

## DIABETE COMO MODELO DE NEUROPATIA AUTÔNOMICA

### DIABETES AS AN AUTONOMIC NEUROPATHY MODEL

Karina L Sato<sup>1</sup>, Vanessa Migliaccio<sup>2</sup>, Jussara M do Carmo<sup>3</sup>, Maria Carolina DBB Oliveti<sup>1</sup>,  
Renata S Ferreira<sup>1</sup>, Valéria PS Fazan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduandas. Departamento de Neurologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. <sup>2</sup>Pós-Graduanda. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba – MG. <sup>3</sup>Pós-Graduanda. Departamento de Fisiologia. <sup>4</sup>Docente. Departamento de Cirurgia e Anatomia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

**CORRESPONDÊNCIA:** Valéria Paula Sassoli Fazan, Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre. CEP14049-900 Ribeirão Preto - SP. Fone: (16) 3602-2501, FAX: (16) 3633-0017, e-mail: vpsfazan@yahoo.com.br ou vpsfazan@fmrp.usp.br

Sato KL, Migliaccio V, Carmo JM, Oliveti MCDBB, Ferreira RS, Fazan VPS. Diabetes como modelo de neuropatia autonômica. Medicina (Ribeirão Preto) 2006; 39 (1): 28-38.

**RESUMO: Modelo do Estudo:** O presente estudo é uma revisão de literatura sobre a neuropatia diabética, especialmente a neuropatia autonômica diabética, enfatizando as recentes descobertas sobre o assunto, com modelos experimentais da doença.

**Importância do problema:** Comprometimento do sistema nervoso autônomo ocorre em uma variedade de doenças sistêmicas, das quais o *diabetes mellitus* é a mais comum. Alterações no sistema nervoso periférico em animais geneticamente diabéticos ou com diabetes induzida experimentalmente têm sido amplamente investigadas, na esperança de que as alterações encontradas em modelos animais possam reproduzir algumas das alterações da neuropatia diabética humana precoce, levando ao melhor entendimento sobre o mecanismo da doença. Vários agentes químicos são citotóxicos para as células beta do pâncreas porém, apenas o aloxane e a estreptozotocina (STZ) tem sido sistematicamente investigados e são amplamente empregados para induzir diabetes nos animais. Em geral, STZ é mais eficaz e mais específica para as células beta do pâncreas que o aloxane. Embora estudos morfológicos tenham sido realizados em vários nervos periféricos de ratos diabéticos induzidos com STZ, tais como sural, fibular e tibial, informações sobre alterações patológicas em nervos autonômicos são limitadas.

**Comentários:** Recentemente, estudamos as alterações do nervo depressor aórtico (NDA) em ratos diabéticos agudos (15 dias após injeção de STZ). Nossos resultados mostraram características de atrofia axonal em 5 dos 10 nervos estudados. Um estudo de microscopia de luz, conduzido em nosso laboratório, o nervo vago cervical de ratos diabéticos crônicos (12 semanas após injeção de STZ), mostrou resultados discretos, a favor da perda de fibras mielínicas finas. Outro estudo recente do nosso laboratório mostrou uma redução do número de fibras mielínicas pequenas dos nervos renais, nos ratos diabéticos crônicos, resultado mais evidente que o observado no nervo vago. Por outro lado, as alterações do NDA (atrofia axonal) se assemelham mais aos resultados obtidos com outros nervos somáticos, confirmando o caráter altamente variável do diabetes, no acometimento dos nervos periféricos.

**Descritores:** Diabetes Experimental. Neuropatias Diabéticas. Neuropatias Autonômicas. Nervo Depressor Aórtico. Nervo Vago. Nervo Renal.

## 1- ASPECTOS GERAIS DO DIABETE

A frequência pela qual o sistema nervoso é acometido pelo diabetes foi, sem dúvida, o responsável pela idéia inicial de que o diabetes era causado por uma doença do sistema nervoso. Apenas em 1864, foi reconhecido inicialmente que o contrário é verdadeiro<sup>1</sup>. A partir de então, as características clínicas marcantes da neuropatia diabética foram precisamente delineadas, com descrições de perda dos reflexos tendinosos nos membros inferiores, semelhanças clínicas com alguns casos de *tabes dorsalis*, a ocorrência de dor espontânea, particularmente noturna, e parestesias. Manifestações motoras nos membros inferiores foram também documentadas, bem como o envolvimento de nervos cranianos. A natureza altamente variável da neuropatia no diabetes foi então apreciada em 1893<sup>1</sup> e surgiram classificações para padronizar todos os eventos nessa direção.

Comprometimento do sistema nervoso autônomo ocorre em uma variedade de doenças sistêmicas, das quais o *diabetes mellitus* é a mais comum. Muitos relatos de características clínicas isoladas foram realizados antes de 1900, porém, a neuropatia autonômica diabética, como uma entidade clínica, tornou-se definitivamente reconhecida apenas após a revisão clássica realizada por Rundles, em 1950<sup>2</sup>.

As décadas subseqüentes testemunharam avanços consideráveis nessa área, com a definição de novas síndromes e um melhor entendimento da história natural dessa variedade de neuropatia diabética. Na literatura sobre neuropatia diabética, uma distinção entre neuropatia “periférica” e “autonômica” tem sido feita, sem o reconhecimento de que a palavra “periférica” se refere ao sistema nervoso periférico e não à distribuição da neuropatia. O sistema nervoso periférico apresenta ambos os componentes: somático e autonômico.

Embora o sistema nervoso autonômico seja tradicionalmente referido como um sistema eferente, para inervação do músculo liso visceral, é interessante incluir as fibras aferentes viscerais que o acompanham. Portanto, a neuropatia autonômica diabética engloba múltiplos distúrbios do sistema motor, sensorial e das funções reflexas, afetando particularmente os sistemas cardiovascular, gastrointestinal e urogenital. Em adição, existe ainda o prejuízo dos mecanismos termoregulatórios sudomotor e vasomotor, da função pupilar reflexa e dos mecanismos do controle endócrino. Não é de interesse a classificação ou separação das características clínicas em “simpáticas” e/ou “parassimpáticas” uma vez que ambos os sistemas

são envolvidos simultaneamente, apresentando lesões morfológicas semelhantes.

