulta em dano nas células β -pancreáticas devido ao estresse oxidativo (HOTTA et al., 1998), além de causar danos no DNA devido a metilação de guaninas, que culmina com a ativação da morte celular programada das células β -pancreáticas (Figura 9; MURATA et al., 1999).

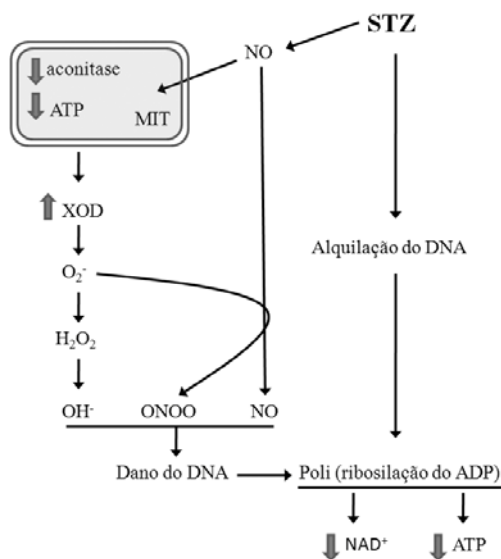


Figura 9: Desenho esquemático das ações da STZ nas células β -pancreáticas, a qual causa estresse oxidativo e dano no DNA. MIT: mitocôndria; XOD: xantina oxidase; O_2^- : superóxido; H_2O_2 peróxido de hidrogênio; OH^- : íon hidroxila; ONOO: peroxinitrito; NO: óxido nítrico (modificado de SZKUDELSKI, 2001).

A administração de uma única dose de STZ, em ratos, resulta na produção de diabetes insulina-dependente, com marcada hiperglicemia, semelhante ao diabetes do tipo 1 em humanos. A simplicidade desse modelo levou este a se tornar o modelo animal mais comum para o estudo do diabetes e suas complicações, inclusive a neuropatia periférica (KISHI et al., 2002; APFEL, 2006).

Estudos experimentais demonstraram que os neurônios do GRD de ratos diabéticos apresentam redução do volume (SIDENIUS et al., 1980; NOORAFSHAN et al., 2001), aumento da expressão de caspase-3 (SCHMEICHEL et al., 2003), apresentam grande quantidade de lipofuscina, um indicativo de envelhecimento precoce; além de haver uma redução no fluxo sanguíneo do GRD de 40%, o que causa hipóxia, contribuindo para a lesão dos neurônios do GRD (SASAKI et al., 1997). Além disso, há um déficit no transporte axonal retrógrado do fator de crescimento nervoso (NGF; *nerve growth factor*), importante para a manutenção da quantidade de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP; *calcitonin gene*

related peptide) dos neurônios do GRD (DONNERER et al., 1992), e este déficit é correlacionado com os níveis de glicose, isto é, quanto maior a glicemia, menor o transporte axonal de NGF (HELLWEG et al., 1994). Outro fator de crescimento importante para a manutenção dos neurônios do GRD é o fator de crescimento do tipo insulina-I (IGF-I; *insulin-like growth factor-I*). Este, por sua vez, apresenta expressão diminuída na presença do diabetes (ISHII, 1995), e as alterações morfológicas, como presença de vacúolos, grânulos apoptóticos e presença de caspase-3, no entanto, se tornam menos evidentes quando esses neurônios recebem infusões de IGF-I (RUSSELL et al., 1999).

1.5. Exercício físico

Em humanos, além do controle dos níveis glicêmicos, a auto-administração de insulina, e a educação do paciente sobre a dieta, a atividade física tem sido preconizada como uma das abordagens terapêuticas convencionais do diabetes do tipo 1 (*The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*, 1993)

A atividade física é definida como um movimento corporal produzido pela contração de músculos esqueléticos, que requer gasto energético maior que em repouso. Exercício físico é caracterizado como uma modalidade da atividade física, sendo este, planejado, estruturado e realizado de forma repetitiva com a finalidade da melhora de um ou mais componentes da aptidão física. Este tem sido utilizado com a finalidade de controlar a glicemia, auxiliar no controle do peso corporal e reduzir os riscos de doenças cardiovasculares (*Centers for Disease Control and Prevention*, 1996). Para isso o exercício físico deve ser realizado por pelo menos 150 min/semana, com atividade aeróbica de intensidade moderada (50-70% da frequência cardíaca

máxima) e/ou 90 min/semana de exercício aeróbico vigoroso (70% ou mais da frequência cardíaca máxima), devendo ser realizado 3 dias/semana, com intervalos de no máximo 2 dias sem exercício físico (*American Diabetes Association, 2007*).

Em ratos diabéticos, os efeitos da atividade física sobre a frequência cardíaca (HOWARTH et al, 2005), disfunção autonômica e do miocárdio (DE ANGELIS et al., 2000; TAKEDA et al., 1988), transportadores musculares de glicose (RODNICK et al., 1992; SLENTZ et al., 1992), síntese de ácidos graxos livres (FIEBIG et al., 2001) e metabolismo do glicogênio (TAN et al., 1984) têm sido amplamente estudados. Além disso, um estudo com humanos demonstrou que a realização de exercício físico é capaz de diminuir a incidência de neuropatia diabética e aumentar a velocidade de condução do nervo peroneal, assim como a sensibilidade vibratória (BALDUCCI et al., 2006). Embora, tanto estudos clínicos como experimentais, demonstrem que a realização de exercício físico produz efeitos positivos sobre esses parâmetros, estes não levam em consideração a possibilidade do exercício físico exercer alguma influência sobre fisiopatologia dos neurônios do GRD em indivíduos diabéticos.

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

Além do controle dos níveis de glicose, a auto-administração de insulina, e a educação do paciente sobre a dieta, a atividade física tem sido preconizada como uma das abordagens terapêuticas convencionais do diabetes do tipo 1. Embora existam vários estudos sobre os efeitos do exercício físico no diabetes, os efeitos deste sobre os neurônios do GRD de ratos diabéticos ainda é um tema que permanece pouco esclarecido. Estudos têm demonstrado efeitos positivos sobre parâmetros cardíacos e metabólicos em ratos, assim como melhora da velocidade de condução de nervos sensoriais em pessoas portadoras de neuropatia diabética. No entanto, torna-se necessário o estudo sobre os efeitos do exercício físico sobre a morfologia e morfometria dos neurônios do GRD de ratos machos diabéticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar a influência do treinamento físico em esteira sobre a morfologia dos neurônios do gânglio da raiz dorsal L5 de ratos machos adultos diabéticos.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar as modificações do volume de neurônios dos tipos A e B do gânglio da raiz dorsal L5 de ratos machos adultos diabéticos induzido pela estreptozotocina, submetidos a 10 semanas de treinamento físico em esteira, realizando uma análise estereológica pelo procedimento de Cavalieri associado à técnica de contagem de pontos, e as comparar com os grupos controles.

