MARCO KENJI BUTUGAN

**Influência da progressão do diabetes nos padrões dinâmicos de
recrutamento de fibras musculares analisados através de
eletromiografia de alta densidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa Ciências da Reabilitação
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel de Camargo
Neves Sacco

São Paulo

2014

Dedico este trabalho à minha família, amigos e colegas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que contribuíram para realização deste trabalho, que não foi, absolutamente, uma produção individual e sim a agregação do auxílio e esforço de muitas pessoas. Isto engrandece este mestrado muito mais do que qualquer produção individual e me deixa muito feliz por participar de algo maior que possa auxiliar uma grande quantidade de pessoas no futuro.

Agradeço à professora Isabel por ter sido meu exemplo. Como pesquisadora aprimorou minha visão e raciocínio, me ensinou a observar uma determinada área da ciência como um todo e também reconhecer a contribuição de cada grupo de pesquisa. Como colega, me mostrou o esforço, respeito, ética e a capacidade de liderar e organizar um grupo de pesquisa, que faz com que todos que trabalhem próximos à você sintam segurança na sua capacidade profissional e responsabilidade. Como amiga agradeço por acreditar em mim, mais do que eu mesmo, nas horas difíceis, pelo esforço em compreender minhas limitações e dificuldades. Por tudo isto e mais uma infinidade de coisas que esqueci, o meu muito, muito obrigado.

Agradeço à equipe do Laboratório de Biomecânica do Movimento e da Postura Humana. Pelas conversas, pelo companheirismo, pela ajuda. Graças à este grupo pude desenvolver as habilidades que tornaram possível a realização deste trabalho. Obrigado Francis por ter me acolhido como aluno de iniciação científica, por ter sido indiretamente meu professor de português, por ter estabelecido a

estrutura que permitiu a coleta de dados de cinemática no laboratório e que serão utilizados em projetos futuros. Obrigado Cris, pela sua experiência clínica, pelo seu senso estético que serve de exemplo nas apresentações e principalmente pela sua disposição em ajudar, desde a iniciação científica até a confecção do artigo, muito obrigado. Obrigado Ricky pela ajuda na primeira discussão dos dados, entre as risadas e brincadeiras é que foi possível observar pela primeira vez o que significavam os resultados obtidos. Obrigado Lícia por ter me feito dar risadas quando estava triste, por ter me estimulado a me esforçar um pouco mais quando eu não queria por abdicar de receber minha ajuda quando eu é que precisava da sua, muito obrigado. Obrigado Yuri por escrever comigo o segundo resumo para congresso, por me ajudar com a documentação e organização, por me ajudar com o texto da dissertação e por me ajudar a ir em frente quando tive dificuldades, muito obrigado. Obrigado Ciça, observar sua forma de escrever a monografia me auxiliou com a linguagem escrita, posso dizer que não foi em vão seu tempo estudando jornalismo, obrigado também por me permitir lançar um novo olhar sobre os dados. Obrigado Naomi por ter me auxiliado no início da vida acadêmica, pela amizade e pelo exemplo de sucesso acadêmico e profissional que é sua vida. Obrigado Paulinha, pela primeira rotina de MATLAB que vi na vida. Aninha, And, Aline, Beto, Franklin e Ivye, sempre que vocês me pediram ajuda com algum aspecto da pesquisa de vocês eu me tornei um pouco melhor como pesquisador e como pessoa, muito obrigado. Obrigado Mari, pelas risadas e pela amizade, por me mostrar um raciocínio muito rápido e e tomada de decisão que vejo em poucas pessoas. Obrigado Ale, pela ajuda com a documentação da FAPESP, pela amizade e

pelas conversas, você tem o potencial para ser a melhor fisioterapeuta, porque se importa de verdade com as pessoas. Obrigado Dri, por me mostrar que é possível cuidar da família, trabalhar e realizar um mestrado, tudo ao mesmo tempo, obrigado pela sua amizade e pelas risadas. Obrigado Anice, sem você não haveria a menor possibilidade do projeto se realizar da forma como foi planejado, obrigado pela competência, pela capacidade de organização, pela experiência clínica e pela ajuda.

Agradeço ao professor Vincent Vigneron pela ajuda com o algoritmo de subtração espectral, por me mostrar novos métodos de análise do sinal e me permitir observar um universo de processos matemáticos que auxiliarão em trabalhos futuros, pelas conversas sobre a vida e pela oportunidade de trabalho oferecida, muito obrigado.

Aos funcionários do centro de docência e pesquisa pelo suporte em relação aos paciente e à secretaria pela ajuda em relação à documentação e prazos: Wellington, Wilson, Ana, Bia, Sidney, Santana , muito obrigado.

À todas as pessoas que participaram como sujeito de pesquisa, obrigado pela paciência e por sempre me lembrarem da importância deste trabalho, graças à vocês .

Agradeço aos professores que participaram da qualificação pela visão crítica e rigor técnico que auxiliaram a imprimir ao trabalho. Agradeço à professora Amélia Pasqual Marques pela experiência clínica, pedindo para que a população fosse melhor descrita durante a qualificação e também pelo endorso junto à FAPESP no início do projeto. Agradeço também aos professores Wilson Henrique

Veneziano e Adson Ferreira da Rocha por dividir sua experiência em eletromiografia conosco, em relação ao rigor técnico durante a coleta e a necessidade de reduzir o ruído, o que resultou em novo tratamento dos dados, seus comentários são valiosos também para os próximos projetos realizados pelo laboratório.

Agradeço também à professora Maria Elisa Pimentel Piemonte pelas idéias em relação ao tratamento estatístico dos dados e também em relação às repercussões da neuropatia sobre o sistema nervoso central, e formas de se avaliar este impacto, tenho certeza que projetos futuros devem considerar também este aspecto.

