DEMILTO YAMAGUCHI DA PUREZA

**Treinamento físico reverte perda de neurônios do gânglio
celíaco em ratos diabéticos (Diabetes mellitus)**

São Paulo

2011

DEMILTO YAMAGUCHI DA PUREZA

**Treinamento físico reverte perda de neurônios do gânglio celíaco em ratos diabéticos
(Diabetes mellitus)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

2420
FMVZ

Pureza, Demilto Yamaguchi da

Treinamento físico reverte perda de neurônios do gânglio celiaco em
ratos diabéticos (Diabetes mellitus) / Demilto Yamaguchi da Pureza. --
2011.

74 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi.

1. Diabetes mellitus. 2. Gânglio celiaco. 3. Treinamento físico.
4. Estereologia. 5. Ratos. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Treinamento físico reverte perda de neurônios do gânglio celíaco em ratos diabéticos (*Diabetes mellitus*)", protocolado sob o nº 1497/2008, utilizando 32 (trinta e dois) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/10/2008.

We certify that the Research "Physical exercise reverses neuronal loss celiac ganglion in diabetics rats (*Diabetes mellitus*)", protocol number 1497/2008, utilizing 32 (thirty two) rats, under the responsibility Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/2008.

São Paulo, 28 de janeiro de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PUREZA, Demilto Yamaguchi da

Título: Treinamento físico reverte perda de neurônios do gânglio celíaco em ratos diabéticos (Diabetes mellitus).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **Francisco Lopes da Pureza** e **Sachie Yamaguchi da Pureza**, meu irmão **Denilzo Yamaguchi da Pureza**, minha esposa **Cynthia Cristina Lins Bentes Frazão** e meu filho **Eduardo Bentes Frazão Yamaguchi da Pureza**, pelo constante apoio e incentivo e pelo amor, carinho e compreensão para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao final de mais uma jornada, de mais uma etapa cumprida, sem dúvidas, muitas pessoas participaram e foram importantes para tal conquista, para a finalização deste trabalho, da realização de mais este sonho. Não quero aqui diferenciar o mais ou a mais importante, pois acredito que da mínima a mais significativa ajuda, foi de extrema importância para a concretização desta pesquisa. Portanto, gostaria desejar os meus sinceros votos de gratidão a estas pessoas abaixo citadas.

Ao professor **Antonio Augusto Coppi**, pela oportunidade, confiança e seus conhecimentos repassados ao longo dessa jornada. Sua força de vontade em lutar pelos objetivos almejados, seu perfeccionismo, sem dúvidas, acrescentou na minha formação e serão sempre lembrados na minha atuação profissional.

Ao professor **Romeu Rodrigues de Souza**, pela participação na minha formação durante o mestrado e pela colaboração/contribuição no doutorado.

A professora **Silvia Renata Gaido Cortopassi**, pela dedicação e por estar sempre à disposição, nas análises realizadas em seu laboratório e por se disponibilizar a ser membro da minha banca.

Ao professor **Angelo João Stopiglia** por ter aceitado o convite em fazer parte da banca contribuindo com suas análises e sugestões.

A professora **Marcia Rita Fernandes Machado** por ter aceitado o convite e por se deslocar de tão longe para fazer parte da minha banca.

A professora **Laura Beatriz Mesiano Maifrino** por ter aceitado o convite de ser membro da banca auxiliando com suas análises e sugestões.

A professora **Sandra Lia do Amaral**, pela sua presteza, pois desde o início da pesquisa sempre se colocou à disposição quando precisávamos.

Ao amigo de laboratório **Silvio Pires Gomes**, que foi a primeira pessoa que me recebeu. Obrigado pela sua hospitalidade, pela amizade sincera e companheirismo ao longo dessa jornada.

A **Luciana Maria Bigaram Abrahão** e a **Andréa Almeida Pinto da Silva**, por termos juntos divididos os trabalhos dos nossos experimentos, pelo companheirismo, pela compreensão, por auxiliarem no período da quantificação do material e por termos divididos as angústias e aflições durante esses anos.

A **Aliny Antunes Barbosa Lobo Ladd** e **Fernando Vagner Lobo Ladd**, que foram imprescindíveis, principalmente nos momentos em que estive ausente e puderam me representar e me auxiliar.

Ao **Felipe da Roza Oliveira**, que diversas vezes dividimos a bancada e trabalhamos juntos, sempre auxiliando no que fosse necessário.

A **Ana Paula Frigo Moura**, que mesmo fazendo parte do projeto posteriormente, se dedicou de forma plena, sempre com suas características peculiares, que são o perfeccionismo e a organização.

A **Eliane Muniz**, sempre disposta e nunca mediu esforços para auxiliar em toda e qualquer etapa da pesquisa.

A **Taís Harumi de Castro Sasahara**, que desde quando eu entrei no laboratório sempre se colocou à disposição para auxiliar no que fosse preciso.

Aos demais membros do laboratório, que direta ou indiretamente participaram da construção e finalização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química – LSSCA**, sob responsabilidade do professor Antonio Augusto Coppi, pela oportunidade, pela execução da minha pesquisa, pelos ensinamentos e pelos amigos que lá conquistei.

Aos meus pais **Francisco Lopes da Pureza** e **Sachie Yamaguchi da Pureza** e meu irmão **Denilzo Yamaguchi da Pureza** pelo apoio, incentivo e oportunidade que me propuseram para que eu pudesse realizar meu sonho.

A minha esposa **Cynthia Cristina Lins Bentes Frazão** e meu filho **Eduardo Bentes Frazão Yamaguchi da Pureza** pelo amor, compreensão, paciência e companheirismo. Sei que pelas minhas obrigações, muitas vezes não pude dar a atenção merecida.

Aos amigos da minha cidade, Belém, de São Paulo e de Macapá, que me deram suporte e apoio para que eu pudesse realizar esta pesquisa.

Saibam que todos vocês são co-autores deste trabalho, sendo fundamentais para que eu alcançasse êxito na finalização desta pesquisa, a todos vocês o meu: MUITO OBRIGADO

Você não sabe
O quanto eu caminhei
Prá chegar até aqui
Percorri milhas e milhas
Antes de dormir
Eu nem cochilei
Os mais belos montes
Escalei
Nas noites escuras
De frio chorei, ei, ei
Ei! Ei! Ei! Ei! Ei!...

A vida ensina
E o tempo traz o tom
Prá nascer uma canção
Com a fé do dia-a-dia
Encontro a solução
Encontro a solução (...)

(Toni Garrido / Lazão / Da Gama / Bino)

RESUMO

PUREZA, D. Y. da. **Treinamento físico reverte perda de neurônios do gânglio celíaco em ratos diabéticos (Diabetes mellitus)**. [Physical exercise reverses loss neurons in the celiac ganglion in diabetic rats (Diabetes mellitus)]. 2011. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O diabetes pode ocasionar diversas complicações, dentre elas, a neuropatia diabética, que se caracteriza por lesões anatômicas e funcionais dos neurônios autonômicos e somáticos periféricos. O modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina tem sido muito utilizado no estudo das diversas complicações do diabetes. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de métodos estereológicos, a microestrutura do gânglio celíaco de ratos diabéticos (Diabetes mellitus) tipo 1 induzidos por estreptozotocina (STZ) submetidos a treinamento físico. Para isto, foram utilizados vinte ratos Wistar adultos, machos, sendo cinco saudáveis sedentários (SS), cinco saudáveis treinados (ST), cinco diabéticos sedentário (DS) e cinco diabéticos treinados (DT). O diabetes foi induzido por uma única injeção de STZ (60 mg/kg, ev). O teste de esforço máximo foi realizado em todos os grupos para verificação da capacidade física. Os grupos saudável treinado e diabético treinado foram submetidos a um protocolo de treinamento físico em esteira ergométrica (1 hora/dia; 5 dias/semana; 10 semanas; 60% da velocidade máxima no teste de esforço). Após as dez semanas, foi implantada uma cânula na artéria femoral em direção ao ventrículo esquerdo, para registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). Vinte e quatro horas após a canalização a PA e a FC foram registradas e processadas em um sistema de aquisição de dados (CODAS, 2KHz). O DS apresentou redução do peso corporal (33%), hiperglicemia (279%) e um prejuízo hemodinâmico com bradicardia (19%) e hipotensão (12%) e redução do número total de neurônios (26%) em relação ao SS. Após o protocolo de treinamento físico, tanto o ST, quanto o DT apresentaram uma melhora na capacidade física (107% e 75%, respectivamente), o DT apesar de não ter apresentado uma melhora metabólica (glicemia), apresentou uma melhora hemodinâmica atenuando a bradicardia (16%) e reverteu a perda neuronal (25%) no DS. Assim, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o treinamento físico tem papel importante no tratamento da neuropatia diabética autonômica.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Gânglio celíaco. Treinamento físico. Estereologia. Ratos.

ABSTRACT

PUREZA, D. Y. da. **Treinamento físico reverte perda neuronal do gânglio celiaco em ratos diabéticos (Diabetes mellitus)**. [Physical exercise reverses neuronal loss celiac ganglion in diabetics rats (Diabetes mellitus)]. 2011. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Diabetes is associated with several complications, among them, diabetic neuropathy, characterized by anatomical and functional injuries of peripheral somatic and autonomic neurons. The experimental model of diabetes induced by streptozotocin has been used in diabetes complication study. In this way, the aim of this study was to evaluate by stereological methods the microstructure of the celiac ganglion in diabetic rats (Diabetes mellitus) type I induced by induced by streptozotocin (STZ) submitted to exercise training. For this, twenty adult male rats were used, five healthy sedentary (HS), five healthy trained (HT), five diabetic sedentary (DS) and five diabetic trained (DT). Diabetes was induced by a single injection of STZ (60 mg/Kg, ev). The maximal exercise test was performed in all groups to check their physical capacity. The healthy trained and diabetic trained groups were submitted to an exercise training protocol on a treadmill (1 hour/day, 5 days/week, 10 weeks, 60% of the maximum speed on a treadmill test). After ten weeks, a cannula was implanted into the femoral artery into the left ventricle to register the arterial blood pressure (BP) and heart rate (HR). Twenty four hours after cannulation BP and HR were recorded and processed in a data acquisition system (codas, 2KHz). The DS group showed a reduction in body weight (33%), hyperglycemia (279%) and bradycardia with hemodynamic impairment (19%) and hypotension (12%) and reduction in the total number of neurons (26%). After the exercise training protocol, the HT and DT presented an improvement in physical capacity (107% and 75% respectively), despite the DT group have not shown a metabolic improvement (glycemia), it presented a hemodynamic improvement attenuating the bradycardia (16%) and reverted the neuronal loss (25%) in the DS. Thus, the results of this study suggest that physical training has an important role in the treatment of the diabetic autonomic neuropathy.