O conceito, freqüentemente afirmado, de um envolvimento sem padrão, é errôneo, uma vez que a patologia nervosa básica é considerada difusa<sup>1</sup>. A aparente falta de padrão clínico pode ser resultante de diferenças na susceptibilidade de cada órgão à desnervação e, também, variação na desnervação sensitiva, que pode modificar os sintomas. O início é precoce no curso do diabetes e existe uma ampla variedade de envolvimento. Características sub-clínicas são comuns, com anormalidades dos reflexos cardiovasculares, detectáveis na época do diagnóstico, e ocorrendo em um terço dos diabéticos jovens. Existe uma diversidade de sintomas que freqüentemente permanecem discretos e não específicos e que são facilmente imperceptíveis pelos clínicos. Numa minoria dos diabéticos, os sintomas podem tornar-se severamente incapacitantes, chegando ao estágio final de um quadro florido de neuropatia autonômica<sup>1</sup>.

Alterações no sistema nervoso periférico em animais geneticamente diabéticos ou com diabetes induzida experimentalmente têm sido amplamente investigadas. Achados de interesse e importância têm sido obtidos porém, alterações morfológicas comparáveis àquelas que ocorrem na neuropatia diabética humana não tem sido reproduzidas<sup>1</sup>. A relevância dos achados em animais continua incerta. Por outro lado, espera-se que as alterações encontradas em modelos animais possam reproduzir algumas das alterações da neuropatia diabética humana precoce, levando a um melhor entendimento sobre o mecanismo da doença<sup>3</sup>.

O *diabetes mellitus* é descrito como prevalente em 1 % a 4 % da população. As duas desordens principais são o diabetes tipo I ou insulino-dependente (uma condição na qual as células beta do pâncreas não produzem ou produzem muito pouco insulina) e o diabetes tipo II ou não insulino-dependente (uma condição na qual existe uma deficiência das células beta ou uma resistência à insulina)<sup>4</sup>.

As complicações do *diabetes mellitus* podem ser classificadas naquelas decorrentes de aterosclerose (cardiovascular, cerebrovascular e vascular periférica) e nas decorrentes de outros mecanismos<sup>4</sup>. A retinopatia, a nefropatia e a polineuropatia (“triopatia” diabética), ocorrem nos dois tipos de diabetes.

A hiperglicemia crônica, associada às alterações metabólicas, e as alterações microvasculares parecem estar implicadas na patogênese da triopatia diabética<sup>4</sup>.

Existem, pelo menos, quatro razões para se estudar as alterações patológicas na neuropatia diabética<sup>4</sup>:

- 1) para caracterizar as alterações patológicas intersiciais do nervo, que não podem ser inferidas por estudos clínicos ou eletrofisiológicos,
- 2) para inferir mecanismos ou causas,
- 3) para correlacionar anormalidades morfométricas com mudanças na velocidade de condução nervosa, testes sensoriais quantitativos e testes quantitativos de anormalidades autonômicas, e
- 4) para correlacionar achados neuropatológicos com alterações metabólicas.

## 2- AGENTES QUÍMICOS DIABETOGÊNICOS

Vários agentes químicos são citotóxicos para as células beta do pâncreas porém, apenas o aloxane e a estreptozotocina (STZ) tem sido sistematicamente investigados e são amplamente empregados para induzir diabetes nos animais. Aloxane é uma pirimidina com estrutura semelhante ao ácido úrico e a glicose. Em 1943 a propriedade diabetogênica do aloxane foi descoberta e o diabetes foi induzido com sucesso em ratos<sup>5</sup>, coelhos<sup>6</sup>, e cães<sup>7</sup>. Diabetes aloxânico foi induzido em outras espécies animais, incluindo gatos, ovelhas, macacos, porcos e camundongos; porém, porcos da Índia (guinea pigs) se mostraram completamente resistentes<sup>8</sup>. Durante as décadas subsequentes, a literatura sobre o aloxane como agente diabetogênico tornou-se ampla e extensivamente revisada<sup>9,10</sup>.

A estreptozotocina (STZ), isolada do *Streptomyces achromogenes* é efetivo contra organismos gram-positivos e gram-negativos e sua ação anti-tumoral foi descrita por Evans et al.<sup>11</sup>. Rakietyen et al.<sup>12</sup> relataram que a injeção intravenosa de soluções de STZ induzia diabetes em ratos e cães. Desde então, o diabetes passou a ser induzido com sucesso em ratos<sup>11,13</sup>, porcos da Índia<sup>14</sup>, camundongos<sup>11,14</sup>, macacos<sup>15</sup>, e cães<sup>12</sup>. Coelhos se mostraram resistentes à ação diabetogênica da STZ<sup>16</sup>.

Os mecanismos de ação do aloxane e da STZ não são ainda completamente compreendidos<sup>10,17</sup> porém, algumas características gerais podem ser aferidas. O local de sua ação diabetogênica é a célula beta do pâncreas, sendo a ligação dessas substâncias muito rápida. Ambos, aloxane e STZ, podem ser seletivamente direcionadas para as células produtoras de insulina devido à especial capacidade dessas células em reconhecer e metabolizar glicose rapidamente. Estruturalmente, aloxane é similar à glicose e a STZ é uma glicose com uma cadeia lateral altamente reativa. Parece então razoável que, alguns açúcares transportáveis, interfiram com a toxicidade de ambos agentes.

Glicose e manose, mas não a frutose ou a galactose, bem como outros nutrientes, protegem contra o dano induzido pelo aloxane mas, análogos da glicose, capazes de proteger contra a STZ diferem significativamente daqueles efetivos contra o aloxane<sup>18</sup>. Ácido nicotínico tem sido descrito como eficiente em suprimir a atividade diabetogênica do aloxane, embora ele seja ineficaz contra a STZ. A nicotinamida mantém atividade protetora considerável quando injetada entre 30 minutos até 2 horas após a injeção de STZ, mas essa ação pós-aloxane não foi observada. Evidências de danos pelo aloxane aparecem entre 2 e 5 minutos e danos estruturais irreversíveis são observados após 1 hora da administração. Evidências de danos pela STZ aparecem entre 30 minutos e 2 horas<sup>18</sup>.

As alterações metabólicas que seguem a administração da STZ ou aloxane foram comparadas por Mansford e Opie<sup>19</sup> que relataram que os animais injetados com STZ, apesar de apresentarem pronunciada hiperglicemia, apresentam níveis normais de corpos cetônicos sanguíneos, ácidos graxos livres plasmáticos e níveis normais de intermediários glicolíticos, glicogênio e citrato no coração perfundido. Nos animais injetados com aloxane, todos esses parâmetros se apresentaram aumentados quando comparados aos controles. Junod et al.<sup>13</sup> estenderam e confirmaram essas observações e também demonstraram que a cetonúria só aparece após a injeção de uma alta dose de STZ. Entretanto, Veleminsky et al.<sup>20</sup> não encontraram diferenças qualitativas na glicose plasmática, ácidos graxos livres e triglicérides após a administração de aloxane e STZ, sugerindo que esses efeitos metabólicos seriam decorrentes primariamente da destruição das células beta do pâncreas e não de um efeito tóxico extra-pancreático.