Aos meus amigos, que me ajudaram muitas e muitas vezes durante o mestrado, para quem desapareci, a quem fui pedir ajuda, a quem pude ajudar, sei que tudo me ajudou a melhorar e me tornar mais completo como ser humano. Agradeço à Karen pela convivência durante estes anos, por me fazer desejar ser uma pessoa melhor, pelas risadas pelo companheirismo pela amizade e pelo apoio. Agradeço especialmente à Mayumi por ser minha irmã nesta vida, por estar comigo nos momentos realmente difíceis, pelas orações. Muito, muito obrigado!

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, pela paciência, pelo suporte, por estarem por perto, por formarem meu caráter através do exemplo, por me acolherem, pelo amor.

Por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa de mestrado (processo nº 2011/15770-0) a qual me foi de grande valia para subsídio pessoal e aquisição de equipamentos para desenvolvimento do presente estudo.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	DIABETES MELLITUS E A NEUROPATIA.....	1
1.2	ALTERAÇÕES NEUROMUSCULARES E MUSCULARES DECORRENTES DO DIABETES E DA NEUROPATIA.....	4
1.3	ESTIMATIVA DE VELOCIDADE DE CONDUÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES	7
2	OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	10
2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2	HIPÓTESES	10
3	MÉTODOS	11
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	11
3.2	CASUÍSTICA	13
3.3	AValiação CLÍNICA.....	13
3.4	AQUISIÇÃO DOS SINAIS ELETROMIOGRÁFICOS	16
3.5	PROCESSAMENTO DO SINAL ELETROMIOGRÁFICO	21
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4.	RESULTADOS.....	28

5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	40
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA	41
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma indicando etapas que foram executadas durante a execução do estudo. 12
- Figura 2 – Instrumentos utilizados para avaliação clínica: (A) Diapasão 128Hz, (B) Monofilamento de 10g..... 14
- Figura 3 – Equipamento utilizado na coleta: (A) Eletromiógrafo EMG-USB2 com as configurações utilizadas: modo diferencial, ganho em 2000, filtro passa alta em 10Hz e passa baixa em 900 Hz; (B) Cabo AD2x8SD5; (C) Cabo AD4x4SD5; (D) Cabo para eletrodo de referência GP1; (E) Eletrodo seco AS8/10; (F) Eletrodo de referência Kendall 200; (G) Eletrodo semi-descartável ELSCH004; (H) Espuma para eletrodo descartável KITAD004; (I) Creme condutor CC1..... 17
- Figura 4 – Procedimento para localização das zonas de inervação do músculo tibial anterior. Inicialmente é colocada a matriz de eletrodos na posição e orientação indicadas pela SENIAM (indicada pelo X verde). Após a localização da zona de inervação mais distal (pequeno traço tracejado vermelho), uma margem de segurança é demarcada na pele, bem como a região onde será a posição final do eletrodo (quatro pequenos traços verdes)..... 18
- Figura 5 – Sinal proveniente do eletrodo na posição indicada pela SENIAM (linha azul); em vermelho é a localização de uma zona de inervação devido à

diminuição da amplitude deste sinal específico e à inversão de fase do potencial do músculo acima e abaixo do sinal em vermelho. 19

Figura 6 – Sinal proveniente do eletrodo seco na posição onde será colocada a matriz de 4 eletrodos (linha azul). Em vermelho pode-se notar a localização da zona de inervação mais distal entre os canais 1 e 2, em cinza nota-se a diminuição do potencial de ação devido ao eletrodo estar próximo da zona tendínea. 19

Figura 7 – Teste de resistência manual do Tibial anterior. O fisioterapeuta foi instruído a manter a posição articular constante durante a realização da contração voluntária máxima. 21

Figura 8 – Sinal adquirido antes e após o processo de subtração espectral. A linha em ciano mostra a região que foi demarcada como ruído, do início até 500ms do sinal. Ao lado, um detalhe da região de maior atividade mostrando que não há alterações importantes no formato do sinal introduzidas por este processo. 23

Figura 9 – Janela utilizada para a coleta e sinal sobrepostos. As janelas são curvas gaussianas com 120ms de desvio padrão e são desalinhadas no tempo de acordo com o resultado da função de correlação cruzada entre os sinais 1 (azul) e 2 (verde)..... 24

Figura 10 - Valores médios e erro padrão da VCFM dos músculos tibial anterior e vasto lateral durante a contração isométrica nos cinco grupos avaliados. Diferenças significativas (post-hoc de Neuman Keuls $p < 0.05$) foram marcadas com um X (comparações entre os grupos). Para o tibial

anterior, os valores de p foram: Controle > Ausente $p=0,02$; Controle > Leve $p = 0,02$; Controle > Moderado $p=0,03$; Controle > Grave $p=0,01$.

Para o vasto lateral, os valores de p foram: Controle > Moderado $p=0,03$; Ausente > Moderado $p=0,02$; Leve > Moderado $p=0,02$; Grave > Moderado $p=0,01$ 29

Figura 11 - Valores médios e erro padrão da VCFM dos músculos gastrocnêmio medial e bíceps femoral durante contração isométrica nos cinco grupos avaliados..... 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis demográficas, antropométricas e clínicas dos grupos estudados.

