

DISCUSSÃO

5.1 Dados ponderais

Nossos resultados reproduzem dados prévios do nosso laboratório (RODRIGUES FILHO, 2003; MIGLIACCIO, 2003; SATO, 2005, CARMO, 2006; OLIVETI, 2007) e de outros (BESTETTI e cols., 1981; LEE e cols., 2001; REGALIA e cols., 2002), quando observamos que os ratos diabéticos crônicos não ganham peso como os ratos controles. Existe uma certa preocupação de alguns autores (SHARMA e cols., 1980) com relação a essa diferença do ganho de peso, conseqüente a uma menor taxa de crescimento, observada nos animais diabéticos crônicos, no que diz respeito ao estudo das neuropatias. Esses autores argumentam que, se o diabetes for induzido em animais com idades muito jovens, eles deixarão de crescer, o que certamente influenciará no crescimento dos nervos e das fibras. Entretanto, resultados prévios do nosso laboratório, onde investigamos a neuropatia diabética em nervos somáticos (RODRIGUES FILHO, 2003; CARMO, 2006; OLIVETI, 2007) e autonômicos (MIGLIACCIO, 2003, Sato, 2005) em ratos diabéticos crônicos, induzidos exatamente da mesma forma que no presente estudo, mostram que os fascículos crescem normalmente, atingindo o mesmo tamanho dos fascículos dos ratos controles.

5.2. Diabetes experimental

O diabetes é uma doença metabólica crônica, que causa complicações secundárias, das quais a neuropatia periférica é uma das mais comuns. As alterações dos nervos periféricos, descritas nos humanos, são perda de fibras nervosas, degeneração axonal e desmielinização segmentar (BEHSE e cols., 1977; DYCK e cols., 1980; DYCK e cols., 1986; THOMAS & LASCELLES, 1996). Em modelos experimentais, evidências funcionais e

morfológicas de neuropatia periférica têm sido demonstradas (ROBERTSON & SIMA, 1980; YAGIHASHIY e cols., 1982, OZAKI e cols., 1996).

Animais diabéticos podem ser utilizados como modelos da doença humana. Entretanto, esses animais apresentam uma grande diversidade na patologia e, de fato, nenhuma síndrome animal corresponde, precisamente, a nenhum tipo de diabetes em humanos (MORDES & ROSSINI, 1981). Tanto as síndromes espontâneas quanto as induzidas são extensivamente estudadas, não apenas porque são fascinantes *per se*, mas também porque podem oferecer um claro entendimento da natureza do diabetes humano (MORDES & ROSSINI, 1981). Diabetes espontâneo tem sido relatado para uma grande variedade de espécies animais, incluindo bovinos, eqüinos, suínos, carneiros, cães e gatos. Relatos de diabetes espontâneo em roedores eram ausentes, até a descoberta de um tipo de diabetes hereditário de hamster chinês nativo (MEIER, 1960). Embora o diabetes espontâneo em animais seja uma ocorrência comum, a doença está bem caracterizada em apenas poucas espécies animais, na maioria roedores. Dados de animais de grande porte são escassos; apenas alguns cães e gatos e poucos primatas foram estudados em detalhes. Animais de laboratório de pequeno porte, em virtude da sua alta taxa de reprodução e baixo custo, tem sido responsáveis pela geração de uma grande quantidade de dados. A maioria das síndromes diabéticas espontâneas em animais é caracterizada por ambos, hiperglicemia e hiperinsulinemia, mesmo que transitória. A maioria, embora nem todos esses animais, são obesos (MORDES & ROSSINI, 1981). Dentre os roedores espontaneamente diabéticos, não obesos, podemos citar o rato BB, que foi descoberto em decorrência de uma mutação espontânea do rato Wistar (NAKHOODA e cols., 1977). Esses ratos apresentam glicosúria que se inicia entre 48 e 120 dias de vida e apresentam hiperglicemia, hipoinsulinemia e hipercetonemia, além de uma dramática lesão inflamatória durante a fase de destruição das

células beta do pâncreas (NAKHOODA e cols., 1977). São vários os relatos de neuropatia diabética autonômica nessa linhagem de ratos. YAGIHASHI & SIMA (1985) demonstraram redução do calibre axonal, sugerindo uma axonopatia, em nervos simpáticos de ratos diabéticos espontâneos BB. Esses mesmos autores demonstraram, posteriormente, diminuição do tamanho das fibras mielínicas e amielínicas no nervo vago dessa mesma linhagem de ratos (YAGIHASHI & SIMA, 1986). Posteriormente, MEDORI e cols. (1988), analisando morfometricamente secções transversais de nervos isquiáticos de ratos diabéticos espontâneos BB, relataram que, nos segmentos proximais, houve um aumento da área dos axônios, enquanto que nos segmentos distais, essa área se mostrou diminuída. Os autores concluem que essas alterações dos calibres axonais estão relacionadas às alterações no transporte axonal, nesse modelo de diabete.

Muitas técnicas experimentais estão disponíveis para a criação de síndromes diabéticas em animais de laboratório. Pancreatectomia levando ao diabete foi, sem dúvida, uma observação “chave” na historia da medicina mas, atualmente, técnicas muito mais sofisticadas tem sido empregadas com sucesso (MORDES & ROSSINI, 1981). Os dois agentes químicos mais extensamente estudados são o aloxane e a estreptozotocina (STZ). Ambas são beta-citotóxicas em doses diabetogênicas e são relativamente livres de efeitos tóxicos inespecíficos (MORDES & ROSSINI, 1981). Interessantemente, estudos de neuropatias periféricas em ratos diabéticos, induzidos experimentalmente com STZ, são mais freqüentes na literatura que aqueles com aloxane. Assim, para que nossos dados pudessem ser comparados com o grande volume de estudos da literatura, o modelo de indução do diabete pela injeção da STZ foi escolhido.

As neuropatias periféricas se caracterizam morfologicamente pelo comprometimento do axônio, da mielina ou de ambos. A polineuropatia sensitiva do diabete

se apresenta como uma síndrome de pequenas fibras, e são em geral caracterizadas por problemas sensitivos termo-algésicos e vegetativos (CHIMELLI e cols., 1993). A mais notável alteração foi encontrada nas fibras finas, tanto mielínicas como amielínicas do nervo sural em humanos, onde há evidências que indicam que, na neuropatia diabética dolorosa, ocorre diminuição de fibras finas e desordens axonais (MARK e cols., 1976). Em relação ao sistema nervoso autônomo, HUANG & WALSH (1973) demonstraram redução na densidade de fibras mielínicas do nervo esplâncnico maior, em pacientes com neuropatia periférica e MIGLIACCIO (2003) e SATO (2005) observaram, respectivamente, redução de fibras mielínicas finas nos nervos vagos e simpático-renais de ratos Wistar diabéticos crônicos, induzidos experimentalmente com o mesmo protocolo utilizado no presente estudo.

O diabetes crônico, induzido experimentalmente, pela injeção endovenosa única de STZ, foi capaz de promover o diabetes nos animais utilizados no presente estudo. Essa doença foi caracterizada pelo aumento da glicemia, quantificada após a indução do diabetes e no dia do experimento, bem como pela observação de polidipsia e poliúria apresentada pelos animais diabéticos, sem tratamento com insulina, ao longo de todo o experimento.