4. MÉTODOS E RESULTADOS

4.1. Artigo: *Improvement in morphological and morphometric aspects of L5 dorsal root ganglion neurons of diabetic rats in response to treadmill training*

Submetido à *Acta Neuropathologica*.

**IMPROVEMENT IN MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC ASPECTS OF L5
DORSAL ROOT GANGLION NEURONS OF DIABETIC RATS IN RESPONSE TO
TREADMILL TRAINING**

P. S do Nascimento ^{a,b}, T. Malysz ^{a,b}, J. Ilha ^{a,b}, R. T. Araujo ^{a,b}, E. E. S Hermel ^a, P. I. Kalil-
Gaspar ^b, B. D. Schaan ^{a,c}, M. Achaval ^{a,b}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Fundação Universitária de Cardiologia e
Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/ Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Matilde Achaval, UFRGS, Departamento de Ciências Morfológicas,
Sarmiento Leite 500, Porto Alegre-RS 90050-170, Brazil. Phone: +555133083624. Fax:
+555133083092. E-mail: achaval@ufrgs.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of physical training on the dorsal root ganglion (DRG) cells of streptozotocin-induced-diabetic rats. Male adult rats were divided into non-diabetic and diabetic rats, exercised or non-exercised. Treadmill training was performed for 10 weeks (5 days/week, twice a day). Glycemia was evaluated every 2 weeks. Then, animals were killed and the right L5 DRG removed. Histological and morphometric analysis consisted of evaluation of the nuclear and somatic volumes in A and B cells of L5 DRG. Our results showed that both untrained and trained diabetic rats displayed increased glycemia when compared to non-diabetic rats. Diabetes decreased both B and A cell nuclear and somatic volumes. In DRG A cell nuclear volumes there was an interaction between diabetes and training, and post hoc tests showed that diabetic rats had lower volumes than controls (3630.68 ± 240.36 ; 2796.24 ± 508.17 ; 2269.36 ± 221.97 ; $2915.84 \pm 209.67 \mu\text{m}^3$ for C, TC, D, and TD, respectively, $P = 0.03$). Exercise increased the DRG A cell nuclear volumes in diabetic rats. In conclusion, diabetes causes pathological alterations in DRG cells, some of which can be modified by treadmill training, as evidenced by the improved morphological features of DRG cells found in the present study. Furthermore, treadmill training was able to increase the DRG A cell nuclear volume in diabetic rats.

Keywords: Dorsal root ganglion neurons, diabetic neuropathy, treadmill training.

Introduction

Neuropathy is one of the most debilitating complications in diabetes, often associated with considerable morbidity and mortality [12]. The pathogenesis of diabetic neuropathy involves hyperglycemia-induced molecular changes, microvascular insufficiency, oxidative stress, nitrosative stress, defective neurotrophism, and autoimmune-mediated nerve destruction [4, 13].

Streptozotocin (STZ)-induced diabetes in rats causes degenerative changes in autonomic [38; 42] and sensorial neurons [6], which are positively correlated with their hyperglycemic state [39]. Also, the dorsal root ganglion (DRG) neurons were reported to have smaller cell volumes [43] and abnormalities in growth factor support, with increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) [36], decreased activity of insulin-like growth factors I and II (IGF-I and IGF II; for review see 22) and decreased axonal transport of nerve growth factor (NGF) as well as expression of its low affinity p75 receptor [10]. While DRG cells have higher metabolic requirements [50], they do not have a selective blood barrier as found in the brain [1], which facilitates cell body damage.

Although no definitive treatment for diabetic neuropathy has yet been established, several studies have shown that it is possible to reduce its effects through intensive therapy/optimal glycemic control [47], autoimmune therapies and nerve growth factors [5]. Although the beneficial effects of regular physical exercise are well-known and used as part of the treatment of diabetic patients [2], very few data on its effectiveness in human diabetic neuropathy have been reported [3] and there is no data available on the effectiveness of physical training on diabetic neuropathy in animals. Moreover, some studies in rats have shown the benefits of exercise training in diabetes-induced cardiovascular and autonomic dysfunction [8, 18]. Also, there is no data currently available on the effects of exercise training on the morphological aspects of DRG cells. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of an exercise training protocol on

the morphological and morphometric features of the nucleus and soma in the DRG cells of STZ-diabetic rats.

Materials and methods

Animal model

Twenty male Wistar rats (12 weeks old) from a local breeding colony (ICBS, UFRGS) were housed under standard laboratory conditions with food and water available *ad libitum* and maintained under a 12:12 light-dark cycle (lights on at 8:00h). All efforts were made to minimise the number of animals studied and their suffering. In addition, all rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC) and to local guidelines on ethical use.

Experimental design

The rats were divided in 4 groups as follows: non-diabetic rats, control (C; n=5); non-diabetic rats submitted to treadmill training (TC; n=5); diabetic rats (D; n=5) and diabetic rats submitted to treadmill training (TD; n=5).

Diabetes induction

After an overnight fasting period (8-10h), the rats received a single intravenous injection of streptozotocin (Sigma Chemicals Co., USA) diluted in 10mM citrate buffer, pH 4.5 (50 mg/kg of corporal weight). Non-diabetic animals received only citrate buffer [25].

Glycemia was evaluated in blood collected from the rat tail after 48h and every 2 weeks following STZ/citrate buffer injection (test strips, Advantage, Roche, Indianapolis, IN, USA), after an overnight fasting period (8-10 h), at 4 P.M, Diabetes was defined as a fasting glucose >300mg/dL in tail vein blood 48 h after STZ injection [25].

At the fifth week after diabetes induction, all animals underwent adaptation to a treadmill originally designed for human use (Runner, Brazil) and modified for use by rats during 10 minutes at 5 m/min for 4 days. On the fifth day they were submitted to a Maximal Exercise Test (MET), consisting of graded exercise on treadmill, with speed increments of 5 m/min every 3 minutes, starting at 5 m/min and continuing up to the maximal intensity attained by each rat, and was stopped when each animal remained more than 50% of the time without giving signs of intention to advance [21, 28]. The values obtained in the MET were used to plan the treadmill training program, which started six weeks after diabetes induction. In order to correct the exercise intensity, a second MET was performed in the fifth training week.

Treadmill training

Exercise was performed on a treadmill twice a day with an interval of 4 h between each session, 5 days per week [45], and the training intensity increased gradually, according to the MET. During the first week the running sessions lasted 10 min, and duration increased each week, reaching 60 min in the eighth week, which was maintained until the tenth week. Moreover, each training session had a warm-up period, a main period and a cooling-off period. During the warm-up the rats ran 15% of the session time, with 20 to 30% of the maximum velocity determined by the MET; in the main period the rats ran 70% of the session time, with 40 to 50% of the maximum velocity; and in the cooling-off period the rats ran 15% of the session time, with 20 to 30% of the maximum MET values.