Aloxane e STZ tem sido de grande interesse porque eles mimetizam a lesão pancreática decorrente da destruição das células beta, que ocorre no *diabetes melitus* insulino-dependente dos humanos.

Mais ainda, esses agentes químicos causam um diabetes relativamente permanente, útil para estudos eletrofisiológicos e morfológicos longitudinais de nervos periféricos no diabetes experimental. A dose diabetogênica efetiva do aloxane ou da STZ é normalmente 4 ou 5 vezes menor que a dose letal. Entretanto, as doses efetivas ou letais do aloxane ou da STZ variam consideravelmente entre as espécies e são altamente sensíveis à idade, sexo e estado nutricional dos animais<sup>21</sup>. Uma injeção única, intraperitoneal ou intravenosa de aloxane ou STZ, preferencialmente com os animais em jejum, induz diabetes experimental em ratos que pode ser mantido sem tratamento

com insulina por um ou dois anos<sup>3,22,23</sup>. Em geral, STZ é mais eficaz e mais específica para as células beta do pâncreas que o aloxane<sup>12</sup>.

### 3- NEUROPATIA DIABÉTICA AUTONÔMICA

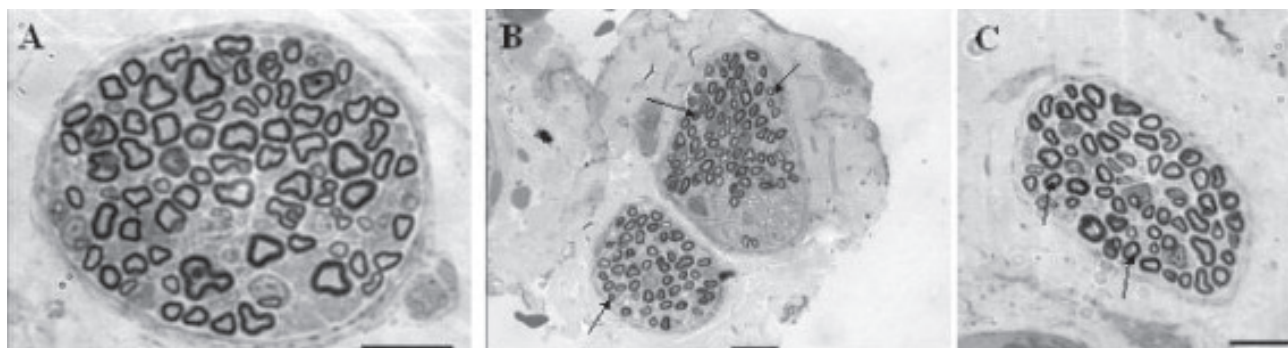
Embora estudos morfológicos tenham sido realizados em vários nervos periféricos de ratos diabéticos induzidos com STZ, tais como sural<sup>3,24,25</sup>, fibular<sup>26</sup> e tibial<sup>3,27,28</sup>, informações sobre alterações patológicas em nervos autonômicos são limitadas. A neuropatia diabética acomete tanto o sistema nervoso somático (principalmente nervos sensitivos) como o sistema nervoso autonômico tanto em humanos como em modelos experimentais. Do ponto de vista de morbi-mortalidade do diabetes, a neuropatia autonômica tem um papel muito importante, principalmente quando compromete o controle autonômico cardiovascular. Por algum tempo acreditou-se que a parte parassimpática do sistema nervoso autonômico estava mais afetada pelo diabetes<sup>29,30</sup>, não só em pacientes<sup>31,32</sup> mas também em modelos experimentais<sup>33,34,35</sup>. Entretanto, há evidências consistentes que a parte simpática também é bastante afetada na neuropatia autonômica diabética<sup>36,37</sup>.

Os estágios iniciais do diabetes experimental já se apresentam com alterações na regulação autonômica cardiovascular, as quais sugerem um comprometimento simpático como redução da taquicardia reflexa à queda da pressão arterial, enquanto que a bradicardia se mantém inalterada<sup>34,38</sup>.

As aferências barorreceptoras do arco aórtico trafegam com o nervo depressor aórtico (nervo de Cyon, NDA) o qual se junta ao vago (X par craniano) para alcançar o sistema nervoso central. As eferências parassimpáticas trafegam no nervo vago. Ratos diabéticos induzidos pela STZ apresentam disfunção do barorreflexo precocemente: apenas 5 dias após a ad-

ministração de STZ<sup>39</sup>. A maioria dos relatos sobre prejuízo da função barorreflexa no diabetes, se refere à alça eferente do mesmo, enquanto que a alça aferente é bem menos explorada. Podemos considerar o NDA como um nervo sensitivo autonômico, devido a suas características funcionais. Recentemente, estudamos as alterações do NDA em ratos diabéticos agudos e crônicos, induzidos pela STZ<sup>40</sup>. Nos animais diabéticos agudos (15 dias após injeção de STZ), nossos resultados mostraram características de atrofia axonal em 5 dos 10 nervos estudados (Figura 1). Esse achado está de acordo com relatos de literatura sobre a ampla variedade de lesões que ocorrem na neuropatia diabética. Esses dados podem explicar por que alguns autores relatam função barorreceptora normal em ratos diabéticos agudos<sup>41,42</sup>, uma vez que esses autores analisaram os dados como um grupo, e não de forma isolada. Em estágio agudo do diabetes, alguns NDA podem não estar alterados ainda, o que poderia dificultar a interpretação dos dados. Com o avançar da doença, todos os NDA dos ratos diabéticos crônicos (12 semanas após a injeção de STZ) se mostraram com sinais de atrofia axonal, além de uma redução significativa da área da bainha de mielina. Importante ressaltar que não houve redução no número de fibras mielínicas nos NDA de ratos diabéticos agudos ou crônicos, bem como não houve alteração dos parâmetros morfométricos fasciculares.