Em relação ao tratamento com insulina, pacientes com diabetes insulino-dependente, sujeitos à insulino-terapia intensiva para evitar hiperglicemia, podem apresentar episódios hipoglicêmicos. Estudos experimentais mostram que esses episódios podem levar à alterações patológicas em nervos periféricos (Sidenius e Jakobsen, 1983; Sidenius e Jakobsen, 1987; Sima e cols., 1993; Yasaki e Dyck, 1990; Yasaki e Dyck, 1991). Apesar de um controle relativamente bom da glicemia, muitos pacientes diabéticos eventualmente desenvolvem neuropatia (Biessels e Van Dam, 1997). Para mimetizar a situação humana em um modelo experimental, o diabetes deve ser tratado com insulina e flutuações bruscas da glicemia, bem como níveis glicêmicos sustentadamente altos ou baixos devem ser evitados.

Nosso modelo, de tratamento dos animais diabéticos com insulina, se mostrou bastante adequado uma vez que este foi eficiente na correção dos valores de glicemia e no ganho ponderal desses animais. Podemos afirmar que um bom controle metabólico foi obtido em nossos animais diabéticos, tratados com insulina, uma vez que o ganho de peso desses animais foi superponível ao ganho de peso dos animais controles, ao longo do mesmo período de tempo experimental. Enquanto isso, nossos animais diabéticos crônicos, sem tratamento, apresentaram ganho ponderal discreto, que, ao final do período experimental, se manifestou como peso corporal significativamente menor que o dos ratos controles e o dos ratos tratados com insulina. O peso corporal dos ratos controles foi estatisticamente semelhante ao peso dos ratos diabéticos crônicos tratados. Esses resultados ponderais são semelhantes aos descritos por Sharma e cols. (1985), McCallum e cols. (1986) e Britland e cols. (1985).

5.3. Ultraestrutura do nervo frênico

Características morfológicas e morfométricas das fibras mielínicas do nervo frênico de ratos adultos normais já foram exploradas na literatura por nosso laboratório (Rodrigues Filho & Fazan, 2006) e por outros (Song et al., 1999; Fraher, 1992; Comerford & Fitzgerald, 1986), e não diferem dos achados do presente estudo. Por outro lado, características ultraestruturais do nervo frênico de ratos foram raramente descritas e um estudo morfométrico detalhado das fibras amielínicas desse nervo, no melhor do nosso conhecimento, ainda não foi descrito. Song et al., (1999) estudou a ultraestrutura do segmento distal nervo frênico de ambos os lados, no nível da junção entre a veia cava inferior e o átrio direito, em apenas dois ratos Wistar adultos. Langford e Schmidt (1983) estudaram as fibras amielínicas somente do segmento distal esquerdo, imediatamente antes do nervo entrar no

diafragma. Ambos os estudos utilizaram ratos da linhagem Wistar. Dessa forma, é interessante a discussão dos dados normais do presente estudo, antes do início da discussão dos dados patológicos.

As características ultraestruturais do epineuro, perineuro e endoneuro descritas no presente estudo não diferem das descritas por Langford e Schmidt (1983) para o segmento distal esquerdo do nervo frênico de ratos adultos, com a adição de que tais características são simétricas, tanto longitudinalmente, quando lateralmente. O epineuro é formado por tecido conjuntivo denso, com poucos fibroblastos, e vários vasos sanguíneos. O perineuro é constituído por células achatadas, organizadas em camadas, interconectadas por “*tight junctions*”. O endoneuro é constituído de fibras colágenas finas que entremeiam elementos celulares usuais: fibras mielínicas e amielínicas com suas células de Schwann associadas, fibroblastos, mastócitos, capilares endoneurais e seus pericitos. Essas características são típicas da ultraestrutura de nervos em geral (Fazan et al., 1997; Sato et al., 2006).

O número total de fibras amielínicas do nervo frênico de ratos adultos foi de aproximadamente 200, sem diferença entre os segmentos e lados. Esse valor é semelhante ao observado por Langford e Schmidt (1983) para o segmento distal esquerdo, em ratos Wistar adultos, e ao observado por Smith e Rosenheimer (1984) para os segmentos distais, em ratos Fisher 344. Entretanto, esses valores diferem consideravelmente dos valores descritos por Song et al., (1999). Esses últimos autores descrevem valores aproximados de 500 fibras amielínicas no segmento distal esquerdo e 700 fibras amielínicas no segmento distal direito. Tais diferenças são explicadas pelas diferenças metodológicas entre os estudos em questão. A metodologia empregada no presente estudo é muito semelhante à descrita por Langford e Schmidt (1983): perfusão dos animais com solução fixadora contendo glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio, pós-fixação com tetróxido de ósmio em ferrocianeto de potássio,

secção transversal ultrafina contrastada com acetato de uranila e estudo das mesmas em grades de abertura única, cobertas com filme de formvar. Ambos os estudos utilizaram a observação direta e contagem de 100 % das fibras presentes em cada nervo. Entretanto, no estudo de Song et al., (1999), os autores utilizaram grades de microscopia eletrônica de transmissão com barras, estimaram o número de fibras que estariam encobertas pelas barras, e acrescentaram essa estimativa nas contagens. Esse procedimento deve ser a causa de um número maior de fibras descritas por esses autores, comparado aos nossos resultados e aos de Langford e Schmidt (1983). Os valores de densidade das fibras amielínicas dos nervos frênicos de ratos Wistar adultos normais (em torno de 6000 fibras/mm²) estão sendo descritos no presente trabalho pela primeira vez na literatura. Ratos Fisher 344 (Smith e Rosenheimer, 1984) apresentam densidade de fibras amielínicas, nos segmentos distais, em torno de 12000 fibras/mm², sendo a área fascicular média desses nervos (20500 μm²) menor que a por nós observada (em torno de 28000 μm²).

O diâmetro mínimo médio das fibras amielínicas do nervo frênico de ratos adultos foi de aproximadamente 0,4 μm, sem diferença entre os segmentos e lados estudados. Esse valor é semelhante ao descrito para o segmento distal direito porém está um pouco acima do descrito para o segmento distal esquerdo por Song et al., (1999). Novamente, essas diferenças podem se dar por causa das diferenças na metodologia de ambos os estudos. Além das diferenças já mencionadas na análise das grades, o método morfométrico empregado na obtenção dos diâmetros das fibras também difere substancialmente do utilizado no presente estudo. Song et al., (1999) traçaram o perímetro da fibra com um cursor conectado a um computador. O computador calculava o número de pontos de uma “matrix padrão” que se localizavam no interior do traçado do perímetro da fibra. Através desse número de pontos, o computador então calculava o diâmetro de um círculo perfeito que tivesse o mesmo número

de pontos do interior do traçado do perímetro da fibra. Além disso, o estudo do diâmetro das fibras foi realizado em apenas um animal. Os valores de área média das fibras amielínicas dos nervos frênicos de ratos adultos normais (em torno de $0,28 \mu\text{m}^2$) estão sendo descritos no presente trabalho pela primeira vez na literatura.

Também descrevemos pela primeira vez, os valores de porcentagem da área fascicular ocupada pelas fibras amielínicas (em torno de 7 %), bem como a relação entre o número de fibras mielínicas e amielínicas (em torno de 2,7) nos nervos frênicos de ratos adultos normais.

A distribuição dos diâmetros das fibras amielínicas com valores entre 0,1 e 1,5 μm descrita por Langford e Schmidt (1983) para o segmento distal esquerdo se assemelha aos nossos resultados para os segmentos distais. Tais autores, entretanto, não demonstraram graficamente essa distribuição, como no presente estudo, nem relataram o pico de frequência mais proeminente. Por outro lado, Song et al., (1999) relataram pico de frequência em 0,3 μm nos segmentos distais de ambos os lados, sem relatar os valores extremos e sem demonstrar graficamente a distribuição. O presente estudo adiciona à literatura a distribuição das fibras amielínicas do nervo frênico de ratos adultos nos segmentos proximais e distais de ambos os lados.