Histological and morphometric analysis

The rats were anaesthetised with sodium thiopental (i.p; 50 mg/kg; Cristalia, Brazil). Heparin (1000 IU; Cristalia, Brazil) was injected into the left cardiac ventricle, then the animals were transcardially perfused through the left ventricle using a peristaltic pump (Control Company, Brazil, 20 mL/min) with 400 mL of 0.9% saline solution, followed by a fixative solution containing 0.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in a 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.4 at room temperature.

The right L5 dorsal root ganglia (L5 DRG) were removed and postfixed for 1 h at room temperature in the same fixative solution, then washed in PB 0.1 M and postfixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co., USA) in PB for 1 h at room temperature. L5 DRG were then washed in PB 0.1M and dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Sciences, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland), kept in vacuum for 24 h, and, afterwards, put in resin blocks and polymerised for 48 h at 60 °C.

Then, the ganglia were sectioned using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson), and the serial semithin sections (1 µm) were stained with toluidine blue (Merck, Germany) diluted in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil).

Images of the DRG neurons were captured and digitalized using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Tokio, Japan; initially 200X and further amplified 200% for analysis) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 6.0 (media Cybernetics, USA).

Fifteen B cells and ten A cells were selected per animal from each experimental group, and only entire cell bodies and their nuclei found within the series of sections were used for

quantitative evaluations [35]. Both the soma and nucleus were analysed separately. The mean value obtained from 10 A and 15 B cells and their nuclei were considered as a single value for further comparisons. A minimum of twelve sections was analysed per B cell, and nineteen sections were analysed per A cell.

The A cells were identified on the presence of a large pale cytoplasm and large nucleus containing one central nucleolus, while the B cells were identified based on the presence dark cytoplasm, containing a large pale nucleus which had several eccentrically located nucleoli [43, 46].

Morphometric quantification of the neuronal somatic and nuclear volumes of the L5 DRG A and B cells was determined by using a point counting technique in association with the Cavalieri method [19, 35]. The mean value of neuronal somatic and nucleus volume was calculated using the equation:

$$V = \Sigma P.a/p.T$$

Where V corresponds to volume; ΣP corresponds to the total counted points; a/p corresponds to area-point ($59,8 \mu\text{m}^2$) and T corresponds to section thickness ($2 \mu\text{m}$).

Statistical analysis

Glycemia levels were analysed using repeated measures analysis of variance (ANOVA). The mean values of the somatic and the nuclear volumes were analysed using two-way ANOVA, with diabetes and training as the independent variables. The differences between the groups were assessed using Tukey *post hoc* test. The statistically significant level was set as $P < 0.05$. Data

were run on SPSS 8.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA). All data are represented by the mean \pm standard error of mean (SEM).

Results

Glycemic levels

As expected, glycemia was higher in D and TD as compared to C and TC animals ($P < 0.001$) in all the evaluations performed. However, glycemic levels in both diabetic groups were similar at the same evaluation times (D vs TD, $P > 0.05$; table 1).

Histological studies

Both A cells from C (Fig. 1a) and TC (images not shown) animal had granular and large pale cytoplasm and one nucleolus in their nuclei. B cells (Fig. 1d) had dark homogeneous cytoplasm, large pale nuclei, with well defined nuclear membranes, and multiple nucleoli. Both B and A cells were surrounded by satellite glial cells. Moreover, in the interstitial space there were fibroblasts, nerve fibres and blood vessels with regular well defined walls (Fig. 1g). There were no differences in these characteristics between the two control groups.

Morphological alterations of B and A cells in D groups (Fig. 1e and b; respectively) included irregular and vacuolated nuclei in both B and A cells and a shrunken aspect in both the nuclei and cytoplasm. Moreover, when compared to control animals, the interstitial space was increased and displayed numerous fibroblasts. In the D group, the blood vessels (Fig. 1h) had irregular profiles, with increased wall thickness and decreased lumen, when compared to controls (Fig. 1g).

B and A cells from the TD group (Fig. 1f and c; respectively) also displayed morphological changes, however, they were not as common as in the D group (Fig. 1e and b). Cell-shrinkage and vacuoles were less frequently seen. Furthermore, the amount of fibroblasts in the interstitial space in the TD was similar to controls (C and TC). There were fewer alterations to the blood vessels (Fig. 1i), with a rounded lumen and a decreased blood vessel thickness, which was similar to controls (Fig. 1g).

Morphometrical studies

Diabetes determined a 32% and 25% reduction in B cell somatic and nuclear volumes, respectively, when compared with the C group [$F(1,19) = 11.73$; $P = 0.03$] and on nuclear volumes [$F(1,19) = 7.98$; $P = 0.01$]. However, there was no interaction between diabetes and training considering these effects in B cells. Similarly, diabetes determined a 31% reduction in the somatic volumes of A cells when compared with the C group [$F(1,19) = 10.41$; $P = 0.005$], with no interaction between diabetes and training. Considering the nuclear volumes of A cells, there was an interaction between diabetes and training [$F(1,19) = 5.35$; $P = 0.03$], and post hoc tests showed that the D group had lower (37.5%) nuclear volumes when compared to C ($P = 0.03$), while A cell nucleus of the TD had 19.7% lower volumes when compared to the C group (table 2).

Discussion

This is the first study to evaluate the effects of diabetes and physical training on the morphological and morphometric characteristics of DRG cells in rats. As expected, diabetic rats displayed higher blood glucose levels when compared to control animals, but physical training

did not improve metabolic control, which is in accordance with previous data [29]. Nevertheless, in streptozotocin-induced diabetic rats, exercise may improve insulin sensitivity and facilitate muscle metabolism [34] even without modifying blood glucose levels. Exercise may also increase adipocyte insulin-stimulated glucose uptake [33], enhance muscle insulin receptor autophosphorylation [49] and membrane GLUT4 translocation and expression [9]. Therefore, exercise training in diabetes presents benefits beyond the control of blood glucose levels.

Diabetic rats exhibited morphological alterations in both DRG B and A cells including irregular and vacuolated nuclei and a shrunken aspect in both the nuclei and cytoplasm, with increased matrix and cell components in the interstitial space. The blood vessels in the untrained diabetic group had irregular profiles, with increased wall thickness and decreased lumen. Previous studies have shown thickening and reduplication of capillary basal lamina, hyperplasia and proliferation of endothelial cells in the nerve [7, 20, 37], neuronal cytoplasmic vacuolations [27], and reduced soma volumes [43]. In trained diabetic rats, although most of the noted vascular changes and the improvement exercise brought were subjective impressions, there is no report in the literature showing similar data.