Keywords: Diabetes. Celiac ganglion. Exercise training. Stereology. Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	23
2.1.1 Estudo qualitativo do gânglio celíaco esquerdo (GCE).....	23
2.1.2 Estudo histoquantitativo (estereológico) do GCE	23
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	23
2.2.1 Estudo bioquímico	24
2.2.2 Estudo hemodinâmico	24
2.2.3 Estudo hemogasométrico	24
3 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	26
3.1 LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DO GÂGLIO CELÍACO.....	26
3.2 DIABETES MELLITUS	27
3.3 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NO DIABETES MELLITUS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAIS	32
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 Indução do Diabetes mellitus.....	33
4.2.2 Peso Corporal.....	33
4.2.3 Treinamento Físico	34
4.2.4 Canalização dos animais para registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	34
4.2.5 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	35
4.2.6 Hemogasometria	35
4.2.7 Coleta do material	35
4.2.8 Avaliação estereológica	36
4.2.8.1 Volume do gânglio celíaco esquerdo (Vref).....	37
4.2.8.2 Número Total de Neurônios (N).....	38
4.2.8.3 Volume neuronal médio ($\bar{V}_N$)	39
6 RESULTADOS	44
6.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL	44
6.2 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA	45
6.3 TESTE DE ESFORÇO	46
6.4 AVALIAÇÕES HEMOGASOMÉTRICAS	47
6.5 AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS SISTÊMICAS NO REPOUSO	48
6.6 MACROESTRUTURA DO GÂGLIO	49
6.7 MICROESTRUTURA DO GÂGLIO	51
6.8 ESTUDO ESTEREOLÓGICO	52
6.8.2 Número total de neurônios do gânglio celíaco (N).....	53
6.8.3 Volume médio dos neurônios do gânglio celíaco ($\bar{V}_N$)	53
7 DISCUSSÃO	56
7.1 ASPECTOS METABÓLICOS DO DIABETES MELLITUS	56
7.2 DIABETES MELLITUS E TREINAMENTO FÍSICO	57
7.3 MACROESTRUTURA QUANTITATIVA	60
7.4 MICROESTRUTURA QUANTITATIVA (ESTUDO ESTEREOLÓGICO)	60
7.4.1 Volume do gânglio celíaco.....	60
7.4.2 Número total de neurônios do gânglio celíaco	61
7.4.3 Volume neuronal médio	62

8 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos estudados.....	32
Tabela 2 – Parâmetros hemogasométricos nos grupos estudados. Valores representam as médias e entre os parênteses o coeficiente de variação (CV).....	47
Tabela 3 – Medidas de comprimento, largura e espessura do gânglio celíaco esquerdo nos grupos estudados.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia do sistema de pontos para a estimativa do volume ganglionar através do Princípio de Cavalieri. Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra: 50µm.....	38
Figura 2 – Fotomicrografia mostrando a aplicação do disector óptico para a estimativa do número total de neurônios do GCE. Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra: 25µm.....	39
Figura 3 – Fotomicrografia mostrando a aplicação do disector óptico para a estimativa do volume neuronal médio do GCE através do método rotator planar. Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra: 25µm	40
Figura 4 – Fluxograma da sequência experimental.	41
Figura 5 – Localização do gânglio celíaco esquerdo nos grupos estudados. AAA = aorta abdominal, AC = artéria celíaca, AMC = artéria mesentérica cranial e GCE = gânglio celíaco esquerdo	50
Figura 6 – Fotomicrografia do Gânglio Celíaco Esquerdo dos animais estudados (A: SS, B: ST, C: DS e D: DT, exibindo perfis de neurônios onde se nota: corpo celular (a), núcleos (b), nucléolos (c), e suas formas, elipsóides (d), circulares (e) e losângicos (f). Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra= 25µm.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Peso corporal (g) no início (1ª semana), no meio (5ª semana) e no final (10ª semana) dos grupos estudados (SS, ST, DS e DT). * vs. saudável; + vs. 1ª semana do mesmo grupo	45
Gráfico 2 – Glicemia (mg/Dl) no início (1ª semana), no meio (5ª semana) e no final (10ª semana) dos grupos estudados (SS, ST, DS e DT). * p= vs. saudável.....	46
Gráfico 3 – Teste de esforço máximo (km/h) dos animais estudados. # vs. sedentário, + vs. 1ª semana do mesmo grupo	47
Gráfico 4 – Frequência cardíaca nos grupos SS, ST, DS e DT. * p = 0,009 vs. SS; # p = 0,014 vs. SS. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média	48
Gráfico 5 – Pressão arterial média nos grupos SS, ST, DS e DT. * p = 0,038 DS vs. SS. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média.....	49
Gráfico 6 – Volume do gânglio celíaco (Principio de Cavalieri) nos grupos: saudável sedentário, saudável treinado, diabético sedentário e diabético treinado. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média.....	52
Gráfico 7 – Número Total de neurônios nos grupos: saudável sedentário, saudável treinado, diabético sedentário e diabético treinado. * p= 0,04 vs. SS. § p= 0,03 vs. ST. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média	53
Gráfico 8 – Volume neuronal médio nos grupos: saudável sedentário, saudável treinado, diabético sedentário e diabético treinado. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média	54

LISTA DE ABREVIATURAS

DM: diabetes mellitus

STZ: estreptozotocina

SS: saudável sedentário

ST: saudável treinado

DS: diabético sedentário

DT: diabético treinado

PA: pressão arterial

PAS: pressão arterial sistólica

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

FC: frequência cardíaca

GCE: gânglio celíaco esquerdo

Vref: volume do gânglio

N: número total de neurônios

$\bar{V}_N$: volume neuronal médio

CE: coeficiente de erro

PaO₂: pressão parcial de O₂

PaCO₂: pressão parcial de CO₂

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso autônomo do rato, como de outros mamíferos, consiste em um extenso arranjo de nervos e gânglios conectados ao sistema nervoso central (representado pelo cérebro e medula espinhal por um lado) e às vísceras pelo outro lado, e está organizado em grupos de gânglios que são classificados topograficamente em paravertebrais, prevertebrais, paraviscerais e intramurais. Os gânglios autônomos, em sua maioria, são facilmente reconhecidos ao longo do tronco simpático através de espessamentos e/ou emaranhado de nervos. Os gânglios prevertebrais estão em sua maioria dispostos em amplos plexos nervosos.

Neste contexto, destacamos o plexo abdominal que inclui o gânglio celíaco e o gânglio mesentérico cranial, principal responsável pela inervação extrínseca do pâncreas (GABELLA, 2004).

Várias doenças podem afetar o sistema nervoso autônomo e seus gânglios. Uma das mais importantes é o diabetes mellitus (DM) que pode provocar a neuropatia diabética. A incidência do diabetes mellitus (tipo I e tipo II) está crescendo a proporções de epidemia, com uma prevalência mundial esperada de 366 milhões em 2030 (WILD et al., 2004).

A neuropatia diabética é acompanhada por uma gama de anormalidades e envolve tanto o sistema nervoso autônomo como o sistema somático, aumentando significativamente a morbidade e a mortalidade desses pacientes (HILSTED; GALBO; CHRISTENSEN, 1979). Possui fatores múltiplos entre os quais alterações no metabolismo endoneural, produção defeituosa de fator neurotrófico, redução do suplemento de sangue para os nervos e falha nos mecanismos imunológicos. Embora tenham sido propostos muitos estudos experimentais e clínicos para determinar a melhor estratégia de prevenção e tratamento da neuropatia diabética, o controle glicêmico rígido é a principal (SIEMIONOW; DEMIT, 2004).

O modelo experimental de DM por estreptozotocina (STZ) tem sido utilizado no estudo da neuropatia diabética, bem como as demais complicações inerentes ao diabetes. Ratos diabéticos por STZ apresentam muitas alterações semelhantes às observadas em humanos, tais como hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria, perda de peso, neuropatia, nefropatia e cardiopatia (JUNOD et al., 1967; SCHAAAN et al., 1997; DALL'AGO et al., 1997; DE ANGELIS et al., 2002).

Atualmente, o exercício físico regular, juntamente com a insulinoterapia e o planejamento alimentar, tem sido considerado como uma das três principais abordagens no tratamento do diabetes.

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos após o exercício físico agudo e crônico têm levado muitos investigadores a sugerir o treinamento físico como uma conduta não-farmacológica importante no tratamento de diferentes patologias entre os quais o diabetes mellitus (JENNINGS et al., 1986; WALLBERG-HERIKSSON; RINCON; ZIERATH, 1988; TIPTON, 1991). Associado a estes autores, estudos epidemiológicos tem demonstrado que o sedentarismo é um grande fator de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo II (HARDMAN, 1996).

Apesar de se verificar que muitos autores têm realizando pesquisas em animais submetidos a treinamento físico (CAVALCANTI, 2009), diabéticos (DALL'AGO, 1997; DE ANGELIS, 2002) e no gânglio celíaco (RIBEIRO, 2002), isoladamente, constata-se uma carência principalmente de publicações enfocando a interação destes fatores, ou seja, os efeitos do treinamento físico no gânglio celíaco de animais diabéticos, principalmente no que tange aos seus aspectos morfoquantitativos.

Desta forma, o conhecimento destas informações quantitativas pode ser útil no entendimento da neuropatia diabética autonômica, bem como condutas adequadas para a prevenção e tratamento destas complicações inerentes ao diabetes, melhorando a qualidade de vida de indivíduos acometidos por essa doença.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de métodos estereológicos, a microestrutura do gânglio celíaco de ratos diabéticos (Diabetes mellitus) tipo 1 induzidos por estreptozotocina (STZ) e submetidos a treinamento físico.

2 OBJETIVOS

Os objetivos da presente pesquisa estão descritos abaixo e, estão divididos em objetivo principal e objetivos secundários.

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de métodos estereológicos, a microestrutura do gânglio celíaco de ratos diabéticos (Diabetes mellitus) tipo 1 induzidos por estreptozotocina (STZ) e submetidos a treinamento físico.

2.1.1 Estudo qualitativo do gânglio celíaco esquerdo (GCE)

Macroestrutura – descrição da localização e forma

2.1.2 Estudo histoquantitativo (estereológico) do GCE

Volume do GCE, número total de neurônios (N) e volume neuronal médio ($\bar{V}_N$).

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Com o intuito de confirmar o modelo experimental de Diabetes mellitus (DM) induzido por STZ e a eficiência do treinamento físico empregado, os seguintes aspectos foram estudados:

2.2.1 Estudo bioquímico

Análise do perfil glicêmico.

2.2.2 Estudo hemodinâmico

Análises dos parâmetros de frequência cardíaca e pressão arterial.

2.2.3 Estudo hemogasométrico

Análises da pressão parcial de O₂ (PaO₂) e da pressão parcial de CO₂ (PaCO₂).

Revisão sistemática da literatura

3 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

A literatura consultada para embasamento científico mais relevante será discorrida em seguida.

3.1 LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DO GÂNGLIO CELÍACO

O sistema nervoso autônomo é organizado em grupos de gânglios que podem ser subdivididos topograficamente em: paravertebrais, prevertebrais, paraviscerais, e intramurais. Os gânglios prevertebrais estão conectados entre si compondo um arranjo plexiforme (plexo abdominal que inclui o gânglio celíaco e o gânglio mesentérico cranial, sendo o principal responsável pela inervação extrínseca do pâncreas) (GABELLA, 2004).

Os gânglios celíacos ficam situados junto ao estômago e pâncreas e em proximidade com o eixo celíaco. O gânglio esquerdo é ligeiramente caudal ao gânglio direito (ABEDI; ZFASS, 2001).

O plexo celíaco é parte do sistema nervoso simpático e é o centro integrador para transmissão da sensação da dor oriunda de todas as vísceras abdominais, incluindo o pâncreas. O gânglio celíaco, compreendendo o gânglio celíaco direito e esquerdo, é uma estrutura cilíndrica em forma de halteres que essencialmente reveste a artéria celíaca na sua origem (MALICK; MCGRATH, 2003).

O gânglio celíaco tem sido também denominado de epigástrico, semilunar, ou gânglio solar, pela alusão à sua forma. Ele tem o aspecto de dois lobos ovóides conectados entre si. O gânglio mesentérico cranial consiste de uma massa única conectada aos gânglios celíacos por curtos ramos interganglionares (MIOLAN; NIEL, 1996).

Os aspectos macroscópicos dos gânglios celíaco-mesentéricos de cães, gatos e búfalos têm sido estudados, utilizando-se a microscopia de luz e eletrônica de transmissão e de varredura. Os resultados mostraram que estes gânglios prevertebrais são um complexo ganglionar os quais são formados por várias unidades ganglionares. Cada um deles possui neurônios multipolares e é relacionado a um órgão-alvo como pâncreas, baço, fígado, estômago. Há uma cápsula que envolve todo complexo ganglionar, contendo fibras

elásticas e colágenas (RIBEIRO et al., 2000; RIBEIRO; MIGLINO, DE SOUZA, 2000; RIBEIRO et al., 2002)

O gânglio celíaco esquerdo tem o formato de meia lua e aloja-se na face lateral da artéria celíaca; o gânglio celíaco direito é triangular, menor do que o esquerdo, e aloja-se no lado oposto da mesma artéria, e dorsal a veia cava caudal. Ambos os gânglios celíacos continuam-se caudalmente, sem limites distintos, em direção ao gânglio mesentérico cranial. Uma extensão dorsal do gânglio celíaco contorna o gânglio ou gânglios aorticorrenais sendo mais desenvolvidos também no lado esquerdo do que no direito. O plexo celíaco com seus gânglios contribui para emitir numerosos troncos de nervos que saem do plexo celíaco e se encaminham para atingir os órgãos abdominais e as artérias celíaca, mesentérica cranial, renal, e a artéria frênica caudal (GABELLA, 2004).