O achado ultraestrutural mais importante e totalmente original do presente estudo, com relação aos dados de normalidade do nervo frênico de ratos adultos, é que, morfometricamente, as fibras amielínicas são simétricas tanto longitudinalmente, quanto lateralmente. Esse dado difere dos achados morfométricos das fibras mielínicas, que mostram assimetria longitudinal e lateral importantes (Fraher, 1992; Rodrigues Filho e Fazan, 2006).

5.4. Ultraestrutura do nervo frênico no diabetes crônico

O presente estudo demonstrou alterações ultraestruturais importantes no nervo frênico de ratos diabéticos crônicos induzidos pela STZ. A presença de características ultraestruturais de atrofia axonal nas fibras mielínicas de grande calibre confirmou nossos resultados morfométricos prévios, em nível de microscopia de luz (Rodrigues Filho e Fazan, 2006). Entretanto, alterações mais evidentes estiveram presentes nas fibras mielínicas finas e nas fibras amielínicas. Os vasos capilares endoneurais também se apresentaram alterados em decorrência do diabetes experimental utilizado no presente estudo, com sinais importantes de espessamento das paredes e colapamento da luz capilar.

Segundo a revisão recente de Hoitsma e cols. (2004), as neuropatias periféricas podem ser categorizadas de acordo com o envolvimento funcional das fibras ou de acordo com o diâmetro e a condução nervosa dessas fibras. Em relação à função, três tipos de fibras periféricas podem ser distinguidas: somato-motoras, somato-sensitivas e fibras autonômicas. Funções sensoriais incluem sensibilidade ao tato, vibração, temperatura e dor. Funções autonômicas incluem sudorese, movimentos do tórax, digestório, lacrimação, funções sexuais, controle da pressão arterial e variabilidade da frequência cardíaca. De acordo com o tamanho, as fibras são distinguidas em: mielínicas de grande calibre (A-alfa e A-beta), mielínicas de calibre intermediário (A-gama), mielínicas de pequeno calibre (A-delta) e amielínicas (fibras C). Fibras A-alfa e A-beta carregam funções motoras e sensibilidade da vibração e do tato. Fibras A-gama carregam função motora do fuso neuromuscular. Fibras A-delta e fibras C carregam sensibilidade à temperatura e dor e funções autonômicas. As chamadas neuropatias de fibras finas afetam, preferencialmente, as fibras mielínicas de pequeno calibre e as fibras amielínicas, mantendo as fibras mielínicas de grande calibre relativamente intactas. Em

alguns casos de neuropatias de fibras finas, ela é parte de uma doença de base. Dentre as causas adquiridas mais citadas, o diabete aparece sempre como primeiro na lista. Entretanto, nenhuma etiologia específica é identificada na maioria dos pacientes, especialmente nos idosos (Hoitsma e cols., 2004). A neuropatologia dessa entidade ainda se encontra quase que totalmente inexplorada, mas, alguns estudos experimentais suportam o papel da isquemia como uma das possíveis causas. Em um modelo animal de infarto arterial, Parry e Brown (1982) demonstraram que as fibras de menor calibre são mais vulneráveis à isquemia que as fibras de maior calibre. Nossos dados morfológicos suportam tal achado, uma vez que nos animais diabéticos crônicos, demonstramos envolvimento das fibras mielínicas finas e das fibras amielínicas, associadas a alterações dos vasos capilares, suficientes para causar isquemia endoneural. Recentemente, Malik e cols. (2005) demonstrou, no nervo sural de pacientes diabéticos com neuropatia, espessamento da membrana basal, hiperplasia endotelial e estreitamento da luz. Todas essas alterações estiveram presentes em nosso material, indicando semelhança do nosso modelo experimental com a doença humana.

Não encontramos relatos de literatura sobre um estudo ultraestrutural, morfológico e/ou morfométrico, do nervo frênico quer em pacientes diabéticos, quer em modelos experimentais de diabete. O diagnóstico neuropatológico da neuropatia de fibras finas tem tradicionalmente sido dependente do exame ultraestrutural de biópsias de nervos (Hoitsma e cols., 2004). Entretanto, as anormalidades podem ser súbitas e de difícil reconhecimento, e esse estudo requer microscopia eletrônica de transmissão, com estudos de alta demanda técnica e morfometria precisa (Hoitsma e cols., 2004). Sabe-se que técnicas morfométricas, especialmente aquelas para a medida de fibras amielínicas, demandam um exaustivo trabalho do pesquisador e envolvem um considerado tédio e grande consumo de tempo (Tomasch, 1983; Auer, 1994). Talvez por essas razões, são raros os estudos

morfométricos de fibras amielínicas, tanto em pacientes diabéticos, quanto em modelos experimentais dessa doença.

Nossos resultados morfométricos mostraram aumento do número de fibras amielínicas nos animais diabéticos crônicos, bem como maior área média e diâmetro mínimo médio dessas fibras nesse grupo. Entretanto, a porcentagem da área fascicular ocupada pelas fibras amielínicas e a relação entre o número de fibras mielínicas e amielínicas se mostrou reduzida nos animais diabéticos crônicos. Esses resultados, associados, sugerem a presença de degeneração das fibras amielínicas de pequeno calibre, o que desvia os valores médios para valores maiores. O discreto desvio dos histogramas de distribuição de frequência dessas fibras no grupo diabético crônico, também fala a favor dessa perda das fibras de pequeno calibre. O maior número de fibras amielínicas pode indicar tentativa de regeneração dessas fibras mas, como não há redução do número de fibras mielínicas e há redução da relação numérica entre as fibras mielínicas e amielínicas, essa regeneração não está acontecendo de forma suficiente.

Bestetti e cols. (1981) estudou o nervo frênico de ratos diabéticos, 12 meses após a indução do diabetes pela STZ. Os autores descrevem a presença de lesões no citoplasma das células de Schwann, sem alterações nos axônios. Entretanto, o autor não realizou morfometria das fibras amielínicas. Walker e cols. (1999) realizou estudo morfométrico das fibras amielínicas do nervo tibial de ratos Sprague-Dawley, diabéticos agudos, 27 dias após a indução pela STZ. Esse autor não evidenciou alterações dos vasos capilares nem diferenças significativas nos parâmetros morfométricos das fibras amielínicas entre os grupos controle e diabético agudo. Esses resultados sugerem que as alterações descritas no presente estudo são características do diabetes experimental crônico.

5.5. Papel do tratamento com insulina na ultraestrutura do nervo frênico no diabetes crônico

Pacientes com diabetes insulino-dependente, sujeitos à insulino-terapia intensiva para evitar hiperglicemia, podem apresentar episódios hipoglicêmicos. Estudos experimentais mostram que esses episódios podem levar à alterações patológicas em nervos periféricos (Sidenius e Jakobsen, 1983; Sidenius e Jakobsen, 1987; Sima e cols., 1993; Yasaki e Dyck, 1990; Yasaki e Dyck, 1991). Apesar de um controle relativamente bom da glicemia, muitos pacientes diabéticos eventualmente desenvolvem neuropatia (Biessels e Van Dam, 1997). Para mimetizar a situação humana em um modelo experimental, o diabetes deve ser tratado com insulina e flutuações bruscas da glicemia, bem como níveis glicêmicos sustentadamente altos ou baixos devem ser evitados.