The idea that diabetes causes alterations in DRG cell volume is already widely accepted [27, 31, 43]. In our study, diabetic rats showed decreased B and A cell somatic and nuclear volumes. The exercise training employed was able to increase A cell nuclear volumes toward non-diabetic values. However, exercise training did not alter the morphometric values of DRG B cell somatic and nuclear volumes. Since B cells send nerve fibres that form A δ and C nociceptors [17], one could speculate that exercise is not producing direct effects on the volumes of these cells. Moreover, nerve growth factor (NGF) is the main neurotrophic factor responsible for the maintenance of small sensory neurons. Nerve growth factor is produced by target organs and

taken up by sympathetic and small sensory fibres via tyrosine-kinase A, a high-affinity receptor (trkA) and retrogradely transported to the neuron cell body where it, in turn, promotes cell survival, maintenance of calcitonin gene-related peptide content (CGRP), substance P content [11] and neurofilament gene expression [48]. Diabetes causes a loss of NGF and CGRP content in sciatic nerve [14], deficits in NGF retrograde transport [10], deficits in axonal transport structural proteins [23] and aberrant neurofilament phosphorylation in DRG cells [15]. All of these features could explain the persistence of the cellular B alterations even after the training program.

Diabetic rats had a 37% decrease in DRG A nuclear mean volume when compared to controls, while trained diabetic rats had only a 19.7% decrease. Although physical training did not produce statistically significant effects on the DRG A cell somatic volume, the diabetic rats showed a 31% decrease in DRG A cell mean somatic volume, while trained diabetic rats had a 19.4% decrease. However, we can not say that physical training completely reversed the diabetes-induced DRG A decrease in nuclear volumes. Statistical analysis showed that, although diabetic rats had different DRG A cell nuclear volumes compared to controls, the fact that the same statistical analysis also considered trained diabetic rats similar to both untrained diabetic rats and controls is worrisome. We prefer to think that physical training improved diabetic DRG A nuclear volumes toward control values, which is still a debatable issue.

Loss of vibratory sensation and reduction in nerve conduction velocity in large diameter A β / γ fibres innervating skin, joints and muscles is a hallmark of diabetic neuropathy [3, 17]. Since diabetes causes a reduction in nerve conduction velocity [3] and this is proportional to the size of the neuronal soma [17], one may suggest that exercise training may improve nerve conduction velocity by changing soma size. We think that the trend toward an increase in DRG A

cell somatic volumes in trained diabetic rats, corroborated by a statistically significant interaction between diabetes and training in DRG A cell nuclear volumes points to this direction.

The morphometric results on DRG cell somatic and nuclear volumes in diabetic rats were in accordance with previous data [31, 43]. However, we found some variations in volume loss in these cells that may be due to the use of different methodologies during the inclusion of materials for analysis, volume evaluation, time past diabetes induction and species variations. The molecular and cellular basis for decreased cell volumes in the DRG of diabetic rats is still unknown, but multiple factors could be implicated, such as high susceptibility to blood glucose variations due to blood-nerve barrier properties and greater metabolic demands in pseudounipolar cells [26, 50]. Furthermore, impaired expression of cytoskeleton proteins like neurofilaments and α -tubulin can contribute to alterations in neuronal volume [41].

The mammalian target of rapamycin (mTOR) controls cell size [40] in a wide variety of cells and is activated by growth factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin and insulin-like growth factor (IGF) which signal upstream phosphoinositide-3 kinase / protein-kinase B/Akt- [24, 32]. Brain-derived neurotrophic factor induces the phosphorylation of mTOR in cortical neurons in vitro [44]. In addition, physical activity in animals is able to increase the BDNF production in muscles [16] and the levels of BDNF mRNA in DRG cells in culture [30]. Therefore, activation of mTOR by neurotrophin signalling may be involved in exercise-induced effects in DRG neurons.

In summary, our results demonstrate that diabetes causes pathological alterations in DRG cells and blood vessels, and that some of these alterations can be modified by physical training, as evidenced by improvement in morphological features of DRG cells and blood vessels.

Furthermore, exercise training was able to increase the DRG B cell nuclear volume in diabetic rats.

Acknowledgments

We thank Jandyra Fachel for her statistical advice and Antônio Severino for his technical assistance. This study was supported by Grants from CNPq and CAPES. P. S do Nascimento was supported by an MSc scholarship from CAPES, M. Achaval and B. D Schaan are CNPq investigators.

References

1. Allen D T, Kiernan J A (1994) Permeation of proteins from the blood into peripheral nerves and ganglia. *Neuroscience* 59: 755-764.
2. American Diabetes Association (2007) Standards of medical care in diabetes—2007. *Diabetes Care* 30: S4-S41.
3. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F, Fallucca F (2006) Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J. Diabetes Complicat.* 20: 216– 223.
4. Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625.
5. Calcutt N A, Freshwater J D, Hauptmann N, Taylor E M, Mizisin A P (2006) Protection of sensory function in diabetic rats by Neotrofin. *Eur. J. Pharmacol.* 534: 187-193.
6. Cameron N E, Cotter M A, Low P A (1991) Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. *Am. J. Physiol.* 261: E1-8.

7. Cameron N E, Eaton S E M, Cotter M A, Tesfaye S (2001) Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44: 1973-1988.
8. De Angelis K L D, Oliveira A R, Dall'Ago P, Peixoto L R A, Gadonski G, Lacchini S, Fernandes T G, Irigoyen M C (2000) Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 635-641.
9. Dela F, Handberg A, Mikinest K J, Vinten J, Galbo H (1993) Glut 4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle. *J. Physiol.* 469: 615-624.
10. Delcroix J D, Tomlinson D R, Fernyhough P (1997) Diabetes and axotomy-induced deficits in retrograde axonal transport of nerve growth factor correlate with decreased levels of p75^{LNTR} protein in lumbar dorsal root ganglia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 51: 82-90.
11. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C (1992) Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 49: 693-698.
12. Ewing D J, Campbell I W, Clarke B F (1976) Mortality in diabetic autonomic neuropathy, *Lancet* 307: 601-603.
13. Feldman E L, Stevens M J, Greene D A (1997) Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin Neurosci.* 4: 365-70.
14. Fernyhough P, Diemel L T, Brewster W J, Tomlinson D R (1994) Deficits in sciatic nerve neuropeptide content coincide with a reduction in target tissue nerve growth factor messenger RNA in streptozotocin-diabetic rats: Effects of insulin treatment. *Neuroscience* 62: 337-344.
15. Fernyhough P, Gallagher A, Averill S A, Priestley J V, Housom L, Patel J, Tomlinson D R (1999) Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* 48: 881-889.