3.2 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é considerado problema de saúde pública prevalente, em ascendência, oneroso do ponto vista social e econômico e com potencial reconhecido para prevenção. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, está previsto aumento na prevalência de DM de 170% no período de 1995 a 2025 (KING; AUBERT; HERMAN, 1998; NARAYAN et al., 2000). Nos países desenvolvidos, mesmo com os avanços científicos e o acesso fácil a cuidados de saúde, a prevalência do diabetes está aumentando e as intervenções com a finalidade de prevenir tal condição, como a atividade física e dieta, são subutilizadas (KING; AUBERT; HERMAN, 1998).

No Brasil, a prevalência de diabetes situa-se ao redor de 11% da população na faixa etária entre 18 e 75 anos. A previsão de prevalência, para 2025, é de 299,9 milhões de pessoas no mundo (KING; AUBERT; HERMAN, 1998). Os diabetes tipo 1 e tipo 2 são os mais frequentes. Porém, o tipo 2 é o mais prevalente, compreendendo por volta de 90% dos casos (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003).

O DM é uma desordem que afeta indivíduos de todas as idades. O diabetes tipo 1 afeta crianças, adolescentes e adultos jovens, mas também, às vezes, acomete indivíduos mais velhos. O diabetes tipo 1 é a consequência da deficiência na produção da insulina, resultando de um processo auto-imune que destrói as células que produzem insulina (célula β -

pancreática). O diabetes tipo 2 ocorre em adultos e em pessoas mais velhas (mas às vezes também em indivíduos novos), e envolve uma predisposição genética, sendo favorecido pelo excesso de peso e pelo sedentarismo (LEFEBVRE, 2005). O DM é uma doença crônica na qual fatores genéticos e ambientais se sobrepõem, levando a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. É caracterizado por estado de hiperglicemia em jejum, advindo principalmente da secreção deficiente ou ausente de insulina, associada a graus variados de resistência dos tecidos periféricos a ação deste hormônio. Trata-se de uma doença etiológica e clinicamente heterogênea que provoca complicações nos vasos capilares (nefropatia diabética e retinopatia diabética), nos vasos arteriais (arteriosclerose e gangrena) e nas vias do sistema nervoso (neuropatia diabética) (JUNOD et al., 1967; YAGIHASHI, 1995). Estas complicações ocorrem tanto no diabetes do tipo I como no tipo II (DUNCAN; SCHIMIDT; GIUGLIANI, 1996).

Assim, uma complicação de grande prevalência é a neuropatia diabética, que se caracteriza por lesões anatômicas e funcionais dos neurônios autonômicos e somáticos periféricos (HILSTED; GALBO; CHISTENSEN, 1979; NATHAN, 1993). Neuropatias têm sido reportadas afetando de 5 a 60% de pacientes com diabetes e tendendo a piorar algumas vezes. Várias classificações têm sido propostas baseado-se na forma de apresentação clínica e nos achados anatômicos. Morfologicamente a neuropatia diabética pode ser classificada como neuropatia difusa ou focal. Neuropatia difusa pode ser separadamente dividida em polineuropatia sensorio motora simétrica distal (DSPN) e neuropatia autonômica. O espectro clínico da neuropatia diabética é variado. DSPN é o tipo mais comum de neuropatia diabética e tipicamente afeta a extremidade distal na perda temporária sensorial (SIEMIONOW; DEMIT, 2004).

Estudos clínicos e experimentais demonstram que a neuropatia autonômica caracteriza-se, inicialmente, por disfunção do sistema nervoso parassimpático e, posteriormente, do sistema nervoso simpático (BARRON et al., 1994; BOTTINI et al., 1995). Estas disfunções podem levar à diminuição da tolerância ao exercício (RAMIRES et al., 1993), à hipoglicemia assintomática (NIAKAN et al., 1986), à diminuição da resposta adrenérgica à hipoglicemia (BOTTINI et al., 1997), à taquicardia em repouso, à presença de hipotensão postural (NATHAN et al., 1996), ao infarto silencioso do miocárdio e a morte súbita (NIAKAN et al., 1986). Além disso, a neuropatia autonômica diabética parece predispor ao aparecimento de outras complicações do diabetes mellitus, como a neuropatia somática periférica, a nefropatia e a retinopatia (SPALLONE; MENZINGER, 1997). De fato, a neuropatia autonômica diabética está altamente correlacionada a altas taxas de morbidade e

mortalidade nos diabéticos (LEVITT et al., 1996).

O modelo experimental de DM por estreptozotocina (STZ) tem sido utilizado no estudo da neuropatia diabética, bem como nas demais complicações do diabetes. Ratos diabéticos por STZ apresentam muitas alterações semelhantes às observadas em humanos, tais como hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria, perda de peso, neuropatia, nefropatia e cardiopatia (JUNOD et al., 1967; DALL'AGO et al., 1997; SCHAAN et al., 1997; DE ANGELIS et al., 2002).

3.3 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NO DIABETES MELLITUS

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos após o exercício físico agudo e crônico têm levado muitos investigadores a sugerir o treinamento físico como uma conduta não farmacológica importante no tratamento de diferentes patologias entre os quais o diabetes (JENNINGS et al., 1986; WALLBERG-HERIKSSON; RINCON; ZIERATH, 1988; TIPTON., 1991). Associado a estes autores, estudos epidemiológicos tem demonstrado que o sedentarismo é um grande fator de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (HARDMAN, 1996).

O treinamento físico em humanos e animais resulta em numerosas adaptações da musculatura esquelética, entre elas, o aumento da expressão gênica do GLUT 4 que contribui para a melhor captação da glicose pelo músculo, mesmo com níveis insulinêmicos alterados, em indivíduos treinados. Esta alteração contribui para a diminuição da resistência periférica à insulina, a intolerância à glicose e do diabetes tipo 2 (GOODYEAR; KAHN, 1998).

Estudos demonstram que o treinamento físico dinâmico em diabéticos do tipo 1 melhora a sensibilidade à insulina, mas não induz melhora no controle glicêmico (ZINMAN; ZUNIGA-GUAJARDO; KELLY, 1984; SCHNEIDER; MORGADO, 1995; RAILE et al., 1999). Em 1984, Zinman, Zuniga-Guajardo e Kelly, demonstraram que o treinamento físico não modificou a glicemia, a hemoglobina glicosilada ou a reposição de insulina em indivíduos com diabetes mellitus do tipo 1. Em outro estudo, conduzido por Ramires (1994) também não foi observado modificação da glicemia ou da hemoglobina glicosilada após 6 meses de treinamento físico, mas, ao contrário de Zinman, Zuniga-Guajardo e Kelly (1984), foi verificado que o treinamento físico regular diminuía a necessidade diária de insulina exógena dos pacientes diabéticos do tipo I. Entretanto, Mosher et al. (1998) evidenciaram redução dos

níveis de hemoglobina glicosilada em adolescentes portadores de DM do tipo 1 submetidos a treinamento físico. Um estudo envolvendo 142 portadores de DM do tipo 1 em idade escolar (6 a 18 anos) evidenciou que o tempo semanal gasto com atividades físicas foi maior nesse grupo comparativamente com 97 crianças não-diabéticas.

Além disso, o aumento da sensibilidade à insulina após o treinamento físico tem sido observado em indivíduos resistentes à insulina (PERSEGHIN et al., 1996). Perseghin et al. (1996) observaram em indivíduos resistentes à insulina e filhos de diabéticos do tipo II, que o treinamento físico aumentava a sensibilidade à insulina de forma semelhante àquela observada em indivíduos saudáveis. Apesar disto, o treinamento não normalizou a sensibilidade à insulina. Assim, em pacientes do tipo II que apresentam resistência à insulina o treinamento físico pode auxiliar no tratamento dessa doença, mas não necessariamente normalizar esse distúrbio metabólico.

O ganho de peso que acompanha por vezes o diabetes do tipo 2, a hipertensão e o envelhecimento, é revertido e prevenido pela atividade física regular. Estudos têm demonstrado que o acúmulo de gordura abdominal e a diminuição da massa muscular estão altamente correlacionados com o desenvolvimento de resistência à insulina. O treinamento físico resulta em perda de peso, preferencialmente em regiões centrais do corpo, e estimula o desenvolvimento muscular (IVY, 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa os seguintes materiais e métodos abaixo listados foram utilizados.

4.1 MATERIAIS

O desenvolvimento da presente pesquisa foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 1497/2008. Foram utilizados 20 gânglios celíacos esquerdos provenientes de 20 ratos Wistar adultos, machos, sendo 5 ratos saudáveis sedentários (SS), 5 saudáveis treinados (ST), 5 diabéticos sedentários (DS) e 5 diabéticos treinados (DT) (Tabela 1). Os animais foram obtidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Foram utilizados os gânglios celíacos esquerdos com o intuito de padronizar o antímero do órgão estudado, evitando assim, as possíveis assimetrias encontradas em órgãos pares (Abrahão, 2009), além do que o gânglio celíaco esquerdo é o principal responsável pela inervação simpática do pâncreas (Gabella, 2004).

Tabela 1 – Grupos estudados

GRUPOS	IDADE	NÚMEROS DE RATOS
A- Saudável Sedentário (SS)	4,5 meses	5
B- Saudável Treinado (ST)	4,5 meses	5
C- Diabético Sedentário (DS)	4,5 meses	5
D- Diabético Treinado (DT)	4,5 meses	5

4.2 MÉTODOS

Os procedimentos empregados, bem como a sequência experimental para o desenvolvimento da pesquisa estão abaixo relacionados.

4.2.1 Indução do Diabetes mellitus

Após o jejum de 8 horas, todos os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50mg/Kg, Ketalar, Parke-Davis,IP) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum, BayerI,IP) e o diabetes foi induzido por uma única injeção endovenosa de estreptozotocina (STZ, 60mg/Kg, ev, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) na veia da cauda (RERUP, 1970). A estreptozotocina foi dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) e injetada cerca de 5 minutos após a diluição.

Os animais dos grupos saudáveis foram submetidos ao jejum, mas receberam apenas injeções de tampão citrato.

Uma semana após a indução do diabetes, os animais foram novamente submetidos a jejum de 8 horas para a confirmação do Diabetes mellitus. A glicemia foi verificada pelo hemoglicoteste, através de tiras Advantage (Advantage - Roche®) (PUREZA, 2006). Foram selecionados para os grupos diabéticos, apenas os animais que apresentaram glicemia acima de 250mg/dl.

4.2.2 Peso Corporal

Os animais foram pesados no início do experimento, na quinta semana e após as dez semanas de treinamento físico (no dia da eutanásia). Para pesagem dos animais foi utilizada uma balança analítica de precisão da marca Marte, modelo ASF8.

4.2.3 Treinamento Físico

Uma semana antes do treinamento físico os animais foram adaptados na esteira 10 minutos por dia com velocidade de 0,3 km/h. Após o período de adaptação foi realizado o teste de esforço máximo, onde a velocidade foi aumentada em 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão, alcançando, desta forma, a velocidade máxima. Para iniciar o treinamento físico foi utilizado de 60% da velocidade máxima. O treinamento durou 10 semanas com caráter progressivo de tempo e velocidade (CAVALCANTI et al., 2009; DE ANGELIS et al., 2000).

Os animais sedentários ficaram em gaiolas com no máximo 4 animais por caixa, permitindo livre movimentação na mesma e foram submetidos aos mesmos procedimentos dos treinados, porém permaneceram sem se exercitar durante todo o protocolo de estudo.

4.2.4 Canalização dos animais para registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

No dia anterior aos registros diretos de pressão arterial e de frequência cardíaca, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50mg/Kg, Ketalar, Parke-Davis,IP) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum, BayerI,IP) e colocados em decúbito dorsal. Logo após realizou-se a incisão na região inguinal e inserção dos cateteres de tygon P10 no interior da artéria femoral para registro de FC e PA. As cânulas foram fixadas com fio de algodão e suas extremidades mais calibrosas foram passadas subcutâneamente e exteriorizadas no dorso da região cervical, sendo fixadas com fio de algodão na pele. Cada rato foi mantido em uma caixa (Plexiglas, 25x15x10cm) durante a realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas (FLORES, 2006).