A literatura é escassa sobre estudos patológicos do nervo vago em pacientes sabidamente portadores de neuropatia diabética autonômica crônica. Estudos morfológicos do nervo vago foram conduzidos, na maioria, em seu segmento abdominal, sendo demonstrado redução severa da densidade das fibras amielínicas, sendo os axônios "sobreviventes", de pequeno diâmetro<sup>43</sup>. Smith<sup>44</sup> demonstrou anormalidade na inervação do esôfago em 18 dos 20 pacientes dia-



**Figura 1:** Secção transversal semi-fina de NDA de rato diabético agudo (15 dias após injeção de STZ), sem sinais de atrofia axonal (A). As setas em B (diabético agudo, 15 dias após a injeção de STZ) e C (diabético crônico, 12 semanas após injeção de STZ) indicam fibras com sinais de atrofia axonal. Barras de escala = 10 µm.

béticos. Kristensson et al.<sup>45</sup> descreveram perda de fibras mielínicas vagais em 3 casos de diabéticos necropsiados, dados que foram confirmados e estendidos por Duchon et al.<sup>46</sup>, que demonstraram, em 5 casos necropsiados, perda severa das fibras mielínicas vagais. Guo et al.<sup>47</sup> estudaram segmentos vagais cervicais, torácicos e abdominais, de 4 pacientes diabéticos necropsiados. Demonstraram redução da densidade das fibras mielínicas, para valores abaixo dos limites dos controles, em todos os níveis estudados. Entretanto, a redução da densidade dessas fibras foi mais marcante nos segmentos distais.

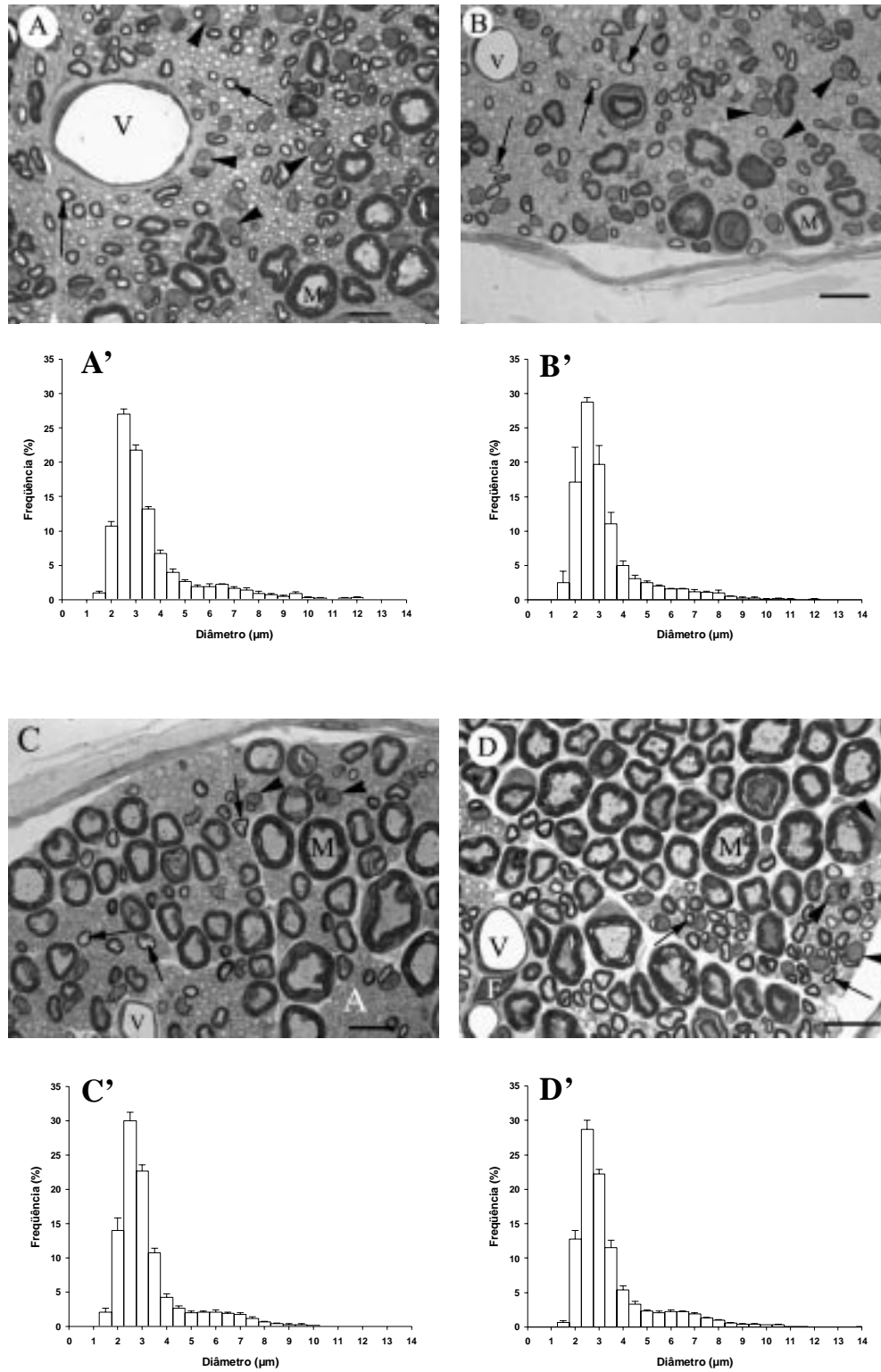
A maioria dos estudos morfológicos do nervo vago no diabete experimental, também envolve o estudo do segmento abdominal desse nervo, ou ainda seus ramos mesentéricos<sup>48,49,50</sup>. Nesses estudos, os autores demonstram a presença da neuropatia diabética e caracterizam o processo de *dying back* dessa neuropatia.

Schmidt et al.<sup>50</sup> não conseguiram demonstrar perda axonal significativa em nervos mesentéricos de animais diabéticos crônicos mas observaram aumento do número de axônios pequenos, considerando como um indicativo de atrofia ou atividade de regeneração desses axônios. Posteriormente, Schmidt et al.<sup>48</sup> relataram a ocorrência de alterações degenerativas e regenerativas em menos de 1% das fibras amielínicas dos nervos do mesentério ileal de animais diabéticos, embora o número de animais estudados fosse pequeno e uma quantificação precisa não tenha sido realizada. Schmidt et al.<sup>49,50,51</sup> também demonstraram a ocorrência de axônios distróficos (2 a 3 %) em nervos do mesentério ileal sendo que esses não estavam presentes nos animais controles. Posteriormente, esses pesquisadores relataram que são poucos os axônios distróficos nos nervos do mesentério ileal de ratos com diabete leve ou em animais tratados com insulina, quando comparado com os animais com diabete severa<sup>50</sup>. Tais axônios distróficos não foram observados em nervos somáticos distais de ratos diabéticos induzidos pela STZ, e a razão para a ocorrência deles em nervos autonômicos não está clara. As lesões morfológicas descritas por esses autores são exclusivamente das fibras amielínicas, uma vez que nos segmentos abdominais, o nervo vago apresenta quantidade muito reduzida de fibras mielinizadas. Assim, um estudo de microscopia de luz, conduzido em nosso laboratório<sup>52</sup>, com nervo vago cervical de ratos diabéticos crônicos, induzidos pela STZ, mostrou resultados discretos, a favor da perda de fibras mielínicas finas (Figura 2). Esse resultado pôde ser interpretado a partir dos dados numéricos (número menor de fibras nos nervos vagos dos ratos diabéticos crônicos), associa-

dos a pequenas diferenças no tamanho das fibras mielínicas (maior nos diabéticos) e nas distribuições dos histogramas (deslocadas para a direita nos diabéticos) (Figura 2). Interessante ressaltar que essas diferenças não foram detectadas morfológicamente, sendo necessária a morfometria para auxiliar a correta interpretação dos dados. Mais ainda, não evidenciamos a neuropatia do tipo *dying back*, sendo os segmentos proximal e distal, acometidos da mesma forma (Figura 2).