Nosso modelo de tratamento dos animais diabéticos, com insulina, se mostrou bastante adequado uma vez que este foi eficiente na correção dos valores de glicemia e no ganho ponderal desses animais. Podemos afirmar que um bom controle metabólico foi obtido em nossos animais diabéticos, tratados com insulina, uma vez que o ganho de peso desses animais foi superponível ao ganho de peso dos animais controles, ao longo do mesmo período de tempo experimental. Enquanto isso, nossos animais diabéticos crônicos, sem tratamento, apresentaram ganho ponderal discreto, que, ao final do período experimental, se manifestou como peso corporal significativamente menor que o dos ratos controles e o dos ratos tratados com insulina. O peso corporal dos ratos controles foi estatisticamente semelhante ao peso dos ratos diabéticos crônicos tratados. Esses resultados ponderais são semelhantes aos descritos por Sharma e cols. (1985), McCallum e cols. (1986) e Britland e cols. (1985).

Existem alguns relatos que descrevem um aumento no número de axônios degenerados nos nervos periféricos de animais diabéticos, tratados com insulina (Bhoyrul e cols., 1988; Sharma e cols., 1985). Nossos dados não reproduziram esses achados, indo ao encontro com os dados de McCallum e cols. (1986) que também não evidenciaram aumento no número de axônios degenerados, em nervos tibiais de ratos diabéticos tratados com insulina. Outros autores descrevem a perda de fibras mielínicas em alguns nervos de animais diabéticos tratados com insulina (Sharma e cols., 1985) e, mais uma vez, nossos dados não reproduziram essas descrições. Entretanto, tais estudos se referem às fibras mielínicas e não encontramos na literatura, descrições de estudos que envolvem ultraestrutura de nervos e o papel do tratamento com insulina nessa estrutura.

São vários os relatos da existência de uma neuropatia decorrente de hipoglicemia experimental (Mohseni e Hildebrand, 1998a; Sidenius e Jakobsen, 1983; Mohseni e Hildebrand, 1998b). Nesses estudos, os autores descrevem, como característica marcante dessa neuropatia, uma degeneração axonal, algumas vezes acompanhada de desaranjos na bainha de mielina. Esses dados, se somados aqueles outros relatos, de um número aumentado de figuras de degeneração axonal em nervos periféricos de ratos diabéticos tratados com insulina (Bhoyrul e cols., 1988; Sharma e cols., 1985), sugerem que, nos ratos tratados com insulina, aqueles que desenvolvem hipoglicemia, podem apresentar degeneração axonal. É importante salientar, entretanto, que Yasaki e Dyck (1990) demonstraram a ocorrência de neuropatia hipoglicêmica experimental, com degeneração de fibras nervosas, apenas em níveis hipoglicêmicos muito severos, mantidos por pelo menos 12 horas e em ratos jovens.

Nossos resultados morfométricos ultraestruturais não mostraram diferenças significativas, quando comparamos os nervos frênicos dos ratos diabéticos com e sem tratamento pela insulina. Tais resultados estão a favor das descrições de que o tratamento com

insulina é capaz de corrigir o ganho de peso e as alterações metabólicas do animais diabéticos, sem, entretanto, corrigir e/ou prevenir a lesão das fibras finas, causada pelo diabete induzido pela STZ. Interessante lembrar que o tratamento com insulina corrige a lesão axonal das fibras mielínicas de grande calibre, causada pelo diabete induzido pela STZ (Sharma e cols., 1985; Bhoyrul E cols., 1988; Britland e cols., 1985; McCallum e cols., 1986), bem como a distribuição do diâmetro mínimo dos axônios, uma vez que essa distribuição apresenta forma bimodal, como a observada nos controles, diferente da distribuição unimodal que aparece nos nervos dos ratos diabéticos crônicos, sem tratamento (Rodrigues Filho e Fazan, 2006).

RESUMO

Estudos em nível de microscopia de luz do nervo frênico foram realizados em nosso laboratório, para investigar a presença de neuropatia desse nervo, devido ao diabetes experimental crônico, induzido por estreptozotocina (STZ). Demonstramos que as fibras mielínicas, principalmente as de grande calibre, são afetadas pelo diabetes crônico experimental. Entretanto, não existem relatos sobre as alterações das fibras amielínicas do nervo frênico nesse modelo de diabetes experimental. Nosso objetivo, com o presente estudo, foi realizar uma avaliação morfométrica ultraestrutural do nervo frênico de ratos com diabetes crônico induzido experimentalmente, com e sem tratamento com insulina. Os segmentos proximais e distais dos nervos frênicos de ratos com diabetes crônico (12 semanas), induzido pela injeção endovenosa única de STZ, foram preparados com técnicas histológicas convencionais para a análise em nível de microscopia eletrônica de transmissão. Animais controle receberam injeção de veículo (tampão citrato) e animais diabéticos crônicos tratados, receberam uma dose diária de insulina subcutânea, ao anoitecer. Secções transversais ultrafinas dos nervos frênicos foram observadas em um microscópio eletrônico de transmissão acoplado a uma câmera digital de alta resolução. Campos microscópicos adjacentes da área endoneural dos fascículos foram obtidos manualmente, sem sobreposição dos mesmos. As fibras amielínicas presentes em cada campo microscópico foram identificadas visualmente e contadas. A análise morfométrica das fibras amielínicas foi realizada com o auxílio do programa KS 400, versão 2.0. Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os parâmetros morfométricos das fibras amielínicas quando comparados segmentos de um mesmo lado ou ambos os lados, em um mesmo grupo experimental. Entre os grupos experimentais, observamos, nos animais diabéticos de ambos os grupos, alterações ultraestruturais significativas, tais como hiperplasia capilar e espessamento da membrana basal dos mesmos. Tanto as fibras mielínicas quanto as amielínicas se mostraram afetadas

pelo diabetes crônico. As fibras mielínicas de grande calibre apresentaram sinais de atrofia axonal, com afrouxamento da bainha de mielina. Nas fibras mielínicas de menor calibre, observamos a presença tanto de sinais de atrofia axonal, com fibras de bainha muito espessa em relação ao tamanho do axônio, bem como fibras com sinais de desmielinização. Nas fibras amielínicas, muitas vezes, observamos células de Schwann com vacúolos citoplasmáticos e, algumas vezes, a presença de prolongamentos de células de Schwann, sem envolver fibras amielínicas. A morfometria mostrou aumento do número de fibras amielínicas nos animais diabéticos em ambos os grupos, bem como maior área média e diâmetro mínimo médio dessas fibras nesses grupos. Entretanto, a porcentagem da área fascicular ocupada pelas fibras amielínicas e a relação entre o número de fibras mielínicas e amielínicas se mostrou reduzida nos animais diabéticos crônicos. Esses resultados sugerem a presença de degeneração das fibras amielínicas de pequeno calibre, o que desvia os valores médios para valores maiores. O maior número de fibras amielínicas pode indicar tentativa de regeneração dessas fibras, mas, como não há redução do número de fibras mielínicas e há redução da relação numérica entre as fibras mielínicas e amielínicas, essa regeneração não está acontecendo de forma suficiente para manter a relação numérica entre as fibras constante. Não houve diferença entre os animais que receberam tratamento com insulina e os que não receberam. Assim o diabetes crônico, induzido experimentalmente, foi capaz de afetar as fibras amielínicas dos nervos frênicos de ratos e o tratamento com insulina não interferiu com esse processo.