4.2.5 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Vinte e quatro horas após a canalização e estando o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 30 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal na caixa (repouso). Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (Blood Pressure XDCR, Kent© Scientific, Litchfield, CT, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (STEMTECH BPMT-2, Quintron Instrument© Inc, Milwaukee, EUA). O sinal analógico da pressão arterial pulsátil foi convertido para digital e, em seguida, gravado em um computador (Dell, pentiumIII 866MHz). A frequência cardíaca e a pressão arterial foram analisadas batimento a batimento no programa AT/CODAS numa frequência de amostragem de 2 KHz por canal. Este programa permite a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD). A pressão arterial média (PAM) foi obtida a partir do cálculo da área sob a curva. A frequência cardíaca (FC) foi calculada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos (MAEDA et al., 1995; DE ANGELIS et al., 1999, 2000).

4.2.6 Hemogasometria

Após as análises hemodinâmicas, as variáveis hemogasométricas, pressão parcial de O₂ no sangue arterial (PaO₂) e a pressão parcial de CO₂ no sangue arterial (PaCO₂) foram obtidas empregando-se equipamento Radiometer, ABL5, por meio de colheita de amostra de sangue, no volume de 0,1mL, obtida por meio da cânula inserida para a mensuração das pressão arterial e frequência cardíaca (FILHO et al., 2008).

4.2.7 Coleta do material

Para a coleta do gânglio celíaco esquerdo (GCE), os animais foram eutanasiados com uma sobredose de tiopental sódico (10mg/100g de peso corpóreo) aplicados por via

intraperitoneal. Após a constatação do óbito dos animais, foi realizada uma celiotomia pré-retro-umbilical. A pele e a musculatura foram rebatidas para permitir amplo acesso à cavidade abdominal. Posteriormente, foi feito o deslocamento caudo-ventral das vísceras permitindo a visualização das artérias celíaca e mesentérica cranial, onde o gânglio se encontra sobreposto e a identificação da glândula adrenal esquerda, a qual referenda a posição do gânglio. À seguir o ventrículo esquerdo, foi então canalizado e perfundido com solução de lavagem composta de solução salina tamponada fosfatada (PBS) (0.1M; pH 7.4) (SYNTH®) e heparina a 2% (Roche®) com extravasamento feito pela aurícula direita.

Após a lavagem do sistema, uma solução fixadora de formoldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PSB) (0.1M, pH7,4), foi perfundida pelo ventrículo esquerdo, permitindo a fixação do material "in situ" para a posterior retirada do gânglio e continuação da etapa de fixação do material por imersão conforme descrito à seguir.

Depois de retirado, o gânglio celíaco foi dissecado e removido do animal e sua cápsula conjuntiva foi retirada por microdissecação, utilizando um microscópio cirúrgico Leica® DM com aumento de 40x. Posteriormente, o gânglio celíaco foi pesado e medido nos seus três eixos: comprimento, largura e espessura, usando o paquímetro digital Digimess®. Após a mensuração o GCE foi lavado com água destilada, verticalizado (BADDELEY; GUNDERSEN; CRUZ-ORIVE, 1986), embebido em uma solução aquosa de Ágar (10%) e seccionado exaustiva, uniforme e sistematicamente (SURS) em micrótomo de lâmina vibratória (vibrótomo) Leica® (VT 1000S) com 40µm de espessura. As secções foram coradas com Giemsa por 5 minutos. As secções histológicas foram desidratadas (em álcool 70%, 80%, 90% e 100) por 5 minutos cada uma e logo após em xilol I, xilol II e xilol III por 5 minutos cada uma e montadas sobre lâmina e lamínula usando DPX para visualização.

4.2.8 Avaliação estereológica

As secções do GCE foram observadas usando o microscópio Leica® DMR equipado com câmera digital Olympus DP72 e analisadas usando o software New Cast da Visiopharm Integrator System, versão 3.6.5.0. Uma fração das secções foi amostrada de acordo com o princípio da amostragem sistemática e uniforme aleatória (SURS).

4.2.8.1 Volume do gânglio celíaco esquerdo (Vref)

Para estimar o volume do gânglio celíaco, foi utilizado o Princípio de Cavalieri aplicado aos cortes histológicos do gânglio celíaco esquerdo (GCE) (MAYHEW; OLSEN, 1991; HOWARD; REED, 2005) (Figura 1).

A seguinte fórmula foi usada para estimar o volume do gânglio (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; MAYHEW; OLSEN, 1991):

$V_{ref} = \sum P \times (a/p) \times t$, onde:

$\sum P$ = somatória de pontos atingindo o tecido ganglionar

(a/p) = área associada a cada ponto

t = espessura média das secções ganglionares

O coeficiente de erro (CE) para a estimativa de volume pelo Princípio de Cavalieri $CE(V_{GCE})$ foi estimado de acordo com a fórmula publicada por Gundersen et al. (1999).

A fórmula utilizada foi:

Variância “noise” da contagem de pontos:

$$\text{Var} [\text{noise}] = c. (b/\sqrt{a}).(\sqrt{n. \Sigma P})$$

Onde c é uma constante ($c = 0,0724$)

$b/\sqrt{a}$ expressa a forma ou complexidade dos perfis analisados

n é o número de secções utilizadas

ΣP é o número total de pontos utilizados para estimar a área das secções.

Variância devido a amostragem sistemática e uniformemente aleatória (surs)

$$\text{Var} [\text{surs}] = (3(A - \text{var}[\text{noise}]) - 4B + C)/240$$

$$CE = \sqrt{\text{var}[\text{total}] / \Sigma P}$$

Figura 1 – Fotomicrografia do sistema de pontos para a estimativa do volume ganglionar através do Princípio de Cavalieri. Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra: 50μm

4.2.8.2 Número Total de Neurônios (N)

O número total de neurônios (N) do GCE foi estimado multiplicando-se o número total de partículas contadas pelo inverso das frações amostradas (MAYHEW; OLSEN, 1991) (Figura 2).

$$N = \sum Q^- \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{hsf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

Onde:

Q- é o número de partículas (neurônios) contadas pelo método do disector óptico

ssf é a fração de amostragem das secções

asf é a fração de áreas amostradas para contagem

hsf é a fração de espessura do corte efetivamente utilizada para contagem

E para calcular o coeficiente de erro, utilizamos a seguinte fórmula (PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1988):

$$CE = \frac{1}{\sqrt{Q^-}}$$

Figura 2 – Fotomicrografia mostrando a aplicação do disector óptico para a estimativa do número total de neurônios do GCE. Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra: 25μm

4.2.8.3 Volume neuronal médio ($\bar{V}_N$)

O volume neuronal foi estimado pelo método do rotator planar. Este método permite estimar o volume médio e a distribuição volumétrica das partículas independentemente da sua forma, distribuição ou orientação (VEDEL-JENSEN; GUNDERSEN, 1993) (Figura 3).

A seguinte fórmula foi utilizada para a estimativa do volume neuronal:

$$\bar{V}_N = \pi \cdot t \cdot \sum_i l_i^2 \text{ onde, } l_i^2 \text{ é uma distância medida a partir de um ponto fixo da célula ou fora dela, até uma borda arbitrariamente escolhida na mesma.}$$

Figura 3 – Fotomicrografia mostrando a aplicação do disector óptico para a estimativa do volume neuronal médio do GCE através do método rotator planar. Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra: 25μm

4.2.9 Fluxograma dos procedimentos experimentais

A Figura 4 representa os procedimentos realizados e a sequência experimental.

Figura 4 – Fluxograma da sequência experimental

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida por meio do software Minitab 16[®] (2010). O procedimento GLM-ANOVA assim como o teste T pareado foram devidamente aplicados para a análise dos dados independentes e dependentes, respectivamente. Diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

À seguir os resultados foram expressos como média (CV); onde CV refere-se ao coeficiente de variação, sendo este o quociente entre o desvio padrão e média.

6.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

No início do estudo não houve diferenças ($p=0,14$) entre os grupos estudados ($SS_{1^a\text{ semana}}=265\text{ g (0,03)}$, $ST_{1^a\text{ semana}}=287\text{ g (0,01)}$, $DS_{1^a\text{ semana}}=275\text{ g (0,05)}$ e $DT_{1^a\text{ semana}}=281\text{ g (0,07)}$), entretanto ao final do protocolo experimental o DS foi significativamente menor ($p=0,001$) em relação ao SS e não foi diferente ($p=0,22$) em relação ao DT. Este último na 10ª semana foi menor ($p=0,001$) em relação ao ST ($SS_{10^a\text{ semana}}=418\text{ g (0,05)}$; $ST_{10^a\text{ semana}}=407\text{ g (0,04)}$; $DS_{10^a\text{ semana}}=282\text{ g (0,08)}$; $DT_{10^a\text{ semana}}=306\text{ g (0,01)}$) (Gráfico 1).

Além disso, após 10 semanas o grupo SS apresentou uma massa corpórea significativamente maior ($p=0,001$) em relação ao seu peso inicial ($SS_{1^a\text{ semana}}=265\text{ g (0,04)}$ e $SS_{10^a\text{ semana}}=418\text{ g (0,05)}$), da mesma forma o grupo ST foi significativamente maior ($p=0,001$) em relação ao peso inicial ($ST_{1^a\text{ semana}}=287\text{ g (0,01)}$ e $ST_{10^a\text{ semana}}=407\text{ g (0,04)}$). Entre os diabéticos, o peso corporal não foi significativo ($p=0,62$) no DS na 10ª semana em relação ao DS na 1ª semana ($DS_{1^a\text{ semana}}=275\text{ g (0,05)}$ e $DS_{10^a\text{ semana}}=282\text{ g (0,08)}$), de forma semelhante o DT não foi diferente ($p=0,07$) na 10ª semana em relação ao DT na 1ª semana ($DT_{1^a\text{ semana}}=281\text{ g (0,07)}$ e $DT_{10^a\text{ semana}}=306\text{ g (0,01)}$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Peso corporal (g) no início (1ª semana), no meio (5ª semana) e no final (10ª semana) dos grupos estudados (SS, ST, DS e DT). * vs. saudável; + vs. 1ª semana do mesmo grupo

6.2 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA

Ao analisar, os animais no início do protocolo experimental o grupo DS apresentou glicemia significativamente maior ($p=0,001$) em relação ao SS da mesma forma o grupo DT apresentou glicemia significativamente maior ($p=0,001$) em comparação ao ST ($SS_{1ª\text{ semana}}=100\text{ mg/Dl}$ (0,03); $ST_{1ª\text{ semana}}=104\text{ mg/Dl}$ (0,03); $DS_{1ª\text{ semana}}=348\text{ mg/Dl}$ (0,10); $DT_{1ª\text{ semana}}=340\text{ mg/Dl}$ (0,08)). Após 10 semanas o grupo DS foi maior ($p=0,001$) em relação ao SS e ST, assim como, o grupo DT apresentou glicemia significativamente maior ($p=0,001$) em comparação ao SS e ST ($SS_{10ª\text{ semana}}=96\text{ mg/Dl}$ (0,09); $ST_{10ª\text{ semana}}=104\text{ mg/Dl}$ (0,06); $DS_{10ª\text{ semana}}=365\text{ mg/Dl}$ (0,04) e $DT_{10ª\text{ semana}}=325\text{ mg/Dl}$ (0,11)) (Gráfico 2).