..... 15

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão da VCFM dos músculos tibial anterior, gastrocnêmio medial, vasto lateral e bíceps femoral durante a contração isométrica..... 30

RESUMO

Butugan MK *Influência da progressão do diabetes nos padrões dinâmicos de recrutamento de fibras musculares analisados através de eletromiografia de alta densidade* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Este estudo teve como objetivo investigar a influência de diferentes estágios de severidade da neuropatia diabética na velocidade de condução das fibras musculares estimada em quatro músculos do membro inferior durante contrações isométricas, utilizando-se eletromiografia de superfície. Oitenta e cinco adultos foram estudados: 16 indivíduos não diabéticos e 69 diabéticos classificados em quatro estágios de neuropatia definidos por um sistema fuzzy: ausente (n=26), leve (n=21), moderada (n=11) e grave (n=11). As velocidades de condução médias das fibras musculares do tibial anterior, gastrocnêmico medial, vasto lateral e bíceps femoral foram avaliadas utilizando uma matriz linear de eletrodos de superfície e foram comparadas entre os grupos estudados por meio de ANOVAs ($p < 0,05$). As velocidades de condução diminuíram significativamente no grupo com neuropatia moderada para o vasto lateral em relação aos outros grupos (18 a 21% de decréscimo), e foram menores em todos os grupos com diabetes para o tibial anterior em relação ao grupo controle (15 a 20% de decréscimo). Não só a localização anatômica distal do músculo afetou a velocidade de condução, mas também a proporção do tipo de fibras musculares, uma vez que o tibial anterior, com maior proporção de fibras do tipo I, estava com sua velocidade de condução alterada já no grupo ausente, enquanto o vasto lateral, com maior proporção de fibras do tipo II, estava com sua velocidade de condução alterada em estágios mais tardios da doença. De forma geral, os músculos do membro inferior têm diferentes suscetibilidades aos efeitos do diabetes mellitus e da neuropatia e mostram uma redução da velocidade de condução conforme a neuropatia progride.

Descritores: neuropatias diabéticas; eletromiografia; fibras musculares esqueléticas; potenciais de ação; contração isométrica

ABSTRACT

Butugan MK *Influence of diabetes progression on dynamic recruitment patterns of muscular fibers analyzed through high density electromyography* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

This study aimed at investigating the influence of different stages of diabetic neuropathy in the muscle fiber conduction velocities estimated in four lower limb muscles during isometric maximal voluntary contraction using surface electromyography. Eighty-five adults were studied: 16 non-diabetic individuals and 69 diabetic patients classified into four neuropathy stages, defined by a fuzzy system: absent (n=26), mild (n=21), moderate (n=11) and severe (n=11). Average muscle fiber conduction velocities of gastrocnemius medialis, tibialis anterior, vastus lateralis and biceps femoris were assessed using linear array electrodes, and the studied groups were compared by ANOVAs ($p < 0.05$). Conduction velocities were significantly decreased in the moderate neuropathy group for the vastus lateralis compared to other groups (from 18 to 21% decrease), and were decreased in all diabetic groups for the tibialis anterior (from 15 to 20% from control group). Not only the distal anatomical localization of the muscle affects the conduction velocity, but also the proportion of muscle fiber type, where the tibialis anterior, with greater type I fiber proportion, is affected already at the absent group while the vastus lateralis with greater type II fiber proportion is affected in later stages of the disease. Generally, the muscles of the lower limb have different responsiveness to the effects of diabetes mellitus and neuropathy and show a reduction in the conduction velocity as the neuropathy progresses.

Descriptors: diabetic neuropathies; electromyography; muscle fibers, skeletal; action potentials; isometric contraction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus e a neuropatia

O diabetes mellitus afeta aproximadamente 8,3% da população adulta mundial, sendo que em 2013 o Brasil possuía a quarta maior população diabética do planeta, com 11,9 milhões de indivíduos. Além da alta prevalência, a incidência de diabetes aumentou em 50% nos últimos dez anos, com previsão de que esta população aumente de 382 milhões atualmente para 592 milhões de pessoas em 2035 (1). Estas estatísticas alarmantes devem-se ao desenvolvimento das nações, especialmente as em desenvolvimento, o que trouxe um estilo de vida mais sedentário, alimentação industrializada e estímulos estressores potencializados.

A neuropatia diabética é a complicação crônica mais comum do diabetes, cerca de 50% da população diabética desenvolve sintomas de neuropatia periférica como perda de sensibilidade tátil, vibratória e térmica após aproximadamente 10 a 15 anos do diagnóstico do diabetes (2).

A polineuropatia diabética sensitiva distal é a mais comum entre as neuropatias diabéticas conhecidas, correspondendo a 75% destes diagnósticos (3-6). Complicações decorrentes da polineuropatia nos diabéticos, como úlceras infectadas e amputações, geram um ônus econômico e social importante para a sociedade (7). De acordo com Hile e Veves (8), 15% dos indivíduos com diabetes mellitus irão desenvolver úlceras plantares no decorrer da vida, o que representa à

economia brasileira um custo direto de 3,9 bilhões de dólares americanos e os custos indiretos podem chegar a valores cinco vezes maiores (9).

O quadro da polineuropatia simétrica distal pode se iniciar com sintomas de perda de sensibilidade e o sinal clínico neuromotor mais evidente é a ausência de reflexos na articulação do tornozelo (10). Com o acometimento dos nervos motores, os primeiros a serem afetados são n. fibular, n. sural e n. plantar medial (11-13) e isso determina uma sequência de afecções musculares, iniciando pelos músculos fibulares, gastrocnêmios e tibial anterior (5, 11, 14) . Com o agravamento da doença esses distúrbios são frequentemente acompanhados de sintomas mais proximais e autonômicos (4, 5, 15), destacando-se afecções na microcirculação e sudorese, causando ressecamento e fissuras na pele (16).

A neuropatia é comumente caracterizada segundo a progressão dos sintomas sensitivos, para motores e depois autonômicos, seguindo esta ordem de surgimento na história clínica (17), embora, mais recentemente, esta ordem de acometimento tem sido questionada já que consequências musculoesqueléticas já são notáveis ao mesmo tempo em que sintomas sensitivos (18).

Enquanto a degeneração nervosa sensorial tem sinais precoces mais evidentes, como diminuição da velocidade de condução nervosa, claros sinais de desmielinização e expressivos sintomas relacionados à perda somatosensorial, a disfunção motora é mais sutil, e considerada ainda por muitos clínicos como um sintoma tardio na progressão do diabetes mellitus (19). Apesar da perda de força muscular ser frequentemente reportada tanto para diabetes do tipo 1 (20) como do tipo 2 (21), a velocidade de condução dos nervos motores é grandemente

preservada devido ao *axonal sprouting* e reinervação (18) e o neurônio motor apresenta-se mais preservado no curso da doença (22), mascarando o envolvimento do sistema neuromuscular em um estágio precoce do desenvolvimento de neuropatia diabética.

