



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

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A REGENERAÇÃO DO NERVO
ISQUIÁTICO NO DIABETES EXPERIMENTAL**

TESE DE DOUTORADO

Taís Malysz Sarzenski

Porto Alegre

2010



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

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A REGENERAÇÃO DO NERVO
ISQUIÁTICO NO DIABETES EXPERIMENTAL**

Taís Malysz Sarzenski

Orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

Co-orientadora: Profa. Dra Beatriz D'Agord Schaan

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Neurociências.

Porto Alegre

2010

AGRADECIMENTOS

À Profa. Matilde Achaval, inicialmente por ter me aceitado como sua aluna, depois por ter incentivado o desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa, e também por ter me orientado na realização deste trabalho, com muita confiança, companheirismo e paciência.

À Profa Beatriz Schaan pela sua disposição e por seus valiosos ensinamentos.

À Profa. Maria Cristina Faccioni-Heuser pelos ensinamentos sobre as técnicas da microscopia eletrônica, pela amizade, confiança e disposição em ajudar.

Aos amigos, colegas de profissão e de laboratório Jocemar Ilha e Patrícia Severo do Nascimento, os quais nunca mediram esforços para auxiliar nas diversas etapas deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Rafaela, Simone, Pedro, Gisele e Régis, pela amizade e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, tornando-o viável.

Agradeço à Moema e à Cristiane, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, pela disposição em ensinar e ajudar.

Aos professores do PPG Neurociências pelos ensinamentos e orientação, aos funcionários do biotério do ICBS - UFRGS pelos cuidados aos animais e a todas as pessoas que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a toda a minha família, especialmente aos meus dois filhos e ao meu marido, pelo sentido que dão à minha vida e às minhas escolhas.

Finalmente, agradeço aos meus anjos (meu irmão e meus avôs) por, de alguma forma, estarem guiando o meu caminho.

Muito obrigada

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	Xii
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Insulina	16
1.1.1 Mecanismos de ação da insulina.....	17
1.1.2 Efeitos metabólicos da ausência da insulina.....	23
1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1	29
1.2.1 Modelo experimental do diabetes tipo 1.....	30
1.3 Neuropatia diabética	33
1.3.1 Incidência.....	33
1.3.2 Quadro clínico e achados patológicos.....	33
1.3.3 Patogênese.....	36
1.4 Lesões dos nervos periféricos	42
1.5 Regeneração nervosa periférica	45
1.5.1 Regeneração nervosa no diabetes experimental.....	50
1.6 O exercício físico no diabetes	52
2 JUSTIFICATIVA.....	58
3 OBJETIVOS.....	60
3.1 Objetivo geral	60
3.2 Objetivos específicos	60
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.1 Experimento 1	62
4.1.1 Modelo Animal.....	62
4.1.2 Grupos experimentais.....	62
4.1.3 Indução do diabetes.....	63
4.1.4 Procedimento cirúrgico.....	64
4.1.5 Teste de esforço máximo.....	65
4.1.6 Treinamento físico	66
4.1.7 Avaliação da função motora do membro posterior.....	67
4.1.8 Análise morfométrica do nervo isquiático.....	69
4.1.9 Análise estatística	71
4.2 Experimento 2	72
4.2.1 Modelo Animal.....	72
4.2.2 Grupos experimentais.....	72
4.2.3 Indução do diabetes.....	73
4.2.4 Procedimento cirúrgico.....	73
4.2.5 Teste de esforço máximo.....	73
4.2.6 Treinamento físico	73
4.2.7 Análise morfológica do músculo sóleo.....	73
4.2.8 Análise estatística	76

5 RESULTADOS	77
5.1 Experimento 1 – Primeiro artigo: Beneficial effects of treadmill training in experimental diabetic nerve regeneration	77
5.2 Experimento 2 – Segundo artigo: Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration	104
6 DISCUSSÃO	132
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148

RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever os efeitos do treinamento físico sobre a regeneração nervosa periférica no diabetes experimental. Ratos Wistar machos foram aleatoriamente distribuídos nos grupos não-diabético (ND; n=6), não-diabético treinado (NDT; n=6), não-diabético com lesão isquiática por esmagamento (NDE; n=6), não-diabético com lesão isquiática por esmagamento e treinado (NDET; n=6), diabético (D; n=6), diabético treinado (DT; n=8), diabético com lesão isquiática por esmagamento (DE; n=9) ou diabético com lesão isquiática por esmagamento e treinado (DET; n=7). O diabetes foi induzido pela injeção intravenosa de estreptozotocina (50 mg/kg) e o treinamento na esteira ergométrica (2X ao dia, 5 dias/semana/10 semanas) foi iniciado 4 semanas após o esmagamento cirúrgico do nervo isquiático direito. Semanalmente após o procedimento cirúrgico a recuperação funcional da marcha foi monitorada através do índice de funcionalidade no nervo isquiático (IFI). Testes de esforço máximo foram realizados para cada rato antes (TEM 1), durante (TEM 2) e após o término do protocolo de treinamento físico (TEM 3). A glicemia capilar e o peso corporal foram monitorados desde o início até o final do protocolo experimental. Os animais foram mortos e porções do nervo isquiático (segmento proximal e segmento distal à lesão) e do músculo sóleo foram retiradas, seccionadas transversalmente e usadas para análises histomorfométricas. Adicionalmente também foram realizadas análises ultraestruturais de secções transversais e longitudinais do músculo sóleo. Os TEM 1 dos grupos DE e DET foram menores que os valores do grupo ND ($p=0,001$) e os grupos NDET e DET mostraram progressivo aumento nos valores de TEM ao longo do período de treinamento ($p<0,05$). Não houve alterações nos valores de TEM nos grupos sedentários. Os grupos NDE, NDET, DE e DET atingiram valores normais de IFI na 4^a, 4^a, 9^a e 7^a semana após a lesão nervosa,

respectivamente. Após 13 semanas da lesão isquiática por esmagamento, o segmento distal do nervo de todos os grupos lesionados e o segmento proximal do grupo DE apresentaram parâmetros histomorfométricos anormais, como diminuição do diâmetro de fibras nervosas mielínicas ($\sim 7,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ vs $\sim 4,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$), do diâmetro axonal ($\sim 5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ vs $\sim 3,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$) e da espessura da bainha de mielina ($\sim 1,2 \pm 0,07 \mu\text{m}$ vs $\sim 0,65 \pm 0,07 \mu\text{m}$) e um aumento do percentual de área ocupada conjuntamente por endoneuro, tecido de degeneração e fibras amielínicas ($\sim 28 \pm 3\%$ vs $\sim 60 \pm 3\%$). Em adição, no grupo NDE, o segmento proximal do nervo mostrou uma diminuição do diâmetro das fibras mielinizadas ($7,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ vs $5,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$) e da espessura da bainha de mielina ($1,29 \pm 0,08 \mu\text{m}$ vs $0,92 \pm 0,08 \mu\text{m}$). As alterações histomorfométricas do segmento proximal dos grupos DE e NDE foram prevenidas/revertidas a valores similares aos atingidos pelo grupo ND pela prática do treinamento físico. Foram observadas maiores densidades e menores áreas de fibras musculares nos grupos DE (468 fibras/ mm^2 ; $1647,1 \mu\text{m}^2$) e DET (385 fibras/ mm^2 ; $1839,4 \mu\text{m}^2$) quando comparados com os outros grupos ($p < 0,05$). No grupo DET a densidade de fibras musculares e o percentual de pequenas fibras musculares foram menores que no grupo DE. O grupo DE mostrou desalinhamento dos sarcômeros das linhas-Z, alterações estruturais nos vasos sanguíneos, sarcolema e na forma do núcleo e de mitocôndrias. No grupo DET as fibras musculares e os vasos sanguíneos apresentaram aspecto muito similar ao normal. Adicionalmente este grupo apresentou polirribossomos, retículo sarcoplasmático rugoso, complexo de Golgi desenvolvido e novas miofibrilas localizadas entre condensações de mitocôndrias localizadas próximas ao sarcolema e ao núcleo. Nossos achados indicam que em ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático, o diabetes causa atraso na regeneração nervosa assim como atrofia e alterações ultraestruturais no músculo sóleo. O treinamento físico pode acelerar a recuperação funcional da marcha em ratos diabéticos lesionados, prevenir/reverter alterações histomorfométricas do segmento proximal do nervo isquiático de ratos não-diabéticos e

diabéticos lesionados e reverter parcialmente as alterações morfológicas do músculo sóleo de ratos diabéticos lesionados.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the effects of physical training in the peripheral nerve regeneration in experimental diabetic. Male Wistar rats were assigned to either a non-diabetic (N; n=6), trained non-diabetic (TN; n=6), non-diabetic with sciatic nerve crush (NC; n=6), trained non-diabetic with sciatic nerve crush (TNC; n=6), diabetic (D; n=6), trained diabetic (TD; n=8), diabetic with sciatic nerve crush (DC; n=9) or trained diabetics with sciatic nerve crush group (TDC; n=7). Diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin (50 mg/kg) and treadmill training (twice a day, 5 days/week/10 weeks) was begun 4 weeks after right sciatic nerve crush, realized surgically. Over the period after surgical procedures, functional recovery was monitored weekly using the sciatic functional index (SFI). Maximal exercise tests were performed for each rat before (MET 1), at the middle (MET 2) and at the end of the training protocol (MET 3). Glycemia and body weight were monitored since began until the end of experimental protocol. Animals were killed and the right proximal and distal sciatic nerve portions (PS and DS, respectively) and soleus muscle portions were cross-sectioned and used in histomorphometrical analysis. In addition, soleus muscle transverse and longitudinal sections were used to ultrastructural analyses. The MET1 of the DC and TDC groups was lower than the values of the N group ($p=0.001$) and the TNC and TDC groups showed a progressive increase in MET values along the training period ($p<0.05$). There were no significant alterations in MET values in the sedentary groups over time. The NC, TNC, DC and TDC groups attained normal SFI from the 4th, 4th, 9th to the 7th week after injury, respectively. At post-injury week 13, the distal nerve portion of all injured groups and the proximal nerve portion of the diabetic with sciatic nerve crush group presented altered morphometric parameters, such as decreased myelinated fiber diameter ($\sim 7.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ vs

~4.8±0.2µm), axonal diameter (~5±0.2µm vs ~3.5±0.1µm) and myelin sheath thickness (~1.2±0.07µm vs ~0.65±0.07µm) and an increase in the percentage of area occupied by endoneurium (~28±3% vs ~60±3%). In addition, in the non-diabetic with sciatic nerve crush group the proximal nerve portion showed a decreased myelinated fiber diameter (7.4±0.3µm vs 5.8±0.3µm) and myelin sheath thickness (1.29±0.08µm vs 0.92±0.08µm). Morphometric alterations in the proximal nerve portion of the diabetic with sciatic nerve crush and non-diabetic with sciatic nerve crush groups were either prevented/reverted to values similar to the non-diabetic group by treadmill training. The soleus muscle showed higher fiber density and a smaller average muscle fiber area in both the DC (468 fiber/mm²; 1647.1 µm²) and TDC (385 fiber/mm²; 1839.4 µm²) groups when compared with the others groups (p<0.05). Furthermore, in the TDC group the muscle fiber density and percentage of small muscle fiber area were lower than in the DC. The DC group showed misalignment of the sarcomeres and Z-lines, and structural alterations in the blood vessels, sarcolemma and in the shape of the nucleus and mitochondria. In the TDC group the myofibers and blood vessels were seen to have a similar, normal aspect. Additionally, polyribosomes, rough sarcoplasmic reticulum, developed Golgi apparatus and new myofibrils were observed located among condensed mitochondria near of the sarcolemma. We conclude that in rats with sciatic nerve crush nerve, the diabetic condition promoted delay in sciatic nerve regeneration and soleus muscle atrophy and ultrastructural alterations. The physical training could accelerate motor functional recovery of injured diabetic rats, prevent/revert morphometric alterations in proximal nerve portions in non-diabetic and diabetic injured rats and partially revert the morphologic alterations of the soleus muscle in diabetic injured rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de ação da insulina nas células.....	19
Figura 2: Regulação do fluxo de glicose através da insulina.....	21
Figura 3: O efeito da insulina no fluxo total de combustíveis.....	22
Figura 4: Metabolismo na ausência da insulina.....	25
Figura 5: Efeitos da ausência da insulina. Fisiopatologia aguda do diabetes mellitus do tipo 1.....	28
Figura 6: Proposta de mecanismo de ação da estreptozotocina na célula β pancreática, no desenvolvimento do diabete insulino-dependente.....	32
Figura 7: Diagrama esquemático da regeneração nervosa.....	48
Figura 8: Patogênese do déficit na capacidade regenerativa no diabetes.....	52
Figura 9: Esquema representando o local da lesão por esmagamento do nervo isquiático.....	64
Figura 10: Esteira ergométrica adaptada para ratos.....	66

ARTIGO 1

Figure 1: Time course line showing the 17 weeks of the experimental procedures and weeks used to assess motor activity after surgical procedures before beginning the training program and after each week of the training period.....	83
Figure 2: Graphs showing functional recovery before beginning the training program and after each week of the training period in non-diabetic, non-diabetic with sciatic nerve crush, trained non-diabetic with sciatic nerve crush, diabetic submitted to sciatic	

nerve crush and trained diabetic submitted to sciatic nerve crush groups.....	91
Figure 3: Digitized images of semithin cross-sections obtained from the proximal and distal portions of the sciatic nerve from different groups in this study.....	92
Figure 4: Graphs showing the morphometrical parameters in the proximal and distal portions of the sciatic nerve from different groups in this study.....	93
Figure 5: Graphs showing the morphometrical parameters in the proximal and distal portions of the sciatic nerve from different groups in this study.....	95

ARTIGO 2

Figure 1: Digitalized images of transverse semithin sections of the right soleus myofibers from the non-diabetic group, non-diabetic with sciatic nerve crush group, diabetic group, diabetic with sciatic nerve crush group and trained diabetic with sciatic nerve crush group.	113
Figure 2: Graphs show the mean cross-sectional soleus myofiber area, density of the myofibers, percentage of total area occupied by myofibers and percentage of total area occupied by interstitial connective tissue.	114
Figure 3: Frequency histograms of the soleus fiber cross-sectional area.....	115
Figure 4: Electron micrographs of soleus muscle from the control (A-D) and non-diabetic (E-G) groups.	117
Figure 5: Electron micrographs of soleus muscle from the diabetic group.	118
Figure 6: Electron micrographs of soleus muscle from the diabetic with sciatic nerve crush group.	119
Figure 7: Electron micrographs of soleus muscle from the trained diabetic with sciatic nerve crush group.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais da glicação não-enzimática
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator de crescimento derivado do cérebro
CCK	Colecistocinina
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
D	Grupo diabético
DE	Grupo diabético submetido ao esmagamento do nervo isquiático
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DET	Grupo diabético submetido ao esmagamento do nervo isquiático e ao treinamento físico
DT	Grupo diabético submetido ao treinamento físico
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblasto – 2
GDNF	Fator neurotrófico derivado das células gliais
GIP	Peptídeo inibitório gástrico
GLP-1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GLUT	Transportador de glicose
GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Glutationa oxidada
IFI	Índice de funcionalidade isquiática
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IRS	Substratos do receptor de insulina
ITS	Expansão intermediária dos dedos
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD1	Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 1
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Na ⁺ K ⁺ ATPase	Bomba de sódio e potássio
ND	Grupo não-diabético
NDE	Grupo não-diabético submetido ao esmagamento do nervo isquiático
NDET	Grupo não-diabético submetido ao esmagamento do nervo isquiático e ao treinamento físico
NDT	Grupo não-diabético submetido ao treinamento físico
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
PKC	Proteína quinase C
PKA	Proteína quinase A
PL	Comprimento da marca da pata
SEM	Erro padrão da média
STZ	Estreptozotocina
TEM	Teste de esforço máximo
TF	Tampão fosfato 0,1M
TS	Expansão dos dedos
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo

ARTIGO 1

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
D	Diabetic group
DC	Diabetic with sciatic nerve crush group
ITS	Intermediary toe spread
MET	Maximal exercise test
N	Non-diabetic group
NC	Non-diabetic with sciatic nerve crush group
NT-3	Neurotrophin 3
PB	Phosphate buffer
PL	Print length
SFI	Sciatic functional index
STZ	Streptozotocin
TD	Trained diabetic group
TDC	Trained diabetic with sciatic nerve crush group
TN	Trained non-diabetic group
TNC	Trained non-diabetic with sciatic nerve crush group
TS	Toe spread

ARTIGO 2

A	A-Band
BM	Basement membrane
bv	Blood vessel

C	Control group
D	Diabetic group
DC	Diabetic with sciatic nerve crush group
En	Vascular endothelium
Fib	Fibroblast
G	Glycogen granules
Go	Golgi apparatus
I	I-band
Ld	Lipid droplet
M	M-line
MET	Maximal exercise test
MF	Myofibers
Mf	Myofibrils
Mit	Mitochondria
N	Non-diabetic group
NC	Non-diabetic with sciatic nerve crush group
NT-4	Neurotrophin 4
PB	Phosphate buffer
R	Ribosomes
ROS	Reactive oxygen-species
S	Sarcolemma
T	T-tubules
TDC	Trained diabetic with sciatic nerve crush group
Vac	Vacuoles
Z	Z-line

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus Tipo 1, responsável por cerca de 10% dos casos de diabetes, é definido como um distúrbio crônico caracterizado por uma deficiência absoluta da insulina, o que causa hiperglicemia, determinante principal de complicações agudas e crônicas da doença (BERNE et al., 2004). Dentre as complicações sintomáticas observadas no diabetes a mais frequente é a neuropatia diabética, a qual ainda não possui um tratamento definitivo e bem estabelecido (YASUDA et al., 2003). Assim, vários procedimentos terapêuticos têm sido estudados com o objetivo de prevenir a progressão dos sintomas neuropáticos e promover a regeneração nervosa periférica.

Considerando a importância que tem sido dada à prática do treinamento físico no tratamento do paciente com diabetes mellitus e a importância da regeneração para a melhora do quadro de neuropatia diabética, nosso trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da caminhada em esteira sobre a regeneração nervosa periférica em um modelo de diabetes experimental.

Este capítulo aborda os mecanismos de ação da insulina e os efeitos de sua ausência, o diabetes mellitus Tipo 1 e seu modelo experimental, a neuropatia diabética, a lesão nervosa periférica, a regeneração nervosa e o treinamento físico no diabetes.

1.1 INSULINA

A insulina humana é um hormônio secretado pelas células beta (β) das ilhotas pancreáticas. Trata-se de um polipeptídeo de 51 aminoácidos, com peso molecular de 5.808 kDa e com meia-vida plasmática de cinco a seis minutos. É composta por duas cadeias

peptídicas ligadas entre si por duas pontes dissulfídicas, a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos. A insulina é metabolizada largamente nos rins e no fígado por enzimas específicas que dividem as ligações dissulfídicas e se separam as cadeias A e B e por associação a seu receptor de membrana plasmática após ser internalizado pelas células-alvo (GUYTON e HALL, 1998; BERNE et al., 2004; CARROLL, 2007).

As ilhotas pancreáticas, estrategicamente localizadas, liberam insulina em resposta ao fluxo de nutrientes do intestino e em resposta aos secretagogos intestinais. Uma elevação nos níveis sanguíneos de glicose resulta em captação da glicose pelas células β , facilitada por uma proteína transportadora de glicose que independe da insulina, GLUT-2, e dando origem a uma liberação imediata de insulina. Os hormônios das ilhotas são secretados na veia pancreática e então na veia porta, onde se misturam ao fluxo de nutrientes após a refeição (BERNE et al., 2004).

1.1.1 Mecanismos de ação da insulina

Os efeitos da insulina são amplos, envolvem muitos órgãos e vias intracelulares e são metabolicamente críticos (Fig. 1). A insulina interage com suas células-alvo unindo-se primeiro a uma proteína receptora na membrana com peso molecular de cerca de 300.000, formada por quatro subunidades distintas unidas por duas ligações dissulfeto: duas subunidades glicoprotéicas α situadas totalmente fora da membrana celular e duas subunidades β que atravessam a membrana se projetando no citoplasma da célula. A insulina liga-se às subunidades α fora da célula e promove uma alteração conformacional que leva à agregação de receptores. Subsequentemente o complexo hormônio-receptor é internalizado por endocitose, o hormônio é degradado e o receptor pode ser degradado, internalizado ou reciclado de volta para a membrana plasmática. A insulina ligando-se a seu receptor faz com

que ocorram múltiplos eventos na membrana plasmática, no citoplasma e no núcleo da célula-alvo, embora nem todas as moléculas envolvidas e os mecanismos tenham sido elucidados (BERNE et al., 2004).

Com a ligação da insulina nas subunidades α do receptor, a transdução do sinal inicial ocorre via ativação da tirosina quinase do receptor que reside nas subunidades β . Possivelmente isso ocorra por uma alteração conformacional transmitida através da molécula do receptor. Essa ativação gera autofosforilação por ATP dos locais intracelulares da subunidade β em três tirosinas principais no domínio catalítico. A tirosina quinase do receptor então fosforila tirosinas em substratos do receptor de insulina homólogos e específicos (IRS). Assim nestes substratos, geralmente por envolvimento de fosforilação da serina e treonina, ocorre ativação de inúmeras outras proteínas quinases, proteínas fosfatases e proteínas facilitadoras que se ligam às proteínas G da membrana, fosfolipases e canais iônicos. Como resultado destas fosforilações ocorrem várias cascatas de eventos que levam a translocação de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) das vesículas citosólicas para a membrana plasmática, ativação ou desativação de inúmeras enzimas no metabolismo da glicose e dos ácidos graxos e reprimem ou transcrevem genes no núcleo da célula-alvo (BERNE et al., 2004; Fig. 1).

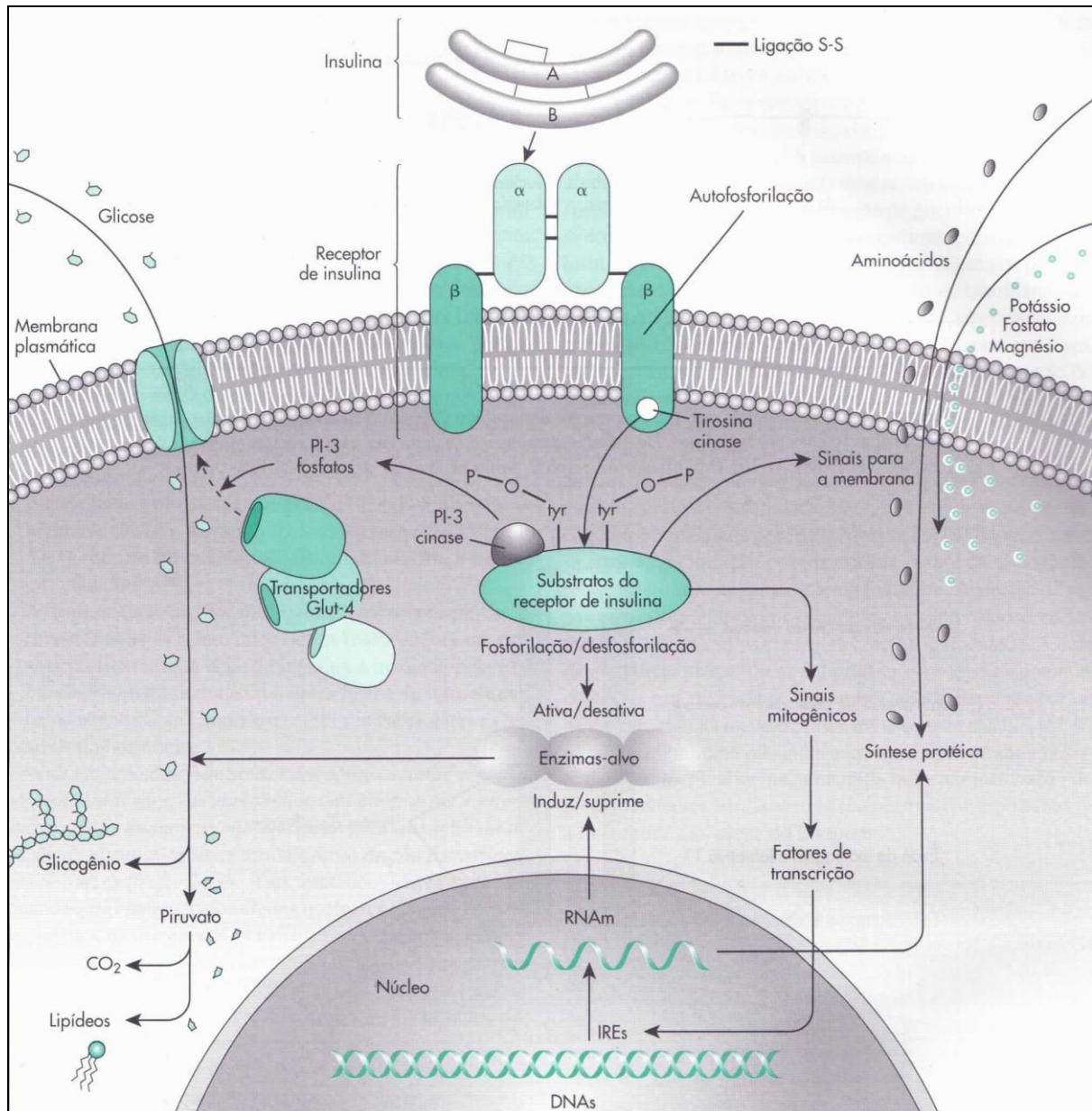


Figura 1: Mecanismos de ação da insulina nas células. A insulina liga-se às subunidades α do seu receptor e provoca a ativação da tirosina quinase do receptor que reside nas subunidades β . A tirosina quinase então fosforila substratos do receptor de insulina. Estes últimos começam uma cascata de fosforilações de serina e treonina, que ativam ou desativam enzimas-alvo do metabolismo da glicose. A ativação da fosfoinosítídeo fosfato 3-quinase (PIP-3K) gera inositol 3,4,5-trifosfato (PI-3 fosfatos) que causa translocação de transportadores de glicose para a membrana plasmática, onde eles facilitam a entrada de glicose. De forma independente, as entradas de aminoácidos, potássio, magnésio e fosfato na célula são facilitadas. A ligação de outras proteínas reguladoras aos substratos do receptor da insulina inicia mais cascatas que estimulam ou reprimem a transcrição gênica via elementos responsivos à insulina (IREs) nas moléculas de DNA. As enzimas mitogênicas também são ativadas e aumentam os fatores de transcrição necessários para estimular a expressão dos genes ligados ao crescimento celular (BERNE et al., 2004).

A insulina promove a captação, o armazenamento e a rápida utilização da glicose especialmente pelos músculos, tecido adiposo e fígado, ao mesmo tempo em que, simultaneamente, inibe a produção de glicose. Assim, a insulina ativa enzimas para a

glicólise, glicogênese e lipogênese e, simultaneamente, inibe enzimas para a glicogenólise, gliconeogênese e lipólise (CARROL, 2007).

A insulina aumenta o transporte de glicose para dentro de muitas, mas não todas as células sensíveis à insulina. A maioria das células do cérebro e os epitélios transportadores dos rins e intestino, não exigem insulina para a glicose ser utilizada em seu metabolismo. No entanto, áreas selecionadas do encéfalo, principalmente o hipotálamo e o endotélio capilar dos seus vasos adjacentes contém receptores de insulina e são responsivas a ela (BERNE et al., 2004). Já o tecido adiposo e o muscular esquelético em repouso exigem insulina para a captação de glicose. Sem insulina, em cerca de 3 a 5 minutos, seus transportadores GLUT-4 são retirados da membrana e armazenados em vesículas citoplasmáticas para serem reutilizadas na medida do necessário. Quando o receptor da insulina é ativado, a cascata de transdução do sinal resultante promove a translocação dos transportadores para a membrana celular. As células então obtêm a glicose do fluido intersticial por difusão facilitada. Dessa forma a insulina estimula o transporte de glicose pelo aumento do número de proteínas transportadoras GLUT-4 funcionais (SILVERTHORN, 2003; Fig. 2 A,B). A insulina também aumenta a atividade do transportador de glicose. Já a transcrição do gene GLUT-4 é estimulada mais lentamente (BERNE et al., 2004).

A glicose transportada para dentro dos hepatócitos e das células β do pâncreas não é diretamente regulada pela insulina e funciona facilitando o equilíbrio rápido da glicose entre os compartimentos intracelular e extracelular (COTRAN et al., 1996). As células têm transportadores GLUT-2 que estão sempre presentes na membrana celular. No estado alimentado, a insulina ativa a glicocinase hepática (hexoquinase), uma enzima que fosforila a glicose em glicose-6-fosfato. Esta reação mantém as concentrações de glicose intracelular livre baixa em relação ao fluido extracelular de modo que a glicose continuamente difunde-se para o hepatócito pelo transportador GLUT-2. No estado de jejum os hepatócitos convertem

os estoques de glicogênio e aminoácidos em glicose, a qual se difunde através dos transportadores de membrana para o sangue (SILVERTHORN, 2003; Fig. 2 C,D).

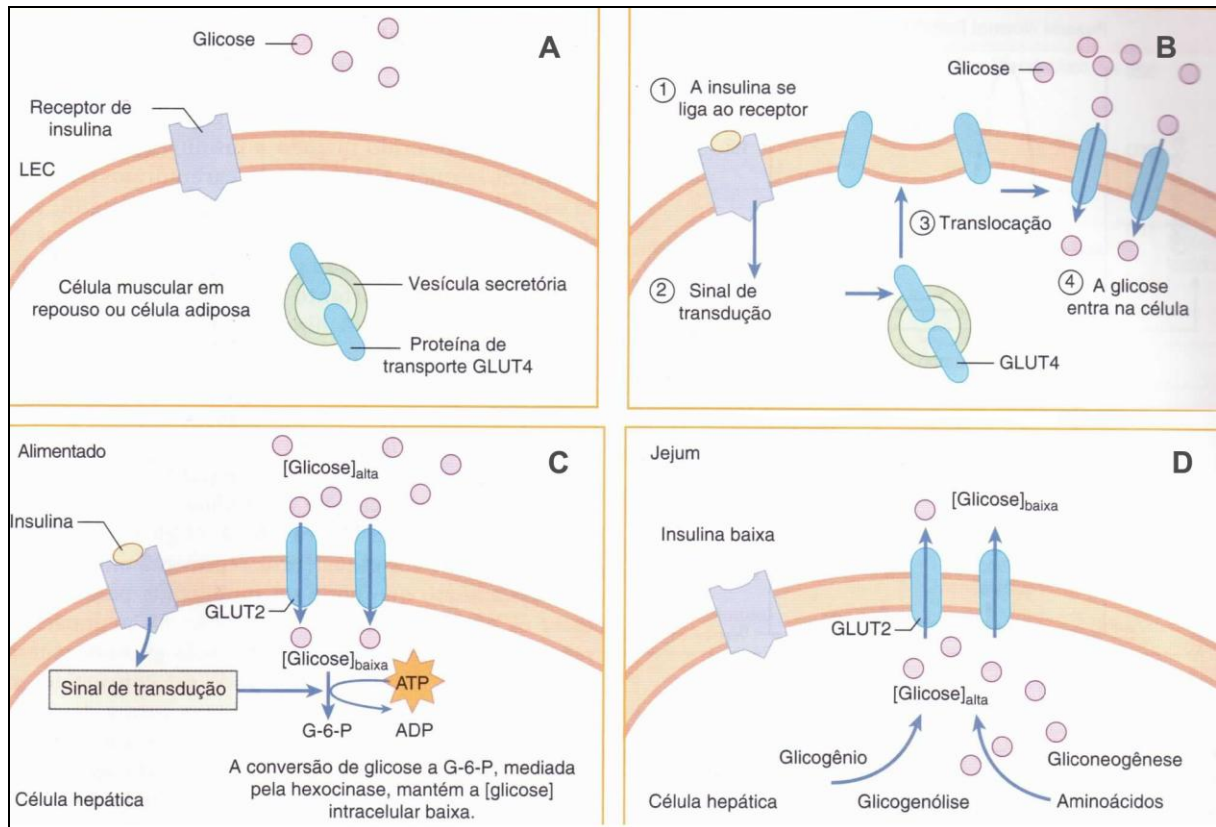


Figura 2: Regulação do fluxo de glicose através da insulina. Sem a ação da insulina a glicose não pode entrar na célula via transportador GLUT4 (A). No tecido muscular esquelético e no tecido adiposo, a glicose entra ou requer a ligação da insulina a um receptor de membrana e a translocação de GLUT4 para a membrana celular (B). Na célula hepática, no estado alimentado, a glicose é utilizada para formação de glicogênio e ácidos graxos (C) e, no jejum, as células hepáticas formam glicose a partir do glicogênio e aminoácidos e a transportam para o sangue (D) (CARROLL, 2007).

A insulina aumenta o depósito de gordura no tecido adiposo e inibe a mobilização e a oxidação dos ácidos graxos. Assim, através de vários efeitos distintos a insulina favorece o armazenamento de gordura no tecido adiposo: (a) aumenta a utilização de glicose em muitos tecidos corporais, o que diminui a utilização de gordura; (b) após a saturação do armazenamento hepático de glicogênio, a glicose adicional que chega ao fígado é convertida em ácidos graxos. De forma semelhante, o excesso de aminoácidos é convertido em ácidos graxos e transformado em triglicerídeos pelo fígado. As células hepáticas liberam ácidos

graxos e triglicerídeos no plasma. Glicose, ácidos graxos e ácidos graxos derivados da ação da lipase sobre os triglicerídeos plasmáticos são absorvidos pelas células adiposas e utilizados para o armazenamento de gordura; (c) inibe a ação da lipase sensível a hormônios a qual causa hidrólise dos ácidos graxos já armazenados no tecido adiposo; (d) a glicose transportada para dentro dos adipócitos é convertida em α -glicerofosfato, que é utilizado na esterificação dos ácidos graxos e permite seu armazenamento em triglicerídeos. Uma menor parte da glicose também pode ser convertida em ácidos graxos (BERNE et al., 2004; Fig. 3).

A insulina facilita o transporte de muitos aminoácidos e aumenta a permeabilidade dos íons potássio, dos íons magnésio e dos íons fosfato através da membrana celular (GUYTON e HALL, 1998). Além disso, estimula enzimas para síntese de proteínas e inibe enzimas que promovem a quebra de proteínas, sustentando assim a hipertrofia e hiperplasia celulares. A insulina reduz a gliconeogênese, novamente, preservando os depósitos de aminoácidos (CARROLL, 2007; Fig. 3).

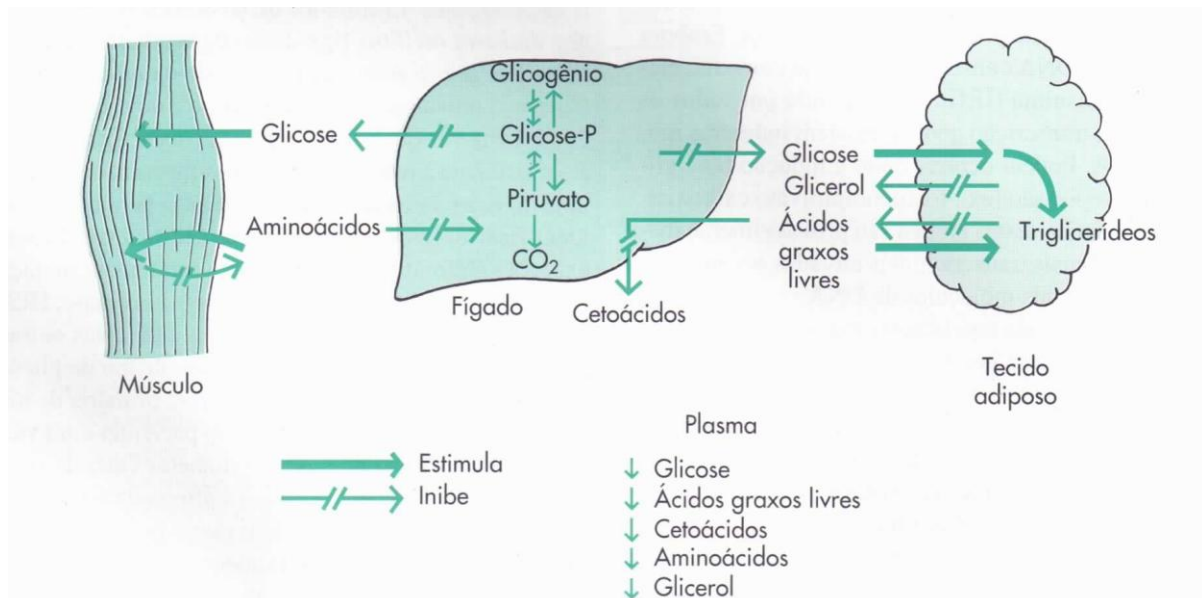


Figura 3: O efeito da insulina no fluxo total de combustíveis resulta em captação tissular de glicose, ácidos graxos livres e aminoácidos, diminuindo seus níveis plasmáticos. A liberação de glicose, de ácidos graxos livres, de glicerol e de aminoácidos é inibida, resultando em redução nos níveis plasmáticos destes substratos (BERNE et al., 2004).

Durante 10 a 15 minutos, após a sua liberação a insulina altera os níveis de atividade de ainda muitas outras enzimas metabólicas intracelulares. Esses efeitos decorrem principalmente da alteração do estado de fosforilação das enzimas (GUYTON e HALL, 1998). Efeitos ainda muito mais lentos continuam a ocorrer durante horas e até mesmo durante vários dias. Eles decorrem do aumento da velocidade da tradução dos RNAs mensageiros nos ribossomos para a formação de novas proteínas; efeitos ainda mais lentos resultam no aumento da velocidade de transcrição de certas sequências genéticas do DNA no núcleo celular dando assim origem a maior quantidade de RNA e a uma síntese ainda maior de proteínas. Assim a insulina remodela grande parte da maquinaria enzimática celular para alcançar seus objetivos metabólicos. Dessa forma, como a insulina atua de forma sinérgica com hormônio do crescimento promovendo a formação de proteínas e impedindo a sua degradação, proporcionando assim o crescimento corporal (GUYTON e HALL, 1998).

1.1.2 Efeitos metabólicos da ausência da insulina

Na ausência da insulina, a digestão e absorção de nutrientes continuam normalmente já que o transporte através do intestino independe da insulina. Como a insulina é um dos principais hormônios anabólicos no organismo, quando ela está ausente ou deficiente, as células assumem um metabolismo catabólico, afetando não apenas o metabolismo da glicose, mas também o metabolismo das gorduras e das proteínas. O resultado é perda de massa corporal magra, tecido adiposo e líquidos corporais. Além disso, balanços negativos como os do nitrogênio, potássio, fosfato e magnésio se desenvolvem conforme estas substâncias são excretadas pela urina (BERNE et al., 2004).

Quando a glicose absorvida no intestino chega ao fígado, o transporte para os hepatócitos é limitado, pois a via metabólica que utiliza a glicose não é estimulada pela

insulina. Dessa forma a concentração intracelular do hepatócito aumenta, a difusão mostra-se diminuída e aumentam os níveis sanguíneos de glicose. Tecidos que não são insulino-dependentes, tais como o cérebro, processam o metabolismo da glicose normalmente. No entanto, na ausência da insulina a assimilação de glicose no tecido muscular e no tecido adiposo é abolida. Sem a insulina para estimular o transporte e o metabolismo da glicose, as células entram num estado de jejum que estimula a glicogenólise hepática e muscular e o aumento da glicose sanguínea (SILVERTHORN, 2003; Fig. 4). A glicose adicional ou o ATP podem ser produzidos através de aminoácidos, particularmente aqueles das proteínas musculares. Enzimas removem os grupos amino dos aminoácidos e os convertem em uréia que é excretada. Alguns aminoácidos desaminados tornam-se intermediários no ciclo do ácido tricarboxílico e produzem ATP. Outros aminoácidos também podem ser processados para formar piruvato, o qual é convertido em glicose pelo fígado (SILVERTHORN, 2003). Assim, com a deficiência da insulina ocorrerá proteólise e os aminoácidos glicogênicos são removidos pelo fígado e utilizados na gliconeogênese (CARROLL, 2007; Fig.4).

O armazenamento de glicogênio no fígado e nos músculos cessa e o fígado fica inapto para reconhecer que as concentrações de glicose plasmática estão altas. Conseqüentemente são iniciadas a glicogenólise e a gliconeogênese para produzir mais glicose, o que também aumenta a hiperglicemia (SILVERTHORN, 2003).

A ausência de insulina aumenta o uso de gorduras como substrato metabólico. A lipase sensível a hormônios, presente nas células adiposas, passa a ser fortemente ativada. Isto ocasiona hidrólise dos estoques de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. O glicerol vai para o fígado e pode ser convertido em glicose e os ácidos graxos são liberados do sangue e utilizados como fonte de energia por muitos tecidos, exceto no encéfalo. O excesso de ácidos graxos no plasma também promove a conversão, pelo fígado, de alguns ácidos graxos em fosfolípídeos e colesterol. Estas duas substâncias, juntamente com os triglicerídios em

excesso, são liberadas no sangue, acondicionadas sob a forma de lipoproteínas. Essa elevada concentração de lipídeos leva ao rápido desenvolvimento de aterosclerose em pessoas com diabetes (GUYTON e HALL, 1998; Fig. 4).