Ao comparar o início e o final do protocolo de treinamento físico, nos saudáveis, o grupo SS na 10ª semana não foi diferente ($p=0,47$) do SS na 1ª semana, assim como o grupo ST na 10ª semana não foi diferente ($p=0,95$) do ST na 1ª semana. Da mesma forma, nos diabéticos, o grupo DS na 10ª semana foi semelhante ($p=0,31$) do DS na 1ª semana e o grupo ST na 10ª semana não foi diferente ($p=0,60$) do ST na 1ª semana ($SS_{1ª\text{ semana}}=100\text{ mg/Dl}$ (0,03), $SS_{10ª\text{ semana}}=96\text{ mg/Dl}$ (0,09); $ST_{1ª\text{ semana}}=104\text{ mg/Dl}$ (0,03), $ST_{10ª\text{ semana}}=104\text{ mg/Dl}$

(0,06); $DS_{1^a \text{ semana}} = 348 \text{ mg/Dl}$ (0,10), $DS_{10^a \text{ semana}} = 365 \text{ mg/Dl}$ (0,04) e; $DT_{1^a \text{ semana}} = 340 \text{ mg/Dl}$ (0,08), $DT_{10^a \text{ semana}} = 325 \text{ mg/Dl}$ (0,11)) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Glicemia (mg/Dl) no início (1ª semana), no meio (5ª semana) e no final (10ª semana) dos grupos estudados (SS, ST, DS e DT). * vs. saudável

6.3 TESTE DE ESFORÇO

No início do protocolo os grupos não apresentaram diferenças significantes ($p = 0,22$) em relação as capacidades físicas máximas ($SS = 1,14 \text{ Km/h}$ (0,22); $ST = 0,90 \text{ Km/h}$ (0,0); $DS = 1,14 \text{ Km/h}$ (0,28); $DT = 0,96 \text{ Km/h}$ (0,13)) (Figura 3). Após 10 semanas de treinamento físico o grupo ST apresentou uma maior ($p = 0,003$) capacidade física em relação ao SS ($SS_{10^a \text{ semana}} = 1,14 \text{ Km/h}$ (0,11) e $ST_{10^a \text{ semana}} = 1,86 \text{ Km/h}$ (0,21)), assim como o grupo DT apresentou uma capacidade física maior ($p = 0,001$) em relação ao DS ($DS_{10^a \text{ semana}} = 0,90 \text{ Km/h}$ (0,0) e $DT_{10^a \text{ semana}} = 1,68 \text{ Km/h}$ (0,20)) (Gráfico 3).

Ao comparar o grupo ST na 10ª semana, este foi maior ($p = 0,005$) em relação ao ST na 1ª semana, semelhante a este o DT foi significativamente maior ($p = 0,004$) no DT na 10ª em relação ao DT na 1ª semana ($ST_{1^a \text{ semana}} = 0,90 \text{ Km/h}$ (0,0) e $ST_{10^a \text{ semana}} = 1,86 \text{ Km/h}$ (0,21); $DT_{1^a \text{ semana}} = 0,96 \text{ Km/h}$ (0,13) e $DT_{10^a \text{ semana}} = 1,68 \text{ Km/h}$ (0,20)) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Teste de esforço máximo (km/h) dos animais estudados. # vs. sedentário, + vs. 1ª semana do mesmo grupo

6.4 AVALIAÇÕES HEMOGASOMÉTRICAS

Após 10 semanas de treinamento físico os grupos estudados não apresentaram diferenças significativas ($p=0,60$) na $PaCO_2$. Semelhante a estes a PaO_2 não apresentou diferenças ($p=0,08$) entre os grupos, conforme mostra tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros hemogasométricos nos grupos estudados. Valores representam as médias e entre os parênteses o coeficiente de variação (CV)

<i>Grupos/Medidas</i>	<i>$PaCO_{2mmHg}$</i>	<i>PaO_{2mmHg}</i>
SS	36,60 (0,06)	69,80 (0,11)
ST	34,40 (0,20)	74,20 (0,04)
DS	37,40 (0,13)	68,80 (0,04)
DT	33,4 (0,15)	77,00 (0,05)

6.5 AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS SISTÊMICAS NO REPOUSO

No gráfico 4 estão representados os valores de FC nos grupos estudados. Os animais do grupo ST apresentaram uma redução ($p = 0,014$) da FC após 10 semanas de treinamento comparado com o SS. Comparando o grupo saudável com o diabético, a FC foi menor no DS em relação ao SS ($p = 0,009$) e não apresentou diferença significativa no DT em relação ao ST ($p = 0,99$).

Gráfico 4 – Frequência cardíaca nos grupos SS, ST, DS e DT. * $p = 0,009$ vs. SS; # $p = 0,014$ vs. SS. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média

Os valores da PAM estão representados no gráfico 5, e estes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos SS em relação ao ST ($p = 0,30$), bem como no DS em relação ao DT ($p = 0,77$). Entretanto, comparando os animais diabéticos com os saudáveis, os animais DS apresentaram uma PAM menor ($p = 0,038$) em relação aos animais SS.

Gráfico 5 – Pressão arterial média nos grupos SS, ST, DS e DT. * $p = 0,038$ vs. SS. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média

6.6 MACROESTRURA DO GÂGLIO

A localização do gânglio celiaco esquerdo nos animais SS, ST, DS e DT não sofreu alteração. Desta forma, o gânglio celiaco esquerdo foi identificado entre as artérias celiaca e mesentérica cranial, ventralmente à glândula adrenal esquerda (Figura 5).

Figura 5 – Localização do gânglio celiaco esquerdo nos grupos estudados. AAA = aorta abdominal, AC = artéria celiaca, AMC = artéria mesentérica cranial e GCE = gânglio celiaco esquerdo

Após, retirado e dissecado os gânglios celíacos foram medidos em seus três eixos: comprimento, largura e espessura. A seguir, na tabela 3, estão representados estes valores nos grupos estudados não havendo diferenças significativas entre os grupos no comprimento ($p=0,72$), na largura ($p=0,15$) e na espessura ($p=0,67$).

Tabela 3 – Medidas de comprimento, largura e espessura do gânglio celiaco esquerdo nos grupos estudados

<i>Grupos</i>	<i>Comprimento (mm)</i>	<i>Largura (mm)</i>	<i>Espessura (mm)</i>
SS	4,87 (0,03)	2,20 (0,06)	1,48 (0,05)
ST	5,09 (0,07)	2,08 (0,10)	1,45 (0,10)
DS	5,02 (0,02)	2,12 (0,14)	1,55 (0,16)
DT	4,95 (0,08)	2,41 (0,08)	1,58 (0,12)

6.7 MICROESTRUTURA DO GÂNGLIO

Os neurônios do gânglio celiaco dispunham-se, nos animais saudáveis de maneira mais condensada e homogênea. Já nos diabéticos sedentários foi observado que os neurônios ganglionares estavam mais dispersos, entretanto nos animais diabéticos treinados os neurônios estavam distribuídos de forma semelhante aos animais saudáveis (Figura 6).

Os perfis dos neurônios ganglionares puderam ser facilmente identificados devido ao seu padrão morfológico típico. Quanto à forma, os perfis neuronais eram elipsóides, circulares e losângicos. Observou-se também que o núcleo era único (mononucleado), e se dispunha de maneira periférica, porém núcleos centrais também foram observados (Figura 6).

Figura 6 – Fotomicrografia do Gânglio Celiaco Esquerdo dos animais estudados (A: SS, B: ST, C: DS e D: DT, exibindo perfis de neurônios onde se nota: corpo celular (a), núcleos (b), nucléolos (c), e suas formas, elipsóides (d), circulares (e) e losângicos (f). Técnica de coloração: Giemsa. Escala de barra= 25µm

6.8 ESTUDO ESTEREOLÓGICO

Os parâmetros estereológicos estudados foram: volume do gânglio celiaco (V_{ref}), número total de neurônios (N) e volume neuronal médio ($\bar{V}_N$).

6.8.1 Volume do gânglio celiaco (V_{ref})

O volume do GCE foi de $0,24 \text{ mm}^3$ (0,01) e coeficiente de erro de 1,43% no SS, de $0,23 \text{ mm}^3$ (0,01) e coeficiente de erro de 1,16% no ST, de $0,28 \text{ mm}^3$ (0,08) e coeficiente de erro 1,26% no DS e de $0,36 \text{ mm}^3$ (0,14) com coeficiente de erro de 1,15 no DT. Entre os grupos não houve diferenças significativas ($p=0,25$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Volume do gânglio celiaco (Princípio de Cavalieri) nos grupos: SS, ST, DS e DT. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média

6.8.2 Número total de neurônios do gânglio celíaco (N)

O número total de neurônios do gânglio celíaco no SS foi de 39204 (0,15) e seu coeficiente de erro 7,11%, no ST foi de 39165 (0,08) com coeficiente de erro de 6,55%, no DS foi de 28854 (0,10) e seu coeficiente de erro foi de 7,99% e no DT foi de 36003 (0,17) com coeficiente de erro de 6,17% (Gráfico 7). Os grupos SS e ST não apresentaram diferenças significantes ($p=1,0$). Ao analisar o DS, este foi diferente em relação ao SS ($p=0,04$) e em relação ao ST ($p=0,03$) e não foi diferente do DT ($p=0,18$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Número Total de neurônios nos grupos: SS, ST, DS e DT. * $p=0,04$ vs. SS. § $p=0,03$ vs. ST. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média

6.8.3 Volume médio dos neurônios do gânglio celíaco ($\bar{V}_N$)

O volume neuronal médio do SS foi de $7072,51 \mu\text{m}^3$ (0,24), do ST foi de $7918,15 \mu\text{m}^3$ (0,17), do DS foi de $9151,17 \mu\text{m}^3$ (0,07) e no DT foi de $9288,60 \mu\text{m}^3$ (0,24). Entre os grupos não houve diferenças significativas ($p=0,17$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Volume neuronal médio nos grupos: SS, ST, DS e DT. Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais a média

7 DISCUSSÃO

Diversos estudos nos últimos anos têm buscado diferentes intervenções com o objetivo de prevenir e/ou tratar o diabetes, bem como suas complicações (MAEDA et al., 1995; DALL'AGO et al., 1997; DE ANGELIS et al., 2000). O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de métodos estereológicos, a microestrutura do gânglio celíaco de ratos diabéticos (Diabetes mellitus) tipo 1 induzidos por estreptozotocina (STZ) e submetidos a treinamento físico.

Os resultados evidenciam prejuízo metabólico e hemodinâmico nos ratos diabéticos sedentários. Além de uma redução na população neuronal do gânglio celíaco destes ratos. Todavia, o achado mais importante de nosso trabalho foi que o treinamento físico reverteu a perda de neurônios do gânglio celíaco observada nos diabéticos sedentários.

7.1 ASPECTOS METABÓLICOS DO DIABETES MELLITUS

A atividade diabetogênica da estreptozotocina mostra que esta é um agente conveniente para a indução de um estado severo de diabetes (JUNOD et al., 1967). Conforme descrito na literatura, a estreptozotocina administrada em uma única injeção intravenosa no presente estudo induziu hiperglicemia e redução do peso corporal no grupo diabético (MAEDA et al., 1995; DALL'AGO et al., 1997; DE ANGELIS et al., 2000).

Em relação ao treinamento físico, no grupo saudável, o presente estudo corrobora estudos anteriores que demonstram que esses animais apresentam peso corporal superiores no final do experimento em relação ao peso inicial, que em nosso estudo este aumento foi de 58%, ainda, no final do experimento os animais saudáveis sedentários e saudáveis treinados não apresentaram diferenças em relação ao peso corporal. De fato, Silva, Melo e Oliveira (2007) avaliaram o efeito do treinamento aeróbico e de força sobre o peso corporal de ratos, os resultados evidenciaram que os grupos sedentários e treinados tiveram valores de peso corporal estatisticamente superiores no final do experimento quando comparados ao peso inicial. Além disso, o peso corporal final dos animais exercitados e não exercitados se manteve, independentemente do tipo de atividade ao qual foram submetidos.

Quanto aos diabéticos treinados o peso corporal foi semelhante aos diabéticos sedentários. Diferentemente dos nossos achados, De Angelis et al. (2002), demonstraram em seu estudo que o treinamento físico induziu um melhor controle do peso corporal, ou seja, os animais diabéticos treinados ganharam peso corporal em relação aos sedentários, provavelmente devido a um melhor controle metabólico.

Em relação à glicemia, esta não se alterou após 10 semanas de treinamento físico. De fato, estudos demonstram que o treinamento físico dinâmico em diabéticos do tipo 1 melhora a sensibilidade à insulina, mas não induz melhora no controle glicêmico (SCHNEIDER; MORGADO, 1995; RAILE et al., 1999). Somado a esses autores, Zinman, Zuniga-Guajardo e Kelly (1984) demonstraram que o treinamento físico não modificou a glicemia, a hemoglobina glicosilada ou a reposição de insulina em indivíduos com DM do tipo 1. Entretanto, Mosher et al. (1998) evidenciaram redução dos níveis de hemoglobina glicosilada em adolescentes portadores de DM do tipo 1 submetidos a treinamento físico. Além disso, em outro estudo envolvendo 142 portadores de DM do tipo 1 em idade escolar (6 a 18 anos) foi observada correlações entre o aumento das atividades esportivas com a redução da reposição diária de insulina, mas não com alterações da hemoglobina glicosilada (RAILE et al., 1999).