Há evidências de que a hemodinâmica renal também está alterada no início do diabete experimental, e que seria um dos principais responsáveis pela evolução da nefropatia do diabete<sup>53,54,55</sup>, sendo que nessa fase da doença, ainda não existem lesões estruturais no glomérulo<sup>53</sup> que justifiquem esta alteração na dinâmica glomerular. Por outro lado, glomérulos de ratos com diabete experimental já apresentam um aumento de 30% no seu volume, apenas quatro dias após a indução do diabete com STZ<sup>56</sup>. No rato, a inervação extrínseca do rim é proveniente do plexo celíaco, dos nervos esplâncnicos lombares e do plexo mesentérico<sup>57</sup>. Este está localizado entre a artéria e a veia renal, facilmente identificado no ângulo entre a aorta abdominal e a artéria renal. Os nervos renais apresentam fibras eferentes simpáticas, que são importantes na regulação da função renal, e fibras aferentes, que transmitem informação sensitiva dos rins para o sistema nervoso central (SNC). Embora o papel fisiológico dos nervos renais tenha sido questionado no passado, atualmente é grande a evidência de que os nervos renais contribuem para o controle da função renal e da homeostasia, em condições normais e patológicas. Alterações nas múltiplas informações sensoriais e na atividade do SNC influenciam a atividade simpática renal eferente, alterando, dessa forma, a função renal, através de mudanças na resistência vascular renal, liberação de renina e reabsorção tubular de sódio.

Os nervos renais são de interesse porque são os sítios de registro da atividade simpática e, também, de estimulação elétrica, em estudos funcionais. Considerável atenção tem sido dada aos nervos renais de ratos, por causa da regulação fisiológica da eferência simpática renal pelos reflexos elicítados por barorreceptores arteriais<sup>58/61</sup>, receptores cardiopulmonares<sup>61</sup>, quimiorreceptores arteriais<sup>61,62</sup>, receptores somáticos<sup>62</sup>, e mecanorreceptores renais<sup>63,64</sup>. Um estudo recente do nosso laboratório avaliou a morfologia do nervo renal em ratos diabéticos crônicos induzidos pela STZ<sup>65</sup>. Nossos resultados mostraram uma redução do número de fibras mielínicas dos nervos renais nos ratos diabéticos crônicos, comparados aos controles



**Figura 2:** Secções transversais semi-finas representativas do endoneuro do nervo vago, segmentos proximais (A e C) e distais (B e D), de animais controles (A e B) e diabéticos crônicos (C e D), com seus respectivos histogramas de distribuição das fibras mielínicas (A', B', C' e D'). Notar que os histogramas são unimodais, com pico em 2,5 μm. Setas indicam fibras mielínicas finas, que predominam sobre as de grande calibre (M). V = vaso capilar, A = área de fibras amielínicas, F = núcleo de fibroblasto. Os núcleos das células de Schwann são apontados pela pontas de seta. Barras de escala = 15 μm

(Tabela I). Entretanto, os valores médios obtidos para os parâmetros morfométricos das fibras mielínicas do nervo renal, nos ratos diabéticos crônicos, mostraram um aumento significativo do tamanho dessas fibras e dos respectivos axônios (área e diâmetro) (Tabela I). Comparando as distribuições do diâmetro das fibras mielínicas dos animais controles, com os diabéticos crônicos, houve um aumento na porcentagem de fibras mais calibrosas, com redução na porcentagem de fibras mais finas, no grupo diabético crônico. Todos esses dados, analisados em conjunto, sugerem perda das fibras mielínicas finas. Além disso, nossos resultados também sugerem que as fibras mielínicas de grande calibre não foram afetadas porque a razão g (razão entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra mielínica – uma medida do grau de mielinização) média foi significativamente maior nos animais diabéticos, com distribuição discretamente desviada para valores mais altos, compatível com a presença de um número maior de fibras mielínicas normais. Além disso, a correlação entre a área da bainha de mielina e o diâmetro mínimo dos axônios foi exatamente a esperada para nervos normais e não foi diferente entre os dois grupos. Esses dados são semelhantes ao obtido nos nervos vagos com esse mesmo modelo de diabetes experimental, entretanto as alterações do nervo renal foram mais evidentes. Por outro lado, as alterações do NDA (atrofia axonal) se assemelham mais aos resultados obtidos com outros nervos somáticos.

#### 4- AÇÃO DA INSULINA

Jakobsen<sup>26</sup> foi capaz de demonstrar que é possível corrigir, com tratamento com insulina, a redução do calibre das fibras observada em ratos diabéticos induzidos pela STZ, comparado com controles de mesma idade. Avanços no conhecimento dos sistemas

liberadores de insulina renovaram o interesse na possibilidade da prevenção de anormalidades morfológicas em nervos periféricos no diabetes experimental.

Sharma et al.<sup>24</sup> demonstraram que uma injeção diária de insulina subcutânea por dois meses normalizou o peso corporal e melhorou o crescimento de ratos diabéticos induzidos com STZ, mas não corrigiu o déficit no tamanho das fibras. Subseqüentemente, foi demonstrado que o tratamento convencional, por 16 semanas, corrigiu a área axonal, embora a área total da fibra não tenha sido normalizada, sugerindo a possibilidade de que a célula de Schwann responda mais lentamente ao tratamento com insulina.

Posteriormente, McCallum et al.<sup>66</sup> demonstraram que, o tratamento contínuo, por 8 semanas, com infusão de insulina subcutânea, corrigiu completamente o peso corporal, o crescimento do animal e o tamanho das fibras mielínicas.