ABSTRACT

Streptozotocin (STZ) induced diabetes is known to cause a reduction of both conduction velocity and axon caliber in rat nerves and also a decrease in muscle fiber size. In the present study we investigated the phrenic nerve neuropathy, due to experimental diabetes induced by STZ and the evolution of this neuropathy in diabetic rats treated with insulin. Proximal and distal segments of the phrenic nerves were evaluated with the aid of a digital transmission electron microscope (TEM), from rats rendered diabetic, for 12 weeks, by injection of STZ. Control rats received vehicle. Treated rats received a single subcutaneous injection of insulin on a daily basis. Our results show that the phrenic nerves of diabetic rats present lesions of the myelinated and unmyelinated fibers, as well as the endoneural vessels and Schwann cells nuclei. The main alterations were the presence of axonal atrophy with loose myelin sheaths on the large caliber myelinated fiber. The small myelinated fibers presented signs of axonal atrophy or demyelination. Basement membrane thickening and signs of endothelial hyperplasia were present on the endoneural blood vessels of both diabetic groups but were more severe on the untreated animals. In the insulin treated animals, most of the alterations were seen on the small myelinated fibers and were related to demyelination signs. Unmyelinated fibers morphometry showed a larger number of fibers as well as larger average fiber area and diameter in both diabetic groups, compared to controls. Nevertheless, there was a reduction on the unmyelinated fibers percentage of occupancy and the ratio between myelinated and unmyelinated fiber numbers in both diabetic groups. No differences were found between both diabetic groups. In conclusion, the phrenic nerve is affected by the experimental diabetes and the conventional insulin treatment was not capable to prevent the small fiber neuropathy identified by TEM.

CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem as principais conclusões:

- 1- Morfometricamente, as fibras amielínicas dos nervos frênicos de ratos Wistar adultos machos, são simétricas tanto longitudinalmente, quanto lateralmente.
- 2- O diabetes crônico, induzido experimentalmente, pela injeção endovenosa única de STZ, foi capaz de promover uma neuropatia de fibras finas, nos nervos frênicos de ratos Wistar adultos machos. Essa neuropatia foi similar nos segmentos proximais e distais, bem como nos lados direito e esquerdo desses nervos. Além disso, os vasos capilares endoneurais foram estruturalmente afetados nesse modelo de diabetes experimental. O tratamento convencional com insulina foi capaz de corrigir o ganho de peso e as alterações metabólicas dos animais diabéticos, sem, entretanto, corrigir e/ou prevenir a lesão das fibras finas e dos vasos capilares, causada pelo diabetes induzido pela STZ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARISON, R. M., CIACCIO, E. I., GLITZER, M. S., CASSARO, J. A., PRUSS, M.P. (1967).
Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin.
Diabetes 16:51.
- AUER RN. Automated nerve fiber size and myelin sheath measurement using microcomputer-based digital image analysis: theory, method and results. J Neurosci Methods 1994, 51: 229-283.
- BAILEY, C. C., BAILEY, O. T. (1943) .The production of diabetes mellitus in rabbits with alloxan. J.A.M.A. 122:1165.
- BEHSE F, BUCHTHAL F, CARLSEN F. Nerve biopsy and conduction studies in diabetic neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1977, 40: 1072-1082.
- BERTHOLD CH. Morphology of normal peripheral axons. In: The axon – Structure, Function and Pathophysiology, edited by Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK. Oxford University Press, New York, 1995.
- BESTETTI, G. AND ROSSI, G.L. (1982). Hypothalamic changes in diabetic Chinese hamsters. A semiquantitative, light and electron microscopic study. *Lab. Invest.*, **47**, 516–522.
- BHOYRUL S, SHARMA AK, STRIBLING D, MIRRLEES DD, PETERSON RG, FARL MO, THOMAS PK. Ultrastructural observations on myelinated fibers in experimental

- diabetes: effect of the aldose reductase inhibition ponalrestat given alone or in conjunction with insulin therapy. *J Neurol Sci* 1988, 85: 131-147.
- BIESSELS GJ, VAN DAM PS. Diabetic neuropathy: pathogenesis and current treatment perspectives. *Neurosci Res Commun* 1997, 20: 1-10.
- BRANNAGAN TH, PROMISLOFF RA, MCCLUSKEY LF, MITZ KA. Proximal diabetic neuropathy presenting with respiratory weakness. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999, 67: 539-541.
- BRITLAND ST, SHARMA AK, DUGUID IG, THOMAS PK. Ultrastructural observations on myelinated fibers in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats: effect of insulin treatment. *Life Support Syst* 1985, 3 Suppl 1: 524-529.
- BRITLAND, S. T., SHARMA, A. K., DUGUID, I. G. M., THOMAS, P. K. (1986). Ultrastructural observations on myelinated fiber size in the tibial nerve os streptozotocin-diabetic rats: Effects of insulin treatment. *Life support Systems. Supplement. Proc. XII Ann. Mtg. Eur. Soc. Artif. Org. (in press)*
- BROSKY, G., LOGOTHETOPOULOS, J. (1969). Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes* 18:606.
- BROWN, M. J., SUMNER, A. J., GREENE, D. A., DIAMOND, S. M., ASBURY, A. K. (1980). Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. *Ann. Neurol.* 8:168.

- CAUSEY G, BARTON AA. The cellular component of the endoneurium of peripheral nerve. *Brain* 1959, 82: 594-598.
- CHASE MR, RANSON SW. The structure of the roots, trunk and branches of the vagus nerve. *J Comp Neurol* 1914, 24: 31-37.
- CHASE MR. An experimental study of the vagus nerve. *J Comp Neurol* 1916, 26: 421-431.
- CHIMELLI L ; EMT, N. . Neuropatia Diabetica. I - Conceito, Epidemiologia, Classificação, Quadro Clínico e Eletroneuromiográfico. Estudo de 210 Casos. *REV BRAS NEUROLOGIA*, RIO DE JANEIRO, v. 28, n. 3, p. 69-73, 1992
- CLARK, H. B., SCHMIDT, R. E. (1984). Identification of dystrophic sympathetic neurons in experimental diabetic autonomic neuropathy. *Brain Res* 292:390.
- COMERFORD T, FITZGERALD MJ. Motor innervation of rodent diaphragm. *J Anat* 1986, 149: 171-175.
- DE CARVALHO MA, MATIAS T, EVANGELHISTA T, PINTO A, SALES LUIS ML. Bilateral phrenic nerve neuropathy in a diabetic patient. *Eur J Neurol* 1996, 3:481-482.
- DE SOUZA RR, WATANABE IS, CHADI G, DE ARAÚJO MV. Number and thickness of myelinic fibers of the phrenic nerve of young and aged rats. *Rev Bras Biol* 1992, 52: 79-82.

DUCHEN, L. W., ANJORIN., WALKINS, P. J., MACKAY, J. D. (1980). Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 92:301-303.

DUNN, S. J., MCLETCHI, N. G. B. (1943). Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* 2:348.

DYCK PJ, LAIS A, KARNES JL, O'BRIEN P, RIZZA R. Fiber loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. *Ann Neurol* 1986, 19: 425-439.

DYCK PJ, GIANNINI C. Pathologic alteration in the diabetic neuropathies of human. *Neurophatol Exp Neurol* 1996; 55: 1181-93

DYCK PJ, SHERMAN WR, HALLCHER LM, SERIVCA FJ, O'BRIEN PC, GRINA LA, PALUMBO PJ, SWANSON CJ. Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and myoinositol related to sural nerve morphometry. *Ann Neurol* 1980, 8: 590-596.