Evidências desta reinervação crônica das fibras musculares em pacientes diabéticos foram demonstradas por meio de estudos de eletromiografia de agulha, antes mesmo dos sintomas clássicos sensoriais da neuropatia aparecerem. Bril et al. (23) observaram um aumento no *jitter*, uma vez que a medida permite identificar a variabilidade no tempo de disparo de diferentes fibras de uma unidade motora, esta mudança indica sinais de denervação e reinervação em conjunto com um aumento na densidade de fibras musculares e na área da unidade motora quando diabéticos foram avaliados por meio da eletromiografia invasiva.

Este dano neuromuscular precoce também pode ser identificado pela medida da velocidade de condução das fibras musculares (VCFM) por meio de eletromiografia de agulha (24). Diferentemente do esperado, uma redução desta velocidade de condução foi observada antes mesmo da perda de força muscular ou do início de sintomas referentes a perda sensorial da neuropatia diabética, sugerindo que a progressão da diabetes provavelmente é coincidente para ambos sistemas neuromuscular e sensoriais, e não uma complicação tardia da neuropatia (18).

A distribuição espacial das perdas no sistema somatosensorial é característica, iniciando-se na parte distal dos segmentos e progredindo para as regiões mais proximais, isto se deve à desmielinização axonal difusa, que afetaria

mais intensamente axônios de maior comprimento e menor diâmetro (25). Os sinais mais precoces de envolvimento motor também foram reportados para músculos mais distais da perna, com perda do torque articular do tornozelo (21) e atrofia da musculatura intrínseca dos pés (26), seguindo a mesma ordem de progressão da perda somatosensorial. Além disso, foi mostrado que a gravidade da disfunção do sistema nervoso periférico está relacionada à reduzida força isocinética, sugerindo que as duas condições são correlacionadas (27).

1.2 Alterações neuromusculares e musculares decorrentes do diabetes e da neuropatia

Em modelos murinos, demonstrou-se que a placa motora parece ser afetada antes dos danos ao nervo, o que é refletido pela retração axonal distal (28). Desta forma, o efeito do diabetes sobre o sistema neuromuscular pode ser caracterizado inicialmente pela retração dos axônios da placa motora, desencadeando um processo de denervação e reinervação das fibras musculares. Paralelamente a esse processo, existe um efeito deletério da doença diretamente sobre as fibras musculares. Esse processo de retração axonal pode ser decorrente da diminuição de fatores neuroprotetores e quimiotáticos dependentes do funcionamento do receptor de insulina das células musculares (29).

Tanto diabéticos com quanto sem a polineuropatia apresentam reinervação de fibras musculares quando em condições de denervação patológica, e isso se deve provavelmente a uma tentativa de compensar e reestabelecer a atividade

neuromuscular (30). A progressão do diabetes, entretanto, lentifica esse processo de reinervação (31, 32), limitando esta compensação e levando à perda de transmissão e de geração de potencial de ação. Estudos de macroeletromiografia apontam para um aumento do potencial de ação de unidade motora única, sugerindo a existência de uma provável perda preferencial da atividade das unidades motoras pequenas e aumento do potencial de ação de unidades maiores (28, 33-37).

Apesar da distribuição espacial de fibras musculares similar, pacientes recentemente diagnosticados com diabetes apresentaram atrofia destas fibras, desconfiguração das linhas Z e anormalidades morfológicas nas mitocôndrias (38), mesmo na ausência de indicações estruturais de neuropatia como degeneração axonal, perda na velocidade de condução dos nervos motores ou perda da sensibilidade vibratória (39). Estes são resultados importantes, pois indicam que o músculo esquelético é agudamente sensível ao diabetes mellitus, antes de complicações neuropáticas típicas (27, 38).

Além disso, os diabéticos tipo 1 e 2 têm demonstrado fraqueza na musculatura em torno do tornozelo e do joelho, expressa por uma menor força de contração voluntária máxima (34, 40, 41), havendo ainda atrofia da musculatura dos pés e das pernas, observado em imagens de ressonância magnética, principalmente naqueles pacientes com sintomas claros de neuropatia (41).

Por outro lado, o padrão da atividade nervosa dos diabéticos por si só já tem apresentado alterações. Há uma diminuição do potencial de ação global do músculo, sugerindo que uma menor quantidade de fibras estaria ativa em relação

ao que seria esperado para populações de indivíduos saudáveis (34). Essa redução do potencial de ação global do músculo também já foi observada em ratos diabéticos (28) e pode estar diretamente associada à diminuição da força observada nesta população.

Estes processos de alterações neuronais, reinervações, alterações de potencial de ação acarretam em uma mudança na proporção do tipo de fibra nos músculos esqueléticos. Esta mudança revela uma presença predominante de fibras do tipo II em diabéticos (42, 43), provavelmente devido à fatores como o aumento da concentração intracelular de cálcio (44) que leva as fibras do tipo I, as quais são mais sensíveis à este íon, à apoptose precoce (45, 46).

Como evidência destas mudanças estruturais na constituição e distribuição de fibras musculares, diversos autores constataram que a atividade oxidativa do vasto lateral dos diabéticos era diminuída, havendo uma redução na fração de fibras oxidativas lentas e um aumento na fração de fibras glicolíticas rápidas. Além disso, tanto a atividade enzimática oxidativa quanto a glicolítica são significativamente aumentadas nas fibras glicolíticas rápidas e nas glicolíticas e oxidativas nos pacientes diabéticos (43, 47, 48), de forma que os diabéticos dependam das fibras de maiores frequências, ou seja, as do tipo 2, remanescentes na musculatura (46, 49, 50).