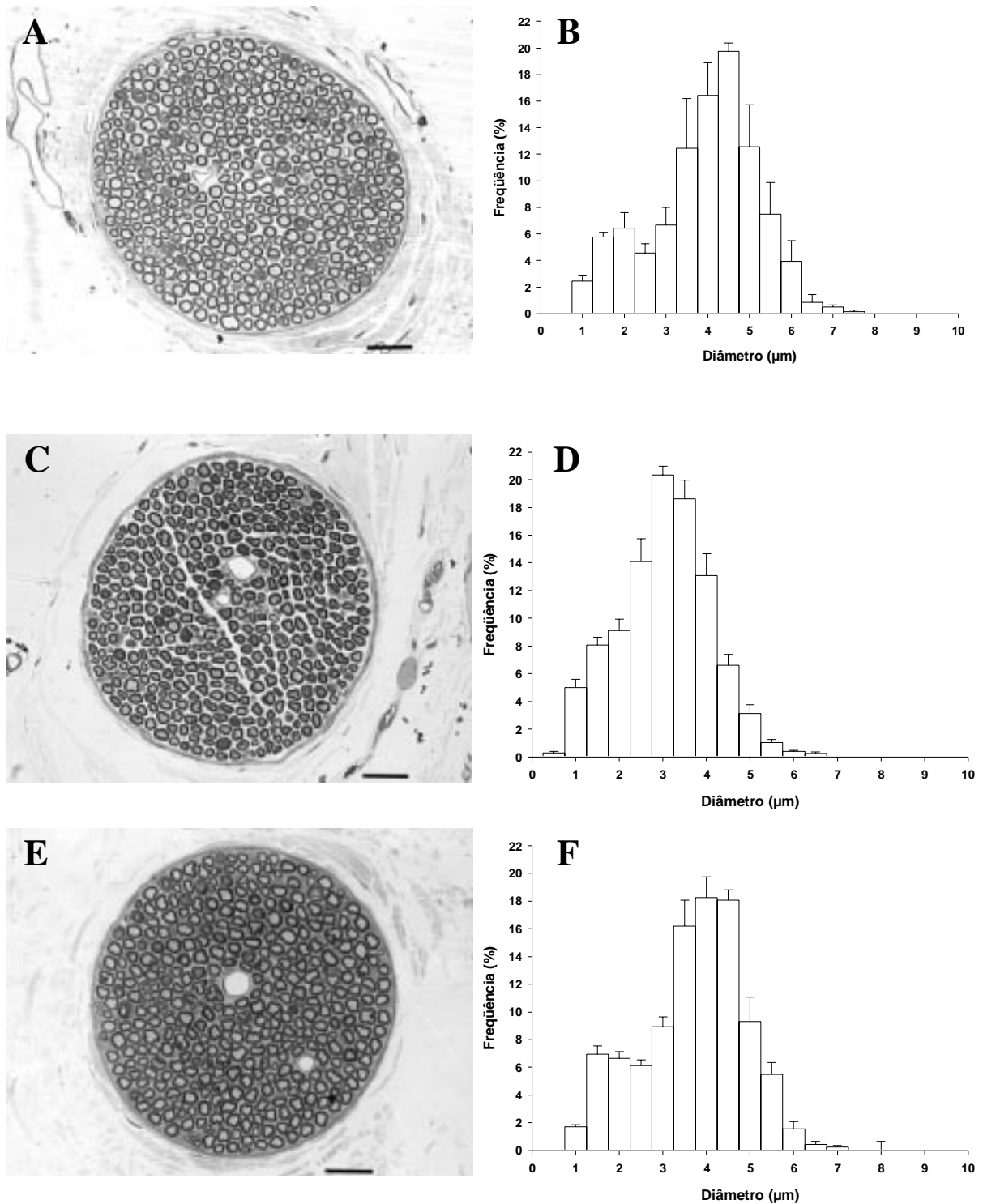
Entretanto, um número aumentado de figuras de degeneração walleriana foi encontrado em ratos diabéticos, induzidos com aloxane ou STZ, tratados com insulina, em comparação com os diabéticos não tratados ou com animais controles<sup>24,67</sup>. Esse achado se mostrou mais evidente em animais que sofreram o tratamento convencional que aqueles que receberam infusão subcutânea contínua de insulina<sup>66,67</sup>.

Resultados recentes do nosso laboratório<sup>68</sup> mostraram que o tratamento convencional com insulina sub-cutânea, uma dose diária, foi capaz de corrigir, não só o peso corporal dos animais, quanto as anormalidades das fibras mielínicas, tanto as de pequeno quanto as de grande diâmetro (Figura 3). O estudo foi realizado em nervos frênicos de ratos diabéticos crônicos, após 12 semanas de injeção de STZ. Não observamos aumento do número de figuras de degeneração walleriana, como relatado por Sharma et al.<sup>24</sup> e Westfall et al.<sup>67</sup>.

**Tabela I: Parâmetros morfométricos dos nervos renais de ratos controles e diabéticos crônicos.**

	Controle (N=20)	STZ (N=14)
Área fascicular ( $\mu\text{m}^2$ )	5210 $\pm$ 637	6705 $\pm$ 943
Diâmetro fascicular ( $\mu\text{m}$ )	92 $\pm$ 8	117 $\pm$ 15
Número de fibras mielínicas	19 $\pm$ 4	8 $\pm$ 2*
Diâmetro da fibra mielínica ( $\mu\text{m}$ )	3,4 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,2*
Diâmetro do axônio mielinizado ( $\mu\text{m}$ )	1,8 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1*

N = número de animais, STZ = animais diabéticos crônicos. \* indica diferença significativa entre os grupos.



**Figura 3:** Secções transversais semi-finas de nervo frênico de ratos controles (A), diabéticos crônicos (12 semanas após a injeção de STZ) (C) e diabéticos crônicos tratados com insulina (E). Notar que os histogramas de distribuição de tamanho dos axônios dos animais controles (B) é bi-modal, com picos em 2,0 e 4,5 μm, muito semelhante ao histograma dos animais tratados com insulina (F). O histograma dos animais diabéticos crônicos sem tratamento (D) é unimodal e desviado para esquerda.



## 5- AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o excelente auxílio técnico de Maria Teresa Picinato Maglia, Maria Cristina Lopes Schiavoni, Aracy Edwirges Vieira da Silva Dias,

Antônio Renato Meirelles e Silva e João Carlos Araújo Ribas. Apoio financeiro FAPESP, processos 02/09406-5, 04/01390-8, 04/09139-2, CNPq, processo 501230/2003-3 e FAEPA, processos 68/2003 e 393/2005.

Sato KL, Migliaccio V, Carmo JM, Oliveti MCDBB, Ferreira RS, Fazan VPS. Diabetes as an autonomic neuropathy model Medicina (Ribeirão Preto) 2006; 39 (1): 28-38.