ESPIR MLE, HARDING DTC. Apparatus for measuring and counting myelinated nerve fibers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1961, 24: 287-290.

EVANS, J. S., GERRITSEN, G. C., MANN, K. M., OWEN, S. P. (1965). Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37971) and its cofactor, U-15,744. *Cancer Chemother* 48:1.

FAZAN VPS, LACHAT JJ. Qualitative and quantitative morphology of the vagus nerve in experimental Chagas' disease in rats: A light microscopy study. *Am J Trop Med Hyg* 1997, 57: 672-677.

FAZAN VPS, SALGADO HC, BARREIRA AA. A descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats. *Hypertension* 1997, 30: 693-698.

FAZAN VPS, SALGADO HC, BARREIRA AA. Aortic depressor nerve myelinated fibers in acute and chronic experimental diabetes. *Am J Hypertens* 2006; 19: 153-60.

FERRIERE G, DENEFF JF, RODRIGUEZ J, GUZZETA F. Morphometric studies of normal sural nerves in children. *Muscle & Nerve* 1985, 8: 697-704.

FISHER MA, LEEHEY DJ, GANDHI V, ING T. Phrenic nerve palsies and persistent respiratory acidosis in a patient with diabetes mellitus. *Muscle & Nerve* 1997, 20:900-902.

FRAHER JP. Myelin-axon relationships in the rat phrenic nerve: longitudinal variation and lateral asymmetry. *J Comp Neurol* 1992, 323: 551-557.

FRAHER JP. On methods of measuring nerve fibers. *J Anat* 1980, 130: 139-151.

FRIEDE RL, SAMORAJSKI T. Relationship between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. *J Comp Neurol* 1967, 130: 223-232.

GARDNER, E., GRAY. D. J., O'RAHILLY, R. *Anatomia: estudo regional do corpo humano*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1967.

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

GOMORI, G., GOLDNER, M. G. (1943). Production of diabetes mellitus in rats by alloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 54:287.

GOTTSHALL J. The diaphragm of the rat and its innervation. Muscle fibers composition; perikarya and axons of efferent and afferent neurons. *Anat Embryol* 1981, 161: 405-417.

GRAY, H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918.

GREENE EC (1963) In: *Anatomy of the Rat*, Vol XXVII. New York: Hafner.

GUY, R. J. C., DAWSON, J. L., GARRET, J. R., et al. (1984). Diabetic gastroparesis from autonomic neuropathy. Surgical considerations and changes in vagus nerve morphology. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 47:686.

HEBB CO, KRNJEVIC K, SILVER A. Acetylcholine and choline acetyltransferase in the diaphragm of the rat. *J Physiol* 1964, 171: 504-513.

HEDGER JH, WEBBER RH. Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (*Mus novergicus albinos*). *Acta Anat* 1976, 96: 206-217.

HEIMER, L. (1995). The human brain and spinal cord. Functional neuroanatomy and dissection guide. 2nd edition, New York Springer-Verlag, p. 241-265.

HOFFMAN HH, SCHNITZLEIN HN. The number of nerve fibers in the vagus nerve of man. *Anat Rec* 1961, 139: 429-435.

HUANG C, KIM Y, CARAMORI M.L.A, FISH, A.J, RICH, S.S, MILLER M.E, RUSSELL, G.B, MAUER, M. Cellular basis of diabetic nephropathy. II. The transforming growth factor- α system and diabetic nephropathy lesions in type 1 diabetes. *Diabetes* 51:3577–3581, 2002

JACOBS JM, LOVE S. Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain* 1985, 108: 897-924.

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

JERÔNIMO, André ; JERONIMO, Cláudia A Domingues ; RODRIGUES FILHO, O. A. ; FAZAN, Valéria Paula Sassoli ; SANADA, Luciana Sawuri . Microscopic anatomy of

the sural nerve in the postnatal developing rat: a longitudinal and lateral symmetry study. *Journal of Anatomy*, v. 206, p. 93-99, 2005.

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

JAKOBSEN, J. (1979). Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient diabetic rats. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 42:509.

JOHNSON, D. D. (1950). Alloxan administration in the guinea pig: A study of the histological changes in the islands of Langerhans, the blood sugar fluctuations, and changes in the glucose tolerance. *Endocrinology* 46:135.

JORDAN, W. R. (1936). Neuritic manifestations in diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* 57: 307.

JUNNOD, A., LAMBERT, A. E., ORCI, L., PICTEC, R., GONET, A. E., RENOLD, A. E. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:201.

JUNNOD, A., LAMBERT, A. E., STAUFACHER, W., RENOLD, A. E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48:2129.

KOSTREVA DR, PONTUS SP. Hepatic vein, hepatic parenchyma and inferior vena caval mechanoreceptors with phrenic afferents. *Am J Physiol* 1993b, 265: G15-G20.

KOSTREVA DR, PONTUS SP. Pericardial mechanoreceptors with phrenic afferents. *Am J Physiol* 1993a, 264: H1823-H1846.

KRISTENSSON, K., NORDBORG, C., OLSSON, Y., SOURANDER, P. (1971). Changes in the vagus nerve in diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 79A: 684-685.

KUSHNER, B., LAZAR, M., FURMAN, M., LIEBERMAN, T. W., LEOPOLD, I. H. (1969). Resistance of rabbits and guinea pigs to the diabetogenic effect of streptozotocin. *Diabetes* 18:542.

LANDFORD LA, SCHMIDT RF. An electron microscopic analysis of the left phrenic nerve in the rat. *Anat Rec* 1983, 205: 207-213.

LASKOWSKI MB, NORTON AS, BERGER PK. Branching patterns of the rat phrenic nerve during development and reinnervation. *Exp Neurol* 1991, 113: 212-220.

LAZAROW, A. (1947). Alloxan diabetes in the mouse. *J. Lab Clin Med* 32: 1258.

LAZAROW, A. (1949) Factors controlling the development and progression of diabetes. *Physiol. Rev.* 28:48.

LEE J.C, *et al.* Efficacy and reliability of fundus digital camera as a screening tool for diabetic retinopathy in Kuwait . *Journal of Diabetes and its Complications* , Volume 17 , Issue 4 , Pages 229 - 233 K . AlSabti

LOPEZ-PLANA C, SAUTET JY, PONS J, NAVARRO G. Morphometric study of the recurrent laryngeal nerve in young normal horses. *Res Vet Sci* 1993, 55: 333-337.

LUBINSKA L, WARYSZEWSKA J. Fibre population of the phrenic nerve of rat: changes of myelinated fibre dimensions along the nerve and characteristics of axonal branching. *Acta Neurobiol Exp* 1974, 34: 525-541.

LUKENS, F. D. W. (1948). Alloxan diabetes. *Physiol Ver* 28:304.

MALAISSE, W. J. (1982). Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. *Biochem Pharmacol* 31:3527.

MALIK, S., *et al.* Cardiovascular Disease in U.S. Patients With Metabolic Syndrome, Diabetes, and Elevated C-Reactive Protein. *Diabetes Care* 2005 28:690-693.

MANCINI M, FILIPPELLI M, SEGHIERI G, IANDELLI I, INNOCENTI F, DURANTI R, SCANO G. Respiratory muscle function and hypoxic ventilatory control in patients with type 1 diabetes. *Chest* 1999, 115: 1553-1562.

MANSFORD, K. R.L., OPIE, L. (1968). Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or alloxan. *Lancet* 1:670.