7.2 DIABETES MELLITUS E TREINAMENTO FÍSICO

O teste de esforço é um dos exames não invasivos para avaliar a capacidade física. Essa avaliação permite detectar isquemia miocárdica, arritmias cardíacas, distúrbios hemodinâmicos induzidos pelo exercício, avaliar a capacidade funcional, avaliar o diagnóstico e o prognóstico das doenças cardiovasculares e prescrever exercício (NEGRÃO; BARRETO, 1998)

Nosso trabalho evidenciou melhora na capacidade física nos grupos que foram submetidos ao protocolo de 10 semanas treinamento físico em esteira ergométrica. O grupo saudável treinado apresentou um aumento de 107% na capacidade física e o diabético treinado um aumento de 75% da velocidade alcançada ao longo do estudo em relação ao teste de esforço inicial.

Na literatura a melhora da capacidade física tem sido considerada um marcador da eficiência do protocolo de treinamento físico, sendo um achado comum pós treinamento em ratos controles, diabéticos, velhos, infartados e hipertensos (DE ANGELIS et al., 1997, 1999,

2000; MUSCH et al., 1989; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003), bem como em humanos saudáveis (BLAIR et al., 1989), homens hipertensos (KOKKINOS et al., 1995) e em indivíduos pós infarto do miocárdio (LA ROVERE et al., 2002). Resultados semelhantes foram obtidos em mulheres pré menopausa (GREEN et al., 2002), menopausadas sem (GREEN et al., 2002; IRWIN et al., 2003; KIRWAN et al., 2003; AIELLO et al., 2004) e com reposição hormonal (GREEN et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003). Protocolos com dieta e treinamento físico, realizando ou não a reposição hormonal, também evidenciaram melhora da capacidade física (STEFANICK et al., 1998).

Utilizando medidas diretas da pressão arterial batimento a batimento, demonstrou-se redução na frequência cardíaca (19%) e na pressão arterial média (12%) no grupo de ratos diabéticos sedentários. De fato, diversos autores, utilizando técnicas de medida direta (MAEDA et al., 1995; DALL'AGO et al., 1997; SCHAAAN et al., 1997; DE ANGELIS et al., 2000), têm demonstrado repetidamente queda de PA basal em ratos diabéticos em diferentes tempos de diabetes experimental.

A redução na FC em animais diabéticos sedentários tem sido atribuída a alterações no nodo sinoatrial (MAEDA et al., 1995; DALL'AGO et al., 1997). Em relação à pressão arterial, Jackson e Carrier (1983) sugerem que a hipotensão em ratos diabéticos sedentários pode ser resultado de um débito cardíaco diminuído devido à hipovolemia causada por diurese osmótica hiperglicêmica. Associado a esses autores, Gama et al. (2002) demonstraram redução do débito cardíaco em ratos diabéticos por STZ (15 dias) a qual esta provavelmente relacionada à redução da FC e da contratilidade miocárdica observadas no diabetes por STZ (MAEDA et al., 1995; DALL'AGO et al., 1997; DE ANGELIS et al., 2000).

Entretanto, existem observações de aumento de PA nestes animais (KAWASHIMA et al., 1978; BUNÃG; TOMIDA; SASAKI, 1982; FEIN et al., 1991; TAKED et al., 1991). Na maioria dos trabalhos que demonstraram hipertensão basal, foram usadas técnicas indiretas de medida de PA, através de pletismografia de cauda. Neste método, o aumento do tecido fibroso na cauda dificulta a oclusão da artéria caudal induzindo erros sistemáticos na medida da PA. É provável, portanto, que essa diferença nos níveis pressóricos basais deva-se aos diferentes métodos usados para a medida de PA (CARRIER; ARONSTAM, 1987).

Quanto ao treinamento físico o presente estudo demonstra que o mesmo causou uma redução de 8% na FC e manutenção da PAM dos ratos saudáveis treinados. De fato, estudos de nosso laboratório, mostraram que um programa de treinamento físico de 10 semanas causou diminuição de 12% da frequência cardíaca em ratos saudáveis e não houve efeito sobre a pressão arterial média (CAVALCANTI et al., 2009). Em relação à pressão arterial,

diferente de nossos resultados, outros estudos demonstraram redução da pressão arterial, porém em animais hipertensos. De fato, Silva et al. (1997) demonstraram em seu estudo que esse efeito é mais pronunciado em indivíduos hipertensos, uma vez que a maioria dos estudos realizados em normotensos não mostrou modificação da pressão arterial (SILVA et al., 1997)

Nos diabéticos treinados não foi diferente os valores de FC em relação aos animais diabéticos sedentários. Confrontando esses achados, De Angelis et al. (2000) observaram aumento da FC de repouso em ratos diabéticos treinados que foi positivamente correlacionado a uma melhora na FC intrínseca e foi acompanhada por atenuação do prejuízo no tônus vagal. Interessantemente, os valores médios de FC apresentados pelos diabéticos treinados são semelhantes aos observados em animais velhos e hipertensos treinados (GAVA et al., 1995; DE ANGELIS et al., 1997), sugerindo que o treinamento físico modificou de forma positiva a FC desses animais. Em contraste, outros estudos demonstraram que o treinamento físico diminui a FC basal em ratos normotensos (NEGRÃO et al., 1992) e hipertensos (GAVA et al., 1995) e em humanos, possivelmente relacionado à diminuição da FC intrínseca e/ou da atividade simpática e/ou a um aumento do tônus vagal para o coração após o treinamento físico.

A avaliação global das trocas gasosas pulmonares pode se basear na mensuração das tensões dos gases no sangue arterial, isto é, pressões parciais arteriais de oxigênio (PaO_2) e dióxido de carbono ($PaCO_2$), que podem ser avaliadas através do exame de hemogasometria arterial. Em nosso estudo o treinamento não melhorou a PaO_2 induzida pelo exercício. De fato, isto fora registrado por Thornton, Essén-Gustavsson, Lindholm (1983) e Butler, Woakes, Anderson (1991). Além destes autores, Roberts, Marlin e Lekeux (1999), demonstraram que o treinamento ao invés de aumentar a PaO_2 , induz hipoxemia e hipercapnia de forma mais pronunciada.

Em relação aos valores de $PaCO_2$ encontrado após a realização de 10 semanas do treinamento físico não foi diferente entre os grupos estudados. Em pessoas submetidas a exercício submáximo com os mesmos requerimentos de energia, a $PaCO_2$ se mantém inalterada (SALTIN; BLOMQUIST; MITCHEL, 1968) ou levemente diminuída (ECKBLOM; ASTRAND; SALTIN, 1968), quando se compara indivíduos treinados e não treinados.

7.3 MACROESTRUTURA QUANTITATIVA

Em relação ao comprimento, largura e espessura, no presente estudo, estes valores não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. De fato, Cavalcanti et al. (2009) ao estudar um outro gânglio simpático, o estrelado, de ratos saudáveis submetidos ao protocolo de treinamento físico semelhante ao utilizado no presente estudo, observaram que os animais após 10 semanas de treinamento físico não apresentaram diferenças nas medidas de comprimento, largura e espessura.

Entretanto, estudos do nosso laboratório realizado no gânglio celíaco de cães diabéticos e saudáveis sedentários revelaram uma hipertrofia nessa estrutura dos animais diabéticos, ou seja, 55% em comprimento, 53% em largura e 61,5% na espessura (GUIDI et al., 2008). Além deste estudo, Gomes et al. (2009), ao analisar o gânglio celíaco esquerdo de ratos demonstraram uma redução nas medidas de comprimento, largura e espessura em animais nutridos comparados a animais desnutridos, causada pela deficiência de proteína.

7.4 MICROESTRUTURA QUANTITATIVA (ESTUDO ESTEREOLÓGICO)

A microestrutura quantitativa (estudo estereológico) foi dividida em: volume do gânglio celíaco, número total de neurônios do gânglio celíaco e volume neuronal médio do gânglio celíaco.

7.4.1 Volume do gânglio celíaco

Para avaliar o volume do GCE foi usado o Princípio de Cavalieri que tem sido reportado como sendo um método eficiente e acurado (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; GUNDERSEN et al., 1988).

Diversos fatores podem alterar a estrutura ganglionar e seus componentes entre eles a idade, o exercício físico (GAMA et al.2010) doenças, entre elas o diabetes (SCHMIDT et al.

1993). De fato, Kamal, Tay e Wong (1991) ao analisar a morfologia a nível ultraestrutural, observaram mudanças nos gânglios cardíacos de ratos diabéticos induzidos por STZ. Na fase média (1 a 6 meses de diabetes) a degeneração das terminações axônicas, assim como dos axônios mielinizados e não-mielinizados, foi consistentemente observada nesses animais, além disso, mostraram que essas degenerações nos gânglios cardíacos parecem ser progressivas. Assim, avaliamos os efeitos do treinamento, do diabetes e da interação dos mesmos na estrutura do gânglio celíaco.

Ao estudar outro órgão, o rim, Heidari et al. (2003) demonstraram que o volume do rim foi maior nos ratos diabéticos em relação aos saudáveis. Em nosso estudo, ao verificarmos o volume do gânglio celíaco esquerdo dos ratos diabéticos, estes não foram diferentes dos saudáveis.

Ao avaliarmos os efeitos do treinamento físico no gânglio celíaco nos animais estudados observamos que o volume não alterou. De fato, Cavalcanti et al. (2009) ao avaliarem o gânglio estrelado de ratos saudáveis submetidos a 10 semanas de treinamento físico observaram que este não alterou o volume ganglionar. Além disso, Gomes et al. (2009), ao analisar o gânglio celíaco esquerdo em ratos com restrição de proteínas demonstrou uma redução no volume ganglionar nestes animais em relação aos animais com dieta normoproteica.

7.4.2 Número total de neurônios do gânglio celíaco

Nos animais diabéticos, estudos têm demonstrado que uma das complicações do diabetes é a neuropatia que compromete os sistemas nervosos somático (sensitivo e motor) e autonômico (simpático e parassimpático). No presente estudo, analisamos a inervação pancreática extrínseca, representada pelo gânglio celíaco esquerdo de ratos diabéticos submetidos a treinamento físico, visto que estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a neuropatia autonômica diabética é caracterizada, inicialmente, por disfunção vagal (parassimpática) e posteriormente por disfunção no sistema nervoso simpático (NATHAN, 1993; BARRON et al., 1994). De fato, encontramos nos animais diabéticos sedentários uma redução de 26% na população neuronal, o que sugere um comprometimento do sistema nervoso autônomo simpático. Esta redução poderia explicar, em parte, a bradicardia e a hipotensão de repouso encontrado nestes animais.

Corroborando com nossos achados Schmidt et al. (1993) relataram uma diminuição de 14% no perfil da densidade neuronal no gânglio mesentérico superior, mas não no gânglio cervical superior de pacientes humanos diabéticos.

Mais recentemente, Schmidt (2001) relataram que 10 meses de diabetes experimental grave não tratada não conseguiu produzir tanta perda de neurônios e diminuição significativa na densidade neuronal. Entretanto, vale ressaltar, que os métodos empregados neste estudo foram bidimensionais, que diferem do empregado em nosso estudo, tridimensional, que tem sido descrito por outros autores como um método mais acurado para a estimativa do número total (GUIDI et al.; 2008).

Nos diabéticos treinados houve uma reversão da perda de neurônios em relação aos animais sedentários. Esta reversão foi de 25%, sugerindo o treinamento físico como uma conduta não farmacológica no tratamento da neuropatia diabética autonômica. Da mesma forma, Nascimento et al. (2010), ao estudar os efeitos do exercício físico no gânglio da raiz dorsal L5 de ratos diabéticos mostraram que a redução do volume celular ocasionados pelo diabetes foi prevenida ou revertida pelo treinamento físico.

Ao analisar os efeitos do treinamento físico no número total de neurônios dos animais saudáveis, estes não alteram após 10 semanas do protocolo de exercício físico. Corroborando nossos achados Cavalcanti et al. (2009) verificaram que o treinamento físico por 10 semanas em esteira ergométrica não alterou o número total de neurônios do gânglio estrelado em relação aos animais sedentários.