A β -oxidação dos ácidos graxos passa a ser a via metabólica primária, produzindo acetil coenzima A (acetil-CoA) e alimentando o ciclo do ácido tricarboxílico. Se existir uma grande demanda para a quebra de ácidos graxos, a β -oxidação no fígado resultará na formação de corpos cetônicos. Estes são transportados do fígado para outras células que os convertem em acetil CoA. As cetonas (ácido acetoacético e ácido β -hidroxibutirato) são ácidos moderadamente fortes, de forma que, a excessiva produção de cetonas leva a um estado de acidose conhecido como cetoacidose. Dessa forma, a falta de insulina acarreta um excesso de concentração plasmática de cetonas (cetose), que pode levar à acidose metabólica e ao coma diabético (CARROLL, 2007; SILVERTHORN, 2003; Fig. 4).

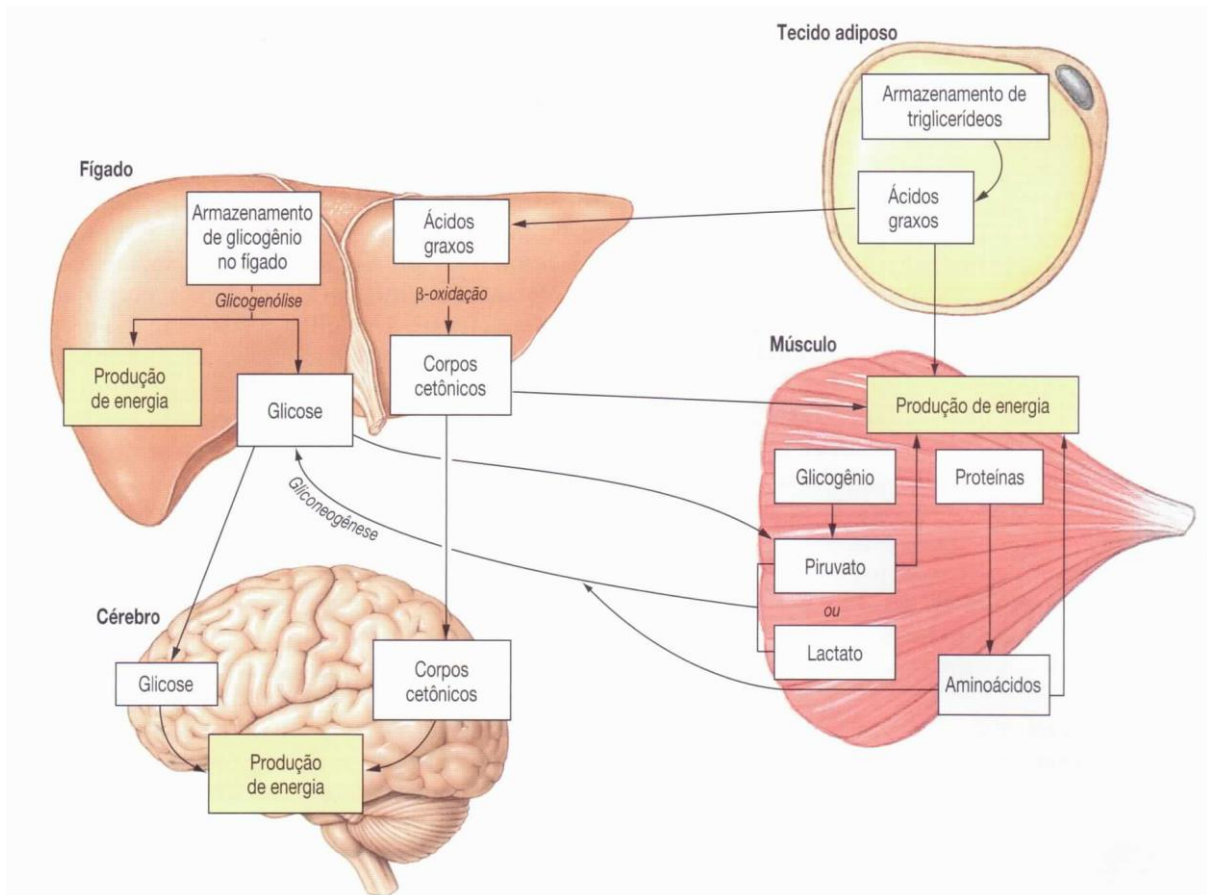


Figura 4: Esquema representando o metabolismo na ausência da insulina (SILVERTHORN, 2003).

Ocorre uma percepção de hipoglicemia pelos sensores da glicose na veia portal e no hipotálamo, que estimula o débito de glicose via ativação do sistema nervoso simpático (BERNE et al., 2004). Dessa forma, os centros encefálicos que controlam a ingestão de comida não reconhecem a hiperglicemia, levando à alimentação excessiva, ou polifagia (COTRAN et al., 1996). Ocorre também uma percepção de hipoglicemia pelas células das ilhotas pancreáticas, que então secretam o antagonista da insulina, o glucagon (BERNE et al., 2004). A hiperglicemia de jejum pode alcançar níveis muito acima dos normais e, quando o nível de glicose circulante ultrapassa o limiar renal para a glicose, a reabsorção de glicose no túbulo proximal do rim torna-se saturada e conseqüentemente haverá glicosúria. Geralmente este extravasamento de glicose ocorre quando o nível sanguíneo da mesma se eleva acima de 180 mg/dL (GUYTON e HALL, 1998). A glicosúria excessiva induz a diurese osmótica e conseqüentemente, poliúria, acarretando uma grande perda de água e de eletrólitos. A desidratação resultante da diurese osmótica leva ao decréscimo do volume de sangue circulante. Com a queda da pressão arterial os mecanismos homeostáticos atuam aumentando a secreção do hormônio antidiurético (ADH), aumentando a sede (polidipsia) e gerando compensações cardiovasculares para normalizar a pressão (COTRAN et al., 1996). Se os mecanismos homeostáticos falham, ocorre diminuição da perfusão tecidual e aumento da glicólise anaeróbica, a qual produz ácido láctico. O ácido láctico deixa as células e entra no sangue, contribuindo para um estado de acidose metabólica (SILVERTHORN, 2003; Fig. 5).

Alterações osmóticas e a conversão da glicose em outros açúcares, como o sorbitol, podem causar edema do cristalino, visão turva e cataratas. Inúmeras proteínas, incluindo a hemoglobina, albumina e colágeno são glicadas de forma não enzimática o que contribui para o dano tissular em longo prazo da retina, rins, nervos e sistema cardiovascular (BERNE et al., 2004).

A cetoacidose diabética, complicação metabólica aguda importante do diabetes tipo 1, é estimulada por uma deficiência grave de insulina associada com aumentos absolutos ou relativos de glucagon. A deficiência de insulina acarreta desintegração excessiva dos depósitos de gordura, resultado em maiores níveis de ácidos graxos livres. A oxidação desses ácidos graxos livres dentro do fígado através de acetil-CoA produz corpos cetônicos acidificados. Glucagon, hormônio que acelera essa oxidação dos ácidos graxos, não é inibido pela insulina. A velocidade com que são formados os corpos cetônicos pode ultrapassar o ritmo com que o ácido acetoacético e ácido β -hidroxibutírico podem ser utilizados pelos músculos e outros tecidos. Conforme os cetoácidos fortes vão sendo neutralizados pelo bicarbonato de sódio, o ácido carbônico é formado e este se dissocia em dióxido de carbono e água. Os aminoácidos cetogênicos agravam os distúrbios do metabolismo lipídico. A cetogênese aumenta, resultando em cetonemia e cetonúria. Se a excreção urinária das cetonas for comprometida por desidratação, a concentração hidrogeniônica aumenta e resulta numa cetoacidose metabólica sistêmica (COTRAN et al., 1996; SILVERTHORN, 2003; Fig. 5).

A condição da cetoacidose diabética faz com que os pacientes exibam sintomas de acidose metabólica: ventilação aumentada, acidificação da urina e hipercalemia. Se não tratada, a combinação de acidose, com o pH sanguíneo que pode cair para menos de 6,8, e hipóxia a partir do colapso circulatório pode causar o coma e até mesmo a morte (SILVERTHORN, 2003).

Em associação com a falta de insulina ocorre uma secreção anormalmente alta de glucagon das células α das ilhotas. O glucagon estimula a glicogenólise no fígado e conseqüentemente contribui para aumentar a glicemia. Adicionalmente estimula a produção de enzimas hepáticas que convertem ácidos graxos em corpos cetônicos, contribuindo para o desenvolvimento da cetoacidose (FOX, 2007).

1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1

O diabetes mellitus é um dos mais importantes problemas de saúde mundial devido ao grande número de pessoas afetadas e à consequente incapacitação, mortalidade prematura e altos custos envolvidos no seu tratamento. Trata-se de uma doença comum em todos os países do mundo, que atinge cerca de 3 a 5% da população mundial e cerca de 7,6% da população brasileira com idade entre 30 e 69 anos. Acomete pacientes de todas as faixas etárias e sua incidência a partir dos 50 anos é de 10 a 15% (MALERBI e FRANCO, 1992).

O diabetes mellitus é definido como um distúrbio crônico caracterizado por uma deficiência absoluta ou relativa da insulina, o que causa hiperglicemia, determinante principal de complicações agudas e crônicas da doença. A deficiência primária da insulina como consequência da destruição seletiva das células β pancreáticas é conhecida como diabetes mellitus Tipo 1, responsável por cerca de 10% dos casos de diabetes (COTRAN et al., 1996). Esta doença geralmente se desenvolve na segunda infância, torna-se evidente e grave na puberdade e normalmente resulta de uma suscetibilidade genética conferida a um provável insulto ambiental que leva a um processo auto-imune destrutivo (COTRAN et al., 1996; BERNE et al., 2004).

A maioria das características patológicas pode ser atribuída aos efeitos principais da falta de insulina, como a menor utilização de glicose pelas células corporais com o consequente aumento da concentração sanguínea de glicose, aumento do sorbitol intracelular, glicação não enzimática de proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, aumento do estresse oxidativo, aumento da gliconeogênese, depleção de proteínas nos tecidos corporais, aumento da cetogênese e aumento da mobilização de gordura produzindo metabolismo lipídico anormal (COTRAN et al., 1996; GUYTON e HALL, 1998).

A morbidez associada com o diabetes de longa duração (10 a 15 anos de doença) resulta das complicações da doença, tais como aterosclerose, retinopatia, catarata, nefropatia e neuropatia diabética (COTRAN et al., 1996; GUYTON e HALL, 1998). Os sinais e sintomas que se originam do metabolismo alterado no diabetes mellitus incluem polifagia, polidipsia, poliúria, glicosúria, hiperglicemia, acidose diabética (aumento de ácido acetoacético e ácido β hidroxibutírico; GUYTON e HALL, 1998; BERNE et al., 2004). A insulina é baixa ou ausente e os níveis de glucagon estão aumentados. A intolerância à glicose é instável, sensível à administração exógena de insulina, aos desvios da ingestão dietética normal, à atividade física incomum, às infecções e outras formas de estresse. Assim, os pacientes com diabetes mellitus tipo 1 são suscetíveis a episódios de hipoglicemia, à desidratação e à cetoacidose diabética, as quais podem levar o paciente ao coma e à morte. Os pacientes diabéticos também possuem suscetibilidade às infecções, déficit dos mecanismos de defesa endógenos e vulnerabilidade dos tecidos a vários tipos de estresse (COTRAN et al., 1996; BENJAMIN e McMILLAN, 1998).

1.2.1 Modelo experimental do diabetes tipo 1

A estreptozotocina (STZ) tem sido amplamente utilizada na indução de diabetes experimental de vários animais de laboratório. Trata-se de um derivado N-nitroso da D-glucosamina que foi originalmente isolado através de culturas de *Streptomyces achromogenes* em 1960 (HERR et al., 1960; VAVRA et al., 1960). É descrito como um composto sólido incolor com peso molecular de 265 e decomposição a 115° com a formação de gás. É livremente solúvel em água e deve ser estocada em locais com temperatura abaixo de 20°C. Uma solução com a droga torna-se estável em pH próximo a 4,0 e baixa temperatura (RAKIETEN et al., 1963, HERR et al., 1967).

Este agente possui propriedades diabetogênicas por causar destruição seletiva das células β pancreáticas em ratos, cães, hamster, macacos, camundongos e cobaias (RAKIETEN et al., 1963; RERUP, 1970). As doses diabetogênicas variam entre as espécies. Em ratos, uma única injeção intravenosa de 50 mg/kg foi descrita como produzindo 100% diabetes (RAKIETEN et al., 1963).

Análises histológicas das ilhotas de Langerhans em ratos e cães tratados com STZ mostram rupturas das ilhotas e uma marcante diminuição ou completa ausência de grânulos nas células β do pâncreas (RAKIETEN et al., 1963). Evidência histológica de necrose das células β foi detectada pela análise ultraestrutural após 2 a 4 horas da injeção da droga, sendo que após 24 horas o conteúdo de insulina das células β é reduzido de 95 a 100% tornando-se permanentemente diabéticos (JUNOD et al., 1967; 1969; STAUFFACHER et al., 1970).

O transportador de glicose 2 (GLUT-2) expresso em células β do pâncreas (FUKUMOTO et al., 1988; THORENS, 1992; SCHNEDL et al., 1994) é mediador da captação de glicose pelas células β (SCHNEDL et al., 1994) e tem sido sugerido como mediador da captação celular da STZ (THORENS, 1992). A STZ causa fragmentação do DNA das células β pancreáticas de ratos através da formação de radicais livres de oxigênio, induzindo o reparo através da ativação da poli ADP-ribose sintetase nuclear a qual induz a uma redução nos níveis celulares de nucleotídeos e componentes relacionados, em particular NAD1, inibindo a síntese de pró-insulina e causando uma rápida necrose das células β (YAMAMOTO et al., 1981a; 1981b; OKAMOTO 1981; 1985a; 1985b; Fig. 6).

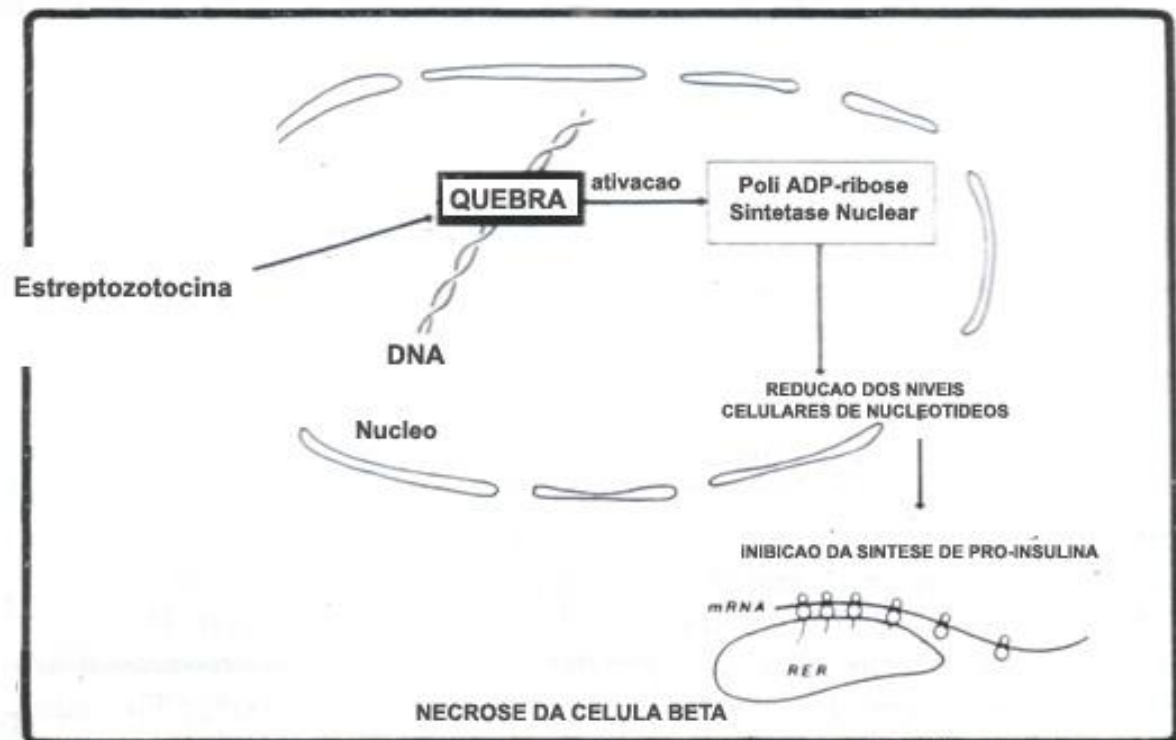


Figura 6: Proposta de mecanismo de ação da estreptozotocina na célula β pancreática, no desenvolvimento do diabetes insulino-dependente (adaptado de OKAMOTO, 1985a)

Os ratos com diabetes mellitus induzido por STZ, quando comparados com ratos normais, mostram aumento da glicose sanguínea, aumento dos ácidos graxos livres plasmáticos, aumento de corpos cetônicos e diminuição do glicogênio cardíaco (*in situ*) (MANSFORD e OPIE, 1968). Apresentam também muitas características semelhantes aos humanos com diabetes, como hiperglicemia, poliúria, hipoinsulinemia, glicosúria, perda de peso (JUNOD et al., 1969; JENSEN et al., 1981) e desta forma, é utilizado por muitos pesquisadores para estudar as complicações crônicas que ocorrem no diabetes mellitus tipo 1 em humanos (CAMERON e COTTER, 1997; DE ANGELIS et al., 2002a,b).

1.3 NEUROPATIA DIABÉTICA

1.3.1 Incidência

Dentre as complicações sintomáticas observadas no diabetes a mais frequente é a neuropatia diabética. A prevalência aumenta com a duração do diabetes e é acelerada pelo controle deficiente da mesma (FELDMAN et al., 1997), porém dados exatos sobre prevalência dependem do critério diagnóstico usado para identificar a neuropatia.

Se condições subclínicas não-sintomáticas forem consideradas então a prevalência atinge valores próximos a 100%. No entanto, para os clínicos, a neuropatia diabética é descrita como um estado clínico de lesão nervosa no qual os pacientes apresentam sintomas que incluem dor, parestesia, ou mostram ter déficits neurológicos que podem levar a problemas como o da perda de sensibilidade nos pés. Por esta definição, 20% dos pacientes terão neuropatia diabética. Muitos estudos sobre prevalência existem, porém, de acordo com os variados critérios diagnósticos e o tipo de população estudada, os resultados percentuais apresentam alta variação (WARD, 1997).

1.3.2 Quadro clínico e achados patológicos

A neuropatia diabética é uma complicação que pode afetar o sistema nervoso sensorial, motor e vegetativo. Sua progressão é insidiosa, surgindo primeiramente manifestações de distúrbios sensoriais, como parestesia e dor contínua, que podem lentamente dar lugar a uma condição anestésica, por consequência de perda de sinapses, axônios e neurônios. Esta condição anestésica predispõe o paciente a úlceras plantares e também pode ser considerada a precursora de eventuais amputações (totais ou parciais) de membro inferior. Os distúrbios

motores podem ser evidentes devido à atrofia muscular secundária à denervação. A neuropatia autonômica pode determinar gastroparesia, disfunção sexual, atonia da bexiga e disfunção cardiovascular, a qual pode estar relacionada à morte súbita (WARD, 1997; APFEL, 1999a; VINIK e MEHRABYAN, 2004).

Vários padrões distintos de anormalidades dos nervos periféricos relacionados com o diabetes já foram reconhecidos e podem ser classificados amplamente como neuropatia sensorial ou sensoriomotora simétrica distal, neuropatia autonômica e neuropatia assimétrica focal ou multifocal. Os indivíduos podem ser acometidos por qualquer combinação dessas lesões e, de fato, o mais comum destes padrões de lesão é a neuropatia simétrica que acomete os nervos sensoriais e motores distais. Muitos pacientes desenvolvem inicialmente déficits nos reflexos tendinosos nos membros inferiores, hipoestesia em distribuição em forma de luva e, tardiamente desenvolvem fraqueza distal (BRUYN e GARLAND, 1970; THOMAS e WARD, 1975; JOHNSON, 1997).

A redução na velocidade de condução nervosa dos nervos periféricos no diabetes está bem estabelecida como um marcador funcional da neurotoxicidade da glicose para as alterações patológicas celulares da neuropatia diabética (AREZZO, 1997; LIEWELYN et al., 2005). Este déficit ocorre precocemente em indivíduos pre-sintomáticos (ALBERS et al., 1997), parece ter seu início logo após o desenvolvimento da hiperglicemia e pode ser revertida rapidamente com a normoglicemia em pacientes (GREGERSEN, 1968; JOHNSON, 1997) e animais diabéticos (GREENE et al., 1975; TOMLINSON et al., 1986). A redução da velocidade de condução nervosa desenvolve-se em nervos sensoriais e motores de animais diabéticos (ELIASSON, 1964), entre a segunda e terceira semana após a indução da doença, sem correlação estrutural visível (GREENE et al., 1975) e tem sido bem correlacionada com escores clínicos (FEKI e LEFAUCHEUR, 2001) e com a incidência de úlceras plantares (BOULTON et al., 1983).

Tem sido verificado que a atrofia axonal (diminuição do diâmetro do axônio e espessura da mielina) precede a desmielinização, remielinização e degeneração axonal em modelos de axotomia e em neuropatia diabética experimental (BISBY, 1980; YASUDA et al., 2003).

Análises morfométricas do nervo periférico de STZ mostram progressiva redução do calibre axonal, no sentido proximal-distal, com axônios expandidos no segmento proximal, associada com mudança no número de neurofilamentos e/ou microtúbulos que resultam de um prejuízo no transporte lento axonal (MEDORI et al., 1988). Atrofia axonal também ocorre nos axônios distais de nervos diabéticos humanos (SAID et al., 1983).

O principal achado patológico da polineuropatia diabética é uma neuropatia axonal com desmielinização segmentar (YASUDA et al., 2003; COTRAN et al., 1996). A disjunção axoglial, descrita como progressiva e irreversível no diabetes de longa duração, precede a desmielinização (SIMA et al., 1988; JOHNSON, 1997; WARD, 1997). Estudos histológicos têm mostrado edema nodal, desmielinização paranodal e segmentar em pequeno percentual de fibras em ratos diabéticos de 8-12 meses (SIMA et al., 1988; YAGIHASHI et al., 1990).

A degeneração e a perda de axônios são observadas tanto em axônios mielinizados quanto em amielínicos (ZHANG et al., 1990). Muitos pesquisadores têm considerado que as primeiras fibras afetadas na neuropatia diabética são as pequenas fibras mielinizadas e amielínicas (COTRAN et al., 1996; DELCROIX et al., 1998; COHEN, 2001). Além disso, recente pesquisa mostra que a degeneração das fibras nervosas intra-epidérmicas e axônios somáticos amielínicos está correlacionada com a presença e severidade da neuropatia sensorial (BIANCHI et al., 2004). Também existem alterações nos limiares dolorosos (térmico e mecânico) e evidências de apoptose nos neurônios do gânglio dorsal da raiz nervosa sensitiva e células de Schwann (LOVE et al., 1996; GUL et al., 1999; KENNEDY e ZOCHODNE, 2002; BIANCHI et al., 2004).

Um significativo número de pacientes com diabetes apresentam dor neuropática que pode ser intermitente, espontânea, crônica, hiperalgésica ou alodínica (SAID, 2007). Tem sido demonstrado hiperalgesia e/ou alodínia em modelos experimentais da neuropatia diabética (COURTEIX et al., 1993), as quais se desenvolvem da 1^a à 8^a semana da indução do diabetes (CALCUTT et al., 1996). Embora a etiologia da dor neuropática seja multifatorial, a hiperglicemia tem sido descrita como maior fator determinante (RAZ et al., 1988).

1.3.3 Patogênese

A patogênese da neuropatia diabética está geralmente descrita como uma interação complexa entre as alterações metabólicas e microvasculares consequentes da hiperglicemia crônica (DYCK e GIANNIMI, 1996). Tem sido descrito o insulto metabólico direto às fibras nervosas (GABBAY et al., 1966) o aumento da atividade dos radicais livres de oxigênio e a diminuição das defesas anti-oxidantes (LOVE et al., 1996; MERZOUK et al., 2003), o aumento da formação de produtos finais da glicação não-enzimática de substratos (RIVAS e HORTA, 1999), a redução do metabolismo de ácidos graxos essenciais (SIMA e SUGIMOTO, 1999), as consequências indiretas de insuficiência neurovascular (CAMERON e COTTER, 1997) o suporte neurotrófico prejudicado (YASUDA et al., 2003; VINIK e MEHRABYAN, 2004) e a mediação imune (DYCK et al., 2001).

A hiperglicemia e a longa duração do diabetes favorecem o desenvolvimento e progressão da neuropatia diabética (DCCT, 1993). No entanto, existem pacientes que desenvolvem a neuropatia em estágios iniciais da doença e outros que apesar de atingirem normoglicemia, por transplante de pâncreas ou bom controle glicêmico, continuam apresentando neuropatia. Estes dados indicam que, uma vez estabelecida a degeneração nervosa, a dificuldade regenerativa destes nervos, mesmo em vigência de normoglicemia,

continua existindo (ELLENBERG, 1973; NAVARRO et al., 1997). Por outro lado, os estados de hipoglicemia observados nas reações insulínicas e a cetoacidose do estado diabético descontrolado também aumentam a severidade da degeneração axonal em neuropatia diabética experimental (PARRY, 1999).

Na hiperglicemia desencadeada pela falta de insulina os neurônios e as células de Schwann mantêm altos níveis de glicose, de acordo com os níveis de glicose do plasma. Estes altos níveis de glicose levam a anormalidades metabólicas e alterações no balanço osmótico destas células e de seus compartimentos. Desta forma, a via do sorbitol é uma das hipóteses etiológicas associadas com o desenvolvimento da disfunção nervosa, especialmente pelo dano das células de Schwann. Fisiologicamente a maior parte da glicose no nervo periférico é convertida em glicose 6-fosfato e somente traços de sorbitol podem ser detectados. No diabetes, a alta concentração de glicose excede a capacidade da rota metabólica normal e a glicose é convertida em sorbitol e frutose nas células pela alta atividade da enzima aldose-reductase (GABBAY et al., 1966). Nestas condições grande quantidade de sorbitol e frutose são formadas e seus acúmulos podem levar ao estresse osmótico celular. O acúmulo de sorbitol resulta em diminuição dos níveis intracelulares de mioinositol e taurina, até o ponto de que sejam limitantes para o metabolismo intracelular. Demonstrou-se que a redução dos níveis de mioinositol se associa com a queda no metabolismo do fosfoinosítídeo e menor atividade de diacilglicerol, PKC e $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e torna mais lentas as velocidades de condução nervosa (NISHIMURA et al., 1987; COTRAN et al., 1996). Em ratos diabéticos, existe forte evidência da relação entre o fluxo exagerado de glicose através desta via e as disfunções dos animais com pouco tempo de diabetes (TOMLINSON et al., 1982).

O estresse osmótico, por acúmulo de sódio intra-axonal e de sorbitol, tem sido sugerido como causa da disjunção axoglial, relatada como primeiro estágio da degeneração. Estes distúrbios metabólicos podem resultar em axonopatia central-periférica distal

(JOHNSON, 1997; WARD, 1997). As anormalidades metabólicas também parecem envolvidas nos déficits do transporte axonal visto no diabetes (MAYER e TOMLINSON, 1983).

A via do sorbitol também está relacionada com o estresse oxidativo, pois compromete a síntese de óxido nítrico e o ciclo da glutatona por usar como cofator o doador de prótons NADPH. Assim, quando a via do sorbitol é ativada, o uso do NADPH reduz a capacidade da glutatona peroxidase de metabolizar o peróxido de hidrogênio em água, diminui a formação de glutatona reduzida (GSH) a partir da glutatona oxidada (GSSH), na presença de glutatona redutase, e diminui a síntese de óxido nítrico a partir da arginina. O metabolismo da glicose na mitocôndria produz superóxido e este é convertido para peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase. Tanto o peróxido de hidrogênio quanto o superóxido podem reagir com o nitrito (derivado do óxido nítrico) para produzir peroxinitrito, e este processo ocorre em nervos periféricos no diabetes experimental (OBROSAVA et al., 2005a). O dano oxidativo pode desencadear o dano ao DNA, o qual ativa a enzima nuclear poli (ADP-ribose) polimerase, que, por consumir o NAD celular usando-o como substrato, diminui a glicólise, o transporte de elétrons e a formação de ATP, resultando em disfunção e morte celular. Estes processos foram também observados em células de Schwann na neuropatia diabética experimental (OBROSAVA et al., 2005b). Tratamento com anti-oxidantes, em ratos diabéticos, previne e reverte o déficit da velocidade de condução nervosa e o reduzido fluxo de sangue para o nervo, efeitos clássicos associados com o diabetes não tratado em ratos (CAMERON et al., 1993).

A glicose gera estresse oxidativo pela combinação de geração radicais livres de oxigênio (ROS) e defesas anti-oxidantes ineficientes (BAYNES, 1991). O aumento da produção de ROS leva ao aumento da peroxidação de membranas lipídicas, proteínas e DNA com consequências importantes para estrutura e função celular. Um dos principais alvos do

aumento da atividade pró-oxidante no diabetes é o sistema vascular em parte explicando o aumento para a propensão da aterogênese e doenças cardiovasculares. Nas complicações microvasculares do diabetes, o estresse oxidativo afeta a função das células endoteliais e a reatividade vascular, contribuindo para o prejuízo do fluxo sanguíneo e oxigenação no nervo periférico (SIMA e SUGIMOTO, 1999).

Ácidos graxos poliinsaturados são particularmente vulneráveis ao dano de radicais livres porque os radicais dos ácidos graxos adicionam oxigênio para formar radical peroxil o qual continua peroxidando outros ácidos graxos e perpetua o processo. Um dos fatores vasogênicos que estão aumentados, pelo estresse oxidativo característico do diabetes, é a endotelina-1, potente vasoconstritor, o qual provavelmente contribui para a redução do fluxo sanguíneo periférico no diabetes (RUBANYI e POLOKOFF, 1994). Este aumento da endotelina-1 ocorre provavelmente pela ativação do NF κ B (fator nuclear Kappa B), o qual também aumenta a adesão dos leucócitos para as células endoteliais e então contribui para o aumento da incidência de trombose no diabetes (CERIELLO, 1993). A redução do fluxo sanguíneo resulta em hipóxia endoneural a qual tem sido considerado um importante e precoce fator patogênico na neuropatia diabética em pacientes e modelos animais (LOW et al., 1989; CAMERON e COTTER, 1994).

O quadro hiperglicêmico desencadeia uma série de distúrbios metabólicos que levam a alterações vasculares que têm sido associadas com a hipóxia/isquemia do nervo periférico e com a neuropatia diabética. Estas alterações incluem aterosclerose ou arterioloesclerose, microangiopatias, espessamento da membrana basal da célula perineural levando à compressão microvascular, degeneração do plexo nervoso transperineural. As alterações microvasculares nos nervos diabéticos incluem comprometimento luminal, hipertrofia endotelial, espessamento da parede capilar e degeneração dos pericitos. Aumento da matriz

extracelular especialmente da membrana basal endotelial dos capilares do endoneuro e perineuro é uma anormalidade estrutural consistente do diabetes (JOHNSON, 1997).

Outra consequência do diabetes, que pode contribuir para o desenvolvimento das complicações da doença é glicação não-enzimática de proteínas (incluindo hemoglobina, albumina e colágeno), lipídeos e ácidos nucléicos pela formação a união quimicamente reversível dos grupos amino livres com a glicose (Bases de Schiff e Produtos de Amadori). Além disso, através da glicação autooxidativa pela via de Wolff formam-se produtos da glicoxidação. Com o tempo estes produtos sofrem um rearranjo químico, reações de desidratação e fragmentação e formam então os irreversíveis AGEs (produtos finais da glicação). Estes produtos contribuem para o dano tissular em longo prazo da retina, rins, nervos e vasos (BERNE et al., 2004). O grau de glicação não-enzimática relaciona-se diretamente com o nível de glicose do sangue. As condições que originam esses complexos, quando mantidas permitem o acúmulo dos produtos finais da glicação não-enzimática (AGEs), que por serem moléculas estáveis, se acumulam no transcorrer de toda a vida e não se degradam mesmo quando os níveis de glicemia retornam à normalidade (COTRAN et al., 1996; RIVAS e HORTA, 1999). Nas proteínas, como o colágeno, os AGEs causam ligações cruzadas entre os polipeptídeos, são resistentes à digestão proteolítica e aprisionam também proteínas plasmáticas (como lipoproteínas de baixa densidade) e intersticiais não-glicosiladas, favorecendo a aterogênese e a microangiopatia diabética, reduzindo a remoção de proteínas ao mesmo tempo que aceleram a deposição. Os AGEs também se unem aos receptores de vários tipos celulares induzindo uma ampla variedade de atividades biológicas, incluindo emigração de monócitos, secreção de citocinas e fatores de crescimento, maior permeabilidade vascular, atividade pró-coagulante, proliferação celular exacerbada e produção aumentada de matriz extracelular por células musculares lisas e fibroblastos (COTRAN et al., 1996).

A glicação de proteínas do nervo parece representar uma manifestação tardia da doença. Exposição prolongada das proteínas da mielina, à hiperglicemia, *in vivo* e *in vitro*, leva a formação de AGEs e uma alteração na interação mielina-macrófagos. Isto pode servir para iniciar o processo de desmielinação segmentar (VLASSARA et al., 1984). Várias proteínas axonais do citoesqueleto, que tem papel fundamental em sua estrutura e função, como a tubulina, neurofilamento e actina, também podem ser alvos da glicação, e prejudicar o transporte lento axonal, promover atrofia e degeneração axonal. A laminina, maior constituinte da lâmina basal das células de Schwann, também pode ser glicosilada e prejudicar a habilidade de regeneração das fibras nervosas (FEDEROFF et al., 1993).

Alterações na síntese de neurotrofinas e fatores neurotróficos e seus receptores tem sido associado na patogênese da neuropatia diabética. Estas alterações são graduais na progressão da neuropatia e são particularmente importantes no desenvolvimento de alterações estruturais secundárias às anormalidades da síntese de proteínas estruturais. O NGF (*nerve growth factor*) é uma das principais neurotrofinas pesquisadas as quais também incluem neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5) e BDNF (*brain derived neurotrophic factor*). São sintetizados pelas células da glia e na periferia pelas células alvo e são transportados retrogradamente para neurônios sensoriais, simpáticos e motores (SCHMIDT et al., 1986; DISTEFANO et al., 1992).

Este suporte neurotrófico aos neurônios apresenta-se defeituoso no diabetes experimental pelo NGF (FERNYHOUGH et al., 1998a) e neurotrofina 3 (NT3) (FERNYHOUGH et al., 1998b). O tratamento de ratos diabéticos com neurotrofinas recombinantes previne ou reverte aberrações da estrutura ou função que são características da neuropatia diabética experimental (MIZISIN et al., 1999) e, em alguns casos em neuropatias diabéticas clínicas (ANAND et al., 1996).

Além das neurotrofinas, existem peptídeos circulantes como o IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), sintetizado no fígado e pelas células de Schwann, a insulina e o peptídeo C que possuem efeitos neuroprotetores e neurotróficos sobre o nervo periférico (ISHII e LUPIEN, 1995; SIMA et al., 1998) e apresentam-se reduzidos no diabetes tipo 1 (ISHII, 1995; IDO et al., 1997; SIMA et al., 1998).

A combinação de hiperglicemia, hipoinsulinemia e estresse oxidativo promovem a redução da desaturação dos ácidos graxos (HORROBIN e CARMICHAEL 1992) leva a déficit na produção de prostanóides vasoativos no diabetes (LYONS, 1991), diminuição da concentração de ácido γ linoléico e ácido araquidônico com prejuízo na síntese dos produtos da ciclooxigenase, levando ao aumento do tônus vascular e diminuição do fluxo sanguíneo endoneural. Outro aspecto do metabolismo anormal dos ácidos graxos envolve a redução plasmática e tecidual de L-carnitina no diabetes experimental (IDO et al., 1994). O tratamento com L-carnitina previne o desenvolvimento da neuropatia diabética (SIMA et al., 1996).

1.4 LESÕES DOS NERVOS PERIFÉRICOS

As lesões do sistema nervoso periférico resultam em parcial ou total perda de funções motoras, sensoriais e vegetativos, devido à interrupção da continuidade axonal, degeneração das fibras distais à lesão e eventual morte de neurônios axotomizados (NAVARRO et al., 2007).

A etiologia das lesões nervosas periféricas traumáticas inclui o dano penetrante, o esmagamento, a tração, a isquemia, e mecanismos menos comuns como choque termal, elétrico, radiação, percussão, e vibração (ROBINSON, 2004). Em geral, os danos relacionados com o estiramento são a maior parte dos traumas nervosos, especialmente em acidentes automobilísticos.

O endoneuro envolve axônios mielínicos individuais e grupos de axônios não mielinizados. Os fascículos são grupos de axônios envolvidos pelo perineuro. O epineuro epifascicular (interno) está entre os fascículos e o epineuro epineural (externo) envolve o tronco do nervo periférico. O endoneuro é longitudinalmente orientado enquanto o perineuro e o epineuro são circunferenciais (SUNDERLAND, 1990). Os plexos vasculares percorrem longitudinalmente o epineuro e enviam transversalmente ramos pelo perineuro para formar uma rede vascular constituída principalmente de capilares do endoneuro. A lesão traumática nervosa aumenta a permeabilidade dos vasos epineurais que são mais suscetíveis ao trauma por compressão do que os vasos endoneurais. Quanto maior for o nível de pressão e mais prolongada for a compressão, maiores serão os danos endoneurais, levando a edema intrafascicular, que pode levar ao dano secundário ao nervo (RYDEVIK e LUNDBORG, 1977).

Existem duas formas de classificação para as lesões nervosas periféricas: a proposta por SEDDON (1943) e a proposta por SUNDERLAND (1951). O primeiro propôs uma classificação das lesões dos nervos periféricos baseada no grau de ruptura das estruturas internas do nervo periférico e está ligada ao prognóstico de recuperação, dividindo-se em neuropraxia, axonotmese e neurotmese. A neuropraxia é o grau mais leve de lesão por contusão ou compressão onde ocorre a preservação do eixo cilíndrico com possibilidade de edema e destruição segmentar da bainha de mielina. Embora a redução ou bloqueio completo da condução seja fisiologicamente interrompido por um tempo, a recuperação é completa em poucos dias ou semanas. A axonotmese tem um grau mais severo de lesão, quando comparado com a neuropraxia, onde ocorrem danos suficientes para promover uma ruptura da continuidade axonal, levando à degeneração walleriana, sendo seu prognóstico uma boa recuperação funcional, desde que haja uma continuidade do tecido conjuntivo de suporte, células satélites e integridade da membrana basal. O grau mais severo de lesão nervosa

periférica é a neurotmeze, que ocorre quando o axônio, as células de Schwann e os componentes do tecido conjuntivo são rompidos, ou seja, há uma completa ruptura do nervo periférico, sendo seu prognóstico de recuperação não favorável, salvo quando houver reconstrução da continuidade do nervo (SEDDON, 1943).

A classificação da lesão nervosa periférica descrita por SUNDERLAND (1951) tem sido mais aplicável clinicamente. Sua classificação está organizada em ordem ascendente de severidade a partir do primeiro até o quinto grau. Anatomicamente os vários graus representam lesão da mielina com interrupção fisiológica da condução do potencial de ação e recuperação espontânea em poucos dias ou semanas (1), lesão do axônio com degeneração walleriana distal ao ponto da lesão e degeneração proximal para um ou mais segmentos nodais, geralmente com boa regeneração e retorno funcional (2), lesão dos tubos endoneurais e axônios, com conseqüente regeneração desorganizada, maior tempo de reparo, com retorno da função motora de proximal para distal, mas com variados graus de déficits sensoriais e motores (3), lesão do perineuro e seu conteúdo, a degeneração retrógrada é mais evidente, a mortalidade neuronal é maior, o retorno funcional é deficiente sem cirurgia (4) e o tronco nervoso completamente seccionado, resultando em variável distância entre os cotos nervosos, com necessidade de reparo cirúrgico para possibilitar retorno funcional (5). Em comparação com a classificação de SEDDON (1943), a graduação 1 corresponde à neuropraxia, os graus 2, 3 e 4 correspondem à diferentes graduações da axonotmeze e o grau 5 corresponde à neurotmeze.