MATTINGLY GE, FISCHER VW. Peripheral nerve axonal dwindling with concomitant myelin sheath hypertrophy in experimentally induced diabetes. *Acta Neuropathol* 1985, 68: 149-154.

MAYR R, GOTTSCHALL J, GRUBER H, NEUHUBER W. Internal structure of cat extraocular muscle. *Anat Embryol.* 1975;1458:25-34.

MCCALLUM KN, SHARMA AK, BLANCHARD DS, STRIBLING D, MIRRLEES DJ, DUGUID IG, THOMAS PK. The effect of continuous subcutaneous insulin infusion therapy on morphological and biochemical abnormalities of peripheral nerves in experimental diabetes. *J Neurol Sci* 1986, 74: 55-67.

MCCALLUM, K. N.C., SHARMA, A. K., BLANCHARD, D. S., STRIBLING, D., MIRRLEES, D.J., DUGUID, I. G. M., THOMAS, P. K. (1986). The effect of continuous subcutaneous insulin infusion therapy on morphological and biochemical abnormalities in peripheral nerves in experimental diabetes. *J Neurol Sci* (in press)

MEDORI R, JENICH H, AUTILIO-GAMBETTI L, GAMBETTI P. Experimental diabetic neuropathy: similar changes of slow axonal transport and axonal size in different animal models. *J. Neurosci.* 1988, 8: 1814-1821.

MEIER H. Diabetes mellitus in animals. A review. *Diabetes* 1960, 9: 485-489.

MEZIN P, TENAUD C, BOSSON JL, STOEBNER P. Morphometric analysis of the peripheral nerve: advantages of the semi-automated interactive method. *J Neurosci Methods* 1994, 51: 163-169.

MIGLIACCIO, V, FAZAN, V . Morphometry of the cervical vagus nerve in chronic experimental diabetes. In: XXI Congresso da Associação Latino Americana de Ciências Fisiológicas ALACF, 2003, Ribeirão Preto- São Paulo, 2003.

MOHSENI S, HILDEBRAND C. Hypoglycaemic neuropathy in BB/Wor rats treated with insulin implants: electron microscopic observations. *Acta Neuropathol* 1998b, 96: 151-156.

MOHSENI S, HILDEBRAND C. Neuropathy in diabetic BB/Wor rats treated with insulin implants. *Acta Neuropathol* 1998a, 96: 144-150.

MORDES JP, ROSSINI AA. Animal models of diabetes. *Am J Med* 1981, 70: 353-360.

MORDES, J.P., ROSSINI, A. A. (1981). Animal models of diabetes. *Am. J. Med.* 70: 353.

NAKHOODA AF, LIKE AA, CHAPPEL CI, MURRAY FT, MARLISS EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. *Diabetes* 1977, 26:100-112.

NARAMA I, KINO I. Peripheral motor neuropathy in spontaneously diabetic WBN/Kob rats: a morphometric and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 1989, 79: 52-60.

NETTER, Frank H, M. D. Atlas de Anatomia Humana. Ed. Artes Médicas, 1996.

NOAKES, P.G., BENNETT, M.R., DAVEY, D.F. GROWTH OF SEGMENTAL nerves to the developing rat diaphragm: absence of pioneer axons. The Journal of Comparative Neurology, 1983. Volume 218, Issue 4 , 365 - 377

OCHODNICKÁ, E; OCHIDNICKÝ, M; BELEI, K; FUSEKOVÁ, E; BOLSEI'OVÁ, L. Quantitative analysis of myelinated nerve fibers of peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetes mellitus. Mol Chem Neuropathol, 1995, 25(2-3) 225-233

OLIVETI, M. C. D. B. B.; DALMAZO, J.; FAZAN, V. P. S. Estudo das alterações do nervo laríngeo recorrente decorrentes do diabete experimental crônico em ratos. O Dendrito. v. 11, n. 02, p. 30-30, 2005.

OZAKI K, MIURA K, TSUCHITANI M, NARAMA I. Peripheral neuropathy in the spontaneously diabetic WBN/Kob rat. Acta Neuropathol 1996, 92:603-607.

PALEARI F, GAMBA P, MAURI G, ROVARIS G, GIANNATTASIO C, PIATTI ML, ZINCONE A, CAVALETTI G, MANCIA G. Phrenic nerve function in type 1 diabetes. Diabetologia 1999, 42:1099.

PITKIN, R. M., REYNOLDS, W. A. (1969). Diabetogenic effects of streptozotocin in rhesus monkeys. Diabetes 18:556.

- POWELL, H., KNOX D, LEE, S., et al. (1977). Alloxan diabetic neuropathy. Electron microscopic studies. *Neurology* 27:60.
- QUIST, V. and QUIST, J. (1977): Marginal Leakage along Concise in Relation to Filling Procedure, *Scand J Dent Res* 85:305-3
- RAKIETEN, N., RAKIETEN, M. L., NADKARNI, M. V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29: 91.
- REGALIA J., CAI F., HELKE C. Streptozotocin-induced diabetes and the neurochemistry of vagal afferent neurons. *Brain Research*, v. 938, n.1, 31, p. 7-14(8), 2002.
- RERUP, C. C. (1970) Drugs producing diabetes through damage of insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 22: 485.
- ROBERTSON DM, SIMA AAF. Diabetic neuropathy im mutantdiabetic [C57Bl/ks(db/db)] mouse. A morphometric study. *Diabetes* 1980, 29: 60-67.
- RODRIGUES FILHO, O. A. ; FAZAN, V. P. S . Brachial Plexus Variation and its formation and main branches . *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 18, n. 5, p. 14-18, 2003.
- RODRIGUES FILHO OA, FAZAN VPS. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. *J Neurosci Meth* 2006; 151: 131-8.

RUDLES, R. W. (1945). Diabetic neuropathy. Geral review with report of 125 cases. *Medicine* 24: 111.

RUSHTON, W. A. H. (1951) A theory of the effects of fiber size in medullated nerve. *J Physiol* 115:101-122.

SATO K.L, MIGLIACCIO V, CARMO J.M, OLIVETI M.C.D.B.B, FERREIRA R.S, FAZAN V.P.S. Diabete como modelo de neuropatia autonômica. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2006; 39 (1): 28-38.

SATO, K. L.; CARMO, J. M.; FAZAN, V. P. S. Estudo morfológico e morfométrico das alterações do nervo renal em ratos diabéticos crônicos. *Revista O Dendrito*. v. 11, n. 02, p. 31-31, 2005.

SCHMIDT, R. E., SCHARP, D. W. (1982). Axonal dystrophy in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 31:761.

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

SCHMIDT, R. E., PLURAD, S. B., MODERT, C. W. (1983). Experimental diabetic autonomic neuropathy characterization in streptozotocin-diabetic Sprague-Dawley rats. *Lab. Invest.* 49:538.