16. Gómez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy R R, Edgerton V R (2001) Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur. J. Neurosci.* 13: 1078-1084.
17. Harper A A, Lawson S N (1985) Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 359: 31-46.
18. Harthmann A D, De Angelis K, Costa L P, Senador D, Schaan B D, Krieger E M, Irigoyen M C (2007) Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosci.* 133: 115-120.
19. Hermel E E S, Ilha J, Xavier L L, Rasia-Filho A A, Achaval M (2006) Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci. Lett.* 405: 153-158.
20. Huebschmann A G, Vlassara H, Regensteiner J G, Reusch J E B (2006) Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 29: 1420-1432.
21. Ilha J, Araujo R T, Malysz T, Hermel E E S, Rigon P, Xavier L L, Achaval M (2008) Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil. Neural Repair* In Press.
22. Ishii D N (1995) Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Brain. Res. Rev.* 20: 47-67.
23. Jakobsen J, Sidenius P (1980) Decreased Axonal Transport of Structural Proteins in Streptozotocin Diabetic Rats. *J. Clin. Invest.* 66 : 292-297.
24. Johnson-Farley N N, Patel K, Kim D, Cowen D S (2007) Interaction of FGF-2 with IGF-1 and BDNF in stimulating Akt, ERK, and neuronal survival in hippocampal cultures. *Brain Res.* 1154: 40-49.

25. Junod A, Lambert A E, Stauffacher W, Renold A E (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48: 2129-39.
26. King R H M (2001) The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 54: 400–408.
27. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer J D, Low P A (2002) Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 51: 819-824.
28. Melo R M, Martinho E, Michelini L C (2003) Training-induced, pressure-lowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 42: 851-857.
29. Midaoui A E, Chiasson J L, Tancrède G, Nadeau A (2006) Physical training reverses the increased activity of the hepatic ketone body synthesis pathway in chronically diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E207–E212.
30. Molteni R, Zheng J, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss J L (2004) Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 8473–8478.
31. Noorafshan A, Ebrahimpoor M R, Sadeghi Y (2001) Stereological study of the cells of dorsal root ganglia in male diabetic rats. *APMIS* 109: 762-766.
32. Oldham S, Hafen E (2003) Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* 13: 79-85.
33. Peres S B, Franzói de Moraes S M, Costa C E M, Brito L C, Takada J, Andreotti S, Machado M A, Alonso-Vale M I C, Borges-Silva C N, Lima F B (2005) Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. *J Appl Physiol* 98: 1037–1043.

34. Richter E A, Garetto L P, Goodman M N, Ruderman N B (1982) Muscle glucose metabolism following exercise in the rat. Increased sensitivity to insulin. *J. Clin. Invest.* 69: 785-793.
35. Rocha M I M, Mestriner R G, Hermel E E S, Xavier L L, Rasia-Filho A A, Achaval M (2007) Neuronal somatic volume of posteroventral medial amygdala cells from males and across the estrous cycle of female rats. *Neurosci. Lett.* 420: 110-115.
36. Samii A, Unger J, Lange W (1999) Vascular endothelial growth factor expression in peripheral nerves and dorsal root ganglia in diabetic neuropathy in rats. *Neurosci. Lett.* 262: 159-162.
37. Sasaki H, Schmelzer J D, Zollman P J, Low P A (1997) Neuropathology and blood flow of nerve, spinal roots and dorsal root ganglia in longstanding diabetic rats. *Acta Neuropathol.* 93: 118–128.
38. Schaan B D, Maeda C Y, Timm H B, Medeiros S, Moraes R S, Ferlin E, Fernandes T G, Ribeiro J P, Schmid H, Irigoyen M C (1997) Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 1081-1086.
39. Schaan B D, Dall'Ago P, Maeda C Y, Ferlin E, Fernandes T G, Schmid H, Irigoyen M C (2004) Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 1895-1902.
40. Schmelzle T, Hall M N (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253–262.
41. Scott J N, Clark A W, Zochodne D W (1999) Neurofilament and gene tubulin gene expression in progressive experimental diabetes. Failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain* 122: 2109-2117.

42. Schmidt R E, Plurad S B (1986) Ultrastructural and biochemical characterization of autonomic neuropathy in rats with chronic streptozotocin diabetes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 45: 525-544.
43. Sidenius P, Jakobsen J (1980) Reduced perikaryal volume of lower motor and primary sensory neurons in early experimental diabetes. *Diabetes* 29: 182-187.
44. Takei N, Kawamura M, Hara K, Yonezawa K, Nawa H (2001) Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes. Comparison with the effects of insulin. *J. Biol. Chem.* 276: 42818- 42825.
45. Tancredi G, Rousseau-Migneron S, Nadeau A (1982) Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 406-9.
46. Tandrup T (1993) A method for unbiased and efficient estimation of number and mean volume of specified neuron subtypes in rat dorsal root ganglion. *J. Comp. Neurol.* 329: 269-276.
47. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) 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.* 329: 977-986.
48. Verge V M K, Tetzlaff W, Bisby M A, Richardson P M (1990) Influence of nerve growth factor on neurofilament gene expression in mature primary sensory neurons. *The Journal of Neuroscience.* 10: 2018-2025.
49. Youngren J, Keen S, Kulp J L, Tanner C J, Houmard J A, Goldfine I D (2001) Enhanced muscle insulin receptor autophosphorylation with short-term aerobic exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: E528–E533.
50. Zochodne D W, Ho L T (1991) Unique microvascular characteristics of the dorsal root ganglion in the rat. *Brain Res.* 559: 89-93.

Table 1. Glycemic values of diabetic and non-diabetic rats.

Groups	48 h	Day 15	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day 105	Day 120
(n)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
C (5)	120.6±7.6	94.4±2	95.4±1.1	106.2±4.5	101±1.6	92.4±3	90±3	83.2±4	90±3.4
TC (5)	125.8±6	90±4.9	96.4±0.8	108.2±3.8	100.4±1.8	95±2.4	92.4±2.1	87.2±3	92±3.6
D (5)	420.6±26.7*	389.4±21.4*	427±54.2*	455.6±16.3*	432.4±18.7*	501.6±16.6*	447.4±9.7*	453.4±18.6*	423±13.2*
TD (5)	374.8±17.8*	395.6±12.1*	451.2±12.3*	483.4±27.46*	463.6±23.5*	474.8±28.7*	442.2±21.7*	433.6±21.5*	456.2±15.2*

C, control; TC, trained control; D, streptozotocin-diabetic; TD, trained streptozotocin-diabetic. Values are expressed as the mean ± SEM. Repeated measures ANOVA. * $P < 0.05$ vs C and TC.

Table 2. Average volumes of B and A cell somata and nuclei.

Group (n)	B Cell soma (μm^3)	B Cell nucleus (μm^3)	A Cell soma (μm^3)	A Cell nucleus (μm^3)
C (5)	13,223.07 ± 1,385.92	1,450.74 ± 101.04	71,533.68 ± 5,507.97	3,630.68 ± 240.36
TC (5)	10,880.41 ± 547.7	1,239.05 ± 96.88	67,884.96 ± 6,609.78	2,796.24 ± 508.17
D (5)	8,949.02 ± 999.15 ^a	1,088.36 ± 80.72 ^a	49,117.16 ± 4,305.7 ^a	2,269.36 ± 221.97 ^a
TD (5)	8,899.83 ± 339.04 ^a	1,039.72 ± 115.67 ^a	57,668.72 ± 3,119.43 ^a	2,915.84 ± 209.67

C, control; TC, trained control; D, streptozotocin-diabetic; TD, trained streptozotocin-diabetic. Values are expressed as the mean ± SEM. Two way ANOVA with diabetes and training as the independent variables. “a” corresponds to $P < 0.05$ vs C.