O rato é o modelo experimental de escolha de muitos investigadores para estudar lesão nervosa periférica por este ser, exceto pelo tamanho e densidade do tecido conjuntivo, indistinguível do nervo humano (MACKINNON et al., 1985). A lesão nervosa por esmagamento, comumente usada no estudo do processo regenerativo histológico e funcional sem a necessidade de reparo cirúrgico (BRIDGE et al., 1994; VAN MEETEREN et al., 1997;

TUMA et al., 1999) foi descrita no rato como sendo do tipo axonotmese, com lesão grau 2 e, mais raramente grau 1 ou 3 (BRIDGE et al., 1994). Este tipo de lesão leva à degeneração walleriana, com bom prognóstico funcional devido à preservação da estrutura de sustentação (HARE et al., 1992).

1.5 REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Os déficits funcionais causados pelas lesões nervosas periféricas podem ser compensados por três mecanismos neurais: a reinervação de órgãos-alvo denervados pela regeneração dos axônios lesionados, a reinervação por ramificação colateral de axônios não lesionados da proximidade e a remodelação da circuitaria do sistema nervoso (NAVARRO et al., 2007). No entanto, evidências clínicas e experimentais geralmente mostram que estes mecanismos não são suficientes para uma recuperação funcional satisfatória, especialmente após lesões severas (SUNDERLAND, 1991; LUNDBORG, 2000).

Após a lesão nervosa periférica, a capacidade de regenerar e de recuperar conexões funcionais é dependente da idade do indivíduo, do tronco nervoso afetado, do local e do tipo da lesão, do tipo e do atraso do reparo cirúrgico e da distância sobre a qual os axônios em crescimento deverão percorrer (NAVARRO et al., 2007).

De uma forma geral, as fibras nervosas do sistema nervoso periférico mostram grande capacidade para regeneração. Em um nervo lesado deve-se distinguir a parte que, pela lesão, se desligou do neurônio, o segmento ou coto distal e a parte que continua unida ao neurônio, o segmento ou coto proximal. Quando o axônio é desconectado do corpo celular pela lesão, seu segmento distal gradualmente degenera e eventualmente desaparece, por um processo conhecido como degeneração walleriana ou degeneração secundária. No corpo celular dos neurônios lesionados ocorre uma série de mudanças fenotípicas, conhecidas como reação

neuronal e cromatólise. Enquanto a degeneração walleriana serve para criar um microambiente distal ao local da lesão que seja favorável ao crescimento dos axônios de neurônios sobreviventes, a reação neuronal representa mudanças metabólicas necessárias para a regeneração e o crescimento axonal (NAVARRO et al., 2007; CAMPBELL, 2008).

A reação proximal a partir do ponto da lesão é chamada de primária, traumática ou degeneração retrógrada. Esta degeneração procede pelo menos para um internodo ou mais, dependendo do grau do insulto proximal, de forma histologicamente idêntica à degeneração walleriana. As mais consistentes mudanças morfológicas no corpo celular após a axotomia são a dissolução dos corpos de Nissl (cromatólise), aumento do tamanho do corpo celular, do núcleo e nucléolo, posicionamento excêntrico do núcleo e retração dos dendritos (Fig 7B). A intensidade e o tempo de resposta neuronal são principalmente influenciados pela severidade da lesão, distância do local da lesão ao corpo celular, tipo de neurônio e idade. Esta reação comumente inicia nas primeiras 24 horas após a lesão com morte ou evidência de recuperação aparente após 4 ou 6 semanas (JOBE e WRIGHT, 1998). Entretanto, aos 10-12 meses após o esmagamento do nervo isquiático de ratos, os motoneurônios da medula espinal continuam exibindo alterações morfológicas como maior do tamanho do corpo celular, maior espessura dendrítica e agrupamentos no corno ventral da medula em comparação com o lado contralateral (BOWE et al., 1992).

Na degeneração walleriana degeneram-se os axônios e bainha de mielina do segmento distal à lesão e afeta retrogradamente um pequeno segmento do segmento nervoso proximal (Fig 7). Os produtos da degeneração são eliminados por uma ação cooperativa dos macrófagos e das células de Schwann (STOLL e MÜLLER, 1999). Distal ao ponto da lesão e na extensão proximal da degeneração retrógrada existe a formação de um tubo de endoneuro preenchido por células de Schwann para aceitar as ramificações dos axônios em crescimento, o qual pode iniciar dentro das 24 horas após a lesão (JOBE e WRIGHT, 1998; Fig 7C). Estas

células subsequentemente migraram ao longo do axônio em regeneração, provavelmente, sob influência dos axônios em crescimento (CAMPBELL, 2008). Esta coluna de células de Schwann, formada depois que a bainha de mielina é removida pelos macrófagos, é uma via indispensável pela qual o axônio cresce para o seu alvo. Se os axônios em regeneração, de algum modo, saem da coluna de células de Schwann e entram no tecido conjuntivo endoneural, eles crescem alguns poucos milímetros e cessam o crescimento formando uma dilatação chamada neuroma, a qual é composta por axônios regenerados imaturos com um curso tortuoso e tecido conjuntivo (FRIED et al., 2001; BANKOFF, 2007; Fig 7E).

Axônios em regeneração são produzidos na região dos nodos de Ranvier e emergem a partir do segmento proximal da lesão com crescimento dentro do segmento distal do nervo, e coluna de células de Schwann (Banda de Bünger), e se estende em direção ao órgão alvo (CAMPELL, 2008; Fig 7). Inicialmente os axônios em crescimento são amielínicos que se originam a partir de fibras mielínicas e amielínicas (JOBE e WRIGHT, 1998).

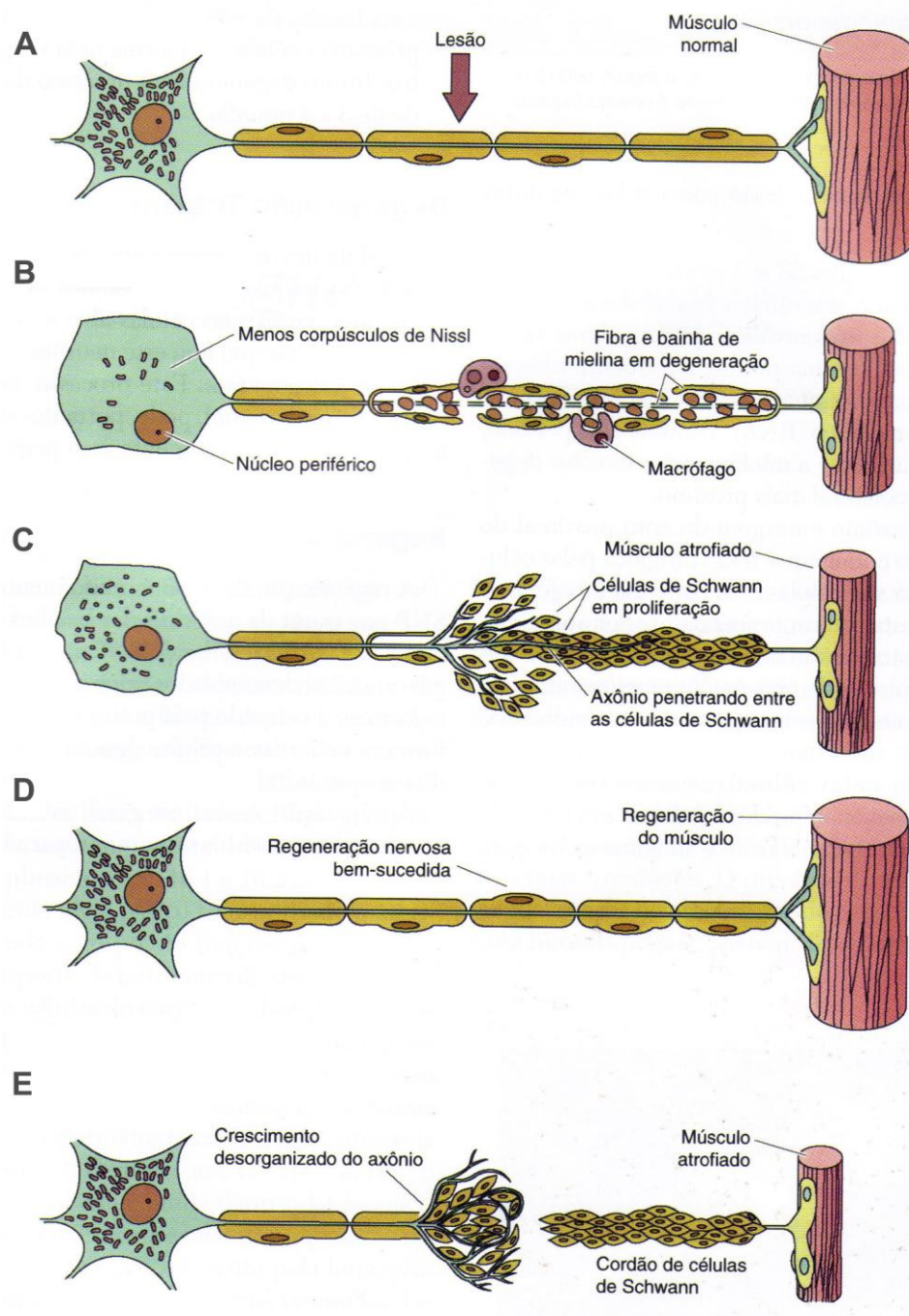


Figura 7: Diagrama esquemático da regeneração nervosa no sistema nervoso periférico. Após uma lesão axonal (A), o corpo neuronal inicia um processo chamado de cromatólise, caracterizado pelo aumento de volume, menos corpúsculos de Nissl e posição excêntrica do núcleo (B). Tão logo a lesão ocorra, o axônio e a mielina localizados distalmente ao corpo neuronal degeneram. Células de Schwann permissivas ao crescimento secretam fatores que estimulam os axônios a sobreviver e regenerar (C), reinervando corretamente o órgão-alvo (D). No entanto, também pode ocorrer crescimento desorganizado do axônio e este não conseguir atingir o órgão-alvo (E) (modificado de GARTNER e HIATT, 2003).

Têm sido relatadas diferentes taxas de crescimento dos axônios em regeneração (0,5 a 9 mm/dia) em diferentes espécies, usando diferentes técnicas. Em ratos a taxa de regeneração

tem sido descrita como 3-4 mm/dia (TONGE e GOLDING, 1993), porém, clinicamente estima-se um crescimento de 1 mm/dia, sendo que a regeneração é melhor proximalmente e em indivíduos jovens (BURNETT e ZAGER, 2004). Os mecanismos envolvidos que estão relacionados com o crescimento dos axônios incluem fatores quimiotróficos secretados pelas células de Schwann que atraem os axônios para o segmento distal, moléculas de adesão do segmento distal que promovem o crescimento do axônio através das membranas celulares e matriz extracelular, e moléculas inibitórias do perineuro que previnem o crescimento desordenado dos axônios (VERDÚ e NAVARRO, 1997; KANDEL et al., 2000).

Uma vez que eles atinjam os seus órgãos-alvo, os axônios regenerados podem formar novas terminações nervosas funcionais. Axônios motores, por exemplo, formam novas junções neuromusculares. Da mesma forma, axônios vegetativos podem reinervar glândulas, vasos sanguíneos e vísceras e axônios sensoriais podem reinervar os fusos musculares. Finalmente os axônios tornam-se remielinizados e o aspecto cromatolítico do soma volta a sua aparência normal (KANDEL et al., 2000).

O fato de que os efeitos da axotomia sejam reversíveis, não significa dizer que esta regeneração seja perfeita. Após a lesão nervosa e o reparo, o diâmetro dos axônios regenerados, sua velocidade de condução e excitabilidade permanecem abaixo dos níveis normais por um longo tempo (FIELDS e ELLISMAN 1986a,b), e conseqüentemente a recuperação funcional dos órgãos reinervados é incompleta e às vezes inadequada. Por exemplo, no sistema motor a recuperação da força pode ser substancial, mas a recuperação de movimentos finos pode ser prejudicada (KANDEL et al., 2000).

Os fatores que contribuem para uma pior recuperação funcional após lesões nervosas periféricas incluem (1) dano ao corpo celular devido à axotomia e degeneração retrógrada, excluindo a possibilidade de regeneração; (2) inabilidade do cone de crescimento devido ou tipo de lesão nervosa ou patologias associadas; (3) déficit na especificidade da reinnervação

por axônios regenerados, quando os órgãos alvo se tornam reinervados por fibras nervosas com funções diferentes. A plasticidade de conexões centrais pode compensar funcionalmente esta falta de especificidade (NAVARRO et al., 2007).

Nos últimos anos muita atenção é focada no papel dos fatores neurotróficos na manutenção e sobrevivência dos neurônios e na promoção da regeneração axonal após a lesão nervosa. Os fatores neurotróficos relatados para estimular a regeneração axonal incluem o NGF, BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NT-3 (*neurotrophin-3*), NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*), IGF-I e IGF-II (*insulin-like growth factors*), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), FGF-2 (*basic fibroblast growth factor*) e GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) (MARKUS et al., 2002; BOYD e GORDON, 2003). Entretanto a potenciação da reação neuronal e a regeneração podem ser melhores explicadas por uma complexa mistura de diferentes fatores neurotróficos e moléculas neurotrópicas (NAVARRO et al., 2007).

1.5.1 Regeneração nervosa no diabetes experimental

O modelo de diabetes experimental por STZ se caracteriza por alterações bioquímicas e funcionais similares às encontradas na neuropatia diabética humana (SIMA e SUGIMOTO, 1999). No entanto, pacientes portadores de neuropatia diabética geralmente mostram, em algum grau, redução no número de fibras nervosas, enquanto que a maioria dos animais com diabetes induzido por STZ não apresenta grau significativo de perda de fibras nervosas (YASUDA et al., 1989a,b; ZOCHODNE et al., 2001). Esta característica não é satisfatória para usar animais diabéticos com nervos não lesionados em pesquisas relacionadas com a regeneração nervosa nesta condição patológica. Entretanto, examinar a regeneração da fibra nervosa em modelos animais com lesões nervosas, como esmagamento, congelamento e

transecção, tem sido um método alternativo satisfatório muito utilizado em pesquisas com animais diabéticos (YASUDA et al., 2003).

A regeneração e remielinização nos nervos periféricos de pacientes e animais diabéticos tende a ser mais lenta e complicada que em pacientes e animais normais. A regeneração do nervo periférico após a lesão nervosa tem sido relatada como prejudicada em ratos com diabetes por STZ (LONGO et al., 1986; TRIBAN et al., 1989; TERADA et al., 1996). Este déficit na regeneração parece ser devido a alterações em uma ou mais fases de processos como atraso no surgimento dos brotamentos axonais, redução da taxa de regeneração e prejuízo na maturação das fibras nervosas regeneradas (YASUDA et al., 2003; Fig. 8). Na neuropatia diabética tanto a degeneração quanto a regeneração axonal são encontradas em biópsias de nervos periféricos, e conforme a progressão da doença, o número de axônios em regeneração diminui (BRADLEY et al., 1995).

Existe diferença entre a capacidade regenerativa dos dois tipos de fibras. Fibras nervosas amielínicas dos nervos diabéticos parecem regenerar na mesma extensão que em nervos controle, embora a capacidade regenerativa das fibras mielinizadas seja prejudicada significativamente no diabetes. Esta preservação da capacidade regenerativa das fibras nervosas amielínicas pode ser parcialmente atribuída ao alto nível de NGF, distal ao local da lesão no diabetes (MAEDA et al., 1996)

A etiologia do déficit regenerativo é multifatorial incluindo a combinação de estresse oxidativo e bioquímico, suporte microvascular inadequado, déficit de neurotrofinas, alteração na expressão de novos genes e proteínas, prejuízo na síntese e transporte de componentes do citoesqueleto e formação de AGEs intracelular e extracelular (DELCROIX et al., 1998; KENNEDY e ZOCHODNE, 2000; KENNEDY e ZOCHODNE, 2002; YASUDA et al., 2003; TOMLISON e GARDINER, 2008). Estas alterações metabólicas e estruturais afetam o corpo celular dos neurônios lesionados e prejudicam a regeneração nervosa no diabetes (Fig.8).

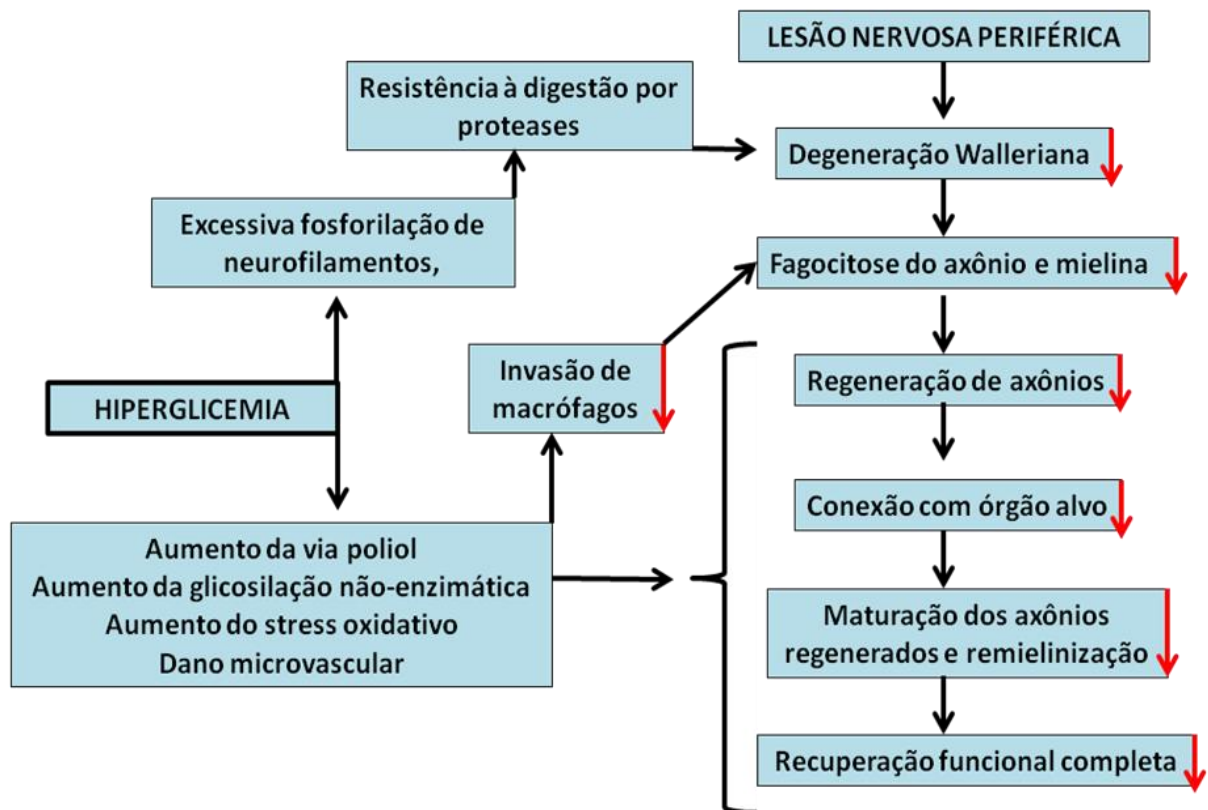


Figura 8: Fluxograma representando a patogênese da capacidade regenerativa no diabetes. Setas em vermelho indicam o prejuízo nos processos fisiológicos de reparo (adaptado de YASUDA et al., 2003).

1.6 O EXERCÍCIO FÍSICO NO DIABETES

Com o objetivo de melhorar as condições metabólicas do indivíduo com diabetes mellitus tipo 1 e prevenir/retardar as complicações agudas e crônicas da doença, o exercício físico regular, juntamente com a terapia insulínica e o controle alimentar, tem sido considerado como uma das três principais ferramentas terapêuticas utilizadas no tratamento de pacientes com diabetes mellitus 1 (STEPPEL e HORTON, 2003; MACEDO, 2003; DA SILVA et al., 2004; AMERICAN, 2007).

Uma das consequências do diabetes mellitus é a reduzida capacidade de exercício que tem sido comumente observada em pacientes diabéticos. Esta redução é provavelmente dependente de vários fatores fisiológicos como atividade neuromuscular, hemodinâmica e mecanismos respiratórios e de consumo de oxigênio (KOMATSU et al., 2005).

O treinamento físico regular acelera as adaptações metabólicas e hormonais que aparecem no início do exercício físico e contribui para o aumento da sensibilidade à insulina, diminuindo a sua necessidade nos pacientes com diabetes em uso de insulina (COSTILL et al., 1979; HARADA et al., 2002). Em relação ao controle glicêmico os resultados dos estudos são bastante variáveis. Alguns trabalhos demonstram que o treinamento físico não modifica a glicemia e a hemoglobina glicada em indivíduos diabéticos tipo 1 (ZINMAN et al., 1984; RAILE et al., 1999) reduz a dose diária de insulina (RAILE et al., 1999). Por outro lado, existem estudos que evidenciam redução dos níveis de hemoglobina glicada em indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 submetidos a treinamento físico aeróbico (MOSHER et al., 1998).

Embora os existam divergências sobre o controle glicêmico pela prática do exercício físico regular, sabe-se que esta prática determina melhora na ação insulínica, especialmente no músculo esquelético, tanto indivíduos com diabetes tipo 1 como em indivíduos não diabéticos (JESSEN e GOODYEAR, 2005). Este efeito ocorre devido a várias adaptações como o aumento da densidade capilar, o aumento na expressão/translocação de proteínas GLUT-4 aumentando o transporte da glicose estimulado pela insulina no tecido muscular esquelético (PLOUG et al., 1990; RODNICK et al., 1992), aumento das fibras musculares mais sensíveis à ação insulínica e o aumento na atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas e aumento na atividade da glicogênio-sintetase (JESSEN e GOODYEAR, 2005).

Estudos demonstraram melhora no perfil lipídico de indivíduos diabéticos tipo 1, após treinamento físico, dentre elas a redução dos níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides e aumento no HDL-colesterol (LEHMANN et al., 1997). Em animais diabéticos o treinamento físico de 10 semanas em esteira ergométrica reduziu a poliúria e a glicosúria sem, no entanto, reduzir de forma significativa a proteinúria (JORGE et al., 2005). Além disso, o treinamento físico atenua a redução do fluxo sanguíneo renal, cardíaco e muscular e

normaliza a hipotensão e a bradicardia observadas em ratos com diabetes por STZ (DE ANGELIS et al., 2000; DE ANGELIS et al., 2002a;b).

O exercício pode melhorar as anormalidades lipídicas associadas ao diabetes, reduzir o risco de doença arterial coronariana, aumentar a capacidade cardiorrespiratória e aumentar a capacidade de trabalho (VRANIC e BERGER, 1979; LEON, 1991; MACEDO, 2003; DA SILVA et al., 2004). O exercício físico regular também diminui o nível de radicais livres e aumenta os níveis de BDNF e GDNF na medula espinal de ratos treinados (SIAMILIS et al., 2009).

As mudanças metabólicas benéficas do treinamento físico regular geralmente ocorrem após períodos continuados de exercício e podem permanecer inclusive por um período de destreino. Recente estudo mostrou que o treinamento físico aeróbico de 10 semanas em ratos diabéticos, não somente mostrou ser uma efetiva ferramenta no tratamento de alterações cardiovasculares e metabólicas como assim permaneceu até mesmo depois de 3 semanas de destreino (MOSTARDA et al., 2009). Entretanto, a manutenção do treinamento é de fundamental importância, visto que, foi demonstrado que oito semanas de destreino induzem ao retorno dos efeitos benéficos do condicionamento físico a valores observados em indivíduos com diabetes sedentários (FUCHSJAGER-MAYRL et al., 2002).

Durante a prática do exercício físico ocorre aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos, especialmente pelos músculos. No início do exercício, a energia provém da fosfocreatina, ATP estocado na célula e proveniente da glicólise. Quando o exercício se prolonga, os estoques de glicogênio se esgotam e gordura e aminoácidos passam a ser as principais fontes energéticas. Desta forma, os níveis de glicose são mantidos e a função do sistema nervoso é preservada. Assim, em um indivíduo não-diabético, raramente ocorre hipoglicemia durante os exercícios. Este ajuste metabólico que preserva a normoglicemia é

mediado em grande parte por hormônios. Durante o exercício ocorre redução da insulina e aumento no glucagon e de catecolaminas (ROBERGS e ROBERT, 2002). Essas adaptações hormonais são essencialmente perdidas no diabetes tipo 1, deficientes em insulina.

Quando existe pouca insulina, por terapia inadequada, uma liberação excessiva de hormônios contra insulina durante o exercício físico pode aumentar os níveis de glicose e corpos cetônicos e pode provocar cetoacidose metabólica. A presença de altos níveis de insulina, pela administração exógena, pode diminuir ou evitar a mobilização da glicose e outros substratos induzidos pelo exercício e pode então ocorrer hipoglicemia (AMERICAN, 2007).

Antes de iniciar um exercício físico, o indivíduo com diabetes deve ser submetido a uma avaliação médica minuciosa que inclua exames físicos e laboratoriais para avaliar o controle metabólico e detectar a presença de possíveis complicações da doença. Além disso, a hiperglicemia ou a glicemia reduzida devem ser corrigidas por representarem fatores de risco para o desenvolvimento de cetose e de hipoglicemia, respectivamente. Segundo as recomendações da American Diabetes Association (2007) algumas diretrizes gerais podem ser benéficas na regulação da resposta glicêmica para exercícios físicos. Estas diretrizes incluem (1) evitar a realização de exercícios físicos quando os níveis de glicose forem >250 mg/dL e a cetose estiver presente, (2) ter precaução na prática do exercício quando os níveis de glicose forem >300 mg/dL e a cetose não estiver presente, (3) ingerir carboidratos (15 a 30 g) se os níveis de glicose forem <100 mg/dL, (4) monitorar a glicose antes e depois do exercício físico, identificando necessárias mudanças na insulina, consumo alimentar ou condições do exercício físico praticada, (5) consumir carboidratos, antes e após o exercício físico, para evitar hipoglicemia. Recomenda-se também hidratação adequada já que a desidratação pode afetar os níveis de glicose no sangue e a função do coração.

Todos os tipos e níveis de atividade física podem ser realizados por pacientes diabéticos tipo 1 que não tenham complicações e apresentem um bom controle glicêmico através da terapia insulínica e controle nutricional. Segundo o American College of Sports Medicine (2002), dentro da rotina de exercícios para os indivíduos diabéticos devem fazer parte três grupos de exercícios: exercícios aeróbios, exercícios resistidos e exercícios de flexibilidade. Uma recomendação padrão em relação a cada sessão de treinamento é que ela inclua um período de aquecimento e um de esfriamento, que consiste de 5-10 min de atividade aeróbica de baixa intensidade e alongamentos musculares (AMERICAN, 2007).

A frequência, a intensidade, a duração e o tipo de exercício físico para diabéticos devam ser prescritos com cautela e precisão (ALBRIGHT et al., 2000; COLBERG, 2000; AMERICAN, 2007). De acordo com orientações, para melhorar o controle glicêmico, ajudar com a manutenção do peso, reduzir o risco de doenças cardiovasculares e a resistência cardiorrespiratória, os indivíduos devem ser engajados em um programa de exercícios de 3 a 5 vezes por semana, com não mais de dois dias consecutivos, sem exercício físico. A duração da atividade deve ser progressivamente aumentada de 20 min diários para 60 min diários, de acordo com o nível inicial de aptidão física. Em relação à intensidade, embora um nível baixo seja adequado para facilitar as adaptações metabólicas é preciso satisfazer o limiar mínimo necessário para melhorar a resistência cardiorrespiratória (ALBRIGHT et al., 2000; COLBERG, 2000; AMERICAN, 2007). Essencialmente, implementando atividades de intensidade baixa a moderada (40-70% do consumo máximo de oxigênio, VO_2 max) para indivíduos com diabetes, minimizam-se os riscos e maximizam-se os benefícios à saúde. Além disso, o exercício físico de mais baixa intensidade propicia um nível de esforço mais confortável e melhora a probabilidade de aderência, enquanto diminui a probabilidade de lesões musculoesqueléticas e lesões por cargas mecânicas altas nos pés, particularmente em

atividades que exijam sustentação do peso corporal (ALBRIGHT et al., 2000; ULBRETCH et al., 2004).

A caminhada é o tipo de atividade mais comumente desempenhada pelos indivíduos com diabetes, por ser mais conveniente para a maioria das pessoas e ser de baixo impacto. Entretanto, devido ao fato das complicações do diabetes, como a neuropatia diabética, o uso de calçado adequado durante a caminhada e manutenção da higiene dos pés devem ser enfatizados. Alternativamente podem ser recomendadas outras modalidades de exercícios físicos que não exijam sustentação do peso corporal, como as atividades aquáticas e o ciclismo estacionário (ALBRIGHT et al, 2000).

Embora o treinamento aeróbico seja um componente essencial para o tratamento do diabetes mellitus, recomenda-se que, devido à diminuição da força muscular apresentada por pacientes diabéticos crônicos, esta modalidade de treinamento deve estar associada com a prática regular de exercícios resistidos. Tal intervenção tem potencial para melhorar força e resistência muscular, melhorar a flexibilidade, alterar a composição corporal e diminuir os fatores de risco para doenças cardiovasculares (ALBRIGHT et al, 2000).

A American Diabetes Association (2007) recomenda a realização de exercício resistido, três vezes por semana, dirigidos a todos os grandes grupos musculares, progredindo para três séries de 8-10 repetições. Os exercícios de flexibilidade também devem ser incorporados na rotina de exercícios com uma frequência de 2 a 3 vezes por semana para minimizar o prejuízo na flexibilidade decorrente da glicação de várias estruturas articulares.

Cabe salientar que, embora o exercício físico seja uma ferramenta terapêutica importante para pacientes diabéticos, como em qualquer terapia, os profissionais da saúde devem analisar os riscos e benefícios da prática da mesma em cada paciente.

2 JUSTIFICATIVA

A maioria dos novos conhecimentos quanto à patogênese da neuropatia diabética foi introduzida através de dados oriundos do campo experimental através de estudos com ratos. Este modelo animal fornece uma fonte de tecido nervoso mamífero, o qual, até sob microscopia eletrônica, demonstra pormenores celulares do nervo periférico que são indistinguíveis aos do nervo periférico humano (MACKINNON et al., 1985). A maior capacidade regenerativa dos nervos encontrada nos ratos tem promovido vários estudos experimentais relacionados com a lesão nervosa periférica, reparo e regeneração, investigando desta forma vários fatores em um curto período de tempo.

Como ainda não existe um tratamento definitivo e bem estabelecido para a neuropatia diabética, vários procedimentos terapêuticos têm sido estudados com o objetivo de prevenir a progressão dos sintomas neuropáticos e para promover a regeneração nervosa periférica. Dentre eles, podemos citar o controle glicêmico intensivo (DCCT, 1993), tratamentos antioxidantes (CAMERON et al., 1993), agentes vasodilatadores (CAMERON et al., 1992), suplementação com ácido γ -linolênico (JAMAL et al., 1986), inibidores de produtos finais da glicação (BROWNLEE et al., 1986), terapias autoimunes (KRENDEL et al., 1995), inibidores da aldose redutase (TERADA et al., 1996) e fatores de crescimento neurais (APFEL, 1999b). Entretanto, estas possibilidades terapêuticas não tiveram sucesso na restauração completa da função neural.

Estudos em animais diabéticos têm mostrado que o treinamento físico melhora a disfunção cardiovascular induzida pela doença (DE ANGELIS et al., 2000b; SOUZA et al., 2007; HARTHMANN et al., 2007). Pesquisas também têm mostrado um importante papel do treinamento físico aeróbico sobre a regeneração do tecido nervoso periférico de ratos não-

diabéticos após lesão isquiática por esmagamento (ILHA et al., 2008). No entanto, são poucos os estudos sobre a eficácia do treinamento físico regular no tratamento da neuropatia diabética humana (RICHARDSON et al., 2001; BALDUCCI et al., 2006) e experimental (SELAGZI et al., 2008) e não foram encontrados trabalhos que estudem a influência da sua efetividade sobre a regeneração de nervos afetados pelo diabetes experimental.

Assim, considerando a importância que tem sido dada à prática do treinamento físico no tratamento do paciente com diabetes mellitus e a importância do processo de regeneração na melhora do quadro de neuropatia diabética, torna-se necessário saber qual é seu efeito sobre a regeneração nervosa periférica na condição diabética sem tratamento farmacológico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do treinamento físico sobre a regeneração do nervo isquiático em ratos diabéticos submetidos à lesão por esmagamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência do treinamento físico sobre a glicemia capilar de ratos diabéticos;
- Analisar a influência do treinamento físico sobre a capacidade máxima aeróbica obtida através da velocidade máxima atingida pelo rato durante a marcha/corrida na esteira ergométrica adaptada, antes, durante e após o treinamento físico de dez semanas;
- Analisar a influência do treinamento físico sobre a recuperação funcional da locomoção estudada através da evolução temporal do índice de funcionalidade do nervo isquiático desde a sua lesão traumática por esmagamento até o término do protocolo experimental;
- Analisar a influência do treinamento físico de 10 semanas sobre a morfometria do nervo isquiático de ratos diabéticos submetidos ao esmagamento deste nervo. Para tal foram estudadas as seguintes variáveis: densidade de fibras nervosas mielínicas, diâmetro das fibras nervosas mielínicas, diâmetro do axônio, espessura da bainha de mielina, porcentagem da área de fibras mielínicas e porcentagem da área de endoneuro nos segmentos do nervo isquiático proximal e distal à lesão.
- Analisar os efeitos de 10 semanas de treinamento físico sobre a morfologia do músculo sóleo na regeneração nervosa periférica de ratos diabéticos. Para tal serão estudadas as

alterações morfométricas (densidade de fibras musculares, área média das fibras musculares, porcentagem da área ocupada por fibras musculares e porcentagem da área ocupada por tecido conjuntivo intersticial) e ultraestruturais do músculo sóleo ipsilateral à lesão isquiática por esmagamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Modelo animal

Foram utilizados 64 ratos machos da linhagem Wistar (260 a 315 g), com 12 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram tratados conforme as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e a lei número 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Os animais foram mantidos em caixas de *plexiglass* medindo 27 x 26 x 31 cm recobertas por maravalha, com ração e água “*ad libitum*”, em temperatura controlada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e permanecendo em ciclo de 12 h claro/escuro.

4.1.2 Grupos Experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos. Cada grupo de rato não-diabético foi formado por 6 ratos e cada grupo de ratos diabéticos foi inicialmente formado por 10 ratos.

1. ratos diabéticos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e ao treinamento físico (DET)
2. ratos diabéticos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (DE)
3. ratos diabéticos submetidos ao treinamento físico (DT)
4. ratos diabéticos (D)

5. ratos não-diabéticos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e ao treinamento físico (NDET)
6. ratos não-diabéticos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (NDE)
7. ratos não-diabéticos submetidos ao treinamento físico (NDT)
8. ratos não-diabéticos (ND)

Durante o período experimental de 17 semanas, 10 (dez) ratos (25%), de diferentes grupos de diabéticos, não resistiram às complicações do diabetes não-controlado e morreram. Desta forma o número final de animais dos grupos foi 7 no grupo DET, 9 no grupo DE, 8 no grupo DT e 6 no grupo D.

4.1.3 Indução do diabetes

Imediatamente após o jejum de 6 h, os ratos foram pesados e anestesiados com éter etílico e receberam uma única injeção de STZ (50 mg/kg, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) por administração intravenosa caudal diluída em tampão citrato, pH 4,5 (2 mL/kg). Os animais controle com a mesma idade receberam somente veículo (10 mM tampão citrato, pH 4,5, 2 mL/kg; GUL et al., 1999; DALL'AGO et al., 2002). Somente foram mantidos no estudo os ratos tratados com STZ com níveis de glicose sanguínea maior ou igual a 300 mg/100 mL (UNGER et al., 1998). A glicose em sangue total, coletado da cauda do animal, foi medida através de fitas reagentes (Advantage, Roche, Indianapolis, IN, USA). Os ratos foram mantidos sem terapia insulínica por todo o período experimental (17 semanas). O peso dos ratos e os níveis de glicose (por fitas reagentes) foram monitorados quinzenalmente após 6 horas de jejum, desde 48 horas após a indução do diabetes até o término do programa de treinamento físico.

4.1.4 Procedimento cirúrgico

Após o período de 4 semanas da data da indução do diabetes por STZ (LOVE et al., 1996; GUL et al., 1999; KENNEDY e ZOCHODNE, 2000), os ratos (com 16 semanas de idade) foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de cetamina (Vetbrands, Brasil; 90 mg/kg) e xilazina (Vetbrands, Brasil; 15 mg/kg) e colocados sobre uma prancha de madeira, onde foram imobilizados em decúbito ventral.

Em seguida foi realizada a tricotomia da área dorsal lateral da coxa direita. A intervenção foi iniciada pela antisepsia do integumento com álcool iodado 2%. Foi então efetuada uma incisão longitudinal de 3 cm, em relação ao maior eixo do membro posterior direito, seccionando o integumento e a fáscia. Foram expostos os músculos do quadril e da coxa e através do afastamento dos mesmos, foi identificado o nervo isquiático em todo o seu trajeto na coxa. O procedimento de esmagamento do nervo isquiático, em sua emergência logo após o limite inferior do músculo glúteo máximo (Fig. 9), foi realizado através de uma pinça lisa (1 mm espessura) comprimida por uma pinça hemostática com força máxima por 30 segundos (BRIDGE et al., 1994; ILHA et al., 2008). O local da lesão foi marcado através de um ponto no perineuro. A incisão cirúrgica foi então suturada (nylon 4-0) e o rato colocado novamente em sua caixa moradia. Os ratos sham passaram por todas as etapas listadas acima, porém sem ao esmagamento do nervo isquiático.

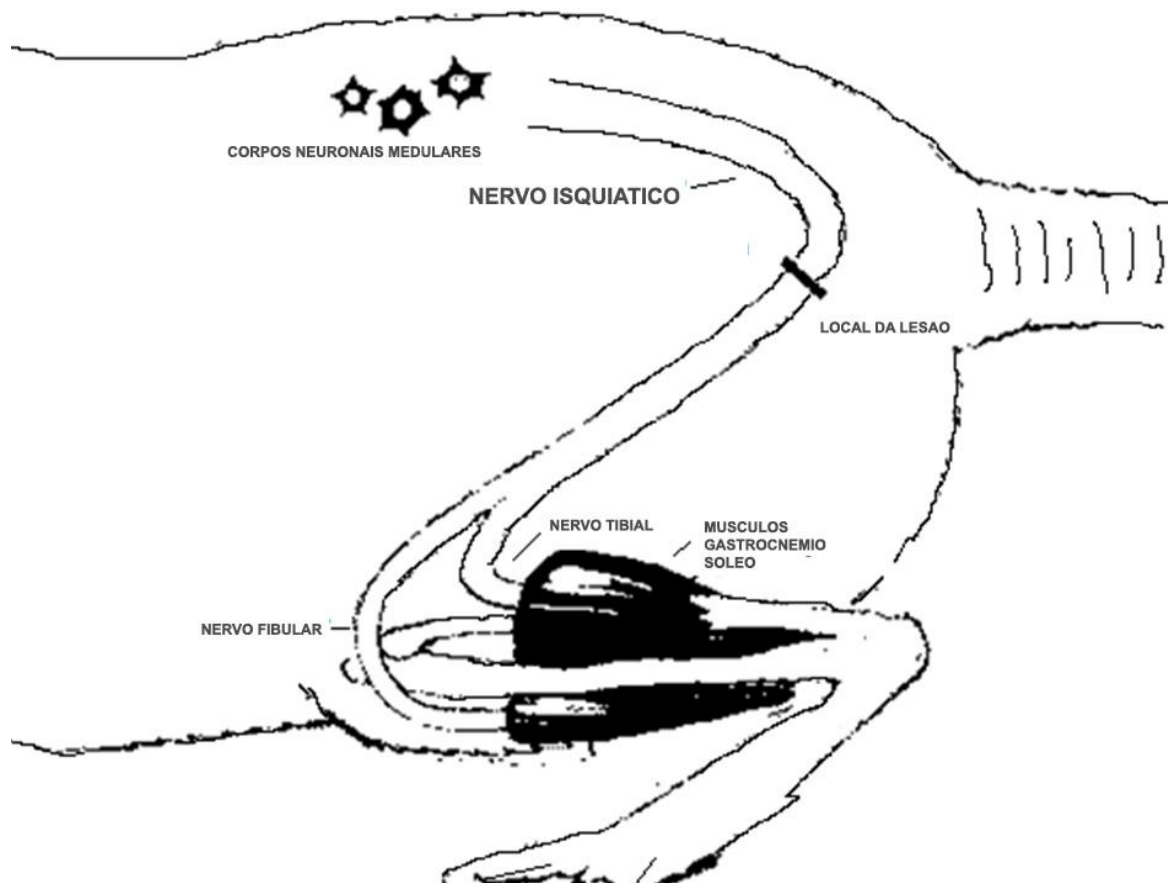


Figura 9: Esquema representando o local da lesão por esmagamento do nervo isquiático (adaptado DE RUITER et al., 2008).