- SCHMIDT, R. E., NELSON, J. S., JOHNSON, E. M. (1981). Experimental diabetic autonomic neuropathy. *Am J Pathol* 103:210.
- SCHMITT, F. O., BEAR, R. S. (1937). Optical properties of the axon sheaths of crustacean nerves. *J Cell Comp Physiol* 9: 275.
- SHARMA AK, DUGUID IG, BLANCHARD DS, THOMAS PK. The effect of insulin treatment on myelinated nerve fiber maturation and integrity and on body growth in streptozotocin diabetic rats. *J Neurol Sci* 1985, 67: 285-297.
- SHARMA AK, THOMAS PK, DE MOLINA AF. Peripheral nerve fiber size in experimental diabetes. *Diabetes* 1977, 26:689-692.
- SHARMA, A. K., DUGUID, I. G. M., BLANCHARD, D. S., THOMAS, K. (1985). The effect of insulin treatment on myelinated nerve fibre maturation and integrity and on body growth in streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol. Sci.* 67:285.
- SHARMA, A. K., THOMAS, P. K. (1999). Animal models: Pathology and Pathophysiology. In: *Diabetic Neuropathy*. Eds Dyck PJ, Thomas PK. WB Saunders Company, Philadelphia, 2nd edition, p 237-252.
- SHARMA, A. K., THOMAS, P. K. (1974). Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. *J. Neurol. Sci.* 23: 1.

- SHARMA, A. K., BAJADA, S., THOMAS, P. K. (1981). Influence of streptozotocin-induced diabetes on myelinated nerve fiber maturation and on body growth in the rat. *Acta Neuropathol.* 53: 257.
- SIDENIUS P, JAKOBSEN J. Anterograde fast component of axonal transport during insulin-induced hypoglycemia in nondiabetic and diabetic rats. *Diabetes* 1987, 36: 853-858.
- SIDENIUS P, JAKOBSEN J. Peripheral neuropathy in rats induced by insulin treatment. *Diabetes* 1983, 32: 383-386.
- SIMA, A.A.F, ZHANG, W.X, GREENE,D.A. Diabetic and hypoglycemic neuropathy – a comparison in the BB rat. *Diabetes Res Clin Pract* 1989, 6: 279-296.
- SIMA, A. A. F, SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: an update. Springer Berlin / Heidelberg. v. 42, n. 7 , 1999
- SMITH, J.W, MARCUS, F.I, SEROKMAN, R. Prognosis of patients with diabetes mellitus after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1984 Oct 1;54(7):718-21
- SMITH, B. (1974). Neuropathology of the oesophagus in doabetes mellitus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37:1151-1154.
- SMITH, R. S., KOLES, Z. J. (1970). Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am J Physiol* 219:1256-1258.

- SONG A, TRACEY DJ, ASHWELL KW. Development of the rat phrenic nerve and the terminal distribution of phrenic afferents in the cervical cord. *Anat Embryol* 1999, 200: 625-643.
- SOUZA, H. C. D. ; BALLEJO, G. ; SALGADO, M. C. O. ; SILVA, V. D. da ; SALGADO, Helio Cesar . CARDIAC SYMPATHETIC OVERACTIVITY AND DECREASED BAROREFLEX SENSITIVITY IN NAME HYPERTENSIVE RATS. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, ESTADOS UNIDOS, v. 280, p. H844-H850, 2001.
- SUGIMURA, K., WINDEBANK, A. J., NATARAJAN, V., LAMBERT, E. H., SCHMIDT, H. H. O., DYCK, P. J. (1980). Interstitial hyperosmolarity may cause axon cylinder shrinkage in streptozotocin-diabetic nerve. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 39: 710.
- THOMAS PK, LASCELLES RG. The pathology of diabetic neuropathy. *QJ Med*, 1996, 69: 489-509.
- THOMAS, P. K., ELIASSON, S. G. (1984). Diabetic Neuropathy. In: *Peripheral Neuropathy*, eds DYCK, P. J., THOMAS, P. K., LAMBERT, E. H., BUNGE, R. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2nd edition, p 1773-1810.
- TOMASCH J. Numerical size variability in the peripheral nerve. *Acta Anat (Basel)*. 1983;115(1):78-90.

TSUCHITAMI M, SAEGUSA T, NARAM I, NISHITANI T, GONDA T. A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Lab Anim* 1985, 19:200-207.

VELEMINSKY, J., BURR, I. M., MAUFFACHER, W. (1970). Comparative study of early metabolic events resulting from the administration of the two diabetogenic agents alloxan and streptozotocin. *Eur. J. Clin. Invest.* 1:104.

VINIK AI, MEHRABYAN A. DIABETIC NEUROPATHIES. *MED CLIN NORTH AM.* 2004;88:947-999

WALKER KZ, PIERS LS, PUTT RS, JONES JA, O'DEA K. Effects of regular walking on cardiovascular risk factors and body composition in normoglycemic women and women with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999 Apr;22(4):555-61

WANKE T, PATERNOSTROSLUGA T, GRISOLD W, FORMANEK D, AUINGER M, ZWICK H, IRSIGLER K. Phrenic-nerve function in type-1 diabetic –patients with diaphragm weakness and peripheral neuropathy. *Respiration* 1992, 59:233-237.

WEIS J, DIMPFEL W, SHRODER JM. Nerve-conduction changes and fine-structural alterations of extra and intrafusa muscle and nerve-fibers in straptozotocin-diabetic rats. *Muscle & Nerve* 1995, 18: 175-184.

WESTFALL, S. G., FELTEN, D. L., MANDELBAUM, J. Á., MOORE, A. S., PETERSON, R. G. (1983). Degenerative neuropathy in insulin-treated diabetic rats. *J. Neurol. Neurosci.* 61:93.

WHITE JES, BULLOCK RE, HUDGSON P, HOME PD, GIVSON GJ. Phrenic neuropathy in association with diabetes. *Diabet Med* 1992, 9:954-956.

WILLIAMS PL. WARWICK R. DYSON M. BAUNISTER LH. *Grays Anatomy*. 138v' edition. Ediuburgh: Churchil Livingstone. 1995a

WILSON AS. Investigations in the innervation of the diaphragm in cats and rodents. *Anat Rec* 1968, 162-425-432.

WOLF E, SHOCHINA M, GONEN B. Phrenic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 1983, 23:523-529.

WOSNIAK W, O'RAHILLY R, BRUSKA M. Myelination of the human fetal phrenic nerve. *Acta Anat* 1982, 112: 281-196.

YAGIHASHI, S., AND A. A. SIMA. 1986. Neuroaxonal and dendritic dystrophy in diabetic autonomic neuropathy: Classification and topographic distribution in the BB rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 45:545-565.

YAGIHASHI S, SIMA AA. Diabetic autonomic neuropathy in the BB rat. Ultrastructural and morphometric changes in sympathetic nerves. *Diabetes*, 1985, 34:558-564.

YAGIHASHI S, TONOSAKI A, YAMADA K, KAKIZAKI M, GOTO Y. Pheripheral neuropathy in selectively-inbred spontaneously diabetic rats: eletrophysiological, morphometrical and freeze-replica studies. *Tohoku J Exp Med*, 1982, 138: 39-48.

YAGIHASHI S, WADA R, KAMIJO M, NAGAI K. Peripheral neuropathy in the WBN/Kob rat with chronic pancreatitis and spontaneous diabetes. *Lab Invest* 1993, 68: 296-307.

YASAKI S, DYCK PJ. Duration and severity of hypoglycemia needed to induce neuropathy. *Brain Res* 1990, 531: 8-15.

YASAKI S, DYCK PJ. Spatial distribution of fibre degeneration in acute hypoglycaemic neuropathy in rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991, 50: 681-692.

ZEMP, C., BESTETTI, G., ROSSI, G. L. (1981). Morphological and morphometric study of nerves from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Neuropathol* 53:99.

ZIMMERMAN IR, KARNES JL, O'BRIEN PC, DYCK PJ. Imaging system for nerve fibre tract morphometry: components, approaches, performance and results. *J Neuropathol Exp Neurol* 1980, 39: 409-419.