Figure 1

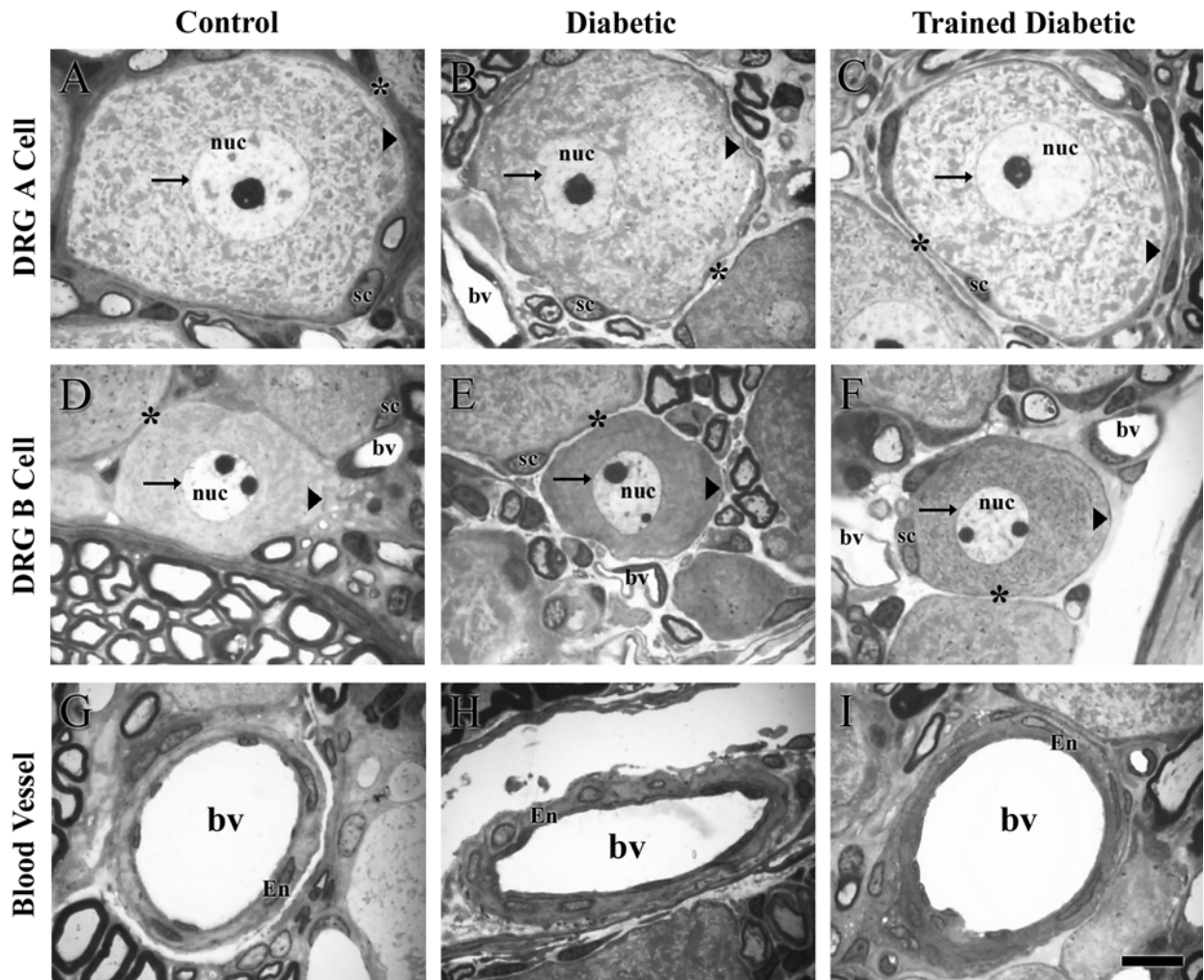


Figure 1. Digitalized images of transverse-semithin sections (1 μm) obtained from L5 DRG. Images a , b and c show examples of an A cell from Control, Diabetic and Trained Diabetic groups, respectively. Note the irregularities in the nuclear (arrow) and plasma (arrowhead) membranes and shrunken aspects of both the nucleus and cytoplasm in Diabetic (b) compared with Control (a) and Trained Diabetic (c). Moreover, note the increase in the interstitial space (asterisk) in the Diabetic group (b). Images d, e and f show examples of a B cell from Control, Diabetic and Trained Diabetic groups, respectively. Note that B cells showed irregularities in the nuclear (arrow) and plasma (arrowhead) membranes and shrunken aspects of both nucleus and cytoplasm in Diabetic (e) compared with Control (d) and Trained Diabetic (f). Moreover, Diabetic group (e) showed an increased interstitial space (asterisk). Images g, h and i show blood vessels from the Control, Diabetic and Trained Diabetic groups, respectively. Note that the Diabetic group (h) showed increased thickness in the vascular wall and decreased lumen of blood vessels, when compared to Control (g) and Trained Diabetic (i). Arrow, nuclear membrane; arrowhead, plasma membrane; nuc, nucleus; * (asterisk), interstitial space; sc, satellite cell; nf, nerve fibre; bv, blood vessel; En, endothelium. Scale bar = 10 μm

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste estudo mostraram que o diabetes experimental causa redução do volume dos núcleos e somas das células B e A do GRD L5 de ratos adultos machos, e que após a realização de exercício físico na esteira há uma diminuição da perda do volume dos núcleos das células A do GRD. No entanto, estas modificações não foram encontradas nas células B. Além disso, o diabetes causou alterações histológicas importantes nas células do GRD, bem como nos vasos sanguíneos, e estas foram menos frequentes nos ratos diabéticos que realizaram exercício físico em esteira.

A compreensão dos mecanismos pelos quais os exercícios físicos exercem suas influências sobre os neurônios do GRD pode contribuir para o aprimoramento das terapias empregadas na reabilitação de pessoas portadoras de diabetes. Dentro deste contexto, os resultados encontrados neste estudo servem como referências para futuras pesquisas que busquem elucidar a relação entre diabetes e a expressão de fatores tróficos dependentes da atividade motora, bem como o estudo de morte celular, e possíveis fatores envolvidos com o volume celular. Além disso, ainda se faz necessário estudar ultra-estruturalmente quais alterações fisiopatológicas foram sofridas pelas células e vasos sanguíneos do GRD de ratos diabéticos induzidos pela STZ e as modificações observadas após o exercício físico na esteira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D.T.; KIERNAN, J.A. Permeation of proteins from the blood into peripheral nerves and ganglia. *Neuroscience*, 59: 755-764, 1994.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes—2007. *Diabetes Care*, 30: S4-S41, 2007.

APFEL, S.C. Diabetic neuropathy models: Are they relevant? *Drug discovery today. Disease models*, 3: 397- 402, 2006.