4.1.5 Teste de esforço máximo

Duas semanas após o procedimento cirúrgico, todos os animais foram adaptados na esteira ergométrica durante 10 minutos a 0,3 km/h por 4 dias. No 5º dia eles foram submetidos ao teste de esforço máximo (TEM) para determinar a sua velocidade máxima de corrida na esteira. O teste consistiu de um exercício graduado sobre a esteira ergométrica, com aumentos de velocidade de 0,3 km/h a cada 3 minutos, começando com 0,3 km/h e continuando até a máxima velocidade atingida pelo rato (RODRIGUES et al., 2007). Foi considerada a velocidade máxima aquela em que o rato permaneceu pelo menos 50% do tempo antes da exaustão.

Os testes de esforço máximo foram realizados para cada rato, sendo que o TEM 1 foi realizado antes do treinamento físico para estabelecer a intensidade do programa, o TEM 2 foi realizado ao final da 5ª semana do treinamento para ajustar a intensidade e o TEM 3 foi realizado no final do treinamento para comparar a eficácia do protocolo de treinamento físico entre os grupos. Estudos prévios mostraram que a capacidade física pode ser determinada pelo TEM e que o treinamento físico pode ser prescrito com base nos valores do TEM em ratos diabéticos por STZ (RODRIGUES et al., 2007).

4.1.6 Treinamento físico

Após o período de adaptação, na quarta semana após o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático, os ratos foram submetidos a um programa de treinamento físico (com intensidade de 40-50% da velocidade máxima atingida no TEM) por 10 semanas. Os animais realizaram o treinamento físico em uma esteira ergométrica adaptada para ratos (Fig. 10), com seis raias (cada raia com 50 cm X 10 cm) e pista sem ângulo de inclinação. Os ratos foram treinados 2 vezes por dia com intervalo de 4 horas entre cada sessão, 5 dias por semana, sendo o programa progressivamente mais vigoroso (protocolo adaptado de TANCRÈDE et al., 1982 e DE ANGELIS et al., 2000). Os ratos inicialmente caminharam por 10 min na primeira semana, atingindo 40 min ao final da quarta semana e 60 min ao final da sétima semana. A partir desta semana, embora o tempo total de cada sessão de treinamento não tivesse sido alterado o rato permanecia progressivamente mais tempo em velocidade máxima (50% da velocidade atingida no TEM). Todas as sessões de treinamento tiveram aquecimento (15% do tempo total da sessão a 25 a 30% da velocidade atingida no TEM), parte principal (70% do tempo total da sessão a 40 a 50% da velocidade atingida no TEM) e resfriamento (15% do tempo total da sessão a 25 a 30% da velocidade atingida no TEM).



Figura 10: Esteira ergométrica adaptada para ratos (RUNNER, Joinville, SC)

4.1.7 Avaliação da função motora do membro posterior

Todos os ratos deste estudo foram avaliados em relação à função motora dos membros posteriores. As avaliações foram realizadas semanalmente após a lesão por esmagamento do nervo isquiático até o final do programa de 10 semanas do treinamento físico, totalizando 13 avaliações para cada rato. A avaliação trata-se de um método quantitativo da avaliação da condição funcional do nervo isquiático baseado nas medidas das marcas das patas posteriores durante a marcha dos ratos (DE MEDINACELI et al., 1982).

Os animais foram testados em uma trilha confinada com 8,5 cm de largura e 100 cm de comprimento com um abrigo escuro no final. Com o objetivo de ambientar os ratos com o aparato, estes realizaram o percurso do corredor para o refúgio escuro, 2 ou 3 vezes antes do teste. Após o treino, o assoalho do corredor de madeira foi forrado com papel branco das

mesmas dimensões e as solas das patas posteriores de cada rato foram pintadas com tinta em almofada de carimbo. Em seguida, cada rato, individualmente, foi colocado no início do corredor e caminhou em direção ao refúgio escuro, deixando as marcas das patas sobre o papel (DE MEDINACELI et al., 1982).

Três marcas de cada pata que apareceram sobre o papel branco foram usadas para determinar os valores médios para cada variável que foi utilizada para o cálculo do índice de funcionabilidade isquiática (IFI; KOKA e HADLOCK, 2001; VAREJÃO et al., 2001), a saber:

- *Comprimento da marca (print length - PL)* - distância entre a borda posterior do calcâneo e a borda anterior do terceiro dedo;
- *Expansão dos dedos (toe spread - TS)* - distância entre um ponto médio do primeiro e quinto dedos;
- *Expansão intermediária dos dedos (intermediary toe spread - ITS)* - distância entre um ponto médio do segundo e quarto dedos.

Todas as três medidas foram realizadas nos lados normal (N) e experimental (E). A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo do índice de funcionabilidade do isquiático: $IFI = -38,3 (EPL - NPL) / NPL + 109,5 (ETS - NTS) / NTS + 13,3 (EIT - NIT) / NIT - 8,8$ (KOKA e HADLOCK, 2001; VAREJÃO et al., 2001). O milímetro foi a unidade utilizada em todas as medidas descritas acima, as quais foram coletadas manualmente através de um paquímetro milimetrado.

O resultado obtido foi considerado como um índice funcional do nervo isquiático onde 12 a -12 representaram excelente função, -13 a -37 função boa, -38 a -62 função média, -63 to -87 função insatisfatória, -88 a -112 déficit completo e -113 to -137 pior que o déficit completo (DE MEDINACELI et al., 1995).

4.1.8 Análise morfométrica do nervo isquiático

Após 24 horas da última sessão de treinamento, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg; i.p.; Cristalia, Brasil), perfundidos transcárdiacamente usando uma bomba peristáltica (20 mL/min, Milan, Brasil), inicialmente com solução salina e posteriormente com solução fixadora composta por glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) e paraformaldeído 4% (Reagen, São Paulo, Brasil) em tampão fostato 0,1M (TF). Foram então retirados dois segmentos do nervo isquiático direito (aproximadamente 3 mm), um coletado cerca de 5 mm antes e outro cerca de 5 mm depois do local da lesão, segmento proximal e distal, respectivamente.

As porções de tecido foram pós-fixadas na mesma solução fixadora por 1 h a temperatura ambiente e 15 dias a 4°C. A seguir, o material foi lavado por 1 h e 30 min em TF, 3 lavagens de 30 min cada, seguido da pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (Sigma Chemicals Co., USA) diluído em TF, por 1 h, à temperatura ambiente. A seguir, o material foi lavado com TF 0,1 M por 45 min (3 trocas de 15 min cada). O material foi então desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 96%, 100%) e imerso em óxido de propileno (Electron Microscopy Science, USA) por 5 min. Após o material foi pré-embebido em resina Durcupan ACM (Fluka, Switzerland) diluída em óxido de propileno (1:1) por 10 min e posteriormente embebido em Durcupan ACM 100% (Fluka, Switzerland) e mantido por 24 h em vácuo. Sequencialmente o material foi incluído na mesma resina, utilizando-se para isso moldes para blocos. Os moldes contendo o material foram mantidos a 60°C por 48 h para a polimerização (ILHA et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008).

Os cortes semifinos (900 nm) dos segmentos do nervo isquiático foram obtidos no ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT 2.0, Germany) utilizando-se navalha de vidro. As

lâminas contendo os cortes semifinos foram coradas com azul de toluidina (Merck, Germany) 1% diluído em tetraborato de sódio 4% (Ecibra, Brasil).

As imagens dos cortes transversais dos segmentos proximal e distal do nervo isquiático foram capturadas e digitalizadas com um microscópio Nikon Eclipse E-600 (Japan) acoplado a uma câmera de alta performance CCD. Para as avaliações semiquantitativas foi utilizado o Software *Image Pro-Plus 6.0* (Media Cybernetic, USA). Para análise, foram escolhidas de forma aleatória 6 imagens de cada corte transversal do nervo isquiático, com aumento inicial de 1000x com posterior ampliação de 200%. Das seis imagens randomicamente escolhidas de cada segmento do nervo isquiático, 3 foram escolhidas da periferia e 3 do centro de cada imagem (DE MEDINACELI et al., 1982; ILHA et al., 2008).

Para a avaliação morfométrica, o total de área avaliada de cada segmento do nervo isquiático foi a soma das seis áreas randomicamente selecionadas (8919,36 μm^2 no total). Ambos os segmentos proximal e distal do nervo isquiático direito foram analisados separadamente, com o número médio de 155 fibras nervosas analisadas por segmento. As medidas morfométricas analisadas foram a densidade de fibras nervosas mielinizadas (número de fibras mielinizadas/ mm^2), o diâmetro médio da fibra nervosa mielinizada (μm), o diâmetro médio do axônio da fibra nervosa mielinizada (μm), espessura média da bainha de mielina (μm), percentual de área total ocupada por fibras mielinizadas (%) e percentual de área ocupada pelo endoneuro (%). Esta última media incluiu fibras amielínicas e tecido em degeneração.

A estimativa da densidade de fibras mielinizadas foi determinada pelo resultado da divisão entre o número de fibras e a área total analisada. A espessura da bainha de mielina foi estimada usando instrumentos de medida do software *Image Pro Plus 6.0*. As medidas de área foram calculadas através da técnica de contagem de pontos (ILHA et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008) sobrepondo grades com a densidade de um ponto por 1,54 μm^2 e a seguinte

equação: $A = \sum p \cdot a/p$, onde A é área, $\sum p$ o total de áreas ponto e a/p o valor da área ponto ($1,54 \mu\text{m}^2$).

Através da soma de todas as áreas das fibras nervosas mielinizadas foi possível estimar a área total ocupada por fibras nervosas mielinizadas e calcular seu percentual da área total analisada (100%). Deduzindo este percentual da área total analisada foi possível estimar o percentual de área ocupada pelo endoneuro. Para estimar os diâmetros dos axônios e das fibras, a área de cada fibra individualmente foi mensurada e o valor obtido foi convertido para diâmetro de um círculo com uma área equivalente.

4.1.9 Análise estatística

Glicemia, peso corporal, velocidade máxima atingida no TEM, valores do IFI e variáveis morfométricas do nervo isquiático (n=6 por grupo) foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. O teste *post hoc* de Bonferroni foi usado para corrigir os resultados das comparações múltiplas a $P < 0,05$. Resultados descritivos foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média). Os dados foram analisados através software SPSS® 11.5 (*Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA*).

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Modelo animal

Foram utilizados 42 ratos machos da linhagem Wistar (260 a 315 g), com 12 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram tratados conforme as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e a lei número 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Os animais foram mantidos em caixas de *plexiglass* medindo 27 x 26 x 31 cm recobertas por maravalha, com ração e água “*ad libitum*”, em temperatura controlada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e permanecendo em ciclo de 12 h claro/escuro.

4.2.2 Grupos Experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos. Cada grupo de ratos não-diabéticos foi formado por 6 ratos e cada grupo de ratos diabéticos foi inicialmente formado por 10 ratos.

- ratos não-diabéticos (ND)
- ratos não-diabéticos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (NDE)
- ratos diabéticos (D)
- ratos diabéticos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (DE)
- ratos diabéticos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e ao treinamento físico (DET)

Durante o período experimental de 17 semanas, 8 (oito) ratos de diferentes grupos de diabéticos, não resistiram às complicações do diabetes não-controlado e morreram. Desta forma o número final de animais dos grupos foi 7 no grupo DET, 9 no grupo DE, 6 no grupo D.

4.2.3 Indução do diabetes

Realizado da mesma forma que o experimento 1 (ver item 4.1.3)

4.2.4 Procedimento cirúrgico

Realizado da mesma forma que o experimento 1 (ver item 4.1.4)

4.2.5 Teste de esforço máximo

Realizado da mesma forma que o experimento 1 (ver item 4.1.5)

4.2.6 Treinamento físico

Realizado da mesma forma que o experimento 1 (ver item 4.1.6)

4.2.7 Análise morfológica do músculo sóleo

Após 24 horas do último treinamento, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg; i.p.; Cristalia, Brasil), perfundidos transcardiacamente usando uma bomba

peristáltica (20 mL/min, Milan, Brasil), inicialmente com solução salina e posteriormente com solução fixadora composta por glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) e paraformaldeído 4% (Reagen, São Paulo, Brasil) em tampão fostato 0,1M (TF). Foi então removida $\frac{1}{4}$ da porção média do músculo sóleo direito (1-2 mm³).

As porções de músculo dos ratos foram pós-fixadas na mesma solução fixadora por 1 h a temperatura ambiente e 15 dias a 4°C. A seguir, o material foi lavado por 1 h e 30 min em TF (3 lavagens de 30 min cada), seguido da pós-fixação em tetróxido de ósmio 1 % (Sigma Chemicals Co., USA) diluído em TF, por 1 h, à temperatura ambiente. A seguir, o material foi lavado com TF 0,1 M por 45 min (3 trocas de 15 min cada). O material foi então desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 96%, 100%) e imerso em óxido de propileno (Electron Microscopy Science, USA) por 5 min. Após o material foi pré-embebido em resina Durcupan ACM (Fluka, Switzerland) diluída em óxido de propileno (1:1) por 10 min e posteriormente embebido em Durcupan ACM 100% (Fluka, Switzerland) e mantido por 24 h em vácuo. Sequencialmente o material foi incluído na mesma resina, utilizando-se para isso moldes para blocos. Os moldes contendo o material foram mantidos a 60° C por 48 h para a polimerização (ILHA et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008).

Os cortes semifinos (900 nm) dos músculos foram obtidos no ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT 2.0, Germany) utilizando-se navalha de vidro. As lâminas contendo os cortes semifinos foram coradas com azul de toluidina (Merck, Germany) 1% diluído em tetraborato de sódio 4% (Ecibra, Brasil).

As imagens dos cortes transversais do músculo sóleo foram capturadas e digitalizadas com um microscópio Nikon Eclipse E-600 (Japan) acoplado a uma câmera de alta performance CCD. Para as avaliações semiquantitativas foi utilizado o Software *Image Pro-Plus 6.0* (Media Cybernetic, USA). Para análise, foram escolhidas de forma aleatória 6

imagens de cada corte transversal do músculo sóleo, com aumento inicial de 20X e posterior ampliação de 100%.

Para a avaliação morfométrica, o total de área avaliada de cada músculo sóleo foi a soma das seis áreas randomicamente selecionadas (0,323 mm² no total), com o número médio de fibras musculares analisadas de 105. As medidas morfométricas analisadas foram densidade de fibras musculares do sóleo (nf/mm²), média da área da fibra muscular (µm²), percentual de área total ocupada por fibras musculares (%) e da área total ocupada pelo tecido conjuntivo intersticial (%). Além disso, foi feito um histograma de frequência (500 µm² de intervalo).

A estimativa da densidade de fibras musculares foi determinada pelo resultado da divisão entre o número de fibras e a área total analisada (0,323 mm²). A área média transversal das fibras musculares foi calculada através da técnica de contagem de pontos (ILHA et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008) sobrepondo grades com a densidade de um ponto por 216,12 µm² e a seguinte equação: $A = \sum p \cdot a/p$, onde A é área, $\sum p$ o total de áreas ponto e a/p o valor da área ponto (216,12 µm²).

Através da soma de todas as áreas das fibras musculares foi possível estimar a área total ocupada por fibras musculares e calcular seu percentual da área total analisada (100%). Deduzindo este percentual da área total analisada foi possível estimar o percentual de área ocupada pelo tecido conjuntivo intersticial.

Para a avaliação ultraestrutural foram realizados cortes transversais e longitudinais ultrafinos (70-85 nm) do músculo sóleo usando um ultramicrótomo (Leica Ultracut UCT 2.0, Áustria) utilizando para isso navalha de diamante. Posteriormente os cortes foram coletados em telas de cobre (200 *meshes*). O material, nas telas, foi contrastado com uma solução aquosa de acetato de uranila 1% (Merck, Alemanha) por 30 min. A seguir foram lavadas em

água bidestilada e secadas com papel filtro. Após isto, as telas foram contrastadas com citrato de chumbo 1% (Merck, Alemanha) por 3-5 min (REYNOLDS, 1963).

Os cortes foram analisados em um microscópio eletrônico (JEM 1200 EXII, Japão). As imagens digitalizadas de músculo sóleo de ratos dos grupos ND, D, DE e DET (n = 4 por grupo) foram analisadas e comparadas com amostras de ratos controle (C, n = 4), para identificar as alterações ultraestruturais causadas pelo TEM.

4.2.8 Análise estatística

Glicemia, peso corporal, velocidade máxima atingida no TEM foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. O teste *post hoc* de Bonferroni foi usado para corrigir os resultados das comparações múltiplas a $P < 0,05$. As variáveis morfométricas do músculo sóleo foram analisadas através da Análise de Variância de uma via (ANOVA *one-way*), seguida do teste *post hoc* de Duncan com significância de $P < 0,05$. Resultados descritivos foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média). Os dados foram analisados através software SPSS® 11.5 (*Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA*).

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 – PRIMEIRO ARTIGO

Título: Beneficial effects of treadmill training in experimental diabetic nerve regeneration

Autores: Tais Malysz, Jocemar Ilha, Patrícia Severo Do Nascimento, Maria Cristina Faccioni-Heuser, Kátia De Angelis, Beatriz D'Agord Schaan, Matilde Achaval

Mensagem encaminhada de mauricio.silva@pobox.com

Data: Sun, 5 Sep 2010 10:08:48 -0400 (EDT)

De: mauricio.silva@pobox.com

Assunto: DECISION on Manuscript ID CLINICS-Aug-2010-OA-0277.R1

Para: achaval@ufrgs.br

Cc: clinics@hcnnet.usp.br, editorial.office@hcnnet.usp.br

05-Sep-2010

Dear Dr. Achaval

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Beneficial Effects of Treadmill Training in Experimental Diabetic Nerve Regeneration" in its current form for publication in CLINICS. According to our normal procedure, your manuscript is being sent to our Language Reviser. Any textual alterations made at this stage have the sole purpose of improving style and clarity, and should never alter intended meaning. As soon as the manuscript returns, it will be sent to you for inspection and approval. Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of CLINICS, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Mauricio Rocha e Silva

Editor, CLINICS - mauricio.silva@pobox.com

BENEFICIAL EFFECTS OF TREADMILL TRAINING IN EXPERIMENTAL DIABETIC NERVE REGENERATION

Running Title: Treadmill Training in Diabetic Nerve Regeneration

Scientific address: Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

Tais Malysz^{1,2}, Jocemar Ilha^{1,2}, Patrícia S. Do Nascimento^{1,2}, Kátia De Angelis³, Beatriz D. Schaan^{1,4}, Matilde Achaval^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

²Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

³Laboratório do Movimento Humano, Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, SP, Brasil

⁴Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author: Matilde Achaval, MD, PhD, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil, Tel.: +55-51-33083624, Fax: +55-51-33083092, E-mail: achaval@ufrgs.br

ABSTRACT

Objectives: We investigated the effects of treadmill training (10 weeks) on hindlimb motor function and nerve morphometric parameters in diabetic rats submitted to sciatic nerve crush.

Materials and Methods: Wistar rats (n=64) were divided into non-diabetic, trained non-diabetic, non-diabetic with sciatic nerve crush, trained non-diabetic with sciatic nerve crush, diabetic, trained diabetic, diabetic with sciatic nerve crush or trained diabetic with sciatic nerve crush groups. Diabetes was induced by streptozotocin injection (50 mg/kg, iv), hindlimb motor function was evaluated weekly by assessing sciatic functional indices, and the proximal and distal portions of the sciatic nerve were used for morphometric analysis.

Results: At post-injury week 13, the distal nerve portion of all injured groups and the proximal nerve portion of the diabetic with sciatic nerve crush group presented altered morphometric parameters such as decreased myelinated fiber diameter ($\sim 7.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ vs $\sim 4.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$), axonal diameter ($\sim 5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ vs $\sim 3.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$) and myelin sheath thickness ($\sim 1.2 \pm 0.07 \mu\text{m}$ vs $\sim 0.65 \pm 0.07 \mu\text{m}$) and an increase in the percentage of area occupied by endoneurium ($\sim 28 \pm 3\%$ vs $\sim 60 \pm 3\%$). In addition, in the non-diabetic with sciatic nerve crush group the proximal nerve portion showed a decreased myelinated fiber diameter ($7.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ vs $5.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$) and myelin sheath thickness ($1.29 \pm 0.08 \mu\text{m}$ vs $0.92 \pm 0.08 \mu\text{m}$). The non-diabetic with sciatic nerve crush, trained non-diabetic with sciatic nerve crush, diabetic with sciatic nerve crush and trained diabetic with sciatic nerve crush groups showed normal sciatic functional index from the 4th, 4th, 9th and 7th week after injury, respectively. Morphometric alterations in the proximal nerve portion of the diabetic with sciatic nerve crush and non-diabetic with sciatic nerve crush groups were either prevented/reverted to values similar to the non-diabetic group by treadmill training.

Conclusions: Diabetic condition promoted delay in sciatic nerve regeneration. Treadmill training is able to accelerate hindlimb motor function recovery in diabetic injured rats and

prevent/revert morphometric alterations in proximal nerve portions in non-diabetic and diabetic injured rats.

Keywords: Diabetes; Sciatic nerve crush; Motor function; Nerve morphometry; Treadmill training

Introduction

Peripheral neuropathy is a common complication in patients with diabetes mellitus and consists of several clinical syndromes that affect motor, sensory and autonomic nerves. Usual pathological alterations are axonal atrophy, demyelination, nerve fiber loss and disordered neural repair.¹

Streptozotocin (STZ)-induced diabetes is a well-established animal model for diabetes mellitus and experimental diabetic neuropathy in rats, however, these animals showed a minimal nerve fiber loss in peripheral nerves.^{2,3} Accordingly, a useful animal model to study nerve fiber regeneration in diabetic neuropathy is the combination of surgically-induced nerve injury with STZ-induced hyperglycemia in rats.⁴

Moreover, nerve regeneration in diabetes is essential for reversal of peripheral neuropathy and also promotes the recovery of nerves from injury due to acute nerve compression and entrapment. However, none of therapeutic procedures used to prevent progression of nerve dysfunction and promote nerve fiber regeneration were able to completely restore neural function.⁴

Walking training is generally indicated by medical professionals in the treatment of the diabetic patients. Nevertheless, the data is scanty concerning the effectiveness of this modality of regular exercise in the treatment of human diabetic peripheral neuropathy.⁵

Previous studies have shown that treadmill exercise training can improve peripheral nervous tissue regeneration in non-diabetic rats and mice after nerve injury⁶⁻⁸. In diabetic rats, this training modality can improve the morphological features and increase the size of A cells from the L5 dorsal root ganglion⁹ and improve autonomic nerve dysfunction in diabetic rats.^{10,11} Although swimming exercise training had shown protective and therapeutic effects

on diabetic experimental peripheral neuropathy¹² there is no data on the effectiveness of treadmill training in the regeneration of nerves affected by experimental diabetes.

Thus, the aim of this study was to investigate the effects of treadmill training on hindlimb motor function recovery and the morphological parameters of nerves in diabetic rats submitted to sciatic nerve crush.

Materials and Methods

Experimental design

Experiments were performed on 64 male Wistar rats, 12 weeks old, weighing 260 g to 315 g, from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). The rats were housed in standard plexiglass boxes, under 12:12 h light/dark cycle, in a temperature-controlled environment ($20\pm 1^\circ\text{C}$), with food and water available *ad libitum*. The animals were cared for in accordance with Brazilian law and the recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences, Review Committee of the School of Veterinary Surgery, University of Buenos Aires and the International Brain Research Organization (IBRO), which are in compliance with the National Institute of Health's Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (publication no. 85-23, revised 1985).

The animals were randomly assigned in groups as follows: non-diabetic (N, n=6), trained non-diabetic (TN, n=6), non-diabetic with sciatic nerve crush (NC, n=6), trained non-diabetic with sciatic nerve crush (TNC, n=6), diabetic (D, n=6), trained diabetic (TD, n=8), diabetic with sciatic nerve crush (DC, n=9) or trained diabetic with sciatic nerve crush (TDC, n=7). During the course of the 17 weeks of the experimental protocol, of the 40 diabetic rats, 10 rats died.

Diabetes induction

After fasting (6 h), rats were rendered diabetic by a single intravenous STZ injection (50 mg/kg, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) diluted in citrate buffer (pH 4.5; 2 mL/kg). Non-diabetic rats were only injected with citrate buffer. After 6 h of fasting, glycemia was evaluated using test strips (Advantage, Roche, Indianapolis, IN, USA) at 48 h after diabetes induction, weekly after the beginning of the experimental period and also 24 h

after the last bout of exercise. Only those rats with glycemic levels >300 mg/dL were maintained in the diabetic groups. No insulin therapy was used during the study.

Surgical Procedures

Four weeks after diabetes induction (Fig. 1), the animals were anesthetized using ketamine and xilazine (90 and 15 mg/kg, i.p., respectively; Vetbrands, Brazil), and the right sciatic nerve was exposed, by splitting the gluteal muscle, and crushed immediately behind the emergence of the lower limit of the gluteus maximus muscle. The crush was made with 1 mm non-serrated hemostatic forceps for 30 seconds⁸ and the crush site was marked by a fine suture through the edge of the epineurium. In rats from the groups without crush (N and D), the sciatic nerve was exposed, but not crushed. The muscles were re-approximated, the skin was closed with 4-0 nylon sutures and the animals were maintained in their cages for 2 weeks.

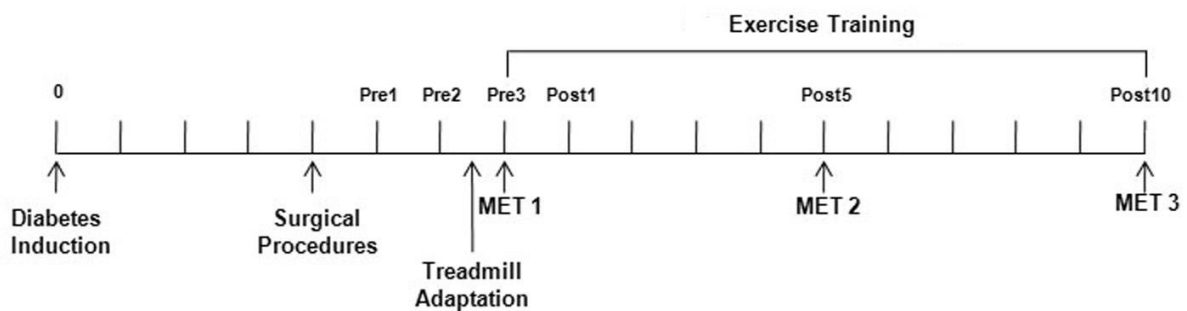


Figure 1- Time course line showing the 17 weeks of the experimental procedures and weeks used to assess motor activity after surgical procedures before beginning the training program (pre 1-3 weeks) and after each week of the training period (post 1-10 weeks). MET 1= Maximal exercise test before training; MET 2= Maximal exercise test during training; MET 3= Maximal exercise test at the end of the training period.

Maximal Exercise Test

Two weeks after the surgery, all animals were adapted on a treadmill for 10 min at 0.3 km/h for 4 days (Fig. 1). Maximal exercise tests were performed (MET) after the adaptation period (MET1), at the end of the 5th week (MET2) and at the end of the training (MET3) to

determine, adjust and compare the efficacy of the treadmill training protocol, respectively. The test consisted of a graded exercise on the treadmill, with speed increments of 0.3 km/h every 3 minutes, starting at 0.3 km/h and continuing up to the maximal intensity attained by each rat.¹³

Training Program

Training program was performed on a treadmill at low-moderate intensity (40-50% maximal running speed of the MET). It began in the 4th week after sciatic nerve crush (Fig. 1), with two sessions per day (at least 4 hours between bouts), 5 days per week for 10 weeks adapted from De Angelis et al.¹⁰ In the sessions, the rats ran for 10 min in the 1st week, attained 40 min at the end of the 4th week and 60 min at the end of the 7th week.

Analysis of Hindlimb Motor Function

Following the sciatic nerve crush and until the conclusion of the treadmill training program, all animals were subjected to a series of weekly motor activity assessments. These assessments were held prior to initiation of exercise training protocol (pre 1-3 weeks) and after each week of the exercise training period (post 1-10 weeks), making a total of 13 assessments for each rat (Fig. 1). Recovery of locomotor activity was considered proof of the adequate post nerve crush re-innervation of the right hindlimb, and functional recovery was monitored by analysis of the free-walking pattern. This method describes an index based on measurements of the footprints of walking rats, which provides a reliable and easily quantifiable method of evaluating the functional condition of the sciatic nerve¹⁴. For this test, the rats were trained to walk over a white sheet of paper covering the bottom of a 100 cm

long, 8.5 cm wide track, which ended in a dark box. Afterward, the animals had their plantar hind feet painted with dark dye and were then placed on the track to walk.

The rat footprints were used to determine the following measurements: distance from the heel to the third toe, the print length (PL); distance from the first to the fifth toe, the toe spread (TS); and distance from the second to the fourth toe, the intermediary toe spread (ITS). These three measurements were obtained from the experimental (E) and normal (N) sides. Several prints of each foot were obtained on each track, but only three prints of each foot were used to determine the mean measurements in the E and N sides. Then, these mean measurements were included in the sciatic function index-formula: $SFI = -38.3 (EPL - NPL) / NPL + 109.5 (ETS - NTS) / NTS + 13.3 (EIT - NIT) / NIT - 8.8$.¹⁴

The result obtained was considered a functional index of the sciatic nerve, where 12 to -12 represents excellent function, -13 to -37 good function, -38 to -62 average function, -63 to -87 unsatisfactory function, -88 to -112 complete deficit and -113 to -137 worse than complete deficit.¹⁵

Histological and Morphometric nerve studies

Twenty-four hours after the end of the exercise training protocol, the rats were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg; i.p.; Cristalia, Brazil) and then transcardially perfused using a peristaltic pump (20 mL/min, Milan, Brazil) with 0.9% saline solution followed by a fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, at room temperature. The right sciatic nerve was isolated and excised in 2 short segments (~3 mm), one taken 5 mm before and one after the crush injury site, the proximal and distal portions, respectively. Then, the portions were post-fixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co., USA) in PB, dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide

(Electron Microscopy Science, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) and polymerized at 60° C for 72 h. Afterward, cross-sectional semithin sections (900 nm) were obtained using an ultramicrotome (Leica Ultracut UCT 2.0, Austria) and stained with 1% toluidine blue (Merck, Germany) in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil).

Images of the proximal and distal portions of the right sciatic nerve obtained from the 6 rats per group were captured and digitalized (initially 1000X and further amplified 200% for analysis) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Japan, Tokyo) coupled to a digital camera and Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). For morphometric evaluation, a set of 6 images, from each nerve portion, were chosen by a blinded examiner using random sampling of one slice, 3 random images from the periphery and 3 random images from the center of the nerve.⁸ The total area of the sciatic segment examined was the sum of the 6 randomly selected areas (8919.36 μm^2 in total). Both proximal and distal portions of the right sciatic nerves were analyzed separately, and the average number of fibers analyzed per nerve segment was 155. The morphometrical measurements included the myelinated fiber density (number of myelinated fibers/ mm^2), average myelinated fiber diameter (μm), average axonal diameter of the myelinated fiber (μm), average myelin sheath thickness (μm), percentage of area occupied by myelinated fibers (%) and percentage of area occupied by the endoneurium (%). The latter measurement included the unmyelinated fibers and degenerative debris.

The estimate of the myelinated fiber density was determined by examining the ratio of the fibers/total area analyzed. The myelin sheath thickness was estimated using the measurement tools from the Image Pro Plus Software. To estimate the axonal and fiber diameters, the area of each individual fiber was measured and the value obtained was converted to diameter of a circle with an equivalent area. The area sizes were estimated using a point-counting technique,⁸ employing grids with point density of 1 point per 1.54 μm^2 and the equation: $A = \sum p \cdot a/p$, where A is area, $\sum p$ the total of counted areas/point and a/p the

area/point value ($1.54 \mu\text{m}^2$). By adding together all the myelinated fiber areas it was possible to arrive at an estimate of the total area occupied by myelinated fibers and calculate its percentage from the total analyzed area (100%). By deducting this percentage of area from the total analyzed area it was possible to estimate the percentage of area occupied by the endoneurium.

Statistical analysis

Glycemic levels, body weight, maximal speed evaluations, SFI values and morphological measurements were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA). The Bonferroni test was used to adjust the results of the multiple comparisons at $P < 0.05$. Descriptive data were expressed as means \pm SEM (standard error of the mean). Data were run on SPSS® 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA).

Results

Glycemic levels, body weight and maximal exercise test

During all the experimental period, diabetic groups (D, TD, DC, TDC) presented higher glycemic levels and lower body weight when compared to non-diabetic groups (N, TN, NC, TNC; $P < 0.05$; Table 1). In both the diabetic and non-diabetic groups glycemic levels remained unchanged throughout the experiment ($P > 0.05$). At the end of the experiment, while non-diabetic groups presented a gain in body weight vs their baseline values ($P < 0.05$), diabetic groups showed maintenance ($P > 0.05$) of their body weights. At the end of the study, there were no differences in terms of glycemic levels or body weight among the members within either the diabetic or non-diabetic groups ($P > 0.05$; Table 1).

As expected, the trained groups (TN, TD, TNC and TDC) presented a progressive increase in their exercise capacity, as verified by the increase in the maximum speed of running in the METs over the training period ($P < 0.001$); however this increase was lower in trained diabetic groups when compared to trained non-diabetic groups ($P < 0.05$) (Table 1). There were no differences between MET performance in N, D and NC groups over time. However, sciatic nerve crush induced a decrease in physical capacity in the diabetic group, as observed by the reduction in the maximum speed of running in the MET1, as compared to the MET2 and MET3 in the DC group ($P < 0.05$; Table 1).

Table 1- Glycemic levels, body weight and maximal exercise test (MET) in non-diabetic (N), trained non-diabetic (TN), diabetic (D), trained diabetic (TD), non-diabetic submitted to sciatic nerve crush (NC), trained non-diabetic submitted to sciatic nerve crush (TNC), diabetic submitted to sciatic nerve crush (DC) and trained diabetic submitted to sciatic nerve crush (TDC) groups.

Groups	Glycemic levels (mg/dL)		Body Weight (g)		MET (km/h)		
	Initial	Final	Initial	Final	MET1	MET2	MET3
N	93±4	92±2	281 ± 8	368±10 ^b	1.08±0.1	1.08±0.1	0.96±0.1
TN	95±2	89±2	269±18	360±18 ^b	1.08±0.1	1.44±0.1 ^{ce}	1.74±0.1 ^{cde}
D	401±28 ^a	412±15 ^a	266±5	290±3 ^a	0.88±0.2	0.96±0.2	0.96±0.2
TD	446±37 ^a	466±8 ^a	288±12	274±5 ^a	0.9±0.1	1.2±0.1 ^{cef}	1.56±0.1 ^{cdef}
NC	98±1	97±2	292±6	393±13 ^b	0.9±0.1	0.9±0.1	0.84±0.1
TNC	91±4	88±2	293±12	352±19 ^b	1.08±0.2	1.5±0.2 ^{ce}	1.86±0.1 ^{cde}
DC	396±16 ^a	456±20 ^a	267±9	252±9 ^a	0.6±0.1 ^{ef}	0.9±0.1 ^c	0.9±0.1 ^c
TDC	445±27 ^a	475±17 ^a	260±7	261±13 ^a	0.6±0.1 ^{ef}	1.02±0.1 ^{cef}	1.38±0.1 ^{cdef}

Data are reported as mean ± SEM.

a. $P < 0.05$ vs. N, TN, NC and TNC groups

b. $P < 0.05$ vs. initial in the same group

c. $P < 0.05$ vs. MET 1 in the same group

d. $P < 0.05$ vs. MET 2 in the same group

e. $P < 0.05$ vs. corresponding MET of the sedentary groups (N, D, NC, DC)

f. $P < 0.05$ vs. corresponding MET of the non-diabetic trained groups (TN and TNC).

Sciatic Functional Index

The SFI values, including pre-training (pre-1 to 3) and post-training week records (post-1 to 10) are shown in Fig. 2. As expected, in the uninjured groups (N, TN, D and TD), all SFI values were normal, remaining stable at around -11 throughout the experiment (data not shown). There were no differences in SFI values between these groups ($P > 0.05$).

Right footprints (ipsilateral to the sciatic nerve crush) of the injured groups (NC, TNC, DC and TDC) presented alterations in relation to the results obtained in left footprints, which included an increase in the print length value and a decrease in the toe spread and

intermediary toe spread values. These alterations affected the SFI values, which tended to be more negative after sciatic nerve crush, a finding which indicates loss of motor function.

In the pre-training evaluation (pre-1 to 3), sedentary and trained non-diabetic injured rats (NC and TNC) showed significantly lower SFI values than uninjured group ($P < 0.05$, Fig. 2). These differences were not seen during all the subsequent post-training weeks ($P > 0.05$). No differences were noted between the SFI values in the NC and TNC groups ($P > 0.05$).

Throughout the 17 weeks of this study, no differences in SFI values ($P > 0.05$) were observed between the DC and TDC groups. However, while the sedentary diabetic injured rats (DC) had lower SFI values when compared to the uninjured groups (N, TN, D and TD) and injured non-diabetic groups (NC and TNC) from pre-training week 1 until the post-training week 5 ($P < 0.05$), the trained diabetic injured rats (TDC) had lower SFI values (vs uninjured groups and injured non-diabetic groups) from pre-training week 1 until the post-training week 3 ($P < 0.05$). Therefore, the TDC group showed functional recovery two weeks before of the DC group. In addition, in subsequent weeks (after post-training week 5 for the DC group and after post-training week 3 for the TDC group) no differences were seen between any of the groups ($P > 0.05$).

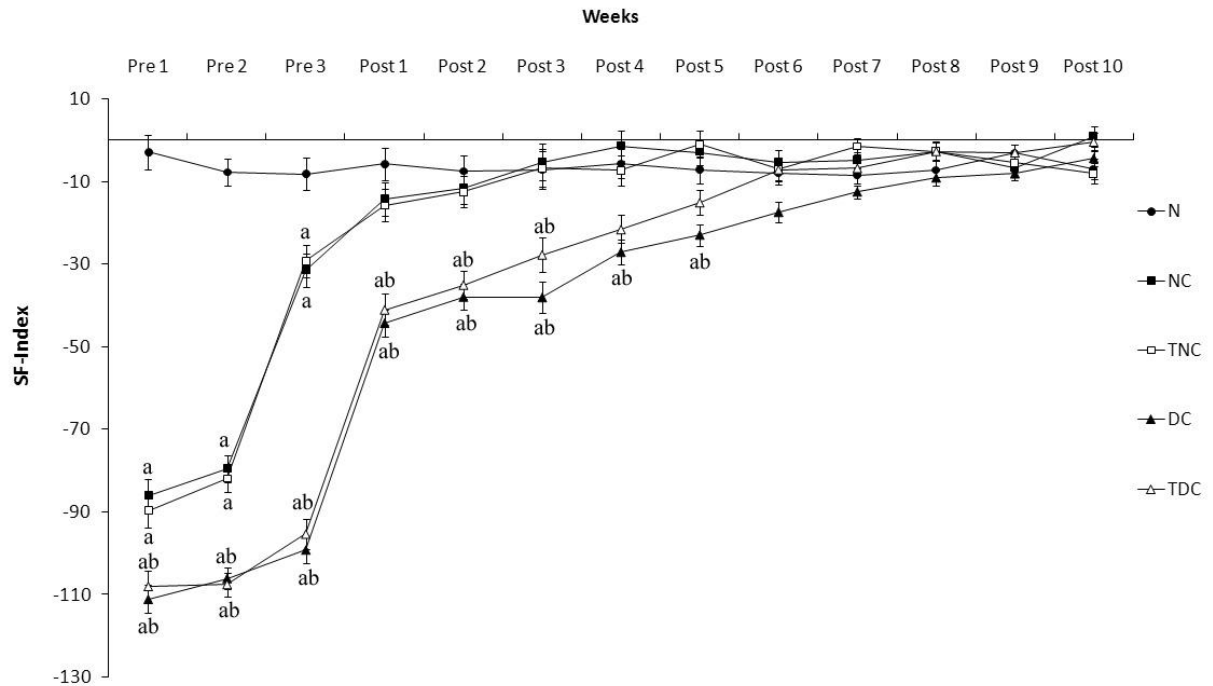


Figure 2- Graphs showing functional recovery (sciatic functional index, SFI) before beginning the training program (pre 1-3 weeks) and after each week of the training period (post 1-10 weeks) in non-diabetic (N, n=6), non-diabetic with sciatic nerve crush (NC, n=6), trained non-diabetic with sciatic nerve crush (TNC, n=6), diabetic submitted to sciatic nerve crush (DC, n=9) and trained diabetic submitted to sciatic nerve crush (TDC, n=7) groups. a $P < 0.05$ vs. N group; b $P < 0.05$ vs. NC and TNC groups. Data are expressed as means \pm SEM.

Histological studies

Analysis of the digitized images from the proximal and distal portions of sciatic nerve in the uninjured rats (N, TN, D and TD groups) revealed no identifiable alteration to the normal histological features of sciatic nerve (Fig. 3).