1.3 Estimativa de velocidade de condução das fibras musculares

O primeiro método utilizado para obter a estimativa de VCFM utilizava a propagação do potencial de ação entre duas agulhas a uma distância conhecida de um estímulo muscular voluntário ou provocado (51). No entanto, o método consumia muito tempo e não ganhou muitas aplicações (52). Um método mais simples foi proposto por Troni et al. (53) onde se utiliza apenas uma agulha para detecção do sinal e a latência é utilizada para estimativa da VCFM e este método, modificado por Van Der Hoeven et al. (23) foi utilizado até então para se observar a VCFM em pacientes com diabetes (18, 54).

A estimativa invasiva da VCFM permite que sejam obtidos valores de velocidade de condução de um pequeno agrupamento de fibras, podendo se distinguir entre fibras com maior e menor velocidade de condução, e com a vantagem de não depender do controle voluntário do paciente (24). No entanto, o método é doloroso e a estimulação supramáxima utilizada também estimula fibras não inervadas perdendo-se informação sobre o estado da musculatura preservada.

A estimativa não-invasiva da VCFM pode avaliar a velocidade de condução média das fibras inervadas (55), permitindo que as alterações detectadas por meio deste método reflitam o estado de um volume de tecido muscular maior do que quando se utiliza a eletromiografia de agulha, método este até então utilizado para estimativa da VCFM em pacientes com diabetes (18).

Inicialmente foi utilizado apenas um eletrodo para a captura do sinal eletromiográfico gerado por um estímulo proximal no nervo motor com distância

com distância conhecida (56), no entanto existiam dificuldades devido ao desconhecimento da velocidade de condução nervosa e também sobre a localização da zona de inervação (52).

Outros métodos foram desenvolvidos utilizando depressões no espectro de frequência causados pela função de transferência sinusoidal da transformada de Fourier (57) que poderiam ser utilizadas para prever a VCFM a partir do sinal de um (58) ou mais eletrodos (59). O método é suficiente para detectar mudanças relativas na VCFM, no entanto as propriedades do músculo, do recrutamento e do derecrutamento de unidades motoras e dos tecidos que se interpõe entre este e os eletrodos provocam mudanças nas propriedades espectrais do sinal que dificultam este tipo de estimativa (60).

A utilização de uma matriz linear de eletrodos foi primeiramente proposta por Masuda et al. (61) e permite a aquisição de sinal em diversos pontos do músculo, assim como permite a delimitação da localização da zona de inervação. Esta possibilidade, em conjunto novas formas de se estimar a VCFM, como os algoritmos de máxima verossimilhança (62), permitiram a obtenção de medidas de baixo coeficiente de variação e portanto melhores comparações desta variável entre músculos (55).

Esta estimativa pode ser utilizada para se compreender outros mecanismos envolvidos na progressão da disfunção motora causada pelo diabetes mellitus e pela neuropatia em músculos do membro inferior. Apesar de existir evidência de um envolvimento motor precoce, a forma com que a função muscular se deteriora ao longo da progressão desta doença continua desconhecida. A estimativa da VCFM

pode ser uma ferramenta sensível para se detectar o estado funcional da musculatura e sinais de disfunção axonal motora em indivíduos onde a diabetes e neuropatia estão progredindo (18) e desta forma, colaborar com o diagnóstico precoce e melhor orientação do tratamento cinético-funcional.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo prospectivo foi investigar a influência de diferentes estágios de severidade da neuropatia diabética na VCFM estimada em quatro músculos do membro inferior durante contrações isométricas.

2.2 Hipóteses

Nós hipotetizamos que conforme aumenta a severidade da neuropatia diabética:

- (i) os valores de VCFM serão progressivamente mais baixos;
- (ii) os músculos distais serão afetados mais precocemente na progressão da doença e em maior magnitude do que músculos proximais;
- (iii) os músculos com maior proporção de fibras do tipo I serão afetados mais precocemente e em maior magnitude do que músculos com menor proporção de fibras do tipo II.

3 MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

Estudo laboratorial transversal (cinco grupos) onde o fator doença (variável independente) foi apresentado em cinco níveis em: (i) não doente (controle), (ii) diabético sem diagnóstico ou sintomas de neuropatia periférica, (iii) diabéticos com sintomas leves de neuropatia periférica, (iv) diabéticos com sintomas moderados de neuropatia diabética, (v) diabéticos com sintomas graves de neuropatia diabética. Estes grupos foram comparados em relação ao cálculo da VCFM provinda da EMG de superfície de alta densidade. As hipóteses testadas para os grupos estudados foram:

$$H_0: \lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_3 = \lambda_4 = \lambda_5 = 0 \text{ e}$$

$$H_A: \text{no mínimo um } \lambda_i \neq 0,$$

onde λ_i , $i = 1, 2, 3, 4, 5$ representando o efeito do fator estágio da neuropatia.

O fluxograma do desenho experimental está ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma indicando etapas que foram executadas durante a execução do estudo.

3.2 Casuística

Para este estudo prospectivo, 16 adultos saudáveis participaram como grupo controle (C) e 69 pacientes diabéticos foram divididos segundo o desenho proposto (Figura 1), classificados por um sistema fuzzy em neuropatia ausente (Aus; n=26), leve (Lev; n=21), moderada (Mod; n=11), e grave (Grv; n=11).

Os critérios de inclusão foram: idade inferior a 65 anos, ausência de amputação total ou parcial do membro inferior ou outros agravos neurológicos ou ortopédicos devidos a acidente vascular encefálico, paralisia cerebral, poliomielite, artrite reumatoide, uso de prótese, osteoartrite moderada ou severa; ausência de úlceras arteriais ou venosas; ausência de retinopatia severa; ausência de nefropatia severa causando edema ou necessitando de hemodiálise; ausência de úlceras plantares no momento da avaliação.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 522/11 e todos os participantes foram informados sobre e assinaram o termo de consentimento esclarecido (Anexo A) elaborado conforme a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde antes de participarem do estudo.