ARING, A.M.; JONES, D.E.; FALKO, J.M. Evaluation and prevention of diabetic neuropathy. *American Family Physician*, 71: 2123-2128, 2005.

BALDUCCI, S.; IACOBELLIS, G.; PARISI, L.; DI BIASE, N.; CALANDRIELLO, E.; LEONETTI, F.; FALLUCCA, F. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *Journal of diabetes and its complications*, 20: 216– 223, 2006.

BOULTON, A.J.M.; MALIK, R.A.; AREZZO, J.C.; SOSENKO, J.M. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*, 27: 1458-1486, 2004.

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*, 28: 956-962, 2005.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*, 54: 1615-1625, 2005.

CAJAL, S.R. *Histology of the nervous system of man and vertebrates*. New York: Oxford University Press, 1995.

CALCUTT, N.A.; FRESHWATER, J.D.; HAUPTMANN, N.; TAYLOR, E.M.; MIZISIN, A.P. Protection of sensory function in diabetic rats by Neotrofin. *European Journal of Pharmacology*, 534: 187-193, 2006.

CAMERON, N.E.; COTTER, M.A.; Low, P.A. Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. *The American Journal of Physiology*, 261: E1-8, 1991.

CAMERON, N.E.; EATON, S.E.M.; COTTER, M.A.; TESFAYE, S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 44: 1973-1988, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General*. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and

Health Promotion. 1996. <http://www.cdc.gov/nccdphp/sgr/pdf/execsumm.pdf>. Acessado em 10.02.2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National diabetes fact sheet: general information and national estimates on diabetes in the United States. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 2005. http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2005.pdf. Acessado em 10.02.2008.

DE ANGELIS, K.L.; OLIVEIRA, A.R.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO, L.R.; GADONSKI, G.; LACCHINI, S.; FERNANDES, T.G.; IRIGOYEN, M.C. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 33: 635-641, 2000.

DELA, F.; HANDBERG, A.; MIKINEST, K.J.; VINTEN, J.; GALBO, H. Glut 4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle. The Journal of Physiology, 469: 615-624, 1993.

DELCROIX, J.D.; TOMLINSON, D.R.; FERNYHOUGH, P. Diabetes and axotomy-induced deficits in retrograde axonal transport of nerve growth factor correlate with decreased levels of p75^{LNTR} protein in lumbar dorsal root ganglia. Brain research. Molecular brain research, 51: 82-90, 1997.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. Pain Supplement, 6: S27-S35, 1999.

DONNERER, J.; SCHULIGOI, R.; STEIN, C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: Evidence for a regulatory function of nerve growth factor *in vivo*. *Neuroscience*, 49: 693-698, 1992.

EWING, D.J.; CAMPBELL, I.W.; CLARKE, B.F. Mortality in diabetic autonomic neuropathy. *Lancet*, 307: 601-603, 1976.

FELDMAN, E.L.; STEVENS, M.J.; GREENE, D.A. Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clinical Neuroscience*, 4: 365-70, 1997.

FIEBIG, R.G.; HOLLANDER, J.M.; JI, L.L. Exercise down-regulates hepatic fatty acid synthase in streptozotocin-treated rats. *The Journal of Nutrition*, 131: 2252-2259, 2001.

FERNYHOUGH, P.; DIEMEL, L.T.; BREWSTER, W.J.; TOMLINSON, D.R. Deficits in sciatic nerve neuropeptide content coincide with a reduction in target tissue nerve growth factor messenger RNA in streptozotocin-diabetic rats: Effects of insulin treatment. *Neuroscience*, 62: 337-344, 1994.

FERNYHOUGH, P.; GALLAGHER, A.; AVERILL, S.A.; PRIESTLEY, J.V.; HOUNSOM, L.; PATEL, J.; TOMLINSON, D.R. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes*, 48: 881-889, 1999.

GENESER, F. *Histologia, com bases biomoleculares*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GÓMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; OPAZO, P.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *The European Journal of Neuroscience*, 13: 1078-1084, 2001.

HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research Reviews*, 48: 457-476, 2005.

HARPER, A.A.; LAWSON, S.N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology*, 359: 31-46, 1985.

HARTHMANN, A.D.; DE ANGELIS, K.; COSTA, L.P.; SENADOR, D.; SCHAAN, B.D.; KRIEGER, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 133: 115-120, 2007.

HELLWEG, R.; RAIVICH, G.; HARTUNG, H.D.; HOCK, C.; KREUTZBERG, G.W. Axonal transport of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in experimental diabetic neuropathy. *Experimental Neurology*, 130: 24-30, 1994.

HERMEL, E.E.S.; ILHA, J.; XAVIER, L.L.; RASIA-FILHO, A.A.; ACHAVAL, M. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neuroscience Letters*, 405: 153-158, 2006.

HOTTA, M.; TASHIRO, F.; IKEGAMI, H.; NIWA, H.; OGIHARA, T.; YODOI, J.; MIYAZAKI, J. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *The Journal of Experimental Medicine*, 188: 1445-1451, 1998.

HOWARTH, F.C.; JACOBSON, M.; SHAFIULLAH, M.; ADEGHATE, E. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Experimental Physiology*, 90: 827-835, 2005.

HUEBSCHMANN, A.G.; VLASSARA, H.; REGENSTEINER, J.G.; REUSCH, J.E.B. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*, 29: 1420-1432, 2006.

ILHA, J.; ARAUJO, R.T.; MALYSZ, T.; HERMEL, E.E.S.; RIGON, P.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, no prelo, 2008. DOI: 10.1177/1545968307313502.

ISHII, D.N. Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Brain Research Reviews*, 20: 47-67, 1995.

JAKOBSEN, J.; SIDENIUS, P. Decreased axonal transport of structural proteins in streptozotocin diabetic rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 66: 292-297, 1980.

JOHNSON-FARLEY, N.N.; PATEL, K.; KIM, D.; COWEN, D.S. Interaction of FGF-2 with IGF-1 and BDNF in stimulating Akt, ERK, and neuronal survival in hippocampal cultures. *Brain Research*, 1154: 40–49, 2007.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation*, 48: 2129-39, 1969.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. *Princípios da Neurociência*. São Paulo: Manole, 2003.

KING, R.H.M. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 54: 400-408, 2001.

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

LINO, C.S.; DIÓGENES, J.P.L.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.P.G.; ANDRADE NETO, M.; ALVES, R.S.; QUEIROZ, M.G.R.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27: 125-127, 2004.

MELO, R.M.; MARTINHO, E.; MICHELINI, L.C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*, 42: 851-857, 2003.

MIDAOU, A.E.; CHIASSON, J.L.; TANCRÈDE, G.; NADEAU, A. Physical training reverses the increased activity of the hepatic ketone body synthesis pathway in chronically diabetic rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290: E207-E212, 2006.

MOLTENI, R.; ZHENG, J.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F.; TWISS, J.L. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 8473-8478, 2004.