7.4.3 Volume neuronal médio

Uma vez que os métodos estereológicos são utilizados para estimar volumes de partículas sem assumir forma, tamanho, orientação ou distribuição das células (GUNDERSEN et al., 1988). Neste sentido, o volume médio se revela muito mais acurado do que a estimativa de tamanho baseado simplesmente em uma área seccional.(TANDRUP, 2004).

Ao avaliar os efeitos de 10 semanas de treinamento físico moderado em esteira ergométrica no gânglio estrelado de ratos saudáveis, Cavalcanti et al. (2009) demonstraram que os animais saudáveis treinados apresentaram um volume neuronal médio maior em

relação ao sedentários, sugerindo que esta hipertrofia possa ser em resposta à sobrecarga funcional imposta pelo exercício físico e uma resposta ou recrutamento à ativação simpática, que normalmente, ocorre após o treinamento. Diferentemente, em nosso estudo, os animais saudáveis treinados não apresentaram diferenças no seu volume ganglionar médio em relação aos saudáveis sedentários.

Segundo Guidi et al. (2008) a neuropatia diabética está associada a uma hipertrofia neuronal, existindo a possibilidade desta hipertrofia neuronal ser um mecanismo de compensação para uma perda neuronal durante o curso do diabetes mellitus. De fato, no sistema nervoso central a hipertrofia de neurônios também tem sido relatada como um mecanismo para compensar a perda neuronal durante o envelhecimento ou sobrecarga funcional (Cabello et al., 2002). Diferentemente destes estudos, nossos achados não demonstraram diferença do volume neuronal médio nos diabéticos, o que podem estar relacionado à amostra do nosso estudo, bem como pela alta variabilidade entre os grupos e no próprio grupo. Além disso, não se pode descartar o fato de que esses animais foram submetidos a 10 semanas de diabetes, ou seja, será que se o tempo de diabetes fosse maior a hipertrofia nos neurônios do gânglio celiaco seria observada?

Outro fato se refere à dosagem de STZ administrada para a indução do diabetes que pode ter efeitos diferentes no gânglio celiaco. De fato, Heidari et al. (2003) demonstraram em seu estudo que diferentes dosagens de STZ tem diferentes efeitos e dosagens mais elevadas tem mais efeitos na estrutura dos rins desses animais.

Vale ressaltar, que os animais diabéticos treinados também não apresentaram um aumento do volume médio dos neurônios, o que pode sugerir que o treinamento físico seja um componente importante para manter este parâmetro semelhante aos valores de animais saudáveis.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e dos métodos empregados foi possível concluir que o diabetes acarretou em uma perda neuronal e não alterou o volume do gânglio e nem seu volume neuronal médio. Além disso, o treinamento físico aeróbio por 10 semanas em esteira ergométrica aplicado nos animais diabéticos reverteu a perda neuronal observado nos animais diabéticos sedentários.

Dessa forma, é pertinente propor que o treinamento físico aeróbio moderado tenha efeito terapêutico no advento da neuropatia diabética autonômica.

Referências

REFERÊNCIAS

ABEDI, M.; ZFASS, A. M. Endoscopic ultrasound-guided (Neurolytic) celiac plexus block. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 32, n. 5, p. 390-393, 2001.

ABRAHÃO, L.M.B.; NYENGAARD, J.R.; SASAHARA, T.H.C.; GOMES, S.P.; OLIVEIRA, F.O.; LADD, F.V.L.; LADD, A.A.B.L.; MELO, M.P.; MACHADO, M.R.F.; MELO, S.R.; RIBEIRO, A.A.C.M. Asymmetric post-natal development of superior cervical ganglion of paca (Agouti paca). **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, p. 37-45, 2009.

AIELLO, E. J.; YASUI, Y.; TWOROG, S. S.; ULRICH, C. M.; IRWIN, M. L.; BOWEN, D.; SCHWARTZ, R. S.; KUMAI, C.; POTTER, J. D.; MCTIERNAN, A. Effect of yearlong, moderate intensity exercise intervention on the occurrence and severity of menopause symptoms in postmenopausal women. **Menopause**, v. 11, n. 4, p. 382-388, 2004.

BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 142, (Pt. 3), p. 259-276, 1986.

BARRON, S. A.; ROGOVSKI, Z.; KANTER, Y.; HEMLI, Y. Parasympathetic autonomic neuropathy in diabetes mellitus: the heart is denervated more often than the pupil. **Electromyography and Clinical Neurophysiology**, v. 34, n. 8, p. 467-469, 1994.

BLAIR, S. H.; KOHL III, H. W.; PAFFENBARGER R. S. JR; CLARK, D. G.; COOPER, K. H.; GIBBONS, L. W. Physical fitness and all cause mortality. A prospective study of healthy men and women. **The journal of the American Medical Association**, v. 262, p. 2395-2401, 1989.

BOTTINI, P.; BOSCHETTI, E.; PAMPANELLI, S.; CIOFETTA, M.; DEL SINDACO, P.; SCIONTI, L.; BRUNETTI, P.; BOLLI, G. B. Contribution of autonomic neuropathy to reduced plasma adrenaline responses to hypoglycemia in IDDM: evidence for a nonselective defect. **Diabetes**, v. 46, n. 5, p. 814-823, 1997.

BOTTINI, P.; TANTUCCI, C.; SCIONTI, L.; DOTTORINI, M. L.; PUXEDDU, E.; REBOLDI, G.; BOLLI, G. B.; CASUCCI, G.; SANTEUSANIO, F.; SORBINI, C. A.; BRUNETTI, P. Cardiovascular response to exercise in diabetic patients: influence of autonomic neuropathy of different severity. **Diabetologia**, v. 38, n. 2, p. 244-250, 1995.

BUÑAG, R. D.; TOMIDA, T.; SASAKI, S. Streptozotocin diabetic rats are hypertensive despite reduced hypothalamic responsiveness. **Hypertension**, v. 4, n. 4, p. 556-565, 1982.

BUTLER, P. J.; WOAKES, A. J.; ANDERSON, L. S. The effect of cessation of training on cardiorespiratory variables during exercise. In: PERSSON, S. G. B.; LINDHOLM, A.; JEFFCOTT, L. B. **Equine Exercise Physiology 3**. Davis, CA: ICEEP Publications, 1991, p. 71-76.

CABELLO, C. R.; THUNE, J. J.; PAKKENBERG, H.; PAKKENBERG, B. Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 28, p. 283-291, 2002.

CARRIER, G. O.; ARONSTAM, R. S. Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 242, n. 2, p. 531-535, 1987.

CAVALCANTI, R. A. O.; PUREZA, D. Y.; MELO, M. P.; SOUZA, R. R.; BERGAMASCHI, C. T.; AMARAL, S. L.; TANG, H.; LOESCH, A.; RIBEIRO, A. A. C. M. Low-intensity Treadmill exercise-related changes in the rat stellate ganglion neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 1334-1342, 2009.

DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G.; MACHADO, U. F.; BELLÓ, A. A.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin (stz) Diabetic Rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 1, p. 119-124, 1997.

DE ANGELIS, K.; SCHAAN, B. D.; MAEDA, C. Y.; DALL'AGO, P.; WICHI, R. B.; IRIGOYEN, M. C. Cardiovascular control in experimental diabetes. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1091-1100, 2002.

DE ANGELIS, K. L. D.; GADONSKI, G.; FANG, J.; DALL'AGO, P.; ALBUQUERQUE, V. L.; PEIXOTO, L. R. A.; FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained LNAME hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 2, p. 768-772, 1999.

DE ANGELIS, K. L. D.; OLIVEIRA, A. R.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO L. R. A.; GADONSKI, G.; FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 635-641, 2000.

DE ANGELIS, K. L. D.; OLIVEIRA, A. R.; WERNER, A.; BOCK, P.; BELLÓKLEIN, A.; IRIGOYEN, M. C. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 767-771, 1997.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; GIUGLIANI, E. R. J. **Medicina ambulatorial: condutas clínicas em atenção primária**, 2. ed., Artes Médicas, Porto Alegre: 1996.

ECKBLUM, B.; ASTRAND, P. O.; SALTIN, B. Effects of training on the circulatory response to exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 24, p. 518-528, 1968.

FEIN, F. S.; MILLER, B.; FLORES, M.; MORTON, E. Myocardial adaptation to chronic propranolol therapy in diabetic rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17, n. 5, p. 846-853, 1991.

FILHO, J. D. R.; BALBINOT, P. Z.; VIANA, J. A.; DANTAS, W. M. F.; MONTEIRO, B. S. Hemogasometria em cães com desidratação experimental tratados com soluções eletrolíticas comerciais administradas por via intravenosa. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1914-1919, 2008.

FLORES, L.J.F. **Efeitos do treinamento físico em ratas ooforectomizadas e infartadas: avaliações do controle autonômico da circulação**. 2006. 142 p. Dissertação (Mestrado), Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, 2006.

- GABELLA, G. **The rat autonomic nervous system**. New York: Elsevier, 2004, p. 77-109.
- GAMA, E. F.; SANTARÉM, J. M.; LIBERTI, E. A.; FILHO, W. J.; DE SOUZA, R. R. Exercise changes the size of cardiac neurons and protects them from age-related neurodegeneration. **Annals of Anatomy**, v. 192, p. 52–57, 2010.
- GAMA, V. M. M.; DE ANGELIS, K.; HARTHMANN, A.; IRIGOYEN, M. C.; FARAH, V. M. A. Impairment of cardiac output and changes in regional blood flows in streptozotocin induced-diabetic rats. **FASEB Journal**, v. 16, p. 864, 2002.
- GAVA, N. S.; VÉRAS-SILVA, A. S.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac β -adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 26, n. 6, (Pt. 2), p. 1129-1133, 1995.
- GOMES, S. P.; NYENGAARD, J. R.; MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; CASTELUCCI, P.; BLAZQUEZ, F. H.; DE MELO, M. P.; RIBEIRO, A. A. Atrophy and neuron loss: effects of a protein-deficient diet on sympathetic neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 16, p. 3568-3575, 2009.
- GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport and insulin sensitivity. **Annual of Review Medicine**, v. 49: p. 235-261, 1998.
- GREEN, J. S.; STANFORTH, P. R.; GAGNON, J.; LEON, A. S.; RAO, D. C.; SKINNER, J. S.; BOUCHARD, C.; RANKINEN, T.; WILMORE, J. H. Menopause, estrogen, and training effects on exercise hemodynamics: the HERITAGE study. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, n. 1, p. 74-82, 2002.
- GUIDI, W. L.; BALIEIRO, J. C.; DE SOUZA, R. R.; LOESCH, A.; RIBEIRO, A. A. Diabetes mellitus-related morphoquantitative changes in the celiac ganglion neurons of the dog. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 54-62, 2008.
- GUNDERSEN, H. J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 379 – 394, 1988.
- GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v. 147, p. 229-263, 1987.
- GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B.; KIÊU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, Pt. 3, p. 199-211, 1999.
- HARDMAN, A. E. Exercise in prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: a review. **Journal of Sports Science**, v. 14, n. 3, p. 201-218, 1996.
- HEIDARI, Z.; SAGHEB, H.R.M.; RAFIGHDOOST, H.; ALI MOEIN, A.; MUGAHI, M.H.N.; MINAI, B. A stereological study of diabetic kidney following administration of different doses of streptozotocin. **DARU**, v. 11, n. 3, 2003.