**ABSTRACT: Type of the study:** The present study is a literature review about the diabetic neuropathy, specially the autonomic diabetic neuropathy, with emphasis on recent reports dealing with experimental models of autonomic neuropathies.

**Importance of the topic:** Injury to the autonomic nervous system occurs in a variety of diseases, being the *diabetes mellitus* the most common. Alterations of the peripheral nervous system in genetically diabetic animals or in induced diabetic animals have been widely investigated, in an attempt to reproduce some of the characteristics of the human diabetic neuropathy. Several chemical agents are toxic to the beta-cells of the pancreas and Aloxane and Streptozotocin (STZ) are widely used to induce experimental diabetes. In general, STZ is more effective than Aloxane in inducing experimental diabetes. Although morphologic studies have been performed in somatic nerves, such as sural, fibular and tibial, in diabetic rats, information on autonomic nerves are scanty.

**Comments:** Recently, we studied the morphology and morphometry of the aortic depressor nerve (ADN) in acute experimental diabetes in rats (15 days after STZ injection) and our results have demonstrated signs of axonal atrophy in 5 out of 10 nerves. A light microscopy study of the cervical vagus nerve of chronic (12 weeks after STZ injection) diabetic rats showed a discrete loss of the small myelinated fibers. Another study conducted in our laboratory showed a loss of the small myelinated fibers of the renal nerves in chronic diabetic rats, more evident than the observed on the vagus nerve. Nevertheless, the alterations of the ADN (axonal atrophy) were similar to the observations for other somatic nerves, and different from the autonomic nerves. These results confirm the diabetic characteristics of a highly variable injury of peripheral nerves.

**Keywords:** Diabetes, Experimental. Diabetic Neuropathies. Neuropathies, Autonomic. Aortic Depressor Nerve. Vagus Nerve. Renal Nerve.

## REFERÊNCIAS

- 1 - Thomas PK, Eliasson SG. Diabetic neuropathy. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R, eds. Peripheral neuropathy, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1984. p. 1773-810.
- 2 - Rundles RW. Diabetic neuropathy. Bull N Y Acad Med 1950; 26: 598-616.
- 3 - Sharma AK, Thomas PK. Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. J Neurol Sci 1974; 23: 1-5.
- 4 - Dyck PJ, Giannini C. Pathologic alteration in the diabetic neuropathies of human. Neurophatol Exp Neurol 1996; 55: 1181-93.
- 5 - Dunn SJ, Mcletchi NGB. Experimental alloxan diabetes in the rat. Lancet 1943; 2: 348-9.
- 6 - Gilliland IC, Mencer Martin M. Effect of tablets of insulin on normal and alloxan-diabetic rabbits. Lancet 1951; 1: 143-6.
- 7 - Wrenshall GA, Collins-Williams J, Best CH. Initial changes in the blood sugar of the fasted anesthetized dog after alloxan. Am J Physiol 1950; 160: 228-46.
- 8 - Johnson DD. 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 1950; 47:393-8.
- 9 - Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of insulin secreting cells. Pharmacol Rev 1970; 22: 485-518.
- 10 - Mordes JP, Rossini AA. Animal models of diabetes. Am J Med 1981; 70: 353-60.
- 11 - Evans JS, Gerritsen GC, Mann KM, Owen SP. Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor, U-15, 774. Cancer Chemother Rep 1965; 48: 1-6.
- 12 - Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep 1963; 29: 91-8.

- 13 - Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-39.
- 14 - Brosky G, Logothetopoulos J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes* 1969; 18: 606-11.
- 15 - Pitkin RM, Reynolds WA. Diabetogenic effects of streptozotocin in rhesus monkeys. *Diabetes* 1970; 19: 85-90.
- 16 - Kushner B, Lazar M, Furman M, Lieberman TW, Leopold IH. Resistance of rabbits and guinea pigs to the diabetogenic effect of streptozotocin. *Diabetes* 1969; 18: 542-4.
- 17 - Malaisse WJ. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3527-34.
- 18 - Sharma AK, Thomas PK. Animal models: pathology and pathophysiology. In: Dyck PJ, Thomas PK, eds. *Diabetic neuropathy*, 2<sup>nd</sup> ed, Philadelphia: WB Saunders Company, 1999. p. 237-52.
- 19 - Mansford KRL, Opie L. Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or alloxan. *Lancet* 1968; 1: 670-1.
- 20 - Veleminsky J, Burr IM, Stauffacher W. Comparative study of early metabolic events resulting from the administration of the two diabetogenic agents alloxan and streptozotocin. *Eur J Clin Invest* 1970; 1: 104-8.
- 21 - Gold G, Manning M, Heldt A, Nowlain R, Pettit JR, Grodsky GM. Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin. Lack of protection by exogenous superoxide dismutase. *Diabetes* 1981; 30: 634-8.
- 22 - Powell H, Knox D, Lee S. Alloxan diabetic neuropathy. Electron microscopic studies. *Neurology* 1977; 27: 60-6.
- 23 - Zemp C, Bestetti G, Rossi GL. Morphological and morphometric study of nerves from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Neuropathol* 1981; 53: 99-106.
- 24 - Sharma AK, Duguid IGM, Blanchard DS, Thomas PK. The effect of insulin treatment on myelinated nerve fibre maturation and integrity and on body growth in streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci* 1985; 67: 285-97.
- 25 - Sugimura K, Windebank AJ, Natarajan V, Lambert EH, Schmidt HHO, Dyck PJ. Interstitial hyperosmolarity may cause axis cylinder shrinkage in streptozotocin-diabetic nerve. *J Neuropathol Exp Neurol* 1980; 39: 710-21.
- 26 - Jakobsen J. Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient diabetic rats. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1979; 42: 509-18.
- 27 - Brown MJ, Sumner AJ, Greene DA, Diamond SM, Asbury AK. Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. *Ann Neurol* 1980; 8: 168-78.
- 28 - Sharma AK, Bajada S, Thomas PK. Influence of streptozotocin-induced diabetes on myelinated nerve fiber maturation and on body growth in the rat. *Acta Neuropathol* 1981; 53: 257-65.
- 29 - McDowell TS, Hajduczuk G, Abboud FM, Chapple MW. Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus. I. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 266: 235-43.
- 30 - Tomilson KC, Gardiner SM, Hebden A, Bennetti T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 103-50.
- 31 - Eckberg DL, Harkins SW, Frisch JM, Musgrave GE, Gardner DF. Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart rate period in healthy subjects and diabetic patients. *J Clin Invest* 1986; 78: 366-74.
- 32 - Lishner M, Akserrod S, Divon M, Ravid M. Spectral analysis of heart rate fluctuation. A non-invasive sensitive method for the early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *J Auton Nerv Syst* 1987; 19: 119-25.
- 33 - Chang SK, Lung DD. Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. *J Molec Cell Cardiol* 1986; 18: 617-24.
- 34 - Maeda CY, Fernandes TG, Luthier F, Irigoyen MC. Streptozotocin diabetes changes arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 497-501.
- 35 - Maeda CY, Fernandes TG, Timm HB, Irigoyen MC. Autonomic dysfunction in short term experimental diabetes. *Hypertension* 1995; 26: 1100-4.
- 36 - Kaul CL. Role of sympathetic nervous system in experimental hypertension and diabetes mellitus. *Clin Exp Hypert* 1999; 21: 95-112.
- 37 - Stumpel F, Kucera T, Bazotte R, Puschel GP. Loss of regulation by sympathetic hepatic nerves of liver metabolism and hemodynamics in chronically streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1996; 39: 161-5.
- 38 - Schaan B, Maeda CY, Timm HB, Medeiros S, Moraes RS, Ferlin E, Fernandes TG, Ribeiro JP, Schimid H, Irigoyen MC. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rat with streptozotocin-induced diabetes treated with insulin. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 1081-6.
- 39 - Salgado HC, Fazan JR R, Fazan VPS, Dias Da Silva VJ, Barreira AA. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. *Ann New York Acad Sci* 2000; 940: 20-7.
- 40 - Fazan VPS, Salgado HC, Barreira AA. Aortic depressor nerve myelinated fibers in acute and chronic experimental diabetes. *Am J Hypertens* 2006; 19: 153-60.
- 41 - Fazan JR R, Ballejo G, Salgado COM, Moraes MFD, Salgado HC. Heart Rate Variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension* 1997; 30: 632-5.
- 42 - Dall'Ago P, Silva VOK, De Angelis KLD, Irigoyen MC, Fazan JR R, Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rat. *Braz J Med Biol Res* 35: 843-9, 2002.
- 43 - Guy RJC, Dawson JL, Garrett JR, Laws JW, Thomas PK, Sharma AK, Watkins PJ. Diabetic gastroparesis from autonomic neuropathy: surgical considerations and changes in vagus nerve morphology. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1984; 47: 686-91.
- 44 - Smith B. Neuropathology of the oesophagus in diabetes mellitus. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1974; 37:1151-4.
- 45 - Kristensson K, Nordborg C, Olsson Y, Sourander P. Changes in the vagus nerve in diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1971; 79A: 684-5.