The distal portion of the sciatic nerve of injured rats (NC, TNC, DC, TDC groups) showed a pattern of incomplete histological regeneration with a predominance of small thin myelinated fibers, enlargement of the space occupied by endoneurial tissue and the presence of degenerative debris. The proximal portion of the sciatic nerve of the TNC and TDC groups showed normal histological features. However, the proximal portion of the NC and DC groups showed a pattern of incomplete histological regeneration, and in the DC group, this pattern was similar to that seen in the distal portion (Fig. 3).

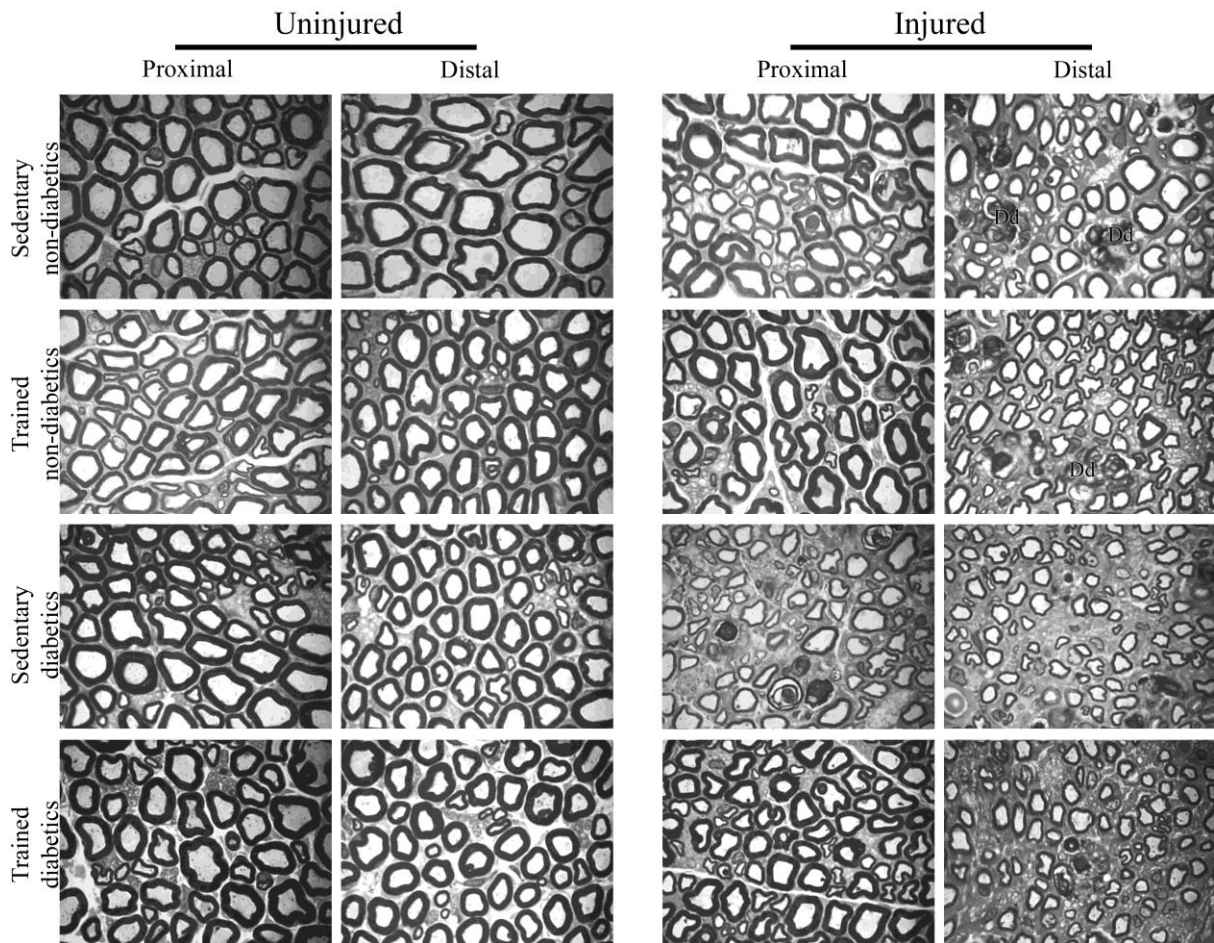


Figure 3- Digitized images of semithin cross-sections obtained from the proximal and distal portions of the sciatic nerve from different groups in this study. Note the predominance of small thin myelinated fibers, enlargement of the space occupied by endoneurial tissue and presence of degenerative debris in the distal nerve portion of all injured groups and proximal nerve portion of the sedentary diabetic injured group. Dd: degenerative debris. Toluidine blue stained. Bar = 20 μ m.

Morphometric Studies

In the sciatic nerve of the uninjured rats (N, NT, D and DT), about 28% of the area was occupied by endoneurium and about 72% by myelinated fibers (Fig. 4). Furthermore, in the distal portion of the sciatic nerve crush of the NC, TNC, DC, TDC groups, the percentage occupied by endoneurium was higher (~58%, 60%, 70% and 59%, respectively) and the percentage occupied by myelinated fibers was lower (~41%, 40%, 29% and 42%, respectively) than in the uninjured groups and to their values in the proximal portion. Also, in the DC group, the proximal portion of the crushed sciatic nerve showed an increase in the

percentage of endoneurium ($54.5 \pm 3\%$; $P<0.01$) and a decrease in the percentage of myelinated fibers ($45.5 \pm 3\%$; $P<0.01$) when compared to all the other groups (Fig. 4).

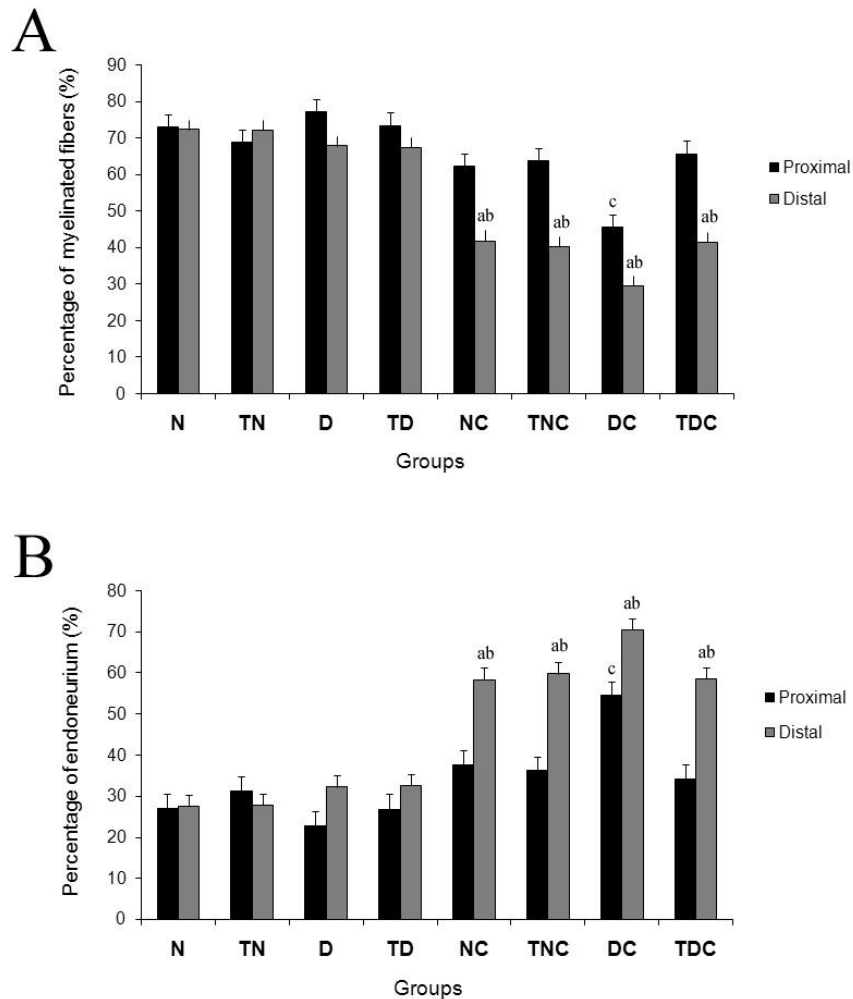


Figure 4- Graphs showing the morphometrical parameters in the proximal and distal portions of the sciatic nerve in non-diabetic (N, n=6), trained non-diabetic (TN, n=6), diabetic (D, n=6), trained diabetic (TD, n=8), non-diabetic submitted to sciatic nerve crush (NC, n=6), trained non-diabetic submitted to sciatic nerve crush (TNC, n=6), diabetic submitted to sciatic nerve crush (DC, n=9) and trained diabetic submitted to sciatic nerve crush (TDC, n=7) groups. A: Percentage of endoneurium and B: percentage of myelinated fibers. Data are expressed as means \pm SEM. a $P<0.05$ vs proximal portion in the same group; b $P<0.05$ vs. distal portion in the N, TN, D, TD groups; c $P<0.05$ vs. proximal portion in the N, TN, D, TD, NC, TNC and TDC groups.

Uninjured diabetic groups (D and TD) showed a decrease in the axonal diameter of the sciatic nerve ($P<0.05$; Fig. 5A), while sedentary injured groups (NC and DC) showed a decrease in the myelinated fiber diameter and myelin sheath thickness of the proximal portion of the crushed nerve when compared to uninjured groups ($P<0.05$; Fig. 5BC). In addition, the DC group had a smaller axonal diameter than the uninjured rats ($P<0.05$; Fig. 5A).

At the distal portion of the crushed nerve, the axonal diameter, the myelinated fiber diameter and the myelin sheath thickness of all the injured groups (NC, TNC, DC, TDC) were smaller than in the uninjured groups (N, TN, D, TD; $P < 0.05$; Fig. 5).

Comparing both nerve segments in the injured groups, the distal portion showed an increase in the percentage of endoneurium, a decrease in the percentage of myelinated fibers and a decrease in axonal diameter, myelinated fiber diameter and myelin sheath thickness ($P < 0.05$). However, there was no difference in the myelin sheath thickness between the proximal and distal portions of the sciatic nerve in the DC group ($P > 0.05$; Fig. 4 and 5).

In these analyzed morphometric measurements, there were no differences between the N *versus* TN, D *versus* TD and NC *versus* TNC groups ($P > 0.05$) and there was also no difference in the density of the myelinated fibers among all the studied groups (data not shown; $P > 0.05$).

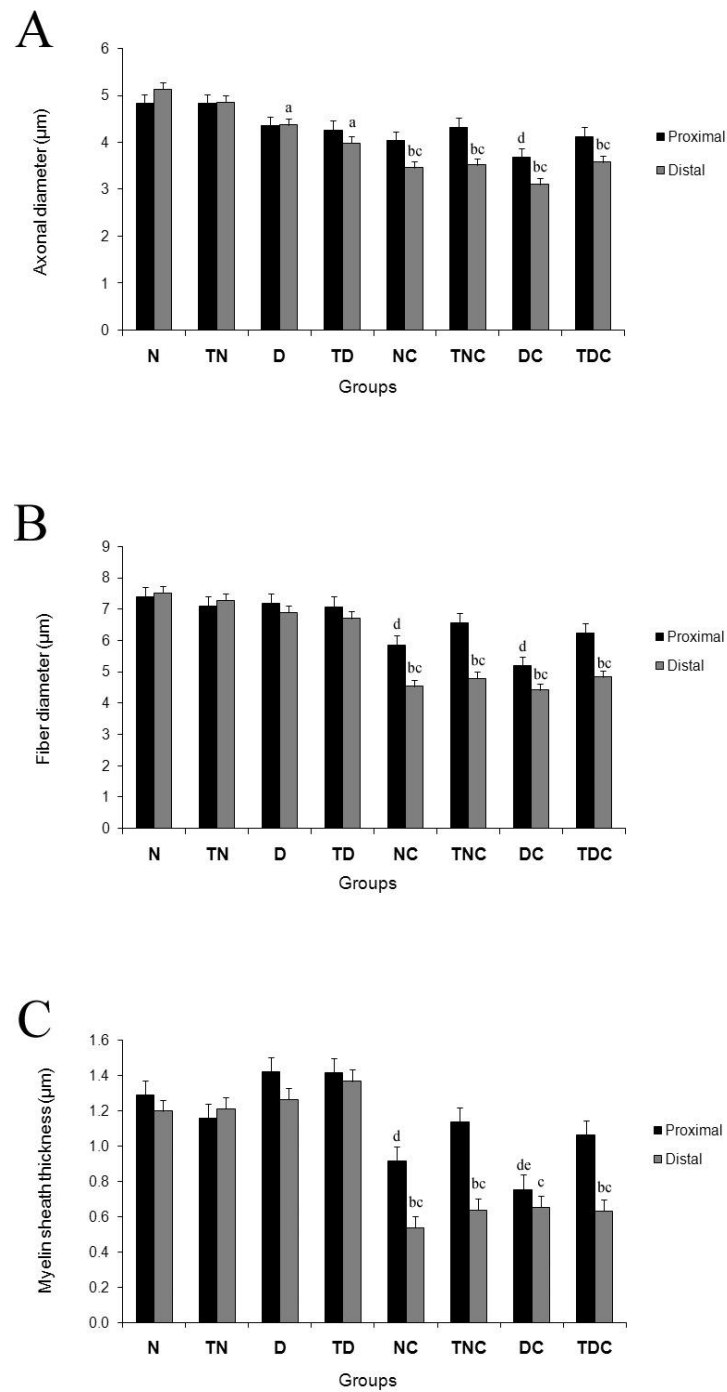


Figure 5- Graphs showing the morphometrical parameters in the proximal and distal portions of the sciatic nerve in non-diabetic (N, n=6), trained non-diabetic (TN, n=6), diabetic (D, n=6), trained diabetic (TD, n=8), non-diabetic submitted to sciatic nerve crush (NC, n=6), trained non-diabetic submitted to sciatic nerve crush (TNC, n=6), diabetic submitted to sciatic nerve crush (DC, n=9) and trained diabetic submitted to sciatic nerve crush (TDC, n=7) groups. A: average axonal diameter; B: average myelinated fiber diameter; C: average myelin sheath thickness. Data are expressed as means \pm SEM. a $P < 0.05$ vs. distal portion in the N and TN groups; b $P < 0.05$ vs. proximal portion in the same group; c $P < 0.05$ vs. distal portion in the N, TN, D, TD groups; d $P < 0.05$ vs. proximal portion in the N, TN, D, TD groups; e $P < 0.05$ vs. proximal portion in the TNC and TDC groups.

Discussion

Axonotmesis, commonly seen in crush injury, causes severe sensorimotor impairments and functional disabilities.¹⁶ As seen in our study, crush injury induced a temporary, but complete, loss of function that recovered to control levels by 4 weeks, in non-diabetic rats.^{15,17} Complete recovery after crush injury has been explained by the guidance of regenerating axons through their original basal lamina tubes.¹⁸ However, a previous study showed that only 71.4% of the peroneal motoneurons were correctly directed 2 months after sciatic crush injury.¹⁹ The authors suggested that this misdirection may have been caused by damage to the basal lamina tubes by the applied crush technique as seen in others studies.²⁰

After sciatic nerve crush, there is a daily increase in SFI values, showing gradual improvement of hindlimb motor function.¹⁵ In our study, in the first three weeks after sciatic nerve crush, injured diabetic rats showed significantly lower SFI values, when compared with injured non-diabetic rats. Moreover, while the non-diabetic rats showed signs of functional recovery from post-injury week 4, diabetic rats recovered their motor function only after post-injury week 9. These findings indicate that the spontaneous functional motor recovery is slower in the presence of persistent hyperglycemia and could be due to the defects in nerve regeneration after injury.

Previous studies have shown that nerve regeneration after injury is impaired in experimental²¹ and human²² diabetes as a result of delay in wallerian degeneration time course,²³ elongation rate of axonal sprouts²⁴ and subsequently in nerve fiber maturation.⁴

Although all injured rats displayed motor function recovery at 13 weeks after sciatic nerve crush, evidence of morphological alterations to the sciatic nerve remained in the proximal and distal nerve portions. In the proximal portion, the injured groups (NC and DC) showed reduction of the myelinated fiber diameter and myelin sheath thickness. The DC

group also showed axonal atrophy, decrease in the percentage of area occupied by myelinated fibers and increase in the percentage of area occupied by endoneurium.

Proximal to the lesion, generally the degeneration stops at the first internode in mild injuries, but may extend further proximally in severe injuries.²⁵ Little is known regarding the effects of crush on the proximal sciatic portion since most studies focus on the distal portion. A recent study from our laboratory showed a decrease in myelinated fiber and axonal diameter in non-diabetic rats after 7 weeks following sciatic nerve crush.⁸ We believe that these findings in the proximal nerve portion of the NC and DC groups may indicate incomplete fiber maturation after retrograde degeneration, following sciatic nerve crush and/or by degeneration process of misdirected axons, which fail to reach the end-organ. Also, a reduced axon diameter represents a characteristic common in diabetes caused by persistent hyperglycemia. In fact, axonal atrophy is a common finding in diabetic peripheral nerves after short (15 days)²⁶ and long term (12 weeks and 12 months) diabetes.^{2,27}

Distal to crush injury, in all the studied groups, there were reductions in the myelinated fiber diameter, axonal diameter, myelin sheath thickness and area occupied by myelinated fiber and an increase in the area occupied by endoneurium. These morphometric alterations could indicate incomplete spontaneous regeneration after wallerian degeneration of the distal nerve portion. These morphological alterations in the distal portion of the sciatic nerve were also observed at 3,¹⁷ 7⁸ and 12 weeks^{15,17} after crush injury in non-diabetic rats, and at 5 and 24 weeks after nerve injury in diabetic rats.²⁸

Considering the debility of motor function presented by injured diabetic animals in the first weeks after sciatic nerve crush, in the present study, we chose to start the training protocol in 4th week after the crush injury, in order to prevent the deleterious effects of exercise on denervated muscle in the diabetic groups.²⁹

The treadmill training, in our study, was not able to promote morphometric modifications of the distal nerve portion of the injured nerve. However, the treadmill training accelerated functional motor recovery to the 7th week after sciatic nerve crush of the injured diabetic rats and prevented/reverted the morphological alterations found in the proximal portion of non-diabetic and diabetic injured sciatic nerve.

Treadmill training after nerve injury, of non-diabetic rats, produces a marked enhancement of motor axon regeneration^{7,30} and enhances the return of sensorimotor function^{30,31} without an increase in the proportion of misdirected motor axons to functionally inappropriate targets.⁶

A previous study showed that 7 weeks following sciatic nerve crush the distal nerve portion of the endurance-trained non-diabetic rats (by 5 weeks) showed an increase in myelin sheath thickness and in the percentage of the area occupied by myelinated fibers in comparison with sedentary non-diabetic rats. This study also showed that abnormal morphological alterations of the proximal portion of sciatic nerve after crush, in non-diabetic rats, were also prevented/reverted by exercise.⁸

We hypothesized that increasing motoneuron inputs via the spinal circuits that drive locomotion during the regeneration period may influence the functional and morphological outcome by enhancing fiber maturation which is impaired by diabetes⁴ and by crush.⁸ Treadmill training may promote enhancement of fiber regeneration after sciatic nerve crush by potentiating Schwann cell proliferation mediated by phospho-ERK1/2 protein levels³² and by up regulation of neurotrophins resulting from increased neuronal activity.³³ In fact, the expression of neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT-3) were decreased in diabetes³⁴ and increased by exercise training in muscle and spinal cord.³⁵

Conclusions

Our findings indicate that diabetic condition caused deleterious effects on sciatic nerve regeneration demonstrated by a delay in hindlimb motor function recovery and worse morphometric alterations in proximal nerve portions. In addition, even in the presence of persistent hyperglycemia, a 10-week treadmill training protocol was able to accelerate hindlimb motor function recovery in injured diabetic rats and prevent/revert morphometric alterations in proximal nerve portions in non-diabetic and diabetic injured rats.

Acknowledgments: This work was supported by the Brazilian funding agencies: CNPq and CAPES. We are indebted to Roche for the test-strip donations. The authors are grateful to Moema Queiros and Christiane Lopes (Electronic Microscope Center, CME/UFRGS) for their technical assistance.

References

1. Dyck PJ, Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1181-1193.
2. Filho OAQR, Fazan VPS. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. *J Neurosci Methods* 2006; 151: 131-138.
3. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 1999; 42: 773-788.
4. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 2003; 69: 229-285.
5. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F, et al. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications* 2006; 20: 216-223.
6. English AW, Cucoranu D, Mulligan A, Sabatier M. Treadmill training enhances axon regeneration in injured mouse peripheral nerves without increased loss of topographic specificity. *J Comp Neurol* 2009; 517(2): 245-55.
7. Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, English AW. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp Neurol* 2008; 211(2): 489-93.
8. Ilha J, Araújo RT, Malysz T, Hermel EES, Rigon P, Xavier LL, et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 2008; 22: 355-366.
9. Do Nascimento PS, Malysz T, Ilha J, Araujo RT, Hermel EES, Kalil-Gaspar PI et al. Treadmill training increases the size of A cells from the L5 dorsal root ganglia in diabetic rats. *Histology and Histopathology* 2010; 25: 719-732.
10. De Angelis KLD, Oliveira AR, Dall'ago P, Peixoto LRA, Gadonski G, Fernandes TG, et al. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 635-641.
11. Souza SB, Flues K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE, et al. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 2007; 30: 786-791.
12. Selagzi H, Buyukakilli B, Cimen B, Yilmaz N, Erdogan S. Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 971-8.

13. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 38.
14. Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita MAS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods* 2001; 108: 1-9.
15. De Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods* 1995; 58: 29-37.
16. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 2007; 82: 163-201.
17. Hoogeveen JF, Troost D, Wondergem J, Van der Kracht AH, Haveman J. Hyperthermic injury versus crush injury in the rat sciatic nerve: a comparative functional histopathological and morphometrical study. *J Neurol Sci* 1992; 108(1): 55-64.
18. Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 2002; 5: 861–867.
19. De Rooter GC, Malessy MJ, Alaid AO, Spinner RJ, Engelstad JK, Sorenson EJ, et al. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Exp Neurol* 2008; 211: 339-350.
20. Bodine-Fowler SC, Meyer RS, Moskovitz A, Abrams R, Botte MJ. Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques. *Muscle Nerve* 1997; 20: 29–37.
21. Kennedy JM, Zochodne DW. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent timing and possible mechanisms. *Brain* 2000; 123: 2118–2129.
22. Bradley JL, Thomas PK, King RH, Muddle JR, Ward JD, Tesfaye S, et al. Myelinated nerve fibre regeneration in diabetic sensory polyneuropathy: correlation with type of diabetes. *Acta Neuropathol* 1995; 90: 403–410.
23. Terada M, Yasuda H, Kikkawa R. Delayed Wallerian degeneration and increased neurofilament phosphorylation in sciatic nerve of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Neurol Sci* 1998; 155: 23-30.
24. Ekström PAR, Kanje M, Skottner A. Nerve regeneration and serum levels of insulin-like growth factor-1 in rats with streptozotocin-induced insulin deficiency. *Brain Res* 1989; 496: 141-148.

25. Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* 2008; 119: 1951-1965.
26. Salgado HC, Fazan Júnior R, Fazan VP, Da Silva VJ, Barreira AA. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 940: 20-27.
27. Bestetti G, Rossi GL, Zemp C. Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. A qualitative and quantitative study. *Acta Neuropathol* 1981; 54: 129-134.
28. Terada M, Yasuda H, Kikkawa R, Shigeta Y. Tolrestat improves nerve regeneration after crush injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 1996; 45: 1189-1195.
29. Herbison GJ, Jaweed MM, Diturnno JF, Scott CM. Effect of overwork during reinnervation of rat muscle. *Exp Neurol* 1973; 41: 1-14.
30. Marqueste T, Alliez J-R, Alluin O, Jammes Y, Decherchi P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *J Appl Physiol* 2004; 96: 1988–1995.
31. Seo TB, Han IS, Yoon JH, Hong KE, Yoon SJ, Namgung U. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38(7): 1267-76.
32. Seo TB, Oh MJ, You BG, Kwon KB, Chang IA, Yoon JH, et al. ERK1/2-mediated Schwann cell proliferation in the regenerating sciatic nerve by treadmill training. *J Neurotrauma* 2009; 26(10):1733-44.
33. Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14661-14668.
34. Rodríguez-Peña A, Botana M, González M, Requejo F. Expression of neurotrophins and their receptors in sciatic nerve of experimentally diabetic rats. *Neurosci Lett* 1995; 200: 37-40.
35. Gómez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1078-1084.

5.2 EXPERIMENTO 2 – SEGUNDO ARTIGO -

**EXERCISE TRAINING IMPROVES THE SOLEUS MUSCLE MORPHOLOGY IN
EXPERIMENTAL DIABETIC NERVE REGENERATION**

Tais MALYSZ^{1,2}, Jocemar ILHA^{1,2}, Patrícia Severo DO NASCIMENTO^{1,2}, Maria Cristina
FACCIONI-HEUSER^{1,2}, Kátia DE ANGELIS³, Beatriz D'Agord SCHAAN^{1,4}, Matilde
ACHAVAL^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

²Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS,
Brasil

³Laboratório de Movimento Humano – Universidade de São Judas Tadeu, São Paulo – SP,
Brasil

⁴Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul e Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Fundação Universitária
de Cardiologia Porto Alegre, RS, Brasil

Acknowledgments: This work was supported by the Brazilian funding agencies: CNPq and CAPES. We are indebted to Roche for the test-strip donations. The authors are grateful to Moema Queiros and Christiane Lopes (Electronic Microscope Center, CME/UFRGS) for their technical assistance.

Corresponding author:

Matilde Achaval, MD, PhD.

Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: +55 51 33083624, Fax: +55 51 33083092

E-mail: achaval@ufrgs.br

ABSTRACT

Introduction: We described the effects of exercise training (10 weeks) on soleus muscle morphology in diabetic nerve regeneration after right sciatic nerve crush injury. **Methods:** Wistar rats were assigned to either a non-diabetic (n=6), non-diabetic injured (n=6), diabetic (n=6), diabetic injured (DC; n=9) or trained diabetic injured group (TDC; n=7). Transverse sections of myofibers were used for morphometrical and ultrastructural analyses. **Results:** Higher fiber density and smaller average myofiber areas were observed in DC and TDC ($P<0.05$). This atrophic pattern was partially reverted in TDC. The DC showed sarcomere misalignment and structural alterations to the sarcolemma, nucleus, mitochondria and blood vessels. In the TDC, myofibers and blood vessels were similar to those of the non-diabetic animals, as other organelles and new myofibrils. **Conclusions:** Sciatic nerve injury promoted soleus muscle atrophy and ultrastructural alterations in experimental diabetic nerve degeneration, which was partially reverted by exercise training.

Keywords: Experimental diabetes; nerve regeneration; exercise training; muscle morphometry; muscle ultrastructure

INTRODUCTION

Peripheral neuropathy and diabetic myopathy are common complications in patients with diabetes mellitus.^{1,2} Streptozotocin (STZ)-induced diabetes is a well-established animal model for diabetes and its complications in rats. Nerves from these rats show reduced myelinated fiber diameter, low nerve conduction velocity and minimal nerve fiber loss.³ Experimental diabetes also produces muscle alterations such as necrosis and focal muscular degeneration,⁴ crystal formation within the mitochondria,⁵ an increase in the number of lipid droplets,⁴⁻⁶ increased deposition of glycogen granules,⁷ higher undulations of the nuclear membrane,⁵ disruption of T tubules^{5,7} and reduction in total microvascular surface area.⁸

Regular walking exercise training is also commonly recommended by medical professionals for the treatment of the diabetic patients. Previous studies have shown that aerobic exercise training can attenuate autonomic nerve dysfunction in diabetic rats⁹⁻¹¹ and promote beneficial effects in the treatment of human¹²⁻¹³ and experimental¹⁴ diabetic peripheral neuropathy.

Nerve regeneration is known to be essential for the reversal of diabetic neuropathy¹⁵ and is closely associated with the morphological and functional integrity of the skeletal muscle.¹⁶ However, the effects of the exercise training on the diabetic skeletal muscles innervated by regenerating nerves are unknown.

Then, the aim of the study was to evaluate the effects of 10 weeks of treadmill exercise training on skeletal muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. To accomplish this, we studied the morphometrical and ultrastructural alterations of the soleus muscle in rats with STZ-induced diabetes submitted to sciatic nerve crush, a useful animal model for the study of nerve fiber regeneration.¹⁵

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Experiments were performed on 42 male Wistar rats weighing 260 g to 315 g, from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). The rats were housed in standard plexiglass boxes, under 12:12 h light/dark cycle, in a temperature-controlled environment ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), with food and water available *ad libitum*. The animals were cared for in accordance with the Brazilian law and the recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences, Review Committee of the School of Veterinary Surgery, University of Buenos Aires and the International Brain Research Organization, that are in compliance with the National Institute of Health's Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (publication no. 85-23, revised 1985).

The animals were randomly assigned to each of the following groups: non-diabetics (N; $n=6$), non-diabetics with sciatic nerve crush (NC; $n=6$), only diabetics (D; $n=6$), diabetics with sciatic nerve crush (DC; $n=9$) and trained diabetics with sciatic nerve crush (TDC; $n=7$). During the course of the 17 weeks of the experimental protocol, of the 30 diabetic rats, 8 rats died.

Diabetes induction

After fasting (6 h), rats were rendered diabetic by a single intravenous injection of STZ (50 mg/kg; Sigma Chemical Co., USA) diluted in citrate buffer (CB; pH 4.5; 2 mL/kg). Non-diabetic rats were injected only with CB. After 6 h of fasting, glycemia was evaluated using test strips (Advantage, Roche, Indianapolis, IN, USA) at 48 h after diabetes induction, weekly after the beginning of the experimental period and also 24 h after the last bout of

exercise. Only those rats with glycemic levels > 300 mg/dL were maintained in the diabetic groups. The rats were not given insulin therapy during the course of the study (17 weeks).

Surgical Procedures

Four weeks after diabetes induction, the animals were anesthetized using ketamine and xylazine (90 and 15 mg/kg, i.p., respectively; Vetbrands, Brazil), and the right sciatic nerve was exposed by means of a incision into gluteal muscle and crushed immediately behind the emergence of the lower limit of the gluteus maximus muscle. The crush was made with 1 mm non-serrated hemostatic forceps for 30 seconds¹⁷. In rats from the groups without crush injury, the sciatic nerve was exposed and elevated from its tissue bed, but no crush lesion was performed. The muscles were approximated, the skin was closed with 4-0 nylon sutures (Somerville, Brazil) and the animals were maintained in their cages for two weeks.

Maximal Exercise Test

Two weeks after the surgery, all animals were adapted to a treadmill for 10 min at 0.3 km/h for 4 days. Maximal exercise tests (METs) were performed after the adaptation period (MET1), at the end of the 5th week (MET2) and at the end of the training (MET3) to determine, adjust and compare the efficacy of the exercise training protocol, respectively. The test consisted of a graded exercise on the treadmill, with speed increments of 0.3 km/h (5 m/min) every 3 minutes, starting at 0.3 km/h and continuing up to the maximal intensity attained by each rat.¹⁸

Training Protocol

The training program was performed on a treadmill at an intensity of between 40-50% of the MET. It began in the 4th week after sciatic nerve crush, and consisted of two bouts a

day (4 hours between bouts), 0% grade, 5 days per week for 10 weeks.⁹ The program was made progressively more vigorous, the rats initially ran for 10 min in the 1st week, attained 40 min at the end of the 4th week and 60 min at the end of the 7th week. The time during which the animals trained at 50% MET was progressively increased.

Morphological muscle studies

Twenty-four hours after the end of the exercise training protocol, the rats were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg; i.p.; Cristália, São Paulo, Brazil) and then transcardially perfused with 0.9% saline solution followed by a fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, São Paulo, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, using a peristaltic pump (Milan, Paraná, Brazil) at room temperature. The right soleus muscle was isolated and excised from the hindlimb. Approximately ¼ of the central portion of each muscle (1-2 mm³) was post-fixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co., USA) in PB, dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Science, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) and polymerized at 60° C.¹⁹

Transverse semithin sections (900 nm) were obtained using an ultramicrotome (Leica Ultracut UCT 2.0, Austria) and stained with 1% toluidine blue (Merck, Germany) in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil).

Images of right soleus muscle were captured and digitalized (initially 20x and further amplified 100% for analysis) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Tokyo, Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). For morphometrical evaluation, a set of 6 images was chosen using random sampling of one slice. The total area examined of each soleus muscle was the sum of the 6 randomly selected areas (0.323 mm² in total). Morphometrical measurements

included the soleus myofiber density, average myofiber area, percentage of total area occupied by myofibers and percentage of area occupied by interstitial connective tissue. Furthermore, a frequency histogram (500 μm^2 intervals) was made.

The fiber density was estimated by examining the ratio of the fibers/total area analyzed. The value of the areas was estimated with a point-counting technique,^{17,19} using the following equation: $A = \sum p \cdot a/p$, where A is area, $\sum p$ the total of counted areas/point and a/p the area/point value (216.12 μm^2). By summing together all the fiber muscle areas, it was possible to estimate the total area occupied by muscle fibers and calculate his percentage from the total analyzed area. By deducting this percentage of area from the total analyzed area it was possible to estimate the percentage of area occupied by the interstitial connective tissue.

For the ultrastructural evaluation, ultrathin transverse and longitudinal sections (70–85 nm) of the soleus muscle were obtained with an ultramicrotome (Leica Ultracut UCT 2.0, Austria) and mounted on copper grids (200 meshes). In accordance with Reynolds (1963), these sections were stained with 1% uranyl acetate (Merck, Germany) followed by 1% lead citrate (Merck, Germany) and examined using an electron microscope (JEM 1200 EXII, Japan). Digitalized images of soleus muscle from rats in the N, D, DC and TDC groups ($n=4$ per group) were analyzed and compared with samples from control rats ($n=4$) to identify the ultrastructural changes caused by the MET.

Statistical analysis

The results of the measurement of glycemia, body weight and maximal speed were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni *post hoc* test was used to adjust the results of the multiple comparisons at $P < 0.05$. Soleus muscle cross-sectional mean area, myofiber density, percentage of interstitial connective tissue area, percentage of total analyzed myofiber area and area–frequency histograms were analyzed

using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's *post hoc* test with significance set at $P < 0.05$. Descriptive data were expressed as means \pm SEM. Data were run on SPSS® 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA).

RESULTS

Glycemia, body weight and maximal exercise test

The glycemic levels (mg/dL) were 93 ± 4 , 98 ± 1 , 401 ± 28 , 396 ± 16 and 445 ± 27 at 48 h after diabetes induction, and 92 ± 2 , 97 ± 2 , 412 ± 15 , 456 ± 20 and 475 ± 17 at the end of experiment in the N, NC, D, DC and TDC groups, respectively. Body weights (g) were 281 ± 8 , 292 ± 6 , 266 ± 5 , 267 ± 9 and 260 ± 7 at 48 h after diabetes induction, and 368 ± 10 , 393 ± 13 , 290 ± 3 , 252 ± 9 and 261 ± 13 at the end of experiment in the N, NC, D, DC and TDC groups, respectively.

During the experimental period, all rats from the diabetic groups showed higher glycemic levels and lower body weight when compared to rats from the non-diabetic groups ($P > 0.05$). There were no differences in glycemic or body weight values between the diabetic groups ($P > 0.05$). As expected, rats from the non-diabetic groups showed a progressive increase in body weight during the experiment ($P < 0.05$).

The trained diabetic injured group showed a progressive increase in maximal exercise test (MET) values along the training period ($P < 0.05$; MET1: 0.6 km/h; MET2: 1.02 ± 0.1 km/h; MET3: 1.38 ± 0.16 km/h). Both diabetic injured groups performed the MET with great difficulty. There were no significant alterations in MET values in the sedentary groups over time ($P > 0.05$; data not shown).

Histological and morphometrical studies

Transverse sections of the soleus muscle of the non-diabetic (N, NC) and diabetic groups (D, DC, TDC) are shown in representative digitalized images (Fig. 1). The soleus muscle of the non-diabetic groups showed a typical pattern of polygonal fibers surrounded by the interstitial tissue.

The diabetic group presented large and isolated rounded myofibers distributed among polygonal myofibers that did not present evident alteration in size when compared to the non-diabetic groups. On the other hand, the diabetic injured groups had isolated rounded myofibers with increased diameter, distributed among atrophic myofibers, which were more evident in the sedentary diabetic injured group.

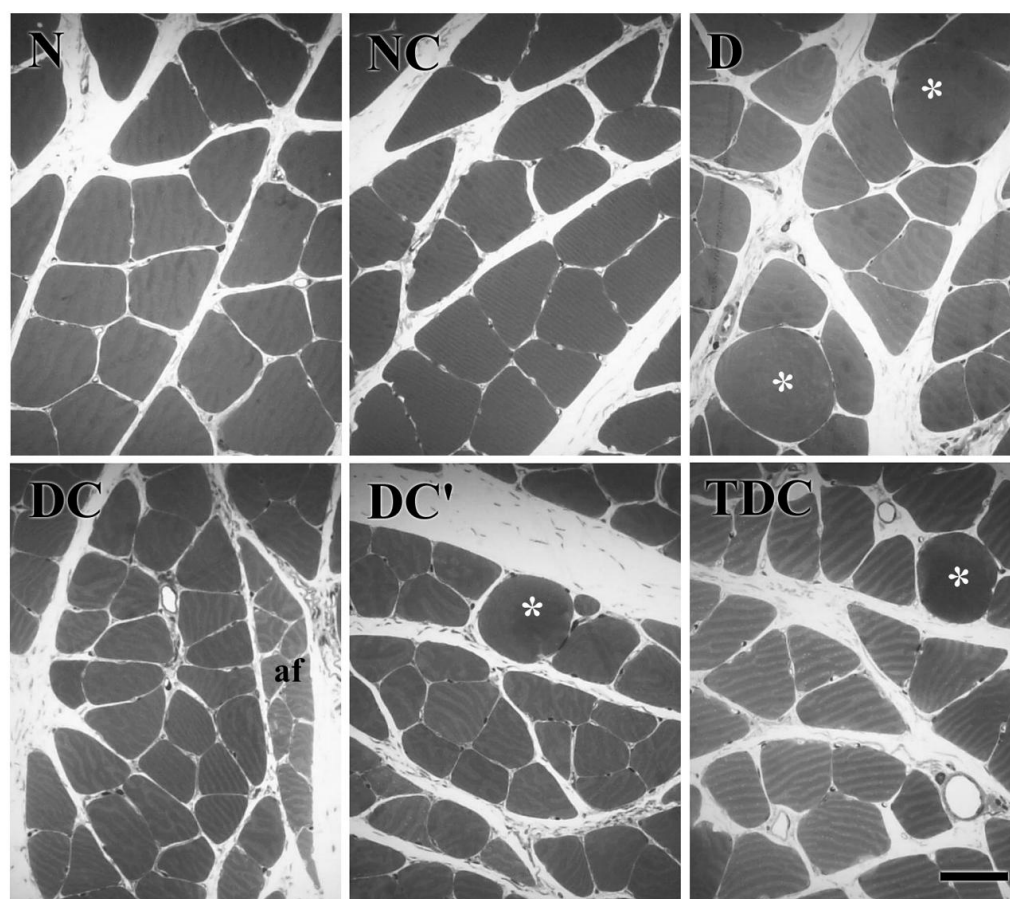


Figure 1. Digitalized images of transverse semithin sections of the right soleus myofibers from the non-diabetic group (N), non-diabetic with sciatic nerve crush group (NC), diabetic group (D), diabetic with sciatic nerve crush group (DC, DC') and trained diabetic with sciatic nerve crush group (TDC). Note the presence of atrophic myofibers (af; DC) and different sizes of rounded myofibers (*) in the D, DC' and TDC groups. Bar = 50 μm .

Injured diabetic groups showed a lower average of the total analyzed myofiber area ($P < 0.05$; DC: 1647.1 μm^2 ; TDC: 1839.4 μm^2) in comparison with the non-diabetic (2618.1 μm^2), non-diabetic injured (2353 μm^2) and uninjured diabetic (2460.3 μm^2) groups (Fig. 2A). The injured diabetic groups also showed a greater fiber density ($P < 0.007$; DC: 468 fiber/ mm^2 ; TDC: 385 fiber/ mm^2) compared with the non-diabetic (276 fiber/ mm^2), non-

diabetic injured (292 fiber/mm²) and uninjured diabetic (301 fiber/mm²) groups (Fig. 2B). Furthermore, the trained diabetic injured group had a lower myofiber density than the sedentary diabetic injured group ($P < 0.05$; Fig. 2B). There were no differences between the groups in terms of the total area occupied by myofibers and total area occupied by interstitial connective tissue $P > 0.05$; Fig. 2C-D).

Although no differences in the average myofiber area were found between the diabetic injured groups ($P > 0.05$; Fig. 2A), the frequency histogram showed alterations in the fiber area distribution (Fig. 3). The percentage of fibers with area between 1000-1500 μm^2 was lower in the trained diabetic injured group compared with the sedentary diabetic injury group ($P < 0.05$). No differences were observed between the non-diabetic, non-diabetic injured and uninjured diabetic groups in the frequency histogram (data not shown; $P > 0.05$).