3.3 Avaliação Clínica

Todos os participantes foram avaliados por um fisioterapeuta treinado que avaliou: (i) a percepção vibratória (diapasão de 128 Hz), (ii) sensibilidade tátil

(utilizando um monofilamento Semmes Weinstein de 10g) (Figura 2), e (iii) presença de sintomas típicos da neuropatia utilizando um questionário adaptado (Anexo B) [baseado no “Michigan Neuropathy Screening Instrument” (63, 64)]. Estes três grupos de variáveis foram utilizados como entradas linguísticas em um sistema fuzzy, publicado recentemente (65), para classificar os pacientes em diferentes estágios de severidade da doença. Este modelo possui uma correlação muito forte (66) com a opinião dos especialistas (Coeficiente de Pearson $r=0,943$) e um alto nível de precisão classificando pacientes reais que passaram pela análise do modelo (área da curva ROC = 0,943).

Figura 2 – Instrumentos utilizados para avaliação clínica: (A) Diapasão 128Hz, (B) Monofilamento de 10g.

O sistema fuzzy classifica cada variável em agrupamentos fuzzy (processo de fuzzificação) e faz uma análise combinatória destas variáveis pelo processo de inferência Mamdani (67), ligando estas combinações com conjuntos fuzzy de saída. Então, pelo método de centro de área de defuzzificação, os conjuntos resultantes

são transformados em valores numéricos organizados em classes de neuropatias correspondentes à seguinte divisão, sendo x o valor de saída: (i) $x \leq 2,5$: ausente; (ii) $2,5 < x < 5,0$: leve; (iii) $5,0 \leq x < 8,0$: moderada; (iv) $x \geq 8,0$: grave.

Níveis de hemoglobina glicada foram medidos com um monitor HbA1c (A1CNow SELFCHECK, Bayer LLC Diabetes Care, New York, USA).

Os grupos não foram diferentes na distribuição de gênero e índice de massa corpórea. A duração do diabetes não foi diferente entre os grupos, níveis de HbA1c foram mais baixos em nos controles quando comparados a todos os grupos diabéticos e o valor de saída do modelo fuzzy aumentou significativamente entre os grupos diabéticos (Tabela 1).

Tabela 1 – Variáveis demográficas, antropométricas e clínicas dos grupos estudados.

Grupos	Idade (anos)	Masculino /feminino (%)	Índice de massa corpórea (kg/m ²)	HbA1c (%)	Duração diabetes (anos)	Pontuação Fuzzy
Controle	56,6±7,5	56	29,3±4,1	5,9±0,5*	-	0,9±0,4
Diabetes	58,0±5,5	62	27,0±2,7	8,5±1,7	13,1±8,7	1,3±0,6
Neuropatia leve	58,3±6,0	28	27,3±7,7	9,0±1,8	10,2±7,8	2,7±0,9
Neuropatia moderada	60,3±4,5	56	28,7±4,9	9,5±1,5	17,4±14,2	6,1±1,0
Neuropatia grave	59,4±4,3	70	31,1±4,1	9,5±2,5	14,6±9,5	8,9±1,0
p	0,56 ¹	0,09 ²	0,22 ¹	<0,01 ¹	0,22 ¹	<0,01 ¹

¹ ANOVA, ² Teste de Chi-quadrado, * representa o grupo significativamente diferente

3.4 Aquisição dos sinais eletromiográficos

Eletromiografia de superfície foi coletada durante a contração isométrica voluntária máxima de quatro músculos do membro inferior (vasto lateral, tibial anterior, gastrocnêmio medial e bíceps femoral) utilizando um sistema multicanais (EMG-USB2, OT Bioelettronica, Turim, Itália) a 2048 Hz. A configuração dos eletrodos foi diferencial simples, o equipamento apresentava com modo de rejeição comum >95dB, impedância de entrada $>10^{12}$ ohm. O sinal foi amplificado por um fator de 2000, filtrado por meio de passa banda através de um filtro Bessel de quinta ordem em 10~900 Hz e convertido para o formato digital pelo seu conversor analógico digital.

Foi utilizada uma matriz com 8 eletrodos secos de barra de prata com dimensão de 5 por 1 mm e 10 mm de distância inter-eletrodos (SA8/10, OT Bioelettronica, Turim, Itália) para se determina a melhor posição da matriz de 4 eletrodos para a coleta das contrações voluntárias máximas. Para a coleta das contrações musculares, utilizamos matrizes lineares com 4 eletrodos (Ag/AgCl, eletrodos de 5mm x 1mm com 10mm de distância inter-eletrodos, ELSCH004 , OT Bioelettronica, Turim, Itália) preenchidos com pasta condutora (CC1,OT Bioelettronica, Turim, Itália) e colocadas com espaçadores descartáveis de espuma (KITAD004, OT Bioelettronica, Turim, Itália) (Figura 3), após a limpeza e abrasão da pele com álcool e gaze. Um eletrodo de referência Kendall 200 (Covidien, Mansfield, EUA) foi colocado na tuberosidade da tíbia.

Figura 3 – Equipamento utilizado na coleta: (A) Eletromiógrafo EMG-USB2 com as configurações utilizadas: modo diferencial, ganho em 2000, filtro passa alta em 10Hz e passa baixa em 900 Hz; (B) Cabo AD2x8SD5; (C) Cabo AD4x4SD5; (D) Cabo para eletrodo de referência GP1; (E) Eletrodo seco AS8/10; (F) Eletrodo de referência Kendall 200; (G) Eletrodo semi-descartável ELSCH004; (H) Espuma para eletrodo descartável KITAD004; (I) Creme condutor CC1.

A matriz com 8 eletrodos secos foi inicialmente colocada sobre cada músculo, seguindo a orientação recomendada pela SENIAM (68), evitando as zonas

de inervação dos músculos (69) (Figura 4). Após esta etapa, a posição da zona de inervação, tendão e alinhamento apropriado do eletrodo com as fibras musculares para cada músculo foram determinadas em contrações sub-máximas por inspeção visual dos sinais (70) (Figura 5). As matrizes lineares descartáveis foram então colocadas entre o tendão distal e a zona de inervação mais distal (Figura 6).