- HILSTED, J.; GALBO, H.; CHRISTENSEN, N. J. Impaired cardiovascular responses to graded exercise in diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes**, v. 28, n. 4, p. 313-319, 1979.
- HOWARD, V.; REED, M. G. **Unbiased stereology**: three-dimensional measurement in microscopy. New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers. p. 277, 2005.
- IRWIN, M. L.; YASUI, Y.; ULRICH, C. M.; BOWEN, D.; RUDOLPH, R. E.; SCHWARTZ, R. S.; YUKAWA, M.; AIELLO, E.; POTTER, J. D.; MCTIERNAN, A. Effects of exercise on total and intra abdominal body fat in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **The journal of the American Medical Association** ; v. 289, p. 323-330, 2003.
- IVY, J. L. Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Sports Medicine**, v. 24, n. 5, p. 321-336, 1997.
- JACKSON, C. V.; CARRIER, G. O. Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 260-265, 1983.
- JENNINGS, G.; NELSON, L.; DEWAR, E.; KORNER, P.; ESLER, M.; LAUFER, E. Antihypertensive and hemodynamic effects of one year's regular exercise. **Journal of Hypertension**, v. 4, p. 659-661, 1986.
- JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; ORCIL PICTET, R.; GONET, A. E.; REINOULD, A. E. Studies of the diabetogenic action of streptozocin. **Proceeding of Society Experimental Biology Medicine**, v. 126, n. 1, p. 201-205, 1967.
- KAMAL, A. A.; TAY, S. S.; WONG, W. C. The cardiac ganglia in streptozotocin induced diabetic rats. **Archives of Histology and Cytology**, v. 54, n. 1, p. 41-49, 1991.
- KAWASHIMA, H.; IGARASHI, T.; NAKAJIMA, Y.; AKIYAMA, Y.; USUKI, K.; OHTAKE, S. Chronic hypertensin induced by streptozotocin in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 305, p. 123-126, 1978.
- KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. "Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections". **Diabetes Care**, v. 21, p. 1414-1431, 1998.
- KIRWAN, L. D.; MERTENS, D. J.; KAVANAGH, T.; THOMAS, S. G.; GOODMAN, J. M. Exercise training in women with heart disease: influence of hormone replacement therapy. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 2, p. 185-192, 2003.
- KOKKINOS, P. F.; NARAYAN, P.; COLLERAN, J. A.; PITTARAS, A.; NOTARGIACOMO, A.; REDA, D.; PAPADEMETRIOU, V. Effects of regular exercise on blood pressure and left ventricular hypertrophy in African American men with severe hypertension. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 22, p. 1462-1467, 1995.
- LA ROVERE, M. T.; BERSANO, C.; GNEMMI, M.; SPECCHIA, G.; SCHWARTZ, P. J. Exercise induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. **Circulation**, v. 106, p. 945-949, 2002.
- LEFEBVRE, P. Diabetes yesterday, today and tomorrow. The action of the International

Diabetes Federation. **Revue Médicale le Liège**, v. 60, n. 5-6, p. 273-277, 2005.

LEVITT, N. S.; STANSBERRY, K. B.; WYNCHANK, S.; VINIK, A. I. The natural progression of autonomic neuropathy and autonomic function tests in a cohort of people with IDDM. **Diabetes Care**, v. 19, n. 7, p. 751-754, 1996.

MAEDA, C. Y.; FERNANDES, T. G.; LULHIER, F.; IRIGOYEN, M. C. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 497-501, 1995.

MALICK, K. J.; MCGRATH, K. M. Endoscopic ultrasound-guided injection: a close look at celiac plexus block and celiac plexus neurolysis. **Gastroenterology Nursing**, v. 26, n. 4, p. 159-163, 2003.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri Principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133-144, 1991.

MELO, R. M.; MARTINHO JR, E.; MICHELINI, L. C. Training-induced, pressurelowering effect in SHR wide effects on circulatory profile of exercise and nonexercised muscles. **Hypertension**, v. 42, p. 851-857, 2003.

MIOLAN, J. P.; NIEL, J. P. The mammalian sympathetic prevertebral ganglia: integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 58, p. 125-138, 1996.

MOSHER, P. E.; NASH, M. S.; PERRY, A. C.; LAPERRIERE, A. R.; GOLDBERG, R. B. Aerobic circuit exercise training: effect on adolescents with well-controlled insulin dependent diabetes mellitus. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 79, n. 6, p. 652-657, 1998.

MUSCH, T. I.; MOORE, R. L.; SMALDONE, P. G.; RIEDY, M.; ZELIS, R. Cardiac adaptations to endurance training in rats with a chronic myocardial infarction. **Journal of Applied Physiology**, v. 66, n. 2, p. 712-719, 1989.

NARAYAN, K. M. V.; GREGG, E. W.; FAGOT-CAMPAGNA, A.; ENGELGAN, M. M.; VINICOR, F. Diabetes- a common growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 50, p. S77-S84, 2000.

NASCIMENTO, P.S.; MALYSZ, T.; ILHA, J.; ARAUJO, R.T.; HERMEL, E.E.; KALIL-GASPAR, P.I.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; SCHAAN, B.D.; ACHAVAL, M. Treadmill training increases the size of A cells from the L5 dorsal root ganglia in diabetic rats. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 6, p. 719-32, 2010.

NATHAN, D. M. Long-term complications of diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 23, p. 1676-1685, 1993.

NATHAN, D. M.; DUNN, F. L.; BRUCH, J.; MCKITRICK, C.; LARKIN, M.; HAGGAN, C.; LAVIN-TOMPKINS, J.; NORMAN, D.; ROGERS, D.; SIMON, D. Postprandial insulin profiles with implantable pump therapy may explain decreased frequency of severe

hypoglycemia, compared with intensive subcutaneous regimens, in insulin-dependent diabetes mellitus patients. **The American Journal of Medicine**, v. 100, n. 4, p. 412-417, 1996.

NEGRÃO, C. E.; BARRETO, A. C. P. Efeito do treinamento físico na insuficiência cardíaca: Implicações autonômicas, hemodinâmicas e metabólicas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 273-284, 1998.

NEGRÃO, C. E.; MOREIRA, E. D.; SANTOS, M. C. L. M.; FARAH, V. M. A.; KRIEGER, E. M. Vagal function impairment after exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 5, p. 1749-1753, 1992.

NIAKAN, E.; HARATI, Y.; ROLAK, L. A.; COMSTOCK, J. P.; ROKEY, R. Silent myocardial infarction and diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. **Archives of Internal Medicine**, v. 146, n. 11, p. 2229-2230, 1986.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. **Journal of microscopy**, v. 150, p. 1-20, 1988.

PERSEGHIN, G.; PRICE, T. B.; PETERSEN, K. F.; RODEN, M.; CLINE, G. W.; GEROW, K.; ROTHMAN, D. L.; SHULMAN, G. I. Increased glucose transport phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulinresistant subjects. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 18, p. 1357-1362, 1996.

PUREZA, D.Y. **Modulação autonômica cardíaca em repouso e durante o exercício em ratos diabéticos: avaliações hemodinâmicas e morfométricas de gânglios parassimpáticos cardíacos**. 2006. 98 p. Dissertação (Mestrado), Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, 2006.

RAILE, K.; KAPellen, T.; SCHWEIGER, A.; HUNKERT, F.; NIETZSCHMANN, U.; DOST, A.; KIESS, W. Physical activity and competitive sports in children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 11, p. 1904-1905, 1999.

RAMIRES, P. R. **Efeito do treinamento físico sobre o impacto metabólico provocado pela ingestão de glicose pré-exercício, em indivíduos portadores de diabetes melito insulino-dependente**. 1994. 122 p. Dissertação (Mestrado), Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

RAMIRES, P. R.; FORJAZ, C. L.; SILVA, M. E.; DIAMENT, J.; NICOLAU, W.; LIBERMAN, B.; NEGRAO, C. E. Exercise tolerance is lower in type I diabetics compared with normal young men. **Metabolism**, v. 42, n. 2, p. 191-195, 1993.

RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Reviews**, v. 22, n. 4, p. 485-518, 1970.

RIBEIRO, A. A.; DAVIS, C.; GABELLA, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. **Anatomy and Embryology (Berl)**, v. 208, n. 5, p. 367-380, 2004.

RIBEIRO, A. A. C. M.; ELIAS, C. F.; LIBERTI, E. A.; GUIDI, W. L.; DE SOUZA, R. R.

Structure and ultrastructure of the celiac mesenteric ganglion complex in the domestic dog. **Anatomia histologia Embryologia**, v. 31, p. 344-349, 2002.

RIBEIRO, A. A. C. M.; FERNANDES FILHO, A.; BARBOSA, J.; DE SOUZA, R. R. Estudo anatômico dos gânglios celíacos, celíaco mesentérico e mesentérico cranial e de suas conexões no gato doméstico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 267-272, 2000.

RIBEIRO, A. A. C. M.; MIGLINO, M. A.; DE SOUZA, R. R. Estudo anatômico dos gânglios celíaco, celíaco mesentérico e mesentérico cranial e de seus componentes aferentes em fetos de búfalos sem raça definida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 109-114, 2000.

ROBERTS, C. A.; MARLIN, D. J.; LEKEUX, P. The effects of training on ventilation and blood gases in exercising thoroughbreds. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 30, p. 57-61, 1999. Supplement.

SALTIN, B.; BLOMQUIST, G.; MITCHELL, J. Response to exercise after bed rest and after training. **Circulation**, Baltimore, v. 38, p. 1-78, 1968. Supplement.

SCHAAN, B. D.; MAEDA, C. Y.; TIMM, H. B.; MEDEIROS, S.; MORAES, R. S.; FERLIN, E.; FERNANDES, T. G.; RIBEIRO, J. P.; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M. C. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 9, p. 1081-1086, 1997.

SCHMIDT, R.E.. Neuronal preservation in the sympathetic ganglia of rats with chronic streptozotocin-induced diabetes. **Brain Research**, v. 921, p. 256-259, 2001.

SCHMIDT, R.E.; PLURAD, S.B.; PARVIN, C.A.; ROTH, K.A. The effects of diabetes and aging on human sympathetic autonomic ganglia. **American Journal Pathology**, v. 143, n. 1, p. 143-153, 1993.

SCHNEIDER, S. H.; MORGADO, A. Effects of fitness and physical training on carbohydrate metabolism and associated cardiovascular risk factors in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v. 3, p. 378-407, 1995.

SIEMIONOW, M.; DEMIT, Y. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. A review. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 20, n. 3, p. 241-252, 2004

SILVA, G. J. J.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 30, p. 714-719, 1997.

SILVA, D. A.; MELO L. A.; OLIVEIRA, A. C. C. Efeito do treinamento físico na massa corporal de ratos. **Motriz**, v. 13, n. 1, p. 43-50, 2007.

SPALLONE, V.; MENZINGER, G. Autonomic neuropathy: clinical and instrumental findings. **Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 6, p. 346-358, 1997.

STEFANICK, M. L.; MACKEY, S.; SHEEHAN, M.; ELLSWORTH, N.; HASKELL, W.; WOOD, P. D. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 1, p. 12-20, 1998.

TAKED, Y.; MIYAMORE, I.; YONEDA, T.; TAKEDA, R. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 48, p. 2553-2556, 1991.

TANDRUP, T. Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival. **Journal of Neurocytology**, v. 33, n. 5, p. 173-192, 2004.

TEIXEIRA, P. J.; GOING, S. B.; HOUTKOOPER, L. B.; METCALFE, L. L.; BLEW, R. M.; FLINTWAGNER, H. G.; CUSSLER, E. C.; SARDINHA, L. B.; LOHMAN, T. G. Resistance training in postmenopausal women with and without hormone therapy. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 4, p. 555-562, 2003.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. "follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus". **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 160-167, 2003.

THORNTON, J. R.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A. Effects of training and detraining on oxygen uptake, cardiac output, blood gas tensions, pH and lactate concentrations during and after exercise in the horse. In: SNOW, D. H.; PERSSON, S. G. B.; ROSE, R. J. **Equine exercise physiology**, Cambridge: Granta editions, 1983. p. 470-486.

TIPTON, C. M. Exercise training and hypertension, an update. **Exercise and Sport Science Review**, v. 4, p. 447-505, 1991.

VEDEL-JENSEN, E. B.; GUNDERSEN, H. J. G. The Rotator. **Journal Microscopy**, v. 170, p. 35-44, 1993.

YAGIHASHI, S. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy. **Diabetes Metabolism Reviews**, v.11, n. 3, p. 193-225, 1995.

WALLBERG-HERIKSSON, H.; RINCON, J.; ZIERATH, J. R. Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Sports Medicine**, v. 25, n. 1, p. 25-35, 1998.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

ZINMAN, B.; ZUNIGA-GUAJARDO, S.; KELLY, D. Comparison of the acute and long-term effects of exercise on glucose control in type I diabetes. **Diabetes Care**, v. 7, n. 6, p. 515-519, 1984.