MURATA, M.; TAKAHASHI, A.; SAITO, I.; KAWANISHI, S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology*, 57: 881-887, 1999.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Biosignaling. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman, p. 421-479, 2005.

NOORAFSHAN, A.; EBRAHIMPOOR, M. R.; SADEGHI, Y. Stereological study of the cells of dorsal root ganglia in male diabetic rats. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 109: 762-766, 2001.

OLDHAM, S.; HAFEN, E. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends in Cell Biology*, 13: 79-85, 2003.

PARENT, A. *Carpenter's human neuroanatomy*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

PAZO, J.H. Fisiologia do sistema somatossensorial. In: Cingolani, H. E., Houssay, A.B., *Fisiologia humana de Houssay*. Porto Alegre: Artmed, p. 810-841, 2004.

PERES, S.B.; FRANZÓI DE MORAES, S.M.; COSTA, C.E.M.; BRITO, L.C.; TAKADA, J.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M.A.; ALONSO-VALE, M.I.C.; BORGES-SILVA, C.N.; LIMA, F.B. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. *Journal of Applied Physiology*, 98: 1037-1043, 2005.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LaMANTIA, A.S.; McNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. *Neurociências*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAMBOURG, A.; CLERMONT, Y.; BEAUDET, A. Ultrastructural features of six types of neurons in rat dorsal root ganglia. *Journal of Neurocytology*, 12: 47-66, 1983.

RICHTER, E.A.; GARETTO, L.P.; GOODMAN, M.N.; RUDERMAN, N.B. Muscle glucose metabolism following exercise in the rat. Increased sensitivity to insulin. *The Journal of Clinical Investigation*, 69: 785-793, 1982.

ROCHA, M.I.M.; MESTRINER, R.G.; HERMEL, E.E.S.; XAVIER, L.L.; RASIA-FILHO, A.A.; ACHAVAL, M. Neuronal somatic volume of posteroventral medial amygdala cells from males and across the estrous cycle of female rats. *Neuroscience Letters*, 420: 110-115, 2007.

RODNICK, K.J.; HENRIKSEN, E.J.; JAMES, D.E.; HOLLOSZY, J.O. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *American Journal of Physiology*, 262: C9-14, 1992.

ROSS, M.; PAWLINA, W. *Histology a text and atlas, with correlated cell and molecular biology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

RUSSELL, J.W.; SULLIVAN, K.A.; WINDEBANK, A.J.; HERRMANN, D.N.; FELDMAN, E.L. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiology of Disease*, 6: 347-363, 1999.

SAMII, A.; UNGER, J.; LANGEW. Vascular endothelial growth factor expression in peripheral nerves and dorsal root ganglia in diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience Letters*, 262: 159-162, 1999.

SASAKI, H.; SCHMELZER, J.D.; ZOLLMAN, P.J.; LOW, P.A. Neuropathology and blood flow of nerve, spinal roots and dorsal root ganglia in longstanding diabetic rats. *Acta Neuropathologica*, 93: 118-128, 1997.

SCHAAN, B.D.; MAEDA, C.Y.; TIMM, H.B.; MEDEIROS, S., MORAES, R.S.; FERLIN, E.; FERNANDES, T.G.; RIBEIRO, J.P.; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M.C. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 1081-1086, 1997.

SCHAAN, B.D., DALL'AGO, P.; MAEDA, C.Y.; FERLIN, E.; FERNANDES, T.G.; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M.C. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 1895-1902, 2004.

SCHMALBRUCH, H. The numbers of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. *The Anatomical Record*, 219: 315-322, 1987.

SCHMELZLE, T.; HALL, M.N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253-262, 2000.

SCHMEICHEL, A. M.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, 52: 165-171, 2003.

SCOTT, J.N.; CLARK, A.W.; ZOCHODNE, D.W. Neurofilament and gene tubulin gene expression in progressive experimental diabetes. Failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain*, 122: 2109-2117, 1999.

SCHMIDT, R.E.; PLURAD, S.B. Ultrastructural and biochemical characterization of autonomic neuropathy in rats with chronic streptozotocin diabetes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45: 525-544, 1986.

SIDENIUS, P.; JAKOBSEN, J. Reduced perikaryal volume of lower motor and primary neurons in early experimental diabetes. *Diabetes*, 29: 182-187, 1980.

SLENTZ, C.A.; GULVE, E.A.; RODNICK, K.J.; HENRIKSEN, E.J.; YOUN, J.H.; HOLLOSZY, J.O. Glucose transporters and maximal transport are increased in endurance-trained rat soleus. *Journal of Applied Physiology*, 73: 486-492, 1992.

SQUIRE, L.R.; ROBERTS, J.L.; SPITZER, N.C.; ZIGMOND, M.J.; McCONNELL, S.K.; BLOOM, F.E. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press, 2002.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*, 50: 536-546, 2001.

TAKEDA, N.; NAKAMURA, I.; OHKUBO, T.; HATANAKA, T.; NAGANO, M. Effects of physical training on the myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats. *Basic Research in Cardiology*, 83: 525-530, 1988.

TAKEI, N.; KAWAMURA, M.; HARA, K.; YONEZAWA, K.; NAWA, H. Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes.

Comparison with the effects of insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 42818- 42825, 2001.

TAN, M.H.; BONEN, A.; WATSON-WRIGHT, W.; HOOD, D.; SOPPER, M.; CURRIE, D.; BELCASTRO, A.N.; PIERCE, G. Muscle glycogen repletion after exercise in trained normal and diabetic rats. *Journal of Applied Physiology*, 57: 1404-1408, 1984.

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

TANDRUP, T. A method for unbiased and efficient estimation of number and mean volume of specified neuron subtypes in rat dorsal root ganglion. *The Journal of Comparative Neurology*, 329: 269-276, 1993.

TANDRUP, T. Are the neurons in the dorsal root ganglion pseudounipolar? A comparison of the number of neurons and number of myelinated and unmyelinated fibres in the dorsal root. *The Journal of Comparative Neurology*, 357: 341-347, 1995.

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. *The New England Journal of Medicine*, 329: 977-986, 1993.

VERGE, V.M.K.; TETZLAFF, W.; BISBY, M.A.; RICHARDSON, P.M. Influence of nerve growth factor on neurofilament gene expression in mature primary sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 10: 2018-2025, 1990.

World Health Organization (WHO). Diabetes programme.
http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/. Acessado em: 10.02.2008.

YOUNGREN, J.; KEEN, S.; KULP, J.L.; TANNER, C.J.; HOUMARD, J.A.; GOLDFINE, I.D. Enhanced muscle insulin receptor autophosphorylation with short-term aerobic exercise training. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280: E528-E533, 2001.

ZOCHODNE, D.W., HO, L.T. Unique microvascular characteristics of the dorsal root ganglion in the rat. *Brain Research*, 559: 89-93, 1991.