Figura 4 – Procedimento para localização das zonas de inervação do músculo tibial anterior. Inicialmente é colocada a matriz de eletrodos na posição e orientação indicadas pela SENIAM (indicada pelo X verde). Após a localização da zona de inervação mais distal (pequeno traço tracejado vermelho), uma margem de segurança é demarcada na pele, bem como a região onde será a posição final do eletrodo (quatro pequenos traços verdes).

Figura 5 – Sinal proveniente do eletrodo na posição indicada pela SENIAM (linha azul); em vermelho é a localização de uma zona de inervação devido à diminuição da amplitude deste sinal específico e à inversão de fase do potencial do músculo acima e abaixo do sinal em vermelho.

Figura 6 – Sinal proveniente do eletrodo seco na posição onde será colocada a matriz de 4 eletrodos (linha azul). Em vermelho pode-se notar a localização da zona de inervação mais distal entre os canais 1 e 2, em cinza nota-se a diminuição do potencial de ação devido ao eletrodo estar próximo da zona tendínea.

Foram obtidas três aquisições de cinco segundos para os músculos vasto lateral, bíceps femoral, tibial anterior e gastrocnêmio medial enquanto os

indivíduos realizavam contração voluntária isométrica máxima contra resistência manual feita por um fisioterapeuta treinado.

O avaliador foi instruído a manter as posições articulares do participante constantes durante todo o teste e o paciente foi instruído a realizar o movimento com força máxima e era estimulado verbalmente durante a contração pelo avaliador. Para cada avaliação muscular, uma postura diferente foi necessária. Para o bíceps femoral, o paciente estava em prono, com o quadril em posição neutra e o joelho posicionado a 45 °, o comando dado foi de fletir a articulação do joelho e a resistência máxima foi aplicada na perna no sentido da extensão do joelho. Para o vasto lateral, o participante estava em supino, com o quadril e joelho em posição neutra, o comando dado foi de pressionar a articulação do joelho contra a resistência do avaliador, estendendo o joelho e a resistência máxima foi dada posteriormente na articulação do joelho e distalmente na perna, no sentido da flexão do joelho. Para o tibial anterior, o paciente estava em supino com o joelho e tornozelo em posição neutra (Figura 7); o comando dado foi de fletir o tornozelo e a resistência máxima foi dada sobre o pé, no sentido da extensão do tornozelo. Para o gastrocnêmio medial, o participante estava em prono, com o tornozelo em 45° de flexão e o joelho em posição neutra; o comando dado foi de estender o tornozelo e a resistência máxima foi aplicada na sola do pé no sentido da extensão do tornozelo.

Figura 7 – Teste de resistência manual do Tibial anterior. O fisioterapeuta foi instruído a manter a posição articular constante durante a realização da contração voluntária máxima.

3.5 Processamento do sinal eletromiográfico

A eletromiografia de superfície foi coletada durante a contração isométrica dos quatro músculos estudados. Os sinais adquiridos foram filtrados digitalmente por filtro passa-banda Butterworth de quarta ordem de 10 a 500Hz. Os sinais também foram filtrados por subtração espectral (Figura 8), o que requer propriedades conhecidas do ruído, utilizando uma secção do sinal sem atividade muscular em que se assumiu conter ruído branco com potência σ^2 . O espectro de amplitude do sinal sem o ruído foi estimado pela expressão:

$$\hat{X}(k) = G(k)X(k) \quad (1)$$

Onde $X(k)$ é a transformada de Fourier discreta de um sinal com ruído $x(n)$ de tamanho N

$$X(k) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n)e^{-2j\pi nk/N} \quad (2)$$

E onde $G(k)$ pode ser estimado por:

$$G(k) = \begin{cases} (1 - \lambda \frac{\sigma\sqrt{N}}{|X(k)|}) & \text{if } \lambda \frac{\sigma\sqrt{N}}{|X(k)|} < 1 \\ \mu & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3)$$

Onde μ e λ foram ajustados experimentalmente para obter o melhor resultado.

O ruído é reduzido satisfatoriamente, no entanto o método introduz um ruído de alta frequência que aumenta em volume conforme diminui o valor de μ . Particularmente onde $\mu = 0$, são eliminados os componentes espectrais abaixo do limite, fazendo com que certos componentes do ruído se comportem como picos isolados. Este efeito foi reduzido diminuindo-se λ e aumentando μ apesar de menor diminuição do ruído. Todo o processo provocou melhora na razão de sinal para ruído em 62% (de 13,5 para 23,13 dB), sem provocar grande distorção na forma do sinal (Figura 8).

A VCFM cada músculo foi estimada no domínio da frequência utilizando-se o algoritmo de máxima verossimilhança proposto por Farina et al. (71). Utilizamos uma janela gaussiana com 120 ms de desvio padrão posicionada no centro do intervalo de 500 ms que corresponde ao máximo valor de Root Mean Square (RMS) observado durante a contração isométrica voluntária máxima (Figura 9), tanto nos diferenciais simples originados do eletromiógrafo, como nos sinais duplo-diferenciais obtidos digitalmente após a aquisição dos dados. Isto permitiu que a VCFM fosse obtida mesmo se um dos canais apresentasse ruído ou tivesse de ser descartado por estar muito próximo à zona de inervação ou ao tendão.

Figura 8 – Sinal adquirido antes e após o processo de subtração espectral. A linha em ciano mostra a região que foi demarcada como ruído, do início até 500ms do sinal. Ao lado, um detalhe da região de maior atividade mostrando que não há alterações importantes no formato do sinal introduzidas por este processo.

Figura 9 – Janela utilizada para a coleta e sinal sobrepostos. As janelas são curvas gaussianas com 120ms de desvio padrão e são desalinhadas no tempo de acordo com o resultado da função de correlação cruzada entre os sinais 1 (azul) e 2 (verde).