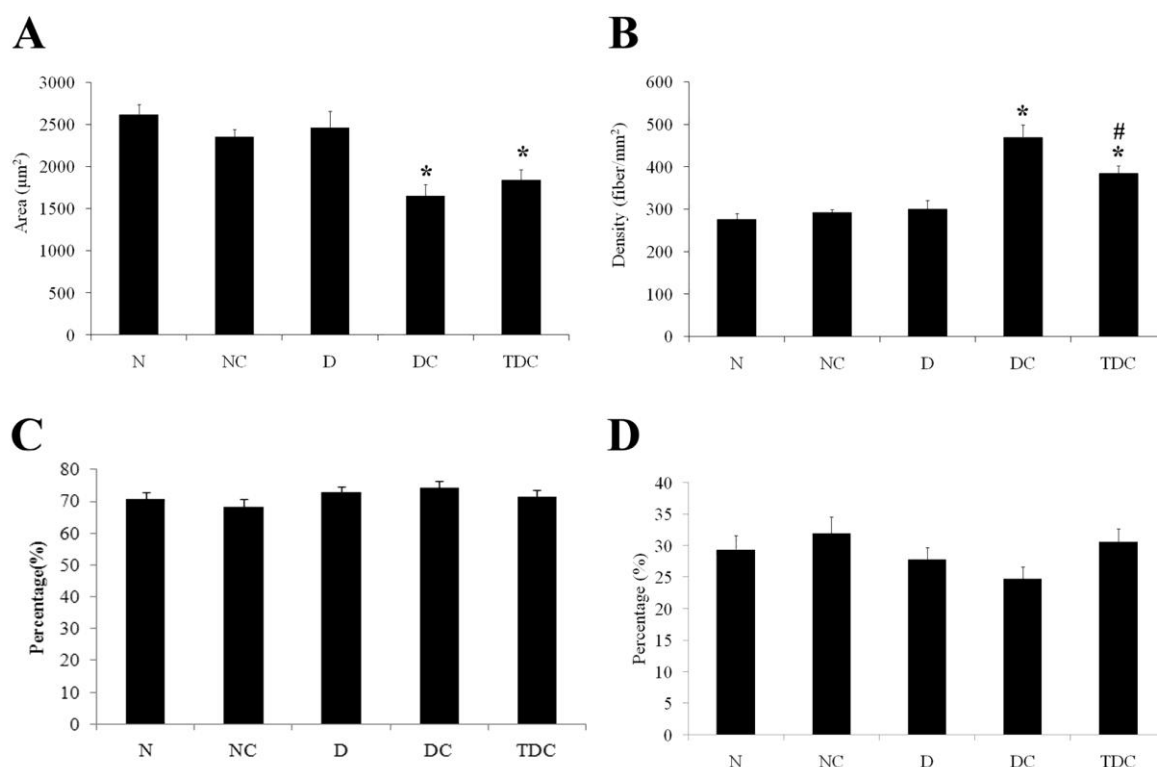


Figure 2. Graphs show the mean cross-sectional soleus myofiber area (A), density of the myofibers (B), percentage of total area occupied by myofibers (C) and percentage of total area occupied by interstitial connective tissue (D). * $P < 0.05$ vs N, NC and D; # $P < 0.05$ vs DC (ANOVA, followed by Duncan's *post hoc* test). Groups: N: non-diabetic; NC: non-diabetic with sciatic nerve crush; D: diabetic; DC: diabetic with sciatic nerve crush; TDC: trained diabetic with sciatic nerve crush.

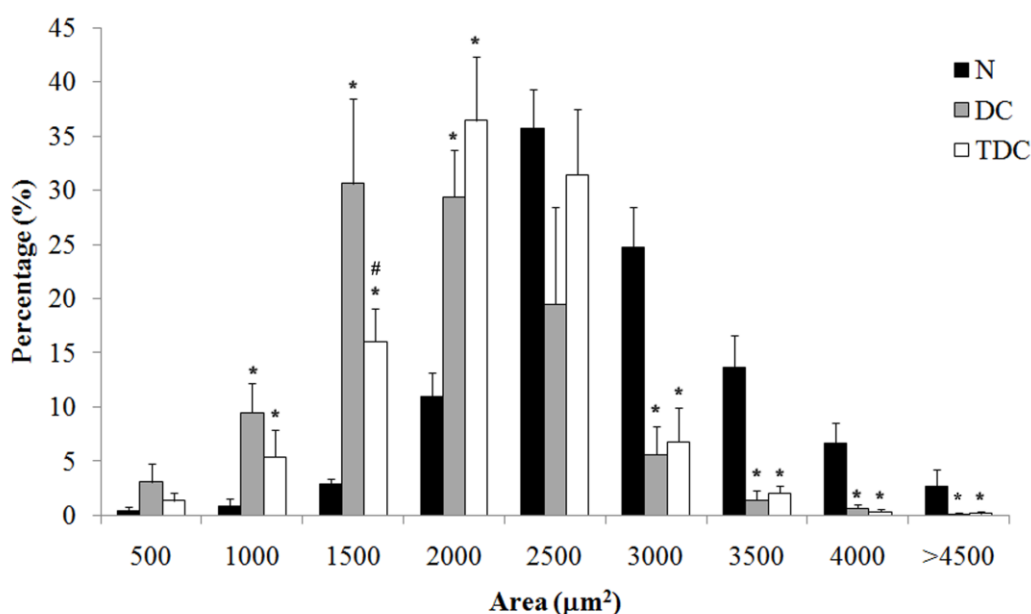


Figure 3. Frequency histograms of the soleus fiber cross-sectional area. * $P < 0.05$ vs N; # $P < 0.05$ vs DC (ANOVA, followed by Duncan's post hoc test). Groups: N: non-diabetic; DC: diabetic with sciatic nerve crush; TDC: trained diabetic with sciatic nerve crush.

Ultrastructural results

Electron micrographs of the soleus muscle revealed normal myofibers in all the sedentary control rats. The images were similar to those observed for most mammalian species, including the rat^{20,21}(Fig. 4 A-D).

In the non-diabetic group, some morphological alterations were noted at 24 h following MET 3. Some myofibers presented a swollen aspect with enlarged intermyofibrillar spaces, focal areas of disorganization or/and misalignment of myofilaments and sometimes Z-lines were misaligned or not detected (Fig. 4E). These alterations were also observed in all diabetic groups (Fig. 5A; 6D; 6E; 7B), though the swollen myofibers were scanty in the diabetic injured groups and there were fewer focal areas of disorganization or/and misalignment of myofilaments in the trained diabetic injured group.

Additionally, in all the diabetic groups, the myofibers were more often seen to have lipid droplets located beneath the sarcolemma and among the myofibrils than in the other

groups (more evident in the sedentary diabetic injured group; Fig. 6). Also, more glycogen granules with intermyofibrillar distribution were observed between the mitochondria and, occasionally, inside the autophagic vacuoles (Fig. 5-7). The latter were observed in the uninjured diabetic and sedentary diabetic injured group, but not in the trained diabetic injured group.

In the uninjured diabetic and sedentary diabetic injured groups, intermyofibrillar mitochondria with atypical shapes (Fig. 5A; 6G) and T tubules with oblique distribution (Fig. 5G; 6E) were observed. In the connective space there were irregular blood vessels with elongated projections to the lumen, thick walls and several transcytotic vesicles (Fig. 5F; 6H).

On the other hand, soleus muscle from the sedentary diabetic injured group also exhibited an irregularly-shape nucleus with an undulated aspect (Fig. 6I), a Golgi apparatus with increased cisternae (Fig. 6J), misalignment of several sarcomeres (Fig. 6E), Z-lines (Fig. 6D) and some degenerative vacuolated mitochondria (Fig 6J). Sarcolemma were seen to be interrupted (Fig. 6C) and occasionally dislocated (Fig. 6F; 6K). In the latter, the subsarcolemmal space was occupied by lipid droplets and cellular debris (Fig. 6F; 6K). Moreover, in the subsarcolemmal region, a membranous structure was found together with condensation of the glycogen granule and cellular debris (Fig. 6A; 6B).

In the trained diabetic injured group the myofibers and blood vessels had a similar normal aspect (Fig. 7A; 7C). The mitochondria were seen to have the aspect of a normal organelle (Fig. 7D; 7F). The sarcolemma and basal membrane were seen to be intact (Fig. 7D; 7G). The myofibers showed a nucleus-shape with a normal aspect and the presence of polyribosomes, rough sarcoplasmic reticulum, developed Golgi apparatus and new myofibrils located among mitochondrial condensation near of the sarcolemma and nucleus (Fig. 7D; 7H).

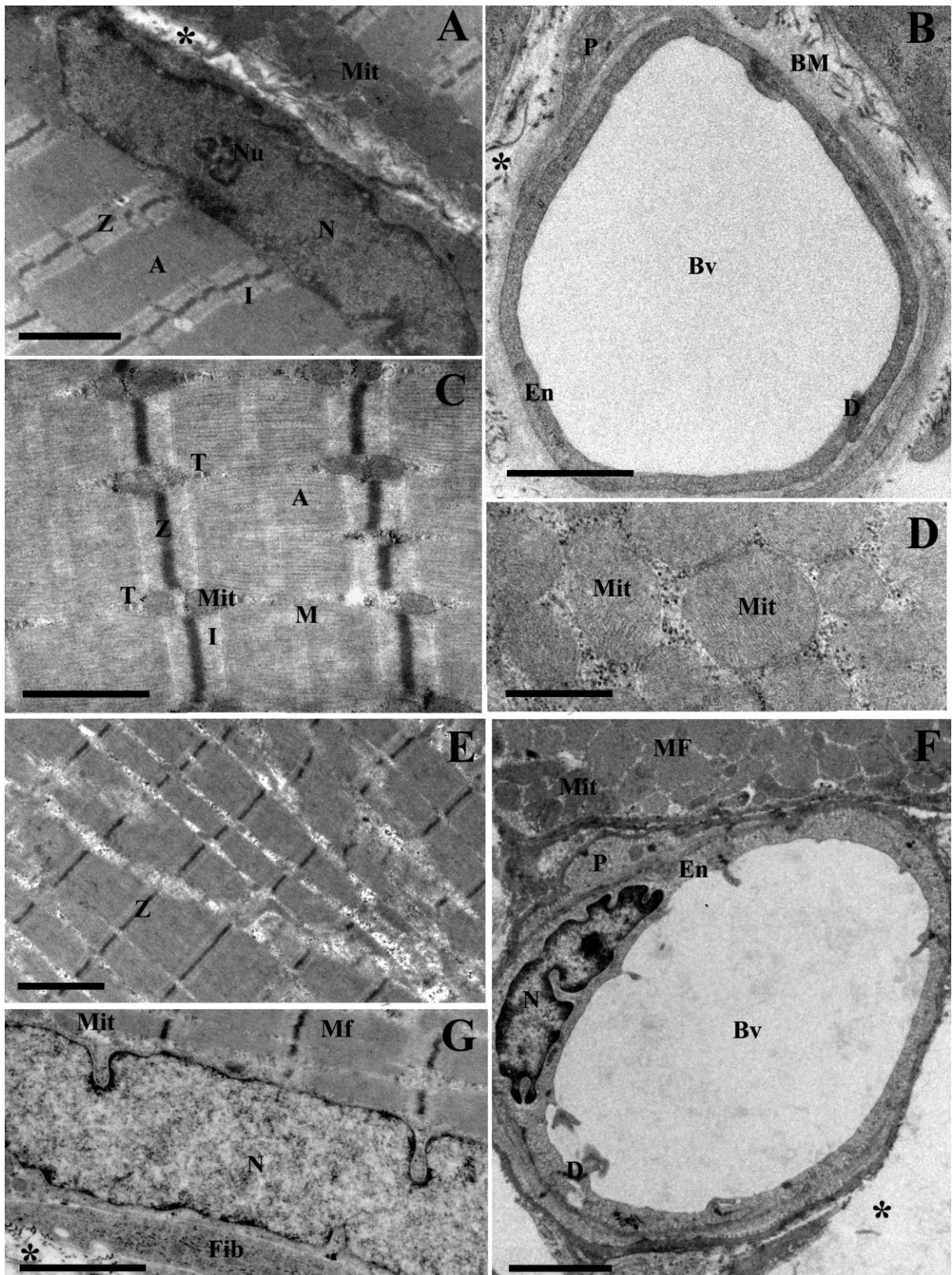


Figure 4. Electron micrographs of soleus muscle from the control (A-D) and non-diabetic (E-G) groups. The images show myofibers and the extracellular space between them (*). In A, note the regular well-defined nuclear region, sarcolemma, mitochondria condensed near the sarcolemma and regular disposition of myofibers. In B and F, note blood vessels with well-defined walls and regular lumen. In C note, the normal sarcomere structure with mitochondria in pairs near the Z-line and aligned T-tubules in proximity with the A-band. In D, a higher magnification of the mitochondria in the perinuclear region with glycogen granules among them. In E, note that

the swollen aspect of the myofiber with enlarged intermyofibrillar and intermitochondrial spaces, focal areas of disorganization or/and misalignment of myofilaments and sometimes Z-lines were misaligned or not detected. In G, note the regular nuclear region. Nucleus (N); nucleolus (Nu); extracellular space (*); mitochondria (mit); Z-line (Z); A-Band (A); I-Band (I); M-line (M); glycogen granules (G); blood vessel (bv); vascular endothelium (En); basement membrane (BM); desmosome (D); myofibrils (Mf); myofiber (MF); fibroblast (Fib). Scale bars: A, E, F, G 2 μ m; B, C 1 μ m; D 0.5 μ m.

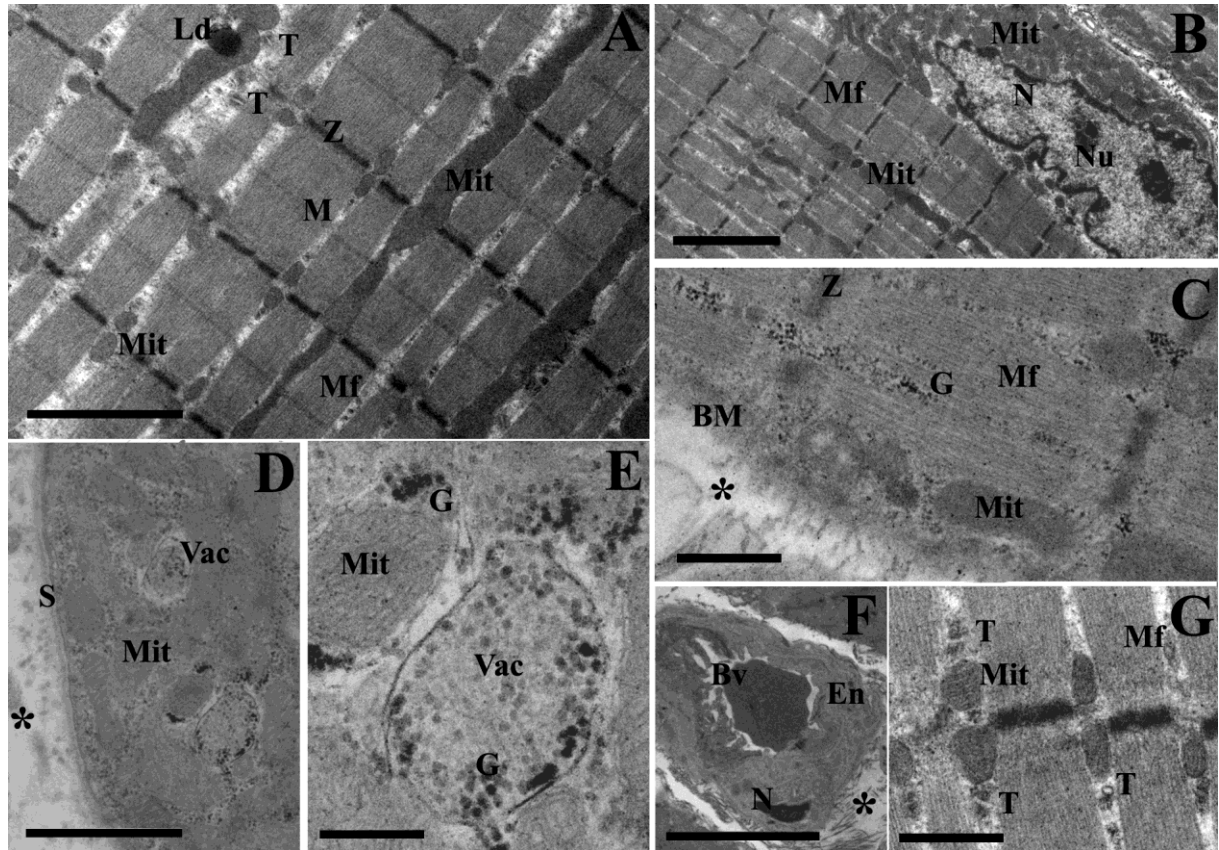


Figure 5. Electron micrographs of soleus muscle from the diabetic group. The images show myofibers and the extracellular space between them (*). In A, B and G the myofiber has a swollen aspect with enlarged intermyofibrillar and intermitochondrial spaces, focal areas of disorganization of myofilaments, intermyofibrillar lipid droplets, oblique T-tubules, intermyofibrillar mitochondria in pairs near the Z-line or with atypical shapes. In B, also note the regular well-defined nuclear region, sarcolemma, mitochondria condensed near the sarcolemma and around the nuclear region. In C, D and E, note glycogen granules with intermyofibrillar distribution between the mitochondria and, occasionally, inside vacuoles. In E note the glycogen granules outside and inside autophagic vacuoles and mitochondria. In F, note the irregular blood vessels with elongated projections to the lumen and thick walls. Lipid droplet (Ld); T-tubules (T); Nucleus (N); nucleolus (Nu); extracellular space (*); mitochondria (mit); Z-line (Z); M-line (M); blood vessel (bv); vascular endothelium (En); sarcolemma (S); basement membrane (BM); vacuoles (Vac); myofibrils (Mf); glycogen granules (G). Scale bars: F 5 μ m; A, B 2 μ m; C 1 μ m; E, G 0.5 μ m; D 0.2 μ m.

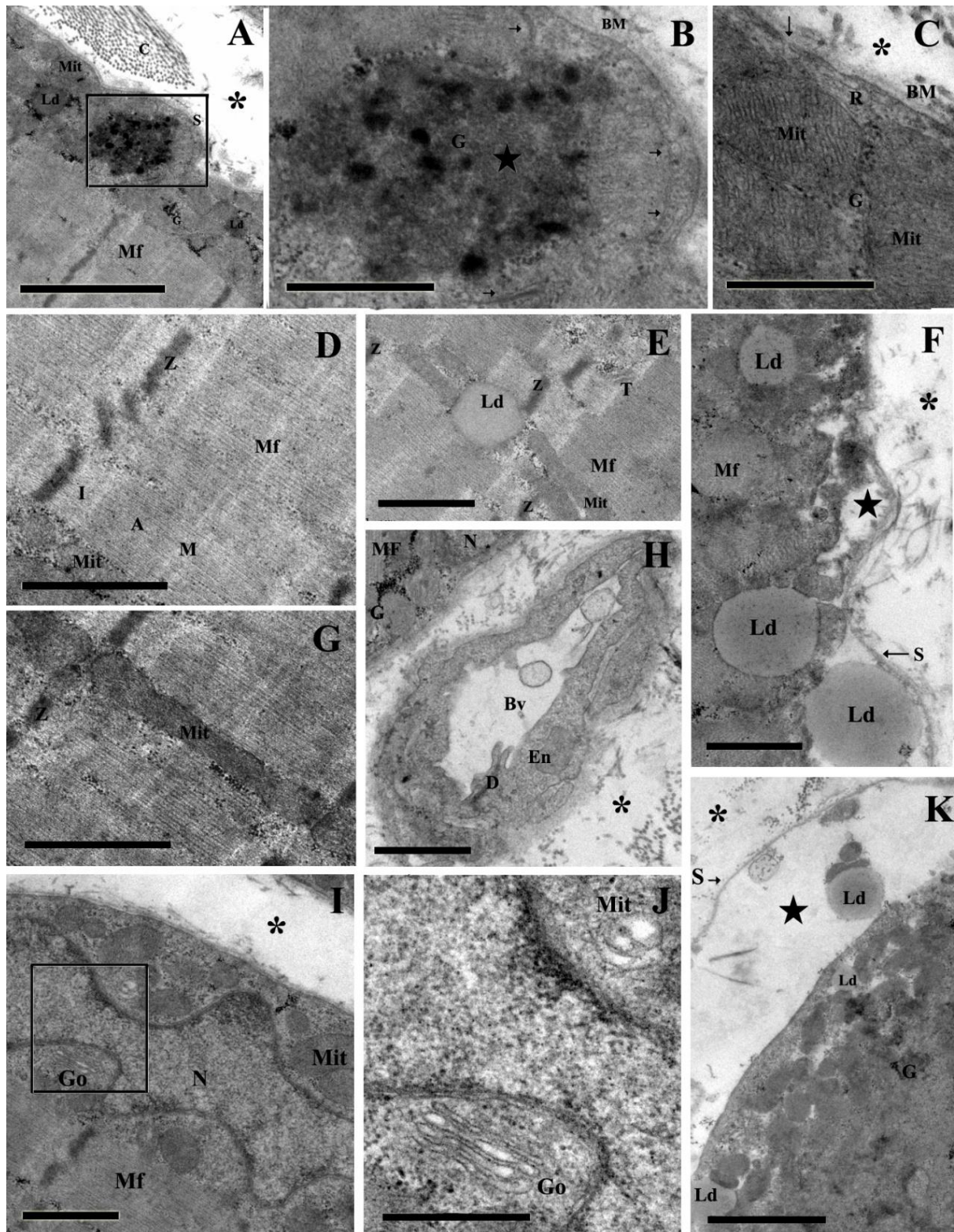


Figure 6. Electron micrographs of soleus muscle from the diabetic with sciatic nerve crush group. The images show myofibers and the extracellular space between them (*). In A, note the myofibrils and subsarcolemmal mitochondria, lipid droplet and glycogen granules condensation. In B (higher magnification of A), note the membranous structure (black star) with a condensation of degenerate membranous organelles (arrows), cellular debris and glycogen granules. In C, note the interrupted sarcolemma (arrows C). In F and K, note the dislocated sarcolemma, not attached to the myofibrils, and in the subsarcolemmal space (black star) note the lipid droplets and cellular debris. In D, E and F, note the focal areas of disorganization of the Z-line and myofilaments, intermyofibrillar glycogen granules and lipid droplets. In E and G, note the atypically-shaped intermyofibrillar mitochondria. In H, note the irregular blood vessels with elongated projections to the lumen and thick walls. In I

(with higher magnification in J), note the irregularly-shaped nucleus with an undulated aspect, a Golgi apparatus with enlarged cisternae and degenerative vacuolated mitochondria. Collagen (C); Lipid droplet (Ld); T-tubules (T); Nucleus (N); extracellular space (*); mitochondria (mit); Z-line (Z); A-Band (A); I-Band (I); M-line (M); blood vessel (bv); vascular endothelium (En); sarcolemma (S); basement membrane (BM); Golgi apparatus (Go); desmosome (D); ribosomes (R); myofibrils (Mf); glycogen granules (G). Scale bars: A, F 2 μm ; D, E, G, H, I, K 1 μm ; B, C, J 0.5 μm .

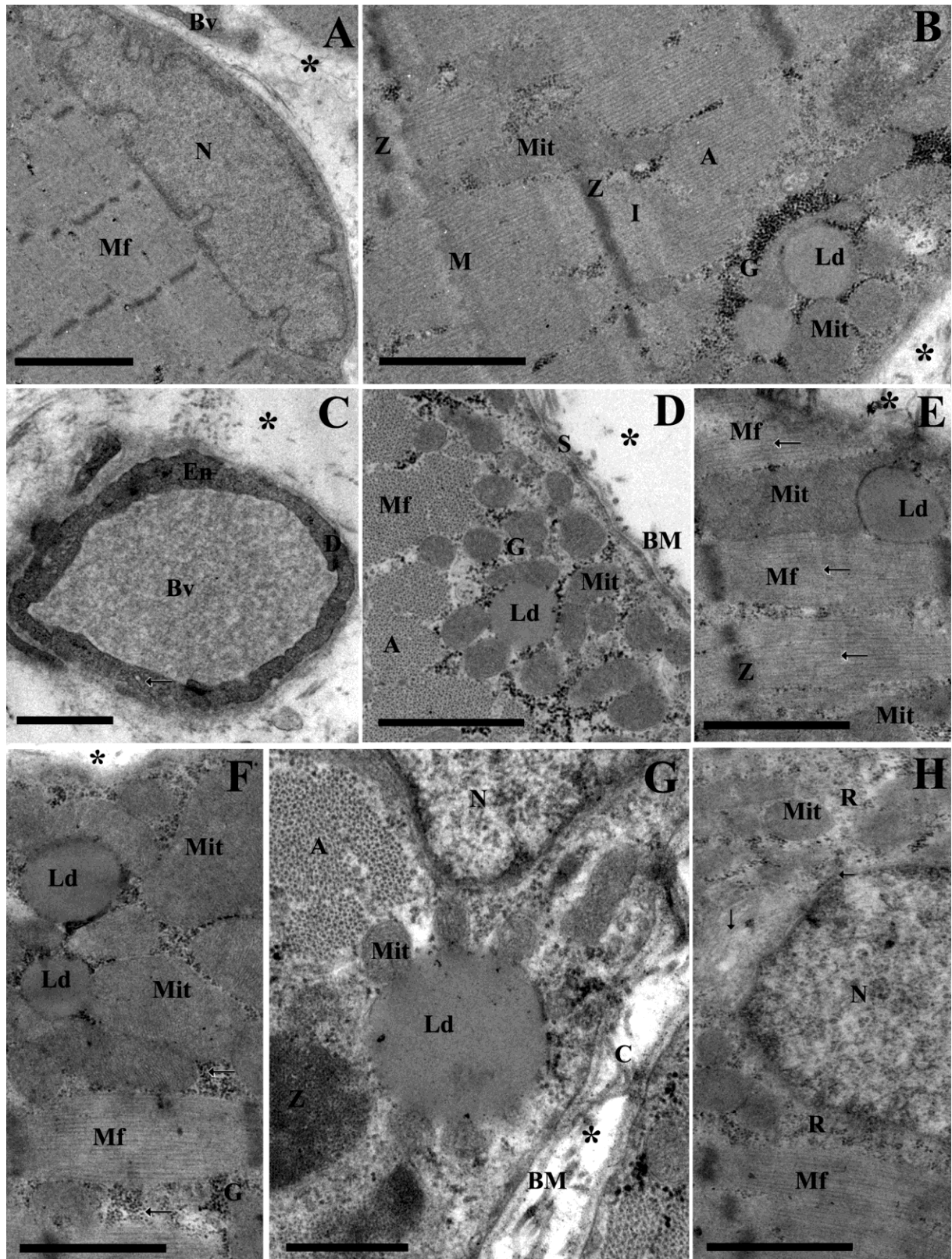


Figure 7. Electron micrographs of soleus muscle from the trained diabetic with sciatic nerve crush group. The images show myofibers and the extracellular space between them (*). In A, near the blood vessel, note the myofiber with intact basement membrane and sarcolemma, the normal appearance of the nucleus and the regular disposition of the myofibrils. In B, note the focal areas of disorganization of myofilaments, intermyofibrillar glycogen granules and lipid droplets, intermyofibrillar and subsarcolemmal mitochondria and subsarcolemmal lipid droplets. In C, note the blood vessels with a normal aspect and numerous transcytotic vesicles (arrow). In D, note the organization of the myofibrils in the transverse section, the intact sarcolemma and basal membrane and the presence of mitochondria, glycogen granules and lipid droplets near the sarcolemma. In D and G, note the presence of glycogen granules, mitochondria, lipid droplet and myofibers in subsarcolemmal and perinuclear region. In E, which represents a subsarcolemmal region in proximity with a nucleus, note the newly formed myofibers (arrows) among glycogen, lipid droplets and mitochondria condensation. In F, note the presence of rough sarcoplasmic reticulum (arrows), mitochondria and lipid droplets condensed in subsarcolemmal and perinuclear region. In H note the presence of free ribosomes, neurofilaments (vertical arrow), ribosomes attached to the nuclear membrane (horizontal arrow), mitochondria and myofibrils near the nucleus. Collagen (C); Lipid droplet (Ld); Nucleus (N); extracellular space (*); mitochondria (mit); Z-line (Z); A-Band (A); I-Band (I); M-line (M); blood vessel (bv); vascular endothelium (En); basement membrane (BM); desmosome (D); ribosomes (R); myofibrils (Mf); glycogen granules (G). Scale bars: A 2 μm ; B, C, D, E, F, H 1 μm ; G 0.5 μm .

DISCUSSION

As expected, all rats injected with streptozotocin displayed higher blood glucose levels and lower body weights than the non-diabetic animals over the follow-up period. These data confirm that the time-course of experimental diabetes did not change lower body weight and fasting glycemc values, as observed in previous studies from our group.^{18,22,23} Exercise training does not change the hyperglycemic state in the diabetic animals, which is in accordance with data previously reported in diabetic rats^{23,24} and type I diabetic patients.²⁵

In the histological examinations of the soleus muscle, diabetic groups showed isolated large rounded myofibers among normally sized fibers (D group) or atrophic fibers (DC and TDC groups). This aspect has been attributed to the myofibers of healthy motor units, which rapidly become enlarged due to the increased anabolic activity and decreased catabolism, as a compensatory effect to the presence of atrophic fibers.²⁶ Similar fibers have been described in denervated rabbit muscles from 36 to 51 weeks,²⁷ in muscles of patients with neurogenic atrophy²⁶ and in patients with Charcot-Marie-Tooth.²⁸ These data may indicate a possible relationship between long-term denervation and neuropathic processes and the presence of the rounded myofibers.

In the uninjured diabetic rats, soleus muscle morphometry, compared to uninjured non-diabetic rats, showed no changes to myofiber density, average cross-sectional area and distribution frequency of the different sizes of myofibers, as in previous studies.²⁹ However, STZ-diabetes can attenuate myofiber growth *in vivo* as a result of a reactive oxygen-species (ROS)-mediated G₂/M phase cell cycle arrest in myoblasts.³⁰

In addition, our study showed soleus myofiber atrophy in injured diabetic groups, which could be explained by reduced regenerative capacity after nerve injury, due to delay in axonal sprouting,³¹ reduction in the rate of regeneration³² and impairment of the maturation of

regenerated nerve fibers.³³ Moreover, since muscle necrosis is normally accompanied by regeneration, these small myofibers could also be new myofibers originated by satellite cells.^{27,34}

Furthermore, exercise training in diabetic injured rats changed the pattern of atrophy in the soleus muscle. Previous studies have shown that the aerobic exercise training in diabetic and non-diabetic rats does not alter the diameter of the soleus myofibers^{24,35} but enhances the axonal regeneration rate of injured peripheral nerves in non-diabetic rats^{17,36}. These alterations observed in trained injured diabetic rats may reflect an improvement in peripheral nerve regeneration³⁷ due to the reestablishment of functional connections with the target tissue³⁸ promoting muscle plasticity in experimental diabetic neuropathy.

A general edema and focal areas of disorganization and misalignment of the myofilaments was observed in the skeletal muscle from animals at 24 h following an exhaustive run during the MET3. Exhaustive exercise is known to be associated with the depletion of metabolic substrates such as glycogen, increases in metabolites, such as hydrogen ion, lactate and muscle fatigue,³⁹ while previous studies have shown significant injury in both humans and animals after running or walking.⁴⁰⁻⁴³ Moreover, it has been suggested that the large increase in metabolites and the mechanical disruption in skeletal muscle may be a cause of injury in skeletal muscle after exercise.⁴⁴

In this study, the focal areas of disorganization and misalignment of the myofilaments and Z-line observed in soleus muscle could have been caused by mechanical disruption after maximal exercise, the diabetic condition or nerve injury. Similar changes were reported after exhaustive exercise⁴⁵ in diabetic animals^{4,46} and denervation.⁴⁷ Moreover, studies have shown that mechanical injury activates proteolytic and degradative pathways, which are part of an intrinsic mechanism of the myofibers^{48,49}. On the other hand, focal areas of degenerative myofibers in diabetic animals could be explained by the increase in proteolysis and areas of

ischemia caused by microangiopathic events^{4,8,50} and after denervation by decreased protein synthesis⁵¹⁻⁵².

The increase in glycogen granules and lipid droplets seen in the myofibers of the diabetic rats in this study has also been reported in previous studies,^{4,7} and has also been seen in myopathic skeletal muscle.⁵³ In most myofiber disorders, there is an increase in glycogen granules especially between the myofibrils, in autophagic vacuoles and beneath sarcolemma.⁵⁴ Diabetic rats generally present increased lipolysis and alterations to lipid catabolism in peripheral tissues, which would explain the increased deposition of lipid droplets in myofibers and their accumulation around mitochondria,⁴⁻⁶ which could be a result of defective transport of free fatty acids across the mitochondrial membrane in β -oxidation, as shown in myopathy.⁵⁵

The atypically-shaped mitochondria observed in the soleus myofibers of the uninjured diabetic and sedentary diabetic injured groups, as well as in myopathies, could be associated with abnormalities in the oxidative metabolism.⁵³ Likewise, disorientation of some triads, as observed in these groups, is commonly described in diabetic rats^{5,7} and also, together with myofibrillar disorganization, in fibers undergoing degeneration or atrophy.^{47,56}

Irregular blood vessels with elongated projections to the lumen, thick walls and increased transcytotic vesicles were observed in the uninjured diabetic and sedentary diabetic injured groups. As with our results, a reduction in the total microvascular surface area,⁸ degeneration of capillaries⁴ and thickening of the capillary basement membrane⁵⁷ are common findings in diabetes. Enlarged endothelial cells and an increase in the numbers of transcytotic vesicles in such cells have also been found in polymyositis⁵⁸ and Duchenne dystrophy.⁵⁹

These alterations may be due to the complex interaction of metabolic and vascular abnormalities resulting from chronic hyperglycemia.¹ These alterations include direct metabolic insult to the tissues,⁶⁰ decreased protein synthesis and enhanced proteolysis,⁶¹

decreased activity and density of the pump $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$,^{62,63} increased activity of oxygen free radicals and reduced antioxidant defenses.^{64,65}

In addition to the morphological changes that probably occur as a consequence of metabolic alterations caused by chronic hyperglycemia, other modifications were found that may be due to the denervation related to the diabetic condition. The sedentary diabetic injured group also exhibits ultrastructural alterations to the myofibers which may be part of a process of degenerative disease. These include the mass of cellular debris near the sarcolemma and the loss of contact between the sarcolemma and the myofibrils, which were also observed in denervated non-diabetic animals.⁴⁷ In addition, the sedentary diabetic injured group showed alterations similar to those described in diabetes, including regions with discontinuous sarcolemma and rounded and vacuolated mitochondria.^{4,23,46} Furthermore, the nuclear membrane with prominent undulations seen in this group was also described in diabetic rats⁵ and in atrophying fibers.⁵³

Although, the trained diabetic injured group exhibited some alterations similar to those previously described in the other groups, the ultrastructure of the myofibers and blood vessels display a similar aspect to those of the control groups, demonstrating that exercise training is able to ameliorate the cellular alterations induced by the diabetic condition associated with denervation. The myofibers were seen to have polyribosomes, rough sarcoplasmic reticulum, developed Golgi apparatus and new myofibrils located among condensed mitochondria near the sarcolemma and nucleus. All these features could indicate an increase in synthetic activity^{53,66} stimulated by exercise training.

These optical and ultrastructural findings in soleus myofibers of trained animals may have been determined by several beneficial factors of the aerobic exercise training. These factors include increased protein synthesis,⁶⁷ increased expression and translocation of GLUT4 sarcolemma,⁶⁸ increased capillary supply in skeletal muscle⁶⁹ and protection against

oxidative stress.⁷⁰ On the other hand, it is possible that aerobic exercise training in diabetic rats may affect the course of peripheral nerve regeneration by increasing the expression of neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 4 (NT-4), and their tyrosine kinase receptors.^{71,72}

In conclusion, crush-induced denervation of the peripheral nerve of diabetic rats causes long-term effects resulting in soleus muscle atrophy and ultrastructural alterations. Treadmill exercise training, in this condition, promoted a better histological aspect of the myofibers and changed the atrophy pattern. Our results are important in clinical practice, since we have shown beneficial effects of exercise training on the soleus muscle of diabetic rats with injured peripheral nerve even in the presence of persistent hyperglycemia.

REFERENCES

1. Dyck PJ, Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1181-1193.
2. Krause MP, Riddell MC, Gordon CS, Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ. Diabetic myopathy differs between $Ins2^{Akita+/-}$ and streptozotocin-induced Type I diabetic models. *J Appl Physiol* 2009; 106: 1650-1659.
3. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 1999; 42:773-788.
4. Klueber KM, Feczko JD. Ultrastructural histochemical and morphometric analysis of skeletal muscles in a murine model of type I diabetes. *Anat Rec* 1994; 239: 18-34.
5. Chao TT, Lanuzz CD, Armstrong RB, Albright JT, Anapole SE. Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers of streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tissue Res* 1976; 168: 239-246.
6. Bestetti G, Zemp C, Probst D, Rossi GL. Neuropathy and myopathy in the diaphragm of rats after 12 months of streptozotocin-induced diabetes mellitus. A light-, electron-microscopic, and morphometric study. *Acta Neuropathol.* 1981; 55: 11-20.
7. Fahim MA, Hasan MY, Alshuaib WB. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2235-2240.
8. Sexton WL, Poole DC, Mathieu-Costello O. Microcirculatory structure-function relationships in skeletal muscle of diabetic rats. *Am J Physiol* 1994; 266: H1502-11.
9. De Angelis KLD, Oliveira AR, Dall'ago P, Peixoto LRA, Gadonski G, Fernandes TG et al. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 635-641.
10. Souza SB, Flues K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE et al. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 2007; 30: 786-791.
11. Harthmann AD, De Angelis K, Parente Costa L, Senador D, Schaan BD, Krieger EM et al. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosc* 2007; 133: 115-120.
12. Richardson JK, Sandman D, Vela S. A focused exercise regimen improves clinical measures of balance in patients with peripheral neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil* 2001; 82: 205-209.
13. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandrielo E, Leonetti F et al. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications* 2006; 20: 216-223.

14. Selagzi H, Buyukakilli B, Cimen B, Yilmaz N, Erdogan S. Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest* 2008; 31, 971-978.
15. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 2003; 69: 229-285.
16. Sakakima H, Kawamata S, Kai S, Ozawa J, Matuura N. Effects of short-term denervation and subsequent reinnervation on motor endplate and the soleus muscle in the rat. *Arch Histol Cytol* 2000; 63: 495-506.
17. Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EES, Rigon P, Xavier LL et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 2008; 22: 355-366.
18. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for exercise capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 38.
19. Marcuzzo S, Ferreira Dutra M, Stigger F, Severo Do Nascimento P, Ilha J, Kalil-Gaspar PI et al. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. *Brain Res* 2008; 30: 129-140.
20. Gauthier GF. Some ultrastructural and cytochemical features of fiber populations in the soleus muscle. *Anat Rec* 1974; 180: 551-564.
21. Fawcett DW. *Ultrastructure: The cell, its organelles and inclusions*. Philadelphia: Saunders; 1966.
22. Schaan BD, Dall'ago P, Maeda CY, Ferlin E, Fernandes TG, Schmid H et al. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1895-1902.
23. Do Nascimento PS, Malysz T, Ilha J, Araujo RT, Hermel EES, Kalil-Gaspar, PI et al. Treadmill training increases the size of A cells from the L5 dorsal root ganglia in diabetic rats. *Histology and Histopathology* 2010; 25: 719-732.
24. Sanchez OA, Snow LM, Lowe DA, Serfass RC, Thompson LV. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. *J Appl Physiol* 2005; 99: 472-478.
25. Hollingsworth DR, Moore TR. Postprandial walking exercise in pregnant insulin-dependent (type I) diabetic women: reduction of plasma lipid levels but absence of a significant effect on glycemic control. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 57: 1359-1363.
26. Maier F, Bornemann A. Comparison of the muscle fibre diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve* 1999; 22: 578-583.

27. Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Russold MF, Unger E, Bijak M et al. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *Am J Physiol* 2007; 292: C440–C451.
28. Ericson U, Ansved T, Borg K. Charcot-Marie-Tooth disease – muscle biopsy findings in relation to neurophysiology. *Neuromuscul Disord* 1998; 8: 175–181.
29. Hegarty PVJ, Rosholt MN. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the number and diameter of fibres in different skeletal muscles of the rat. *J Anat* 1981; 133: 205-211.
30. Johnston AP, Campbell JE, Found JG, Riddell MC, Hawke TJ. Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *American Journal of Physiology. Cell Physiol* 2007; 292: C1033-C1040.
31. Bisby MA. Axonal transport of labeled protein and regeneration rate in nerves of streptozotocin-diabetic rats. *Exp Neurol* 1980; 69: 74-84.
32. Longo FM, Powell HC, Lebeau J, Gerrero MR, Heckman H, Myers RR. Delayed nerve regeneration in streptozotocin diabetic rats. *Muscle Nerve* 1986; 9: 385-393.
33. Terada M, Yasuda H, Kikkawa R, Shigeta Y. Tolrestat improves nerve regeneration after crush injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 1996; 45: 1189-1195.
34. Kalhovde JM, Jerkovic R, Sefland I, Cordonnier C, Calabria E, Schiaffino S et al. "Fast" and "slow" muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J Physiol* 2005; 562: 847-857.
35. Schluter JM, Fitts RH. Shortening velocity and ATPase activity of rat skeletal muscle fibers: effects of endurance exercise training. *Am J Physiol* 1994; 266: C1699-1673.
36. Van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helders PJ, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 1997; 78: 70-77.
37. Zhou Z, Cornelius CP, Eichner M, Bornemann A. Reinnervation-induced alterations in rat skeletal muscle. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 595-602.
38. Irintchev A, Draguhn A, Wernig A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. *Neuroscience* 1990; 39: 231-243.
39. Karlson J, Saltin B. Lactate, ATP, and CP in working muscles during exhaustive exercise in man. *Am J Physiol* 1970; 29: 598-602.
40. Highman B, Altland PD. Effects of exercise and training on serum enzyme and tissue changes in rats. *Am J Physiol* 1963; 205: 162-166.
41. Jacobsson S, Kjellmer I. Accumulation of fluid in exercising skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1964a; 60: 286-295.

42. Jacobsson S, Kjellmer I. Flow and protein content of lymph in resting and exercising skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1964b; 60: 278-285.
43. Friden J, Sjoström M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med* 1983; 4: 170-176.
44. Armstrong RB. Mechanisms of exercise-induced delayed muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1984; 16: 529-538.
45. Warhol MJ, Siegel AJ, Evans WJ, Silverman LM. Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. *Am J Pathol* 1985; 118: 331-339.
46. Ozaki K, Matsuura T, Narama J. Histochemical and morphometrical analysis of skeletal muscle in spontaneous diabetic WBN/Kob rat. *Acta Neuropathol* 2001; 102: 364-370.
47. Pellegrino C, Franzini C. An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 1963; 17: 327-349.
48. Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* 1991; 12: 184-207.
49. Morgan DL, Allen DG. Early events in stretch-induced muscle damage. *J Appl Physiol* 1999; 87: 2007-2015.
50. Awad EA, Kottke FJ. Changes in muscle ultrastructure in diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil* 1970; 51: 683-687.
51. Sieck GC. Physiological effects of diaphragm muscle denervation and disuse. *Clin Chest Med* 1994; 15: 641-59.
52. Frostick SP. The physiological and metabolic consequences of muscle denervation. *Int Angiol* 1995; 14(3): 278-87.
53. Mastaglia FL, Hudgson P. Ultrastructural studies of diseased muscle. In: Walton, J. *Disorders of Voluntary Muscle*, 4th ed, New York: Churchill Livingstone; 1981, p. 296-356.
54. Mair WGP, Tomé FMS. *Atlas of the ultrastructure of diseased human muscle*. Churchill Livingstone Edinburgh & London; 1972.
55. Engel AG, Angelini C. Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy: a new syndrome. *Science* 1973; 179: 899-902.
56. Neville HE. Ultrastructural changes in muscle disease. In: *Muscle Biopsy* (Dubowitz V, Brooke, M) Saunders-London; 1973, p.383-444.
57. Zacks SI, Pegues JJ, Elliott FA. Interstitial muscle capillaries in patients with diabetes mellitus: a light and electron microscope study. *Metabolism* 1962; II: 381.
58. Mastaglia FL, Walton JN. An ultrastructural study of skeletal muscle in polymyositis. *J Neurol Sci* 1971; 12, 473.

59. Jerusalem F, Engel AG, Gomez MR. Duchenne dystrophy. I. Morphometric study of the muscle microvasculature. *Brain* 1974; 97: 115.
60. Gabbay KH, Merola LO, Field, RA. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 1966; 151: 209-210.
61. Pain VM, Garlick PJ. Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 1974; 249: 4510-4514.
62. Moore RD, Munford JW, Pillsworth TJ. Effects of streptozotocin diabetes and fasting on intracellular sodium and adenosine triphosphate in rat soleus muscle. *J Physiol* 1983; 338: 277-294.
63. Kjeldsen K, Braendgaard H, Sidenius P, Larsen JS, Norgaard A. Diabetes decreases NaK pump concentration in skeletal muscles, heart ventricular muscle and peripheral nerves of rat. *Diabetes* 1987; 31: 194-202.
64. Love A, Cotter MA, Cameron NE. Nerve function and regeneration in diabetic and galactosaemic rats: antioxidant and metal chelator effects. *Eur J Pharmacol* 1996; 314: 33-39.
65. Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J et al. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22(1):15-27.
66. Cullen MJ, Appleyard ST, Bindoff L. Morphologic aspects of muscle breakdown and lysosomal activation. *Ann N Y Acad Sci* 1978; 317: 440.
67. Tipton KD, Wolfe RR. Exercise-induced changes in protein metabolism. *Acta Physiol Scand* 1998; 162: 377-387.
68. Dela F, Handberg A, Mikines KJ, Vinten J, Galbo H. Glut 4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle. *J Physiol* 1993; 469: 615-624.
69. Gute D, Fraga C, Laughlin MH, Amann JF. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. *J Appl Physiol* 1996; 81: 619-626.
70. Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 2004; 97: 605-611.
71. Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H et al. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 1995; 268: 1495-1499.
72. Gómez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1078-1084.

6 DISCUSSÃO

Todos os ratos tratados com STZ apresentaram, ao longo de todo o estudo, altos níveis de glicose sanguínea quando comparados com os animais não-diabéticos. Estes dados confirmam que o tempo de diabetes experimental não altera os valores glicêmicos de jejum, como observado em estudos prévios (RODRIGUES et al., 2007; SCHAAN et al., 2004; DO NASCIMENTO et al., 2010). Outro importante achado foi que o treinamento físico não alterou o estado hiperglicêmico nos animais diabéticos, o que está de acordo com dados previamente publicados referente a ratos (SANCHEZ et al., 2005; DO NASCIMENTO et al., 2010).

Enquanto os ratos não-diabéticos tiveram um aumento progressivo do peso corporal, nos ratos diabéticos ocorreu diminuição do peso corporal, independente do esmagamento do nervo isquiático e da prática regular do treinamento físico, confirmando assim o seu estado catabólico, como previamente descrito (SCHAAN et al., 2004).

O teste de esforço máximo (TEM) é um instrumento útil na avaliação da capacidade cardiorrespiratória de ratos não-diabéticos e diabéticos (RODRIGUES et al., 2007). Conforme mostrado pela análise dos valores dos TEMs, no nosso estudo, os ratos sedentários não aumentaram a sua capacidade cardiorrespiratória, enquanto que os animais treinados mostraram uma melhora significativa da capacidade cardiorrespiratória depois de 5 e 10 semanas de treinamento físico com intensidade progressiva. De acordo com os resultados previamente publicados por Rodrigues et al. (2007) os ratos diabéticos treinados deste estudo apresentaram menor capacidade física aeróbica em comparação com ratos não-diabéticos treinados.

De acordo com estudos que correlacionaram o consumo de oxigênio com a velocidade da corrida em ratos sedentários (RODRIGUES, IRIGOYEN e DE ANGELIS, 2006), comparativamente, ratos e camundongos treinados não lesionados mostraram aumento na capacidade fisiológica aeróbica estimada (IRIGOYEN et al., 2005; DE ANGELIS et al., 2004). Outro estudo com semelhante protocolo de treinamento mostrou que os ratos treinados não-lesionados apresentaram bradicardia de repouso o que é um bom indicador da eficácia do treinamento no condicionamento físico (SOUZA et al., 2007).

Os ratos diabéticos lesionados mostraram redução da velocidade de esforço máximo atingida durante a realização do teste antes do início do treinamento físico (menor TEM1 em comparação com os outros grupos). Esta redução foi progressivamente atenuada ao longo do tempo de protocolo experimental, conforme mostrado pelos valores de TEM2, os quais se apresentaram semelhantes aos dos outros grupos. Por outro lado, os ratos não-diabéticos lesionados não apresentaram esta redução da velocidade no TEM1. Nós acreditamos que a redução da velocidade durante o teste de esforço máximo dos ratos diabéticos lesionados foi determinada pelo déficit funcional da marcha induzido pelo esmagamento do nervo isquiático em associação com o insulto metabólico, o qual tem sido associado com o atraso no processo regenerativo de animais diabéticos (TANTUWAYA et al., 1997; KENNEDY e ZOCHODNE, 2000). Isto poderia explicar a recuperação parcial mostrada pelos ratos diabéticos lesionados oito semanas após o procedimento cirúrgico (conforme TEM2) a qual ocorreu independentemente da prática do treinamento físico.

A axonotmese, comumente vista na lesão nervosa por esmagamento, provoca grandes déficits sensório-motores e funcionais (DE MEDINACELI, 1988). Como também foi observado em nosso estudo, a lesão por esmagamento do nervo isquiático induz a uma temporária, mas completa, perda da função motora, a qual retorna aos níveis normais, na

quarta semana após a lesão, em ratos não-diabéticos (HOOGEVEEN et al., 1992; DE MEDINACELI, 1995). A recuperação completa após a lesão tem sido explicada pelo crescimento orientado dos axônios em regeneração através dos tubos formados pela lâmina basal (DE MEDINACELI, 1988; NGUYEN et al., 2002). No entanto, dois meses depois do esmagamento do nervo isquiático, apenas 71,4% dos motoneurônios peroneais regeneram de forma orientada em direção ao órgão-alvo (DE RUITER et al., 2008). De acordo com diferentes estudos, esta perda da direção pode ser causada por danos aos tubos de lâmina basal devido ao procedimento cirúrgico de esmagamento aplicado (BODINE-FOWLER et al., 1997; SWETT et al., 1991; VAREJÃO et al., 2004).

Após o esmagamento do nervo isquiático, há um aumento diário nos valores de IFI, indicativo de melhora progressiva da função motora do membro posterior (DE MEDINACELI, 1995). Em nosso estudo, nas três primeiras semanas após o esmagamento do nervo isquiático os ratos diabéticos lesionados apresentaram valores de IFI significativamente mais baixos, quando comparado com ratos não-diabéticos lesionados. Além disso, enquanto os ratos não-diabéticos mostraram recuperação funcional de semana na 4ª semana após a lesão, os ratos diabéticos recuperaram a função motora na 9ª semana após a lesão. Estes resultados indicam que a espontânea recuperação motora funcional é mais lenta na presença de hiperglicemia persistente e pode ser devido à presença de déficits na regeneração do nervo periférico após a lesão.

O déficit na regeneração nervosa periférica após lesão em ratos diabéticos foi demonstrado usando diferentes métodos, como técnicas eletrofisiológicas (LOVE et al., 1996), o teste "reflex pinch" (BISBY et al., 1980), técnicas de imunohistoquímica e de microscopia eletrônica (LONGO et al., 1986; TRIBAN et al., 1989). O processo regenerativo foi mostrado ser deficiente no diabetes experimental (TANTUWAYA et al., 1997; KENNEDY e ZOCHODNE, 2000) e em humanos (BRADLEY et al., 1995) por consequência

de atraso na degeneração walleriana (TERADA et al., 1998), no brotamento axonal (BISBY, 1980), na taxa de crescimento dos brotos axonais (EKSTRÖM et al., 1989) e na maturação da fibra nervosa. Esta maturação inclui um aumento no diâmetro axonal, a formação da unidade axônio-célula de Schwann, e a mielinização apropriada das fibras nervosas (YASUDA et al., 2003).

Apesar de todos os ratos lesionados terem mostrado recuperação da função motora do membro posterior, 13 semanas após esmagamento do nervo isquiático, foram encontradas alterações morfológicas nas porções proximal e distal do nervo isquiático. No segmento proximal, os grupos de ratos lesionados (NDE e DE) mostraram redução do diâmetro das fibras mielinizadas e da espessura da bainha de mielina. Além destas alterações o grupo diabético lesionado também mostrou atrofia axonal, diminuição do percentual da área ocupada por fibras mielinizadas e aumento do percentual de área ocupada por endoneuro.

Proximal à lesão, geralmente o processo degenerativo cessa no primeiro internodo em lesões leves, mas pode se prolongar ainda mais proximalmente em lesões graves (CAMPBELL, 2008). Na regeneração nervosa periférica, são escassos os dados sobre as alterações do segmento proximal isquiático, pois a maioria dos estudos está focada ao segmento distal. Um estudo recente de nosso laboratório mostrou que o segmento proximal apresenta uma diminuição do diâmetro das fibras mielinizadas e do diâmetro axonal em ratos não-diabéticos sete semanas após a lesão por esmagamento do nervo isquiático (ILHA et al., 2008). Pensamos que estes resultados do segmento proximal do nervo dos grupos NDE e DE podem indicar uma maturação incompleta das fibras após a degeneração retrógrada, consequente ao esmagamento do nervo isquiático e/ou pelo processo de degeneração de axônios mal-orientados que não conseguem atingir o órgão-alvo. Além disso, a redução do diâmetro axonal também representa uma característica comum no diabetes causado pela hiperglicemia persistente. De fato, a atrofia axonal tem sido um achado comum em nervos

periféricos de pacientes diabéticos, tanto nos casos de diabetes de curta duração (15 dias; SALGADO et al., 2001) quanto nos casos de longa duração (4 meses; BESTETTI et al., 1981 e 12 meses; FILHO e FAZAN, 2006).

A atrofia axonal pode estar associada com a redução na velocidade de condução de nervo (MINWEGEN e FRIEDE, 1984, CAMERON et al., 1986), que se desenvolve em nervos motores e sensitivos depois de 2-3 semanas da indução do diabetes em ratos (GREENE et al., 1975). A redução da velocidade de condução é basicamente causada pelo déficit do fluxo sanguíneo endoneural, o qual resulta em um microambiente hipóxico para axônios e células de Schwann (CAMERON et al., 1991).

No segmento do nervo isquiático distal ao local da lesão por esmagamento, em todos os grupos estudados, houve redução do diâmetro das fibras mielínicas, do diâmetro axonal, da espessura da bainha de mielina e da área ocupada por fibras mielinizadas e um aumento da área ocupada pelo tecido conjuntivo endoneural. Estas alterações morfométricas podem indicar regeneração espontânea incompleta após degeneração walleriana do segmento distal do nervo. Estas alterações morfológicas no segmento distal do nervo isquiático também já foram observadas após 3 (HOOGEVEEN et al., 1992), 7 (ILHA et al., 2008) e 12 semanas (HOOGEVEEN et al., 1992; DE MEDINACELI, 1995) da lesão nervosa por esmagamento em ratos não-diabéticos, e após 5 e 24 semanas da lesão nervosa em ratos diabéticos (TERADA et al., 1996).

Após 13 semanas do procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático, a análise da área média das fibras musculares de ratos não-diabéticos revelou a inexistência de atrofia muscular. O sistema nervoso periférico, em ratos não-diabéticos, apresenta alta capacidade regenerativa após a denervação experimental. Estudos prévios mostram que 2-3 semanas após a lesão do nervo isquiático ocorre um aumento na área de secção transversal das fibras do músculo sóleo, atrofiadas pela denervação (SAKAKIMA et al., 2000).

No músculo sóleo dos ratos dos grupos diabéticos, as fibras musculares grandes e arredondadas foram encontradas entre fibras musculares com tamanho normal, no grupo diabético, e entre fibras musculares atroficas, nos grupos diabéticos lesionados. Este aspecto grande e arredondado das fibras musculares tem sido atribuído a inervação residual ou fibras musculares reinervadas de algumas unidades motoras saudáveis que, por um efeito compensatório da presença de fibras atroficas, rapidamente aumentam de tamanho devido à atividade anabólica aumentada e reduzido catabolismo (MAIER e BORNEMANN, 1999). Fibras com aspecto semelhante foram descritas em músculos de coelhos denervados por 36 e 51 semanas (ASHLEY et al., 2007), em músculos de pacientes com atrofia neurogênica (MAIER e BORNEMANN, 1999) e em pacientes com a doença de Charcot-Marie-Tooth (ERICSON et al., 1998). Esses dados podem indicar uma possível relação entre a denervação de longo prazo e processos de neuropáticos com a presença das fibras musculares arredondadas.

Em ratos diabéticos não-lesionados, a morfometria do músculo sóleo não mostrou nenhuma modificação na densidade de fibras musculares, na média da área de secção transversal e na distribuição da frequência de fibras musculares de diferentes tamanhos, como em estudos prévios (HEGARTY e ROSHOLT, 1981). No entanto, estudos mostram que o diabetes por STZ pode diminuir o crescimento da fibra muscular *in vivo* mediado pelas espécies reativas de oxigênio que afetam o ciclo celular dos mioblastos (JOHNSTON et al., 2007).

Em comparação com outros grupos, os formados por ratos diabéticos lesionados mostraram a atrofia muscular difusa (redução na média das áreas das fibras musculares e aumento na densidade das fibras musculares) com um aumento no percentual de pequenas fibras musculares e uma redução no percentual de grandes fibras musculares do sóleo. Estes resultados podem ser explicados pela reduzida capacidade regenerativa dos ratos diabéticos

após a lesão nervosa periférica (BISBY, 1980; LONGO et al., 1986; TERADA et al., 1996). Entretanto, como a necrose muscular é normalmente acompanhada por regeneração, as pequenas fibras musculares encontradas nestes grupos podem também ser novas fibras musculares originadas de células satélites (KALHOVDE et al., 2005; ASHLEY et al., 2007).

Um edema geral e áreas focais de desorganização e desalinhamento dos miofilamentos foram observados no músculo esquelético dos animais, 24 h após a corrida exaustiva do TEM3. O exercício exaustivo é conhecido por ser associado à depleção dos substratos metabólicos como glicogênio, os aumentos de metabólitos como íons de hidrogênio e lactato e fadiga muscular (KARLSON e SALTIN, 1970). De forma similar, outros estudos também mostraram alterações das fibras musculares significativas tanto em seres humanos quanto em animais depois de correr ou caminhar (HIGHMAN e ALTLAND, 1963; JACOBSSON e KJELLMER, 1964a,b; FRIDEN et al., 1983). O grande aumento dos metabólitos e as sobrecargas mecânicas no músculo esquelético podem ser a causa das alterações das fibras musculares observadas após a prática do exercício físico (ARMSTRONG, 1984).

As áreas focais de desorganização e desalinhamento dos miofilamentos e das linhas Z observadas no músculo sóleo de diferentes grupos experimentais, podem ter sido causadas pelas microrupturas mecânicas após o teste de esforço máximo, pela condição diabética ou pela lesão nervosa periférica. Alterações semelhantes foram relatados após o exercício exaustivo (WARHOL et al., 1985), em animais diabéticos (KLUEBER e FECZKO, 1994; OZAKI et al., 2001) e em animais submetidos a denervação (PELLEGRINO e FRANZINI, 1963). Além disso, estudos prévios têm mostrado que a lesão mecânica ativa as vias proteolíticas e de degradação, que são parte do mecanismo intrínseco das fibras musculares (ARMSTRONG et al., 1991, MORGAN e ALLEN, 1999). As áreas focais de degeneração nas fibras musculares de animais diabéticos também podem ser explicadas pelo aumento da

proteólise e das áreas de isquemia causadas por eventos microangiopáticos (AWAD e KOTTKE, 1970; KLUEBER e FECZKO, 1994; SEXTON et al., 1994) e após a denervação pela diminuição da síntese de proteínas (SIECK, 1994; FROSTICK, 1995).

O aumento de grânulos de glicogênio e gotículas lipídicas nas fibras musculares dos ratos diabéticos deste estudo foi também observados em estudos anteriores (CHAO et al., 1976; BESTETI et al., 1981; KLUEBER e FECZKO, 1994; FAHIM et al., 2000), foi observada também no músculo esquelético miopático (MASTAGLIA e HUDGSON, 1981). Na maioria das desordens das fibras musculares, há um aumento nos grânulos de glicogênio, especialmente entre as miofibrilas, em vacúolos autofágicos e abaixo do sarcolema (MAIR e TOMÉ, 1972). Os ratos diabéticos apresentam aumento da lipólise e alterações no catabolismo de lipídeos nos tecidos periféricos, o que explicaria o aumento da deposição de gotículas lipídicas nas fibras musculares e sua acumulação em torno de mitocôndrias (CHAO et al., 1976, BESTETTI et al., 1981; KLUEBER e FECZKO, 1994). Este acúmulo de lipídeos ao redor das mitocôndrias pode ser um resultado de defeito no transporte de ácidos graxos livres através da membrana mitocondrial no processo de beta-oxidação, como já foi demonstrado em casos de miopatia (ENGEL e ANGELINI, 1973).

As mitocôndrias de formas atípicas foram observadas nas fibras musculares do sóleo, tanto nos grupos D e DE deste estudo como em casos de miopatias, podem estar associadas com anormalidades no metabolismo oxidativo (MASTAGLIA e HUDGSON, 1981). Da mesma forma, a desorientação de algumas tríades musculares, observadas nestes grupos, é comumente descrita em ratos diabéticos (CHAO et al., 1976; FAHIM et al., 2000) e em conjunto com a desorganização miofibrilar em fibras em degeneração ou atrofia (PELLEGRINO e FRANZINI, 1963; NEVILLE, 1973).

Nas fibras musculares do sóleo dos grupos D e DE também foram observados vasos sanguíneos irregulares com projeções alongadas direcionadas para a luz dos mesmos, com

paredes espessadas e com grande quantidade de vesículas transcitóticas. Estes resultados, também observados em estudos prévios (ZACKS et al., 1962; SEXTON et al., 1994; KLUEBER e FECZKO, 1994) são dados comuns no diabetes. Células endoteliais aumentadas e um aumento no número de vesículas transcitóticas em tais células também foram encontrados na polimiosite (MASTAGLIA e WALTON, 1971) e na distrofia de Duchenne (JERUSALÉM et al., 1974).

Estas alterações podem ser devido à complexa interação de anormalidades metabólicas e vasculares decorrentes da hiperglicemia crônica (DYCK e GIANNIMI, 1996). Estas alterações incluem o insulto metabólico direto para os tecidos (GABBAY et al., 1966), diminuição da síntese protéica e aumento da proteólise (PAIN e GARLICK, 1974), diminuição da atividade e da densidade da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (MOORE et al., 1983; KJELDEN et al., 1987), aumento da atividade dos radicais livres de oxigênio e redução das defesas antioxidantes (LOVE et al., 1996; MERZOUK et al., 2003).

Além das alterações morfológicas que, provavelmente, ocorreram em consequência de alterações metabólicas causadas pela hiperglicemia crônica, foram encontradas outras alterações que podem ser devido à denervação em associação com o diabetes. Os ratos do grupo DE também apresentam alterações ultraestruturais nas fibras musculares que podem fazer parte de um processo degenerativo. Estas alterações incluem um aglomerado de restos celulares localizados perto do sarcolema e a perda de contato (descolamento) entre o sarcolema e as miofibrilas, os quais também já foram observados em animais denervados não-diabéticos (PELEGRINO e FRANZINI, 1963). Além disso, o grupo DE apresentou alterações semelhantes às descritas no diabetes, incluindo também regiões com descontinuidade do sarcolema e mitocôndrias arredondadas e vacuoladas (KLUEBER e FECZKO, 1994; OZAKI et al., 2001; DO NASCIMENTO et al., 2010). A presença de membrana nuclear com

ondulações proeminentes neste grupo também foi previamente descrita em ratos diabéticos (CHAO et al., 1976) e em fibras atróficas (MASTAGLIA e HUDGSON, 1981).

Considerando a debilidade da função motora apresentada por animais diabéticos lesionados nas primeiras semanas após esmagamento do nervo isquiático, no presente estudo, optamos por iniciar o protocolo de treinamento na 4^a semana após a lesão por esmagamento, a fim de evitar os efeitos deletérios do exercício no músculo denervado dos ratos que compõe os grupos diabéticos (HERBISON et al., 1973).

O treinamento em esteira ergométrica, em nosso estudo, não foi capaz de promover alterações morfométricas do segmento distal do nervo lesado. No entanto, o treinamento acelerou a recuperação da função motora para a 7^a semana após a lesão isquiática de ratos diabéticos e preveniu/reverteu as alterações morfológicas encontradas no segmento proximal dos nervos isquiáticos de ratos não-diabéticos e diabéticos lesionados.

Estudos prévios têm descrito que o treinamento em esteira realizado após a lesão nervosa periférica de ratos não-diabéticos, produz uma melhoria acentuada na regeneração de axônios motores (MARQUESTE et al., 2004; SABATIER et al., 2008) e acelera o retorno da função sensório-motora (MARQUESTE et al., 2004; SEO et al., 2006) sem um aumento na proporção de axônios motores que se regeneram em direção errônea atingindo órgãos-alvo funcionalmente inadequados (ENGLISH et al., 2009).

Adicionalmente, o estudo de Ilha et al., (2008) mostrou que em sete semanas após a lesão isquiática por esmagamento, o segmento distal do nervo de ratos não-diabéticos endurance-treinados (por 5 semanas) apresentou aumento na espessura da bainha de mielina e na porcentagem da área ocupada pelas fibras mielinizadas em comparação com ratos sedentários não-diabéticos. Este estudo também mostrou que as alterações morfológicas

anormais do segmento proximal do nervo isquiático após esmagamento em ratos não-diabéticos, também foram prevenidas/revertidas pelo treinamento.

O treinamento físico em ratos diabéticos lesionados (DET) proporcionou uma recuperação parcial da atrofia das fibras musculares do sóleo ipsilateral ao esmagamento do nervo isquiático. Estudos anteriores mostraram que o treinamento aeróbio em ratos diabéticos e não-diabéticos, não altera o diâmetro das fibras musculares do sóleo (SCHLUTER e FITTS, 1994; SANCHEZ et al., 2005), mas aumenta a taxa de regeneração axonal dos nervos periféricos lesionados em ratos não-diabéticos (VAN MEETEREN et al., 1997; ILHA et al., 2008). Essas alterações observadas em ratos diabéticos lesionados e treinados podem refletir uma melhoria na regeneração de nervo periférico (ZHOU et al., 2006), restabelecimento das conexões funcionais com o tecido-alvo (IRINTCHEV et al., 1990) e uma maior plasticidade muscular durante a regeneração nervosa periférica no diabetes experimental.

Embora o grupo diabético lesionado e treinado tenha apresentado, no músculo sóleo, algumas alterações ultraestruturais semelhantes às apresentadas pelos outros grupos (ND, NDE, D, DE) os aspectos ultraestruturais das fibras musculares e vasos sanguíneos deste grupo mostram-se semelhantes aos apresentados pelo do grupo controle, mostrando que o treinamento físico mostra-se capaz de atenuar as alterações celulares da condição diabética associada à denervação. Nas fibras musculares foram observados poliribosomos, retículo sarcoplasmático rugoso, complexo de Golgi desenvolvido e novas miofibrilas situadas entre mitocôndrias condensadas ao redor do sarcolema e do núcleo. Todas estas características podem indicar um aumento na atividade de síntese protéica (CULLEN et al., 1978; MASTAGLIA e HUDGSON, 1981), estimulado pelo treinamento físico.

Sabe-se que o treinamento físico tem sido uma importante ferramenta no tratamento de pacientes diabéticos. Neste trabalho nós mostramos que adicionalmente, ele pode levar a um

aumento na regeneração nervosa periférica em ratos diabéticos e não-diabéticos e na recuperação da atrofia muscular evidenciada pelos ratos diabéticos lesionados.

Nós pensamos que o aumento das aferências nos motoneurônios espinais através dos circuitos que comandam a locomoção, durante o período de regeneração, pode ter influenciado o resultado funcional e morfológico através do aumento da maturação da fibra nervosa, a qual geralmente está diminuída pelo diabetes (YASUDA et al., 2003) e pelo esmagamento do nervo isquiático (ILHA et al., 2008). O treinamento em esteira ergométrica pode promover a regeneração nervosa após lesão por esmagamento por potencializar a proliferação das células de Schwann (SEO et al., 2009) e por aumentar a expressão de neurotrofinas e conseqüentemente a atividade neuronal (CHAN et al., 2001). De fato, a expressão de fatores neurotróficos, como o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) e a neurotrofina 3 (NT-3) aumenta a regeneração nervosa periférica após a lesão (CHAN et al., 2001), apresenta-se diminuída no diabetes (RODRÍGUEZ-PEÑA et al., 1995) e aumentada no músculo e na medula espinal em consequência da prática do treinamento físico (GÓMEZ-PINILLA et al., 2001). Além disso, o treinamento físico aumenta a síntese de proteínas (TIPTON e WOLFE, 1998), aumenta a expressão e a translocação de GLUT4 na membrana plasmática (DELA et al., 1993), aumenta o suprimento capilar no músculo esquelético (GUTE et al., 1996), protege contra o estresse oxidativo (ATALAY et al., 2004).

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O treinamento físico em ratos diabéticos e não-diabéticos não alterou a glicemia capilar deste período;
- A capacidade máxima aeróbica avaliada através da velocidade máxima atingida pelo rato durante a marcha/corrída na esteira ergométrica adaptada, antes, durante e após o treinamento físico de 10 semanas aumentou progressivamente nos ratos não-diabéticos e diabéticos treinados. Este aumento foi comparativamente maior nos ratos não-diabéticos treinados;
- O esmagamento do nervo isquiático direito em ratos diabéticos dificultou a marcha/corrída na esteira ergométrica adaptada e diminuiu a velocidade máxima atingida pelo rato no primeiro teste de esforço máximo, antes do início do treinamento físico;
- O teste de esforço máximo causou edema das fibras musculares e áreas focais de desorganização e/ou desalinhamento dos miofilamentos nos grupos não-diabético, diabético, diabético lesionado e diabético lesionado treinado. Entretanto, estas alterações foram menos evidentes nos grupos de ratos diabéticos lesionados;
- A lesão traumática experimental por esmagamento do nervo isquiático direito de ratos diabéticos, comparativamente com os animais não-diabéticos, resultou em maior diminuição no índice de funcionalidade do nervo isquiático nas primeiras três semanas após a lesão;

- A recuperação da funcionalidade da marcha foi mais lenta em ratos diabéticos lesionados em comparação com ratos não-diabéticos lesionados. Além disso, o treinamento físico acelerou em duas semanas a recuperação da funcionalidade da marcha de ratos diabéticos lesionados;
- O diabetes experimental diminuiu o diâmetro axonal do nervo isquiático, alteração que não foi revertida pelo treinamento físico;
- Ratos não-diabéticos lesionados, 13 semanas após o esmagamento do nervo isquiático, apresentaram, no segmento proximal do nervo, menor espessura da bainha de mielina, menor área e menor diâmetro das fibras nervosas mielínicas. Os ratos diabéticos lesionados apresentaram as mesmas alterações descritas acima e também menor diâmetro axonal, menor percentual de área ocupada por endoneuro e maior percentual de área ocupada por fibras mielínicas. O treinamento físico preveniu e/ou reverteu essas alterações morfológicas nos segmentos proximais do nervo isquiático;
- Após 13 semanas da lesão do nervo isquiático por esmagamento os segmentos distais do nervo isquiático dos ratos não-diabéticos e diabéticos apresentaram alterações sugestivas de regeneração nervosa incompleta (menor espessura da bainha de mielina, menor área e menor diâmetro das fibras nervosas mielínicas, menor diâmetro axonal, menor percentual de área ocupada por endoneuro e maior percentual de área ocupada por fibras mielínicas). O treinamento físico não alterou essas alterações morfológicas nos segmentos distais do nervo isquiático;

- O diabetes experimental de 17 semanas determinou, no músculo sóleo direito, a presença de isoladas fibras musculares grandes e arredondadas distribuídas entre fibras musculares poligonais eutróficas do grupo não-lesionado ou atróficas dos grupos lesionados;
- O treinamento físico melhorou, mas não reverteu, o padrão atrófico do músculo sóleo direito de ratos diabéticos (diminuiu o percentual de pequenas fibras musculares) após o período de 13 semanas da lesão isquiática por esmagamento;
- No diabetes experimental, o músculo sóleo apresentou fibras musculares com maior acúmulo de gotículas lipídicas e de grânulos de glicogênio, mitocôndrias com formas atípicas, túbulos T com distribuição oblíqua e vasos sanguíneos com aspecto irregular, espessado e com várias vesículas transcitóticas. As fibras musculares dos ratos diabéticos lesionados, também apresentaram núcleo com formato irregular, complexo de Golgi com cisternas aumentadas, desalinhamento de vários sarcômeros, mitocôndrias degeneradas e sarcolema com interrupções ou descolamentos;
- O músculo sóleo dos ratos diabéticos lesionados e treinados apresentou fibras musculares e vasos sanguíneos com um aspecto similar ao normal e alterações ultraestruturais indicativas de aumento da síntese protéica como núcleo com forma normal, presença de polirribosomos, retículo sarcoplasmático rugoso, complexo de Golgi desenvolvido e novas miofibrilas situadas entre condensação mitocondrial perto do sarcolema e núcleo.

Resumidamente, este estudo mostrou que o diabetes provocou efeitos deletérios sobre a regeneração do nervo isquiático demonstrados por um atraso na recuperação da função motora dos membros posteriores após o esmagamento do nervo isquiático, piores alterações

morfológicas no segmento proximal do nervo isquiático e no músculo sóleo ipsilateral ao nervo lesionado cirurgicamente. Por outro lado, o treinamento físico em ratos diabéticos lesionados, foi capaz de acelerar a recuperação funcional da marcha, prevenir e/ou reverter as alterações histomorfométricas do segmento proximal do nervo isquiático e do músculo sóleo evidentes nos ratos diabéticos lesionados e sedentários. Adicionalmente o treinamento físico foi capaz de prevenir e/ou reverter as alterações histomorfométricas do segmento proximal do nervo isquiático de ratos não-diabéticos lesionados.

Concluimos que o treinamento físico (10 semanas; 2x/dia) em esteira ergométrica adaptada acelerou a regeneração do nervo isquiático lesionado de ratos diabéticos Wistar machos adultos.

Portanto, nossos resultados demonstraram efeitos benéficos do treinamento físico sobre a regeneração nervosa periférica de ratos diabéticos mesmo na presença de hiperglicemia persistente. Estes achados podem ser importantes na prática clínica, pois sugerem que, mesmo na presença da hiperglicemia persistente, o treinamento físico poderia aumentar o processo regenerativo em casos de lesão nervosa periférica de pacientes diabéticos assim como em casos de neuropatia diabética.

Futuras investigações, neste modelo experimental, podem incluir a detecção da presença de fibras musculares regeneradas, possíveis melhoras metabólicas não detectadas neste trabalho, investigação nas alterações morfométricas de diferentes tipos de fibras musculares, alterações ultraestruturais do nervo isquiático, gânglios sensitivos L4 e L5 e do corno anterior da medula espinal. Além disso, estudos subsequentes também podem incluir análise dos efeitos metabólicos, funcionais e morfológicos no músculo esquelético, medula espinal, gânglios sensitivos e nervo isquiático, quando ratos diabéticos lesionados sejam tratados como o uso da terapia insulínica em associação com o treinamento físico regular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, J.W., BROWN, M.B., SIMA, A.A.F., GREENE, D.A. Nerve conduction measures in mild diabetic neuropathy in the Early Diabetes Intervention Trial: the effects of age, sex, type of diabetes, disease duration, and anthropometric factors. **Neurology** 46: 85-91, 1996.

ALBRIGHT, A., FRANZ, M., HORNSBY, G., KRISKA, A., MARRERO, D., ULLRICH, I., VERITY, L.S. American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and type 2 diabetes. **Med Sci Sports Exerc** 32: 1345-60, 2000.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **Diretrizes do ACSM para os Testes de Esforço e sua Prescrição**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION POSITION STATEMENT. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care** 30: S4-41, 2007.

ANAND, P., TERENGI, G., WARNER, G., KOPELMAN, P.G., WILLIAMS-CHESTNUT, R.E., SINICROPI, D.V. The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy. **Nat med** 2: 703-707, 1996.

APFEL, S.C. Introduction to diabetic neuropathy. **Am J Med** 107: 1S, 1999a.

APFEL, S.C. Neurotrophic factors in the therapy of diabetic neuropathy. **Am J Med** 107: 34S-42S, 1999b.

AREZZO, J.C. The use of electrophysiology for the assessment of diabetic neuropathy. **Neurosci Res Commun** 21: 13-23, 1997.

ASHLEY, Z., SUTHERLAND, H., LANMULLER, H., RUSSOLD, M.F., UNGER, E., BIJAK, M., MAYR, W., BONCOMPAGNI, S., PROTASI, F., SALMONS, S., JARVIS, J.C. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. **Am J Physiol Cell Physiol** 292: C440-C451, 2007.

ARMSTRONG, R.B., WARREN, G.L., WARREN, J.A. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. **Sports Med** 12: 184-207, 1991.

ATALAY, M., OKSALA, N.K., LAAKSONEN, D.E., KHANNA, S., NAKAO, C., LAPPALAINEN, J., ROY, S., HÄNNINEN, O., SEN, C.K. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. **J Appl Physiol** 97: 605-611, 2004.

AWAD, E.A., KOTTKE, F.J. Changes in muscle ultrastructure in diabetes mellitus. **Arch Phys Med Rehabil** 51: 683-687, 1970.

BALDUCCI, S., IACOBELLIS, G., PARISI, L., DI BIASE, N., CALANDRIELO, E., LEONETTI, F., FALLUCCA, F. Exercise Training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. **J. Diabetes Complications** 20: 216-223, 2006.

BANKOFF, A.D.P. Tecido Nervoso. In: **Morfologia e Cinesiologia aplicada ao movimento Humano**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.53-74, 2007.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. **Diabetes** 40: 405-412, 1991.

BENJAMIN, I.J., MCMILLAN, D.R. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. **Circ Res** 83: 117-32, 1998.

BERNE, R.M., LEVY, M.N., KOEPPEN, B.M., STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 815-844, 2004.

BESTETTI, G., ROSSI, G.L., ZEMP, C. Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. A qualitative and quantitative study. **Acta Neuropathol** 54: 129-134, 1981.

BIANCHI, R., BUYUKAKILLI, B., BRINES, M., SAVINO, C., CVALETTI, G., OGGIONI, N., LAURIA, G., BORGNA, M., LOMBARDI, R., CIMEN, B., COMELEKOGLU, U., KANIK, A., TATAROGLU, C., CERAMI, A., GHEZZI, P. Erythropoietin both protects from and reverses experimental neuropathy. **PNAS**, 101: 823-828, 2004.

BISBY, M.A. Axonal transport of labeled protein and regeneration rate in nerves of streptozotocin-diabetic rats. **Exp Neurol** 69: 74-84, 1980.

BODINE-FOWLER, S.C., MEYER, R.S., MOSKOVITZ, A., ABRAMS, R., BOTTE, M.J. Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques. **Muscle Nerve** 20: 29-37, 1997.

BOULTON, A.J.M., ARMSTRONG, W., SCARPELLO, J.H.B., WARD, J.D. The natural history of painful diabetic neuropathy – a 4 year study. **Postgrad Med J** 59: 556-559, 1983.

BOWE, C.M., EVANS, N.H., VLACHA, V. Progressive morphological abnormalities observed in rat spinal motor neurons at extended intervals after axonal regeneration. **J Comp Neurol** 321: 576-590, 1992.

BOYD, J.G., GORDON, T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Mol Neurobiol** 27: 277-324, 2003.

BRADLEY, J.L., THOMAS, P.K., KING, R.H., MUDDLE, J.R., WARD, J.D., TESFAYE, S., BOULTON, A.J., TSIGOS, C., YOUNG, R.J. Myelinated nerve fibre regeneration in diabetic sensory polyneuropathy: correlation with type of diabetes. **Acta Neuropathol (Berl)** 90: 403-410, 1995.

BRIDGE, P.M., BALL, D.J., MACKINNON, S.E., NARAD, Y., BRANDT, K., HUNTER, D.A., HERTL, C. Nerve crush injuries-A model for axonotmesis. **Exp Neurol** 127: 284-290, 1994.

BROWNLEE, H., VLASSARA, A., KOONEY, P., ULRICH, P., CERAMI, A. Inhibition of diabetes-induced arterial wall lipoprotein deposition and prevention of arterial wall collagen crosslinking by aminoguanidine. **Diabetologia** 29, 523A, 1986.

BRUYN, G.W., GARLAND, H. Neuropathies of endocrine origin. In: Viken, P.G., Bruyn, G.W., **Handbook of Clinical Neurology**, v.8. Amsterdam: North-Holland, p.29, 1970.

BURNETT, M.G., ZAGER, E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurg Focus** 16: 1–7, 2004.

CALCUTT, N.A., JORGE, M.C., YAKSH, T.L., CHAPLAN, S.R. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. **Pain** 68: 293–299, 1996.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A. The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral nerve complications. **Diabetes Metab Rev** 10: 189-224, 1994.