- 46 - Duchon LW, Anjorin A, Walkins PJ, Mackay J D. Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1980; 92: 301-3.
- 47 - Guo YP, McLeod JG, Baverstock J. Pathological changes in the vagus nerve in diabetes and chronic alcoholism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50: 1449-53.
- 48 - Schmidt RE, Nelson JS, Johnson EM. Experimental diabetic autonomic neuropathy. *Am J Pathol* 1981; 103:210-25.
- 49 - Schmidt RE, Scharp DW. Axonal dystrophy in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1982; 31: 761-70.
- 50 - Schmidt RE, Plurad SB, Modert CW. Experimental diabetic autonomic neuropathy characterization in streptozotocin-diabetic Sprague-Dawley rats. *Lab Invest* 1983;49: 538-52.
- 51 - Clark HB, Schmidt RE. Identification of dystrophic sympathetic neurons in experimental diabetic autonomic neuropathy. *Brain Res* 1984; 292: 390-5.
- 52 - Migliaccio V, Fazan VPS. Morphometry of the cervical vagus nerve in chronic experimental diabetes [resumos]. XXXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia & Congresso da Associação Latino americana de Ciências Fisiológicas – ALACF, Ribeirão Preto-SP; 2003, p.210.
- 53 - Mauer SM, Steffes MW, Azar S, Semelberg SK, Brown DM. The effects of Goldblatt hypertension on development of the glomerular lesion of diabetes mellitus in the rat. *Diabetes* 1978; 27: 738-44.
- 54 - Mogenseng CE, Andresen MJF. Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin treatment. *Diabetologia* 1975; 11: 221-4.
- 55 - Steffes MW, Brown DM, Mauer SM. Diabetic glomerulopathy following unilateral nephrectomy in the rat. *Diabetes* 1978; 27: 35-41.
- 56 - Gundensen HJG, Gotzsche O, Hirose K, Kroustrup JP, Mogensen CE, Seyer-Hansen K, Osterby R. Early structural changes in glomerular capillaries and their relationship to long-term diabetic neuropathy. *Acta Endocrinologica* 1981 (Suppl 7): 19-21.
- 57 - DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997; 77: 75-197.
- 58 - Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR, Murphy WR, Hockel GM. Sympathetic nerve activity—role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1976; 38: 21–9.
- 59 - Judy WV, Watanabe AM, Murphy WR, Aprison BS, Yu PL. Sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive backcross rats genetically related to the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1979; 1: 598–604.
- 60 - Judy WV, Farrel SK. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1979; 1: 605–14.
- 61 - Kidd C, Linden RJ, Scott EM. Reflex responses of single renal sympathetic fibers to stimulation of atrial receptors and carotid baro- and chemoreceptors. *Q J Exp Physiol* 1981; 66: 311–20.
- 62 - Dorward PK, Burke SL, Ja'Nig W, Cassel J. Reflex responses to baroreceptor, chemoreceptor and nociceptor inputs in single renal sympathetic neurones in the rabbit and the effects of anaesthesia on them. *J Auton Nerv Syst* 1987; 18: 39–54.
- 63 - Rogenes PR. Single unit and multiunit analyses of renorenal reflexes elicited by stimulation of renal chemoreceptors. *J Auton Nerv Syst* 1982; 6: 143–56.
- 64 - Kopp UC, Smith LA, Dibona GF. Facilitory role of efferent renal nerve activity on renal sensory receptors. *Am J Physiol* 1987; 22: 767– 77.
- 65 - Sato KL, Carmo JM, Fazan VPS. Morfologia do nervo renal no diabete experimental crônico em ratos. *Arq Ciênc Saúde Unipar* 2004; 8: 69-71.
- 66 - 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.
- 67 - Westfall SG, Felten DL, Mandelbaum JÁ, Moore AS, Peterson RG. Degenerative neuropathy in insulin-treated diabetic rats. *J Neurol Neurosci* 1983; 61: 93-107.
- 68 - Rodrigues Filho OA, Fazan VPS. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. *J Neurosci Meth* 2006; 151: 131-8.