CAMERON, N.E.; COTTER, M.A. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Diabetes** 46 (sup.2): S31-S37, 1997.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A., HARRISON, J., Effect of diabetes on motor conduction velocity in different branches of the rat sciatic nerve. **Exp Neurol** 92: 757-761, 1986.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A., LOW, P.A. Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. **Am J Physiol** 261: E1-8, 1991.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A., MAXFIELD, E.K. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia** 36: 299-304, 1993.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A., ROBERTSON, S. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents development of muscle and nerve dysfunction and stimulates angiogenesis in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia** 35: 12-18, 1992.

CAMPBELL, W.W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clin Neurophysiol** 119: 1951-1965, 2008.

CARROLL, R.G. **Fisiologia**: Série Elsevier de Formação Básica Integrada. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p. 184-185.

CERIELLO, A. Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. **Diabetologia** 36: 1119-1125, 1993.

CHAN, J.R., COSGAYA, J.M., WU, Y.J., SHOOTER, E.M. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 14661-14668, 2001.

CHAO, T.T., LANUZZ, C.D., ARMSTRONG, R.B., ALBRIGHT, J.T., ANAPOLE, S.E. Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers of streptozotocin-diabetic rats. **Cell and Tissue Res**, 168: 239-246, 1976.

COHEN, H. **Neurociência para Fisioterapeutas**: incluindo correlações clínicas. 2.ed. Manole: São Paulo, 2001.

COLBERG, S.R. Use of clinical practice recommendations for exercise by individuals with type 1 diabetes. **Diabetes Educ**, 26:265-71, 2000.

COSTILL, D.L., CLEAY, P., FINK, W.J., FOSTER, C., IVY, J.C., WITZMAN, F. Training adaptations in skeletal muscle of juvenile diabetics. **Diabetes** 28 Suppl 9: 818-822, 1979.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Pancreas. In: **Robbins: Patologia Estrutural Funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 806-833, 1996.

COURTEIX, C., ESCHALIER, A., LAVARENNE, J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. **Pain** 53: 81-88, 1993.

CULLEN, M.J., APPELYARD, S.T., BINDOFF, L. Morphologic aspects of muscle breakdown and lysosomal activation. **Ann N Y Acad Sci**, 317: 440, 1978.

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

DA SILVA, C.A., DE LIMA, W.C., AMORIM, S., KRETZCHMAR, M. Efeito de um programa de exercício físico regular na glicemia de pacientes diabéticos tipo 2. **Diab Clin** 4: 269-272, 2004.

DCCT 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** 329: 977-986, 1993.

DE ANGELIS, K.L.D., OLIVEIRA, A.R., DALL'AGO, P., PEIXOTO, L.R.A., GADONSKI, G., FERNANDES, T.G., IRIGOYEN, M.C. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res** 33: 635-641, 2000.

DE ANGELIS, K., HARTHMANN, A.D., PARENTE COSTA, L., KRIEGER, E.M., IRIGOYEN, M.C. Improvement of circulation control in trained diabetic rats: role of baroreflex sensitivity and blood flow distribution. **Hypertension** 40: 407, 2002a.

DE ANGELIS, K., SCHAAN, B.D., MAEDA, C.Y., DALL'AGO, P., WICHII, R.B., IRIGOYEN, M.C. Cardiovascular control in experimental diabetes. **Braz J Med Biol Res** 35: 1091-1100, 2002b.

DE ANGELIS, K., WICHI, R.B., JESUS, W.R., MOREIRA, E.D., MORRIS, M., KRIEGER, E.M., IRIGOYEN, M.C. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **J Appl Physiol** 96: 2174-2178, 2004.

- DELA, F., HANDBERG, A., MIKINEST, K.J., VINTEN, J., GALBO, H. Glut 4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle. **J Physiol** 469: 615-624, 1993.
- DELCROIX, J.D., MICHAEL, G.J., PRIESTLEY, J.V, TOMLINSON D.R., FERNYHOTGH, P. Effect of nerve growth factor treatment on p75 Gene Expression in lumbar dorsal root ganglia of streptozocin-induced diabetic rats. **Diabetes** 47: 1779-1785, 1998.
- DE MEDINACELI, L., FREED, W.J., WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol** 77: 634-643, 1982.
- DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **J Neurosci Methods** 58: 29-37, 1995.
- DE RUITER, G.C., MALESSY, M.J., ALAID, A.O., SPINNER, R.J., ENGELSTAD, J.K., SORENSON, E.J., KAUFMAN, K.R., DYCK, P.J., WINDEBANK, A.J. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. **Exp Neurol** 211: 339-350, 2008.
- DISTEFANO, P.S., FRIEDMAN, B., RADZIEJEWSKI, C., ALEXANDER, C. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. **Neuron** 8: 983-993, 1992.
- DO NASCIMENTO, P.S., MALYSZ, T., ILHA, J., ARAUJO, R.T., HERMEL, E.E.S., KALIL-GASPAR, P.I., FACCIONI-HEUSER, M.C., SCHAAN, B.D., ACHAVAL, M. Treadmill training increases the size of A cells from the L5 dorsal root ganglia in diabetic rats. **Histol Histopathol** 25: 719-732, 2010.
- DYCK, P.J., GIANNINI, C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. **J Neuropathol Exp Neurol** 55: 1181-1193, 1996.
- DYCK, P.J., NORELL, J.E., DYCK, P.J. Methylprednisolone may improve lumbosacral radiculoplexus neuropathy. **Can J Neurol Sci** 28: 224-7, 2001.
- ELIASSON, S. G. Nerve conduction changes in experimental diabetes. **J Clin Invest** 43: 2353-2358, 1964.
- EKSTRÖM, P.A.R., KANJE, M., SKOTTNER, A. Nerve regeneration and serum levels of insulin-like growth factor-1 in rats with streptozotocin-induced insulin deficiency. **Brain Res** 496: 141-148, 1989.
- ELLENBERG, M. Current status of diabetic neuropathy. **Metabolism** 22: 657, 1973.
- ENGEL, A.G., ANGELINI, C. Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy: a new syndrome. **Science** 179(76): 899-902, 1973.

ENGLISH, A.W., CUCORANU, D., MULLIGAN, A., SABATIER, M. Treadmill training enhances axon regeneration in injured mouse peripheral nerves without increased loss of topographic specificity. **J Comp Neurol** 517(2): 245-55, 2009.

ERICSON, U., ANSVED, T., BORG, K. Charcot-Marie-Tooth disease – muscle biopsy findings in relation to neurophysiology. **Neuromuscul Disord** 8: 175–181, 1998.

FAHIM, M.A., HASAN, M.Y., ALSHUAIB, W.B. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. **J Appl Physiol** 89: 2235-2240, 2000.

FEDEROFF, J.H., LAWRENCE, D., BROWNLEE, M. Nonenzymatic glycosylation of laminin and the laminin peptide CI-KVAVS inhibits neurite outgrowth. **Diabetes** 42: 509-513, 1993.

FEKI, I., LEFAUCHEUR, J.P. Correlation between nerve conduction studies and clinical scores in diabetic neuropathy. **Muscle nerve** 24: 555-558, 2001.

FELDMAN, E.L., STEVENS, M.J., GREENE, D.A. Pathogenesis of diabetic neuropathy. **Clin Neurosci** 4: 365-370, 1997.

FERNYHOUGH, P., DIEMEL, L.T., HARDY, J., BREWSTER, W.J., MOHIUDDIN, L., TOMLINSON, D.R. Human recombinant nerve growth factor replaces deficient neurotrophic support in the diabetic rat. **Eur J Neurosci** 7: 1107-1110, 1998a.

FERNYHOUGH, P., DIEMEL, L.T., TOMLINSON, D.R. Target tissue production and axonal transport of neurotrophin-3 are reduced in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia** 41: 300-306, 1998b.

FIELDS, R.D., ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction properties. **Exp Neurol** 92, 48–60, 1986a.

FIELDS, R.D., ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. **Exp Neurol** 92, 61–74, 1986b.

FILHO, O.A.Q.R., FAZAN, V.P.S. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. **J Neurosci Methods** 151: 131-138, 2006.

FOX, S.I. **Fisiologia Humana**. 7.ed. Barueri, SP: Manole, 2007, p 613-620.

FRIDEN, J., SJOSTROM, M., EKBLUM, B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. **Int J Sports Med** 4: 170-176, 1983.

FRIED, K., GOVRIN-LIPPMANN, R., ROSENTHAL, F., ELLISMAN, M.H., DEVOR, M. Ultrastructure of afferent axon endings in neuroma. **J Neurocytol** 20: 682–701, 1991.

FROSTICK, S.P. The physiological and metabolic consequences of muscle denervation. **Int angiolog** 14(3): 278-87, 1995.

- FUCHSJAGER-MAYRL, G., PLEINER, J., WIESINGER, G.F., SIEDER, A.E., QUITTAN, M., NUHR, M.J. et al. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care** 25:1795-801, 2002.
- FUKUMOTO, H., SEINO, S., IMURA, H., SEINO, Y., EDDY, R.L., FUKUSHIMA, Y., BYERS, M.G., SHOWS, T.B., BELL, G.I. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 85: 5434–5438, 1988.
- GABBAY, K.H., MEROLA, L.O., FIELD, R.A. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. **Science** 151: 209-210, 1966.
- GARTNER, L.P., HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2.ed. 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. **Eur J Neurosci** 13: 1078-1084, 2001.
- GUL, H., ODABASI, Z., YILDIZ, O., OZATA M., DENIZ, G., VUL, O., ISIMER, A. Beneficial effect of thyrotropin-releasing hormone on neuropathy in diabetic rats. **Diabetes Res Clin Pract** 44: 93-100, 1999.
- GUTE, D., FRAGA, C., LAUGHLIN, M.H., AMANN, J.F. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. **J Appl Physiol** 81: 619-626, 1996.
- GUYTON, A.C. HALL, J.E. Insulina, Glucagon e Diabetes Melito. In: **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 557-565, 1998.
- GREENE, D.A., DE JESUS, P.V. JR., WINEGRAD, A.I. Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. **J Clin Invest** 55: 1326-1336, 1975.
- GREGERSEN, G. Variations in motor conduction velocity produced by acute changes of the metabolic state in diabetic patients. **Diabetologia** 4: 273–277, 1968 .
- HARADA, N., TAKISHITA, E., ISHIMURA, N., MINAMI, A., SAKAMOTO, S., NAKAYA, Y. Combined effect of ACE inhibitor and exercise training on insulin resistance in type 2 diabetic rats. **Life Sci** 70: 1811-1820, 2002.
- HARE, G.M., EVANS, P.J., MACKINNON, S.E., BEST, T.J., BAIN, J.R., SZALAI, J.P., HUNTER, D.A. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. **Plast Reconstr Surg** 89: 251–258, 1992.
- 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. **Auton Neurosci** 133(2):115-20, 2007.

- HEGARTY, P.V.J., ROSHOLT, M.N. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the number and diameter of fibres in different skeletal muscles of the rat. **J Anat** 133: 205-211, 1981.
- HEO, Y.R., KANG, C.W., CHA, Y.S. L-Carnitine changes the levels of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in streptozotocin-induced diabetic rat. **J Nutr Sci Vitaminol** 47, 329-334, 2001.
- HERBISON, G.J., JAWEED, M.M., DITURNNO, J.F., SCOTT, C.M. Effect of overwork during reinnervation of rat muscle. **Exp Neurol** 41: 1-14, 1973.
- HERR, R.R., EBLE, T.E., BERGY, M.E., JAHNKE, H.K. Isolation and characterization of streptozotocin. **Antibiotics Annu** 7: 236-240, 1960.
- HERR, R.R., JAHNKE, H.K., ARGOUEDELIS, A.D. The structure of streptozotocin. **J Am Chem Soc** 89: 4808-09, 1967.
- HIGHMAN, B., ALTLAND, P.D. Effects of exercise and training on serum enzyme and tissue changes in rats. **Am J Physiol**. 205: 162-166, 1963.
- HOLLINGSWORTH, D.R., MOORE, T.R. Postprandial walking exercise in pregnant insulin-dependent (type I) diabetic women: reduction of plasma lipid levels but absence of a significant effect on glycemic control. **Am J Obstet Gynecol** 57: 1359-1363, 1987.
- HOOGEVEEN, J.F., TROOST, D., WONDERGEM, J., VAN DER KRACHT, A.H., HAVEMAN, J. Hyperthermic injury versus crush injury in the rat sciatic nerve: a comparative functional histopathological and morphometrical study. **J Neurol Sci** 108(1): 55-64, 1992.
- HORROBIN, D.F., CARMICHAEL, H. Essential fatty acids in relation to diabetes. In: Horrobin, D.F. (Ed). **Treatment of diabetic neuropathy, a new approach**, Churchill Livingstone, London, 1992.
- IDO, Y., MCHOWAT, J., CHANG, K.C., ARRIGONI-MARTELLI, E., ORFALIAN, Z., KILO, C., CORR, P.B., WILLIAMSON, J.R. Neural dysfunction and metabolic imbalances in diabetic rats: prevention by acetyl-L-carnitine. **Diabetes** 43: 1469-1477, 1994.
- IDO, Y., VINDIGNI, A., CHANG, K., STRAMM, L., CHANCE, R., HEATH, W.F., DIMARCHI, R.D., DI CERA, E., WILLIAMSON, J.R. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. **Science** 777: 563-566, 1997.
- ILHA, J., ARAÚJO, 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. **Neurorehabil Neural Repair** 22: 355-366, 2008.
- IRIGOYEN, M.C., PAULINI, J., FLORES, L.J., FLUES, K., BERTAGNOLLI, M., MOREIRA, E.D., CONSOLIN-COLOMBO, F., BELLO-KLEIN, A., DE ANGELIS, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension** 46: 998-1003, 2005.

IRINTCHEV, A., DRAGUHN, A., WERNIG, A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. **Neuroscience** 39: 231-243, 1990.

ISHII, D.N. Implications of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Brain Res Rev** 20: 47-67, 1995.

ISHII, D.N., LUPIEN, S.B. Insulin-like growth factors protect against diabetic neuropathy: effects on sensory nerve regeneration in rats. **J Neurosci Res** 40: 138-144, 1995.

JACOBSSON, S., KJELLMER, I. Accumulation of fluid in exercising skeletal muscle. **Acta Physiol Scand** 60: 286-295, 1964 a.

JACOBSSON, S., KJELLMER, I. Flow and protein content of lymph in resting and exercising skeletal muscle. **Acta Physiol Scand** 60: 278-285, 1964b.

JAMAL, G.A., CARMICHAEL, H., WEIR, A.I. Gamma-linolenic acid in diabetic neuropathy. **Lancet** 1: 1098, 1986.

JENSEN, P.K., SANDAH CHRISTIANSEN, J., STEVEN K., PARVING H.H. Renal function in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia** 21: 409-414, 1981.

JESSEN, N., GOODYEAR, L.J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **J Appl Physiol** 99(1):330-7, 2005.

JERUSALEM, F., ENGEL, A.G., GOMEZ, M.R. Duchenne dystrophy. I. Morphometric study of the muscle microvasculature. **Brain** 97: 115, 1974.

JOBE, M.T., WRIGHT II, P.E. Nervous System Disorders. In: Canale, S.T (Ed). **Campbell's Operative Orthopaedics**. 9.ed. Baltimore: Mosby, 3828-3853, 1998.

JOHNSON, P.C. Peripheral Nerve. In: Davis, R.L., Robertson, D.M. (Eds). **Textbook of Neuropathology** 3.ed, Chapter 20, Baltimore: Williams e Wilkins, 1260-1269, 1997.

JOHNSTON, A.P., CAMPBELL, J.E., FOUND, J.G., RIDDELL, M.C., HAWKE, T.J. Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. **Am J Physiol. Cell Physiol** 292: C1033-C1040, 2007.

JORGE, L., ROGOW, A., FLORES, L.J.F., SANCHES, I.C., PUREZA, D.Y., IRIGOYEN, M.C. et al. Exercise training-induced metabolic improvement was associated with attenuation of cardiovascular and autonomic dysfunction in diabetics. **FASEB J** 19(5[part 2]): suppl A1685, 2005.

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

JUNOD, A., LAMBERT A.E., ORCI, L., PICTET, R., GONET, A.E., RENOLD A.E. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med** 126: 201-05, 1967.

- KALHOVDE, J.M., JERKOVIC, R., SEFLAND, I., CORDONNIER, C., CALABRIA, E., SCHIAFFINO, S., LØMO, T. "Fast" and "slow" muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. **J Physiol** 562: 847-57, 2005.
- KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M. The formation and regeneration of synapses. In: **Principles of neural Science**. USA: Mc Graw Hill, 4th ed. 1087-1114, 2000.
- KARLSON, J., SALTIN, B. Lactate, ATP, and CP in working muscles during exhaustive exercise in man. **Am J Physiol** 29: 598-602, 1970.
- KENNEDY, J.M., ZOCHODNE, D.W. Influence of experimental diabetes on the microcirculation of injured peripheral nerve. **Diabetes** 51: 2233-2240, 2002.
- KENNEDY, J.M., ZOCHODNE, D.W. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. **Brain** 123, 2118-2129, 2000.
- KJELDSEN, K., BRAENDGAARD, H., SIDENIUS, P., LARSEN, J.S., NORGAARD, A. Diabetes decreases NaK pump concentration in skeletal muscles, heart ventricular muscle and peripheral nerves of rat. **Diabetes** 31: 194-202, 1987.
- KLUEBER, K.M., FECZKO, J.D. Ultrastructural histochemical, and morphometric analysis of skeletal muscles in a murine model of type I diabetes. **Anat Rec** 239: 18-34, 1994.
- KOKA, R., HADLOCK, T.A. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. **Exp Neurol** 168: 192-195, 2001.
- KOMATSU, W.R., GABBAY, M.A., CASTRO, M.L., SARAIVA, G.L., CHACRA, A.R., DE BARROS NETO, T.L., DIB, A.S. Aerobic exercise capacity in normal adolescents and those with type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Diabetes** 3:145-149, 2005.
- KRENDEL, D.A., COSTIGAN, D.A., HOPKINS, L.C. Successful treatment of neuropathies in patients with diabetes mellitus. **Arch Neurol** 52, 1053-1061, 1995.
- LEHMANN, R., KAPLAN, V., BINGISSER, R., BLOCH, K.E., SPINAS, G.A. Impact of physical activity on cardiovascular risk factors in IDDM. **Diabetes Care** 20:1603-11, 1997.
- LEON, A.S. Diabetes. In: Skinner, J.S. **Provas de esforço e prescrição de exercícios para casos específicos**. Rio de Janeiro: Revinter. p. 127-147, 1991.
- LIEWELYN, J.G., TOMLINSON, D.R., THOMAS, P.K. In: Dyck, P.J., Thomas, P.K. **Peripheral neuropathy** 1951–1991, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005.
- LONGO, F.M., POWELL, H.C., LEBEAU, J., GERRERO, M.R., HECKMAN, H., MYERS, R.R. Delayed nerve regeneration in streptozotocin diabetic rats. **Muscle Nerve** 9: 385-393, 1986.
- LOVE, A., COTTER, M.A., CAMERON, N.E. Nerve function and regeneration in diabetic and galactosaemic rats: antioxidant and metal chelator effects. **Eur J Pharmacol** 314: 33-39, 1996.

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

LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **J Hand Surg** 25A: 391-414, 2000.

LYONS, T.J. Oxidised low density lipoproteins - a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. **Diabet Med** 8: 411-419, 1991.

MACEDO, C.S. Benefícios do exercício no manejo de pacientes diabéticos. **Diabet Clin**, 5: 367-372, 2003.

MACHADO, U.F., CARPINELLI, A.R., ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J.A. **Pâncreas Endócrino**. In: AIRES, M.M. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1032-1050.

MACKINNON, S.E., HUDSON, A.R., HUNTER, D.A. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. **Plast Reconstr Surg** Baltimore, v.75, p.384-388, 1985.

MAEDA, K., FERNYHOUGH, P., TOMLINSON, D.R. Regenerating sensory neurones of diabetic rats express reduced levels of mRNA for GAP-43, gamma-preprotachykinin and the nerve growth factor receptors, trkA and p75NGFR. **Brain Res Mol Brain Res** 37(1-2):166-74, 1996.

MAIER, F., BORNEMANN, A. Comparison of the muscle fibre diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. **Muscle Nerve** 22: 578-583, 1999.

MAIR, W.G.P., TOMÉ, F.M.S. **Atlas of the ultrastructure of diseased human muscle**. Churchill Livingstone Edinburgh & London, 1972.

MALERBI, D., FRANCO, L. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care** 15: 1509-16, 1992.

MANSFORD, K.R.L., OPIE, L. Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. **Lancet** 30: 670-671, 1968.

MARCUZZO, S., FERREIRA DUTRA, M., STIGGER, F., SEVERO DO NASCIMENTO, P., ILHA, J., KALIL-GASPAR, P.I., ACHAVAL, M. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. **Brain Res** 30, 129-140, 2008.

MARKUS, A., PATEL, T.D., SNIDER, W.D. Neurotrophic factors and axonal growth. **Curr Opin Neurobiol** 12, 523-531, 2002.

MARQUESTE, T., ALLIEZ, J.R., ALLUIN, O., JAMMES, Y., DECHERCHI, P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **J Appl Physiol** 96: 1988-1995, 2004.

MASTAGLIA, F.L., HUDGSON, P. Ultrastructural studies of diseased muscle. In: **Disorders of Voluntary Muscle** (Walton J), 4th ed, p. 296-356, New York: Churchill Livingstone, 1981.

MASTAGLIA, F.L., WALTON, J.N. An ultrastructural study of skeletal muscle in polymyositis. **J Neurol Sci** 12, 473, 1971.

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

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

MERZOUK, S., HICHAMI, A., MADANI, S., MERZOUK, H., BERROUIGUET, A.Y., PROST, J., MOUTAIROU, K., CHABANE-SARI, N., KHAN, N.A. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. **Gen Physiol Biophys** 22: 15-27, 2003.

MINWEGEN, P., FRIEDE, R.L. Conduction velocity varies with osmotically induced changes of the area of the axon's profile. **Brain Res** 297, 105-113, 1984.

MIZISIN, A.P., CALCUTT, N.A., TOMLINSON, D.R., GALLAGHER, A., FERNYHOUGH, P. Neurotrophin-3 reverses nerve conduction velocity deficits in streptozotocin-diabetic rats. **J Peripher Nerv Syst** 4: 211-221, 1999.

MOORE, R.D., MUNFORD, J.W., PILLSWORTH, T.J. Effects of streptozotocin diabetes and fasting on intracellular sodium and adenosine triphosphate in rat soleus muscle. **J Physiol** 338: 277-294, 1983.

MORGAN, D.L., ALLEN, D.G. Early events in stretch-induced muscle damage. **J Appl Physiol** 87: 2007-2015, 1999.

MOSHER, P.E., NASH, M.S., PERRY, A.C., LAPERRIERE, A.R., GOLDBERG, R.B. Aerobic circuit exercise training: effect on adolescents with well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. **Arch Phys Med Rehabil** 79: 652-7, 1998.

MOSTARDA, C., ROGOW, A., SILVA, I.C., DE LA FUENTE, R.N., JORGE, L., RODRIGUES, B., HEEREN, M.V., CALDINI, E.G., DE ANGELIS, K., IRIGOYEN, M.C. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. **Auton Neurosci** 145(1-2):11-6, 2009.

NAVARRO, X., SUTHERLAND, D.E., KENNEDY, W.R. Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. **Ann Neurol** 42: 727-736, 1997.

NAVARRO, X., VIVÓ, M., VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Prog Neurobiol** 82: 163-201, 2007.

NEVILLE, H.E. Ultrastructural changes in muscle disease. In: DUBOWITZ, V., BROOKE, M. **Muscle Biopsy**, Saunders-London, 1973, p.383-444.

NGUYEN, Q.T., SANES, J.R., LICHTMAN, J.W. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. **Nat Neurosci** 5: 861–867, 2002.

NISHIMURA, C., LOU, M.F., KINOSCHITA, J.H. Depletion of myo-inositol and amino acids in galactosemic neuropathy. **J Neurochem** 49: 290-295, 1987.

OBROSAVA, I.G., MABLEY, J.G., ZSEENGELLER, Z., CHARNIAUSKAYA, T., ABATAN, O.I., GROVES, J.T., SZABO, C. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. **FASEB J** 19: 401-403, 2005a.

OBROSAVA, I.G., DREL, V.R., PACHER, P., ILNYTSKA, O., WANG, Z.Q., STEVENS, M.J., YOREK, M.A. Oxidative-nitrosative stress and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. **Diabetes** 54: 3435-3441, 2005b.

OKAMOTO, H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes. **Mol Cell Biochem** 37: 43–61, 1981.

OKAMOTO, H. The role of poly (ADP-ribose) synthetase in the development of insulin-dependent diabetes and islet B-cell regeneration. **Biomed Biochem Acta** 44: 15–20, 1985a.

OKAMOTO, H. Molecular basis of experimental diabetes: degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells of islets of Langerhans. **Bioessays** 2:15–21, 1985b.

OZAKI, K., MATSUURA, T., NARAMA, J. Histochemical and morphometrical analysis of skeletal muscle in spontaneous diabetic WBN/Kob rat. **Acta Neuropathol** 102: 364-370, 2001.

PAIN, V.M., GARLICK, P.J. Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo. **J Biol Chem** 249: 4510-4514, 1974.

PARRY, G.J. Management of diabetic neuropathy. **Am J Med** 107 (2B): 27S-33S, 1999.

PELLEGRINO, C., FRANZINI, C. An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibers. **J Cell Biol** 17: 327-349, 1963.

PLOUG, T., STALLKNECHT, B.M., PEDERSEN, O., KAHN, B.B., OHKUWA, T., VINTEN, J., GALBO, H. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **Am J Physiol** 259(6 Pt 1): E778-86, 1990.

RAKIETEN, N., RAKIETEN, M.L., NADKARNI, M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep** 29: 91-98, 1963.

RAILE, K., KAPELLEN, T., SCHWEIGER, A., HUNKERT, F., NIETZSCHMANN, U., DOST, A. et al. Physical activity and competitive sports in children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes Care** 22: 1904-5, 1999.

RAZ, I., HASDAI, D., SELTZER, Z., MELMED, R.N. Effect of hyperglucemia on pain perception and on efficacy of morphine analgesia in rats. **Diabetes** 37: 1253-1259, 1988.

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

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 209-212, 1963.

RIVAS, M.A., HORTA, O.D. Productos de la glucosilación avanzada y diabetes mellitus. **Rev Cubana End** 10(1): 57-64, 1999.

RICHARDSON, J.K., SANDMAN, D., VELA, S. A focused exercise regimen improves clinical measures of balance in patients with peripheral neuropathy. **Arch Phys Med Rehabil** 82: 205-209, 2001.

ROBERGS, R.A., ROBERT, S.O. Respostas sistêmicas ao exercício. Princípios fundamentais de fisiologia do exercício. São Paulo: Phorte, 2002. p 34-46.

ROBINSON, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Suppl Clin Neurophysiol** 57: 173-86, 2004.

RODNICK, K.J., HENRIKSEN, E.J., JAMES, D.E., HOLLOSZY, J.O. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. **Am J Physiol** 262(1 Pt 1): C9-14, 1992.

RODRIGUES, B., FIGUEROA, D.M., MOSTARDA, C.T., HEEREN, M.V., IRIGOYEN, M.C., DE ANGELIS, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol** 6: 38, 2007.

RODRIGUES, B., IRIGOYEN, M.C., DE ANGELIS, K. Correlation between speed and oxygen consumption (VO₂) in rats submitted to maximum exercise test. **Fiep Bulletin**. 76:231-233, 2006.

RODRÍGUEZ-PEÑA, A., BOTANA, M., GONZÁLEZ, M., REQUEJO, F. Expression of neurotrophins and their receptors in sciatic nerve of experimentally diabetic rats. **Neurosci Lett** 200: 37-40, 1995.

RUBANYI, G.M., POLOKOFF, M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacol Rev** 46: 325-415, 1994.

RYDEVIK, B., LUNDBORG, G. Permeability of intraneural microvessels and perineurium following acute, graded experimental nerve compression. **Scand J Plast Reconstr Surg** 11: 179-87, 1977.

SABATIER, M.J., REDMON, N., SCHWARTZ, G., ENGLISH, A.W. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Exp Neurol** 211(2): 489-93, 2008.

SAID, G. Diabetic neuropathy—a review. **Nature Clin Pract Neurol** 3: 331-340, 2007.

- SAID, G., SLAMA, G., SELVA, J. Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy. **Brain** 106: 791-807, 1983.
- SAKAKIMA, H., KAWAMATA, S., KAI, S., OZAWA, J., MATUURA, N. Effects of short-term denervation and subsequent reinnervation on motor endplate and the soleus muscle in the rat. **Arch Histol Cytol** 63: 495-506, 2000.
- SALGADO, H.C., FAZAN JÚNIOR, R., FAZAN, V.P., DA SILVA, V.J., BARREIRA, A.A. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. **Ann N Y Acad Sci** 940: 20-27, 2001.
- SANCHEZ, O.A., SNOW, L.M., LOWE, D.A., SERFASS, R.C., THOMPSON, L.V. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. **J Appl Physiol** 99: 472-478, 2005.
- SCHAAN BD, DALL'AGO P, MAEDA CY, FERLIN E, FERNANDES TG, SCHMID H, IRIGOYEN MC. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Braz J Med Biol Res** 37: 1895-1902, 2004.
- SCHLUTER, J.M., FITTS, R.H. Shortening velocity and ATPase activity of rat skeletal muscle fibers: effects of endurance exercise training. **Am J Physiol** 266: C1699-1673, 1994.
- SCHMIDT, R.E., GRABAN, G.G., YIP, H.K. Retrograde axonal transport of [125I]-nerve growth factor in ileal mesenteric nerves vitro: effect of streptozotocin diabetes. **Brain Res** 378: 325-336, 1986.
- SCHNEIDL, W.J., FERBER, S., JOHNSON, J.H., NEWGARD, C.B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes** 43: 1326-1333, 1994.
- SEDDON, H.J. Three types of nerve injuries. **Brain** 66: 237, 1943.
- SELAGZI, H., BUYUKAKILLI, B., CIMEN, B., YILMAZ, N., ERDOGAN, S. Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Endocrinol Invest** 31: 971-8, 2008.
- SEO, T.B., HAN, I.S., YOON, J.H., HONG, K.E., YOON, S.J., NAMGUNG, U. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. **Med Sci Sports Exerc** 38(7): 1267-76, 2006.
- SEO, T.B., OH, M.J., YOU, B.G., KWON, K.B., CHANG, I.A., YOON, J.H., et al. ERK1/2-mediated Schwann cell proliferation in the regenerating sciatic nerve by treadmill training. **J Neurotrauma** 26(10):1733-44, 2009.
- SEXTON, W.L., POOLE, D.C., MATHIEU-COSTELLO, O. Microcirculatory structure-function relationships in skeletal muscle of diabetic rats. **Am J Physiol** 266: H1502-11, 1994.
- SIAMILIS, S., JAKUS, J., NYAKAS, C., COSTA, A., MIHALIK, B., FALUS, A., RADAK, Z. The effect of exercise and oxidant-antioxidant intervention on the levels of neurotrophins and free radicals in spinal cord of rats. **Spinal Cord** 46: 453-457, 2009.

SIECK, G.C. Physiological effects of diaphragm muscle denervation and disuse. **Clin Chest Med** 15(4): 641-59, 1994.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana**: uma abordagem integrada. Baureri, SP: Manole, 2003 p. 652-659

SIMA, A.A.F., RISTIC, H., MERRY, A., KAMIJO, M., LATTIMER, S.A., STEVENS, M.J., GREENE, D.A. The primary preventional and secondary interventive effects of acetyl-L-carnitine on diabetic neuropathy in the BB/W-rat. **J Clin Invest** 97: 1900-1907, 1996.

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

SIMA, A.A.F., ZHANG, W.X., TAI, J., TZE, W.J. NATHANIEL, V. Diabetic neuropathy in STZ-induced diabetic rat and effect of allogenic islet cell transplantation. Morphometric analysis. **Diabetes** 37: 1129-1136, 1988.

SIMA, A.A.F., ZHANG, W.X., XU, G., SUGIMOTO, K., WAHREN, J. C-peptide treatment has an ameliorating effect on type-1 diabetic neuropathy. **Proc Diabetes Compl** Conference Joslin 100th Anniversary, Boston, MA, 1998.

SOUZA, S.B., FLUES, K., PAULINI, J., MOSTARDA, C., RODRIGUES, B., SOUZA, L.E., IRIGOYEN, M.C., DE ANGELIS, K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. **Hypertension** 30: 786-791, 2007.

STAUFFACHER, W., BURR, I., GUTZEIT, A., BEAVEN, D., VELEMINSKY, B.J., RENOLD, A.E. Streptozotocin diabetes: Time course of irreversible B-cell damage; further observations on prevention by nicotinamide. **Proc Soc Exp Biol Med** 133: 194-200, 1970.

STEPPEL, J.H., HORTON, E.S. Exercise in the management of type 1 diabetes mellitus. **Rev Endocr Metab Disord** 4: 355-60, 2003.

STOLL, G., MÜLLER, H.W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathol** 9: 313-325, 1999.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain** 74: 491-516, 1951.

SUNDERLAND, S. The anatomy and physiology of nerve injury. **Muscle Nerve** 13:771-84, 1990.

SWETT, J.E., HONG, C.Z., MILLER, P.G. All peroneal motoneurons of the rat survive crush injury but some fail to reinnervate their original targets. **J Comp Neurol** 304:234-252, 1991.

TANCRÈDE, G., ROUSSEAU-MIGNERON, S., NADEAU, A. Beneficial Effects of physical training in rats with streptozotocin-induced Diabetes Mellitus. **Diabetes** 31: 406-409, 1982.

TANTUWAYA, V.S., BAILEY, S.B., SCHMIDT, R.E., VILLADIEGO, A., TONG, J.X., RICH, K.M. Peripheral nerve regeneration through silicone chambers in streptozocin-induced diabetic rats. **Brain Res** 759: 58–66, 1997.

TERADA, M., YASUDA, H., KIKKAWA, R. Delayed Wallerian degeneration and increased neurofilament phosphorylation in sciatic nerve of rats with streptozotocin-induced diabetes. **J Neurol Sci** 155: 23-30, 1998.

TERADA, M., YASUDA, H., KIKKAWA, R., SHIGETA, Y. Tolrestat improves nerve regeneration after crush injury in streptozotocin-induced diabetic rats. **Metabolism** 45: 1189-1195, 1996.

THOMAS, P.K., WARD, J.D. Diabetic neuropathy. In: Keen, H., Jarret, J. **Complications of diabetes**. London: Edward Arnold, 1975, p. 151-177.

THORENS, B. Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. **Int Rev Cytol** 137A: 209–238, 1992.

TIPTON, K.D., WOLFE, R.R. Exercise-induced changes in protein metabolism. **Acta Physiol Scand** 162: 377-387, 1998.

TOMLINSON, D.R., GARDINER, N.J. Diabetic neuropathies: component of etiology. **J Peripher Nerv Syst** 13: 112-121, 2008.

TOMLINSON, D.R., HOLMES, P.R., MAYER, J.H. Reversal, by treatment with an aldose reductase inhibitor, of impaired axonal transport and motor nerve conduction velocity in experimental diabetes mellitus. **Neurosci Lett** 31: 189–193, 1982.

TOMLINSON, D.R., SIDENIUS, P., LARSEN, J.R. Slow component-a of axonal transport, nerve myo-inositol and aldose reductase inhibition in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetes** 35: 398-402, 1986.

TONGE, D.A., GOLDING, J.P. Regeneration and repair of the peripheral nervous system. **Semin Neurosci** 5: 385-390, 1993.

TUMA, J.R., D'AGOSTINO DIAS, M., ARRUNÁTEGUI, G., DUARTE, G.G., WADA, A., CUNHA, A.S., FERREIRA, M.C. Effect of hyperbaric oxygen on the regeneration of experimental crush injuries of nerves. **Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo** 54: 81-84, 1999.

TRIBAN, C., GUIDOLIN, D., FABRIS, M., MARINI P., SCHIAVINATO, A., DONA, M., BORTOLAMI, M.C., DI GIAMBERARDINO, L., FIORI, M.G. Ganglioside treatment and improved axonal regeneration capacity in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes** 38: 1012-1022, 1989.

UNGER, J.W., KLITZSCH, T., PERA, S., REITER, R. Nerve Growth Factor and Diabetic Neuropathy in the rat: Morphological investigations of the sural nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord. **Exp Neurol** 153: 23-34, 1998.

ULBRETCH, J.S., CAVANAGH, P.R., CAPUTO, G.M. Foot problems in diabetes: an overview. **Clin Infect Dis** 39: S73-82, 2004.

VAN MEETEREN, N.L.U., BRAKKEE, J.H., HELDERS, P.J.M., GROISSET, G., GISPEN, W.H., WIEGANT, V.M. Recovery of function after sciatic nerve crush lesion in rats selected for diverging locomotor activity in the open field. **Neurosci Lett** 238: 131-134, 1997.

VAREJÃO, A.S.P., MEEK, M.F., FERREIRA, A.J.A., PATRÍCIO, J.A.B., CABRITA, M.A.S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in rat: walking track analysis. **J Neurosci Methods** 108: 1-9, 2001.

VAREJÃO, A.S., CABRITA, A.M., MEEK, M.F., BULAS-CRUZ, J., MELO-PINTO, P., RAIMONDO, S., GEUNA, S., GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **J Neurotrauma**.21(11):1652-70, 2004

VAVRA, J.J., DEBOER, C., DIETZ, A., HANKA, L.J., SOKOLSKI, W.T. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. **Antibiotic Annu** 230-235, 1959-60.

VERDÚ, E., NAVARRO, X. Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. **Exp Neurol** 146: 187-198, 1997.

VLASSARA, H., BROWNLEE, M., CERAMI, A. Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts. **J Exp Med** 160: 197, 1984.

VINIK, A.I., MEHRABYAN A. Diabetic neuropathies. **Med Clin North Am** 88: 947-99, 2004.

VRANIC, M., BERGER, M. Exercise and diabetes mellitus. **Diabetes** 28: 147-167, 1979.

WARHOL, M.J., SIEGEL, A.J., EVANS, W.J., SILVERMAN, L.M. Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. **The American Journal of Pathology** 118: 331-339, 1985.

WARD, J.D. Diabetic Peripheral Neuropathy. In: Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., Defronza, P. A., Keen, H. **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 2.ed. Chichester: John Wiley & Sons, vol 2, 1477-1496, 1997.

YAGIHASHI, S., KAMIJO, M., IDO, Y., MIRRLESS, D. Effects of long-term aldose reductase inhibition on development of experimental diabetic neuropathy: ultrastructural and morphometric studies of sural nerve in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes** 39: 690-696, 1990.

YAMAMOTO, H., UCHIGATA, Y., OKAMOTO, H. DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. **Biochem Biophys Res Commun** 103: 1014-1020, 1981a.

YAMAMOTO, H., UCHIGATA, Y., OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. **Nature** 19294(5838): 284-6, 1981b.

YASUDA, H., SONOBE, M., YAMASHITA, M., TERADA, M., HATANAKA, L., HUITIAN, Z., SHIGETA, Y. Effect of prostaglandin E1 analogue TFC612 on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes** 38: 832-838, 1989a.

YASUDA, H., TANIGUCHI, Y., HUITIAN, Z., KOSUGI, K., HIDAKA, K., HATANAKA, L., KASHIWAGI, A., KIKKAWA, R., HARANO, Y., SHIGETA, Y. Chronically streptozocin-diabetic monkeys does not mimic human diabetic neuropathy. **Exp Neurol** 104: 133-137, 1989b.

YASUDA, H., TERADA, M., MAEDA, K., KOGAWA, S., SANADA, M., HANEDA, M., KASHIWAGI, A., KIKKAWA, R. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. **Progress in Neurobiol** 69: 229-285, 2003.

ZACKS, S.I., PEGUES, J.J., ELLIOTT, F.A. Interstitial muscle capillaries in patients with diabetes mellitus: a light and electron microscope study. **Metabolism II**: 381, 1962

ZHANG, W.X., CHAKRABARTI, S., GREENE, D.A., SIMA, A.A. Diabetic autonomic neuropathy in BB rats and effect of ARI treatment on heart-rate variability and vagus nerve structure. **Diabetes** 39(5):613-8, 1990.

ZHOU, Z., CORNELIUS, C.P., EICHNER, M., BORNEMANN, A. Reinnervation-induced alterations in rat skeletal muscle. **Neurobiol Dis** 23(3): 595-602, 2006.

ZINMAN, B., ZUNIGA-GUAJARDO, S., KELLY, D. Comparison of the acute and long-term effects of exercise on glucose control in type 1 diabetes. **Diabetes Care** 7: 515-9, 1984.

ZOCHODNE, D.W., VERGE, V.M.K., CHENGE, C., SUN, H., JOHNSTON, J. Does diabetes target ganglion neurons? Progressive sensory nerve involvement in long-term experimental diabetic. **Brain** 12: 2319-2334, 2001.