Foram descartados valores da VCFM que não estivessem dentro da faixa de valores fisiológicos menores do que 13 m/s (72). Caso houvesse ruído no sinal, valores mais altos de VCFM eram encontrados. No caso de ambas as medidas apresentarem valores não fisiológicos, a janela de 500ms com segundo maior RMS, foi utilizada para o cálculo.

O cálculo da VCFM é realizado em diversas etapas. Inicialmente, uma primeira estimativa é feita calculando-se a correlação cruzada entre os sinais do primeiro e do segundo canais no intervalo de 500ms selecionado. Esta medida inicial de defasagem no sinal é utilizada para se aplicar as janelas gaussianas de forma que o sinal observado por cada janela não apresente diferenças devido ao corte realizado pela janela de 120ms.

Após esta etapa, o sinal é transformado no domínio da frequência para que seja feita a primeira estimativa do mínimo erro quadrado, que será o critério que o algoritmo de cálculo da VCFM usa. O erro quadrado médio (e^2) entre um determinado canal x_k com n amostras e um número k de canais, pode ser representado pela equação:

$$e_k^2 = \sum_{n=1}^N \left(x_k(n) - \frac{1}{K-1} \sum_{m=1, m \neq k}^K x_m(n + (m-k)\theta) \right)^2 \quad (4)$$

Onde θ é o valor de defasagem utilizado na iteração corrente do algoritmo, e m indica o índice de cada canal.

Para se utilizar uma janela p aplicada ao sinal, a equação deve ser modificada para:

$$\hat{e}_k^2 = \sum_{n=1}^N \left[p(n) \cdot \left(x_k(n) - \frac{1}{K-1} \cdot \sum_{m=1, m \neq k}^K x_m(n + (m-k)\theta) \right)^2 \right] \quad (5)$$

Este procedimento anterior (equação 5), permite que não haja truncamento do sinal se este previamente for ajustado para o desvio θ . Esta equação pode ser escrita na seguinte forma:

$$\begin{aligned} \hat{e}_k^2 &= \sum_{n=1}^N \left(\sqrt{p(n)} \cdot x_k(n) - \frac{1}{K-1} \sqrt{p(n)} \cdot \sum_{m=1, m \neq k}^K x_m(n + (m-k)\theta) \right)^2 \\ &= \sum_{n=1}^N \left(q(n) \cdot x_k(n) - \frac{1}{K-1} \cdot \sum_{m=1, m \neq k}^K (q(n) \cdot x_m(n + (m-k)\theta)) \right)^2 \end{aligned} \quad (6)$$

Onde q é a raiz quadrada da janela p . Esta equação (6) pode ser utilizada recorrentemente, deslocando-se os sinais no domínio da frequência e computando-se o erro médio quadrado no domínio do tempo.

No entanto, pode-se calcular diretamente o erro médio no domínio da frequência utilizando-se a equação:

$$\begin{aligned}\hat{e}_k^2 &= \frac{2}{N} \sum_{\alpha=1}^{N/2} \left| Q(\alpha) * X_k(\alpha) - \frac{1}{K-1} \cdot \sum_{m=1, m \neq k}^K [Q(\alpha)(X_m(\alpha)e^{j2\pi\alpha(m-k)\theta/N})] \right|^2 \\ &= \frac{2}{N} \sum_{\alpha=1}^{N/2} |\gamma(\alpha, \theta)|^2\end{aligned}\tag{7}$$

Onde $*$ indica o produto convolutivo, α é a frequência discreta, $Q(\alpha)$ é a transformada de Fourier de $q(n)$ e $X_i(\alpha)$ é a transformada de Fourier dos sinais $x_i(n)$.

A primeira e a segunda derivadas da função $\hat{e}_k^2$ podem ser utilizadas para aplicar o método de Newton visando encontrar o mínimo da função do erro médio quadrado, evitando a busca exaustiva e economizando tempo computacional utilizando-se:

$$\begin{aligned}\frac{d\hat{e}_k^2}{d\theta} &= \frac{4}{N} \sum_{\alpha=1}^{N/2} \left[Re\{\gamma(\alpha, \theta)\} \frac{dRe\{\gamma(\alpha, \theta)\}}{d\theta} + Im\{\gamma(\alpha, \theta)\} \frac{dIm\{\gamma(\alpha, \theta)\}}{d\theta} \right] \\ \frac{d^2\hat{e}_k^2}{d\theta^2} &= \frac{4}{N} \sum_{\alpha=1}^{N/2} \left\{ \begin{aligned} &\left[\frac{dRe\{\gamma(\alpha, \theta)\}}{d\theta} \right]^2 + Re\{\gamma(\alpha, \theta)\} \frac{d^2Re\{\gamma(\alpha, \theta)\}}{d\theta^2} \\ &+ \left[\frac{dIm\{\gamma(\alpha, \theta)\}}{d\theta} \right]^2 \\ &+ Im\{\gamma(\alpha, \theta)\} \frac{d^2Im\{\gamma(\alpha, \theta)\}}{d\theta^2} \end{aligned} \right\}\end{aligned}\tag{8}$$

Onde $Re\{\bullet\}$ e $Im\{\bullet\}$ são as partes reais e imaginárias da função no domínio da frequência.

Os termos utilizados na equação 8 estão definidos em Farina et al. (71).

A função do erro médio quadrado obtida do critério de máxima verossimilhança é dada pela somatória dos erros e_{2k} , com $k = 1, \dots, K$ e suas derivadas são:

$$\begin{aligned}\frac{d\hat{e}_{MLE}^2}{d\theta} &= \left(1 - \frac{1}{K}\right) \sum_{k=1}^K \frac{d\hat{e}_k^2}{d\theta} \\ \frac{d^2\hat{e}_{MLE}^2}{d\theta^2} &= \left(1 - \frac{1}{K}\right) \sum_{k=1}^K \frac{d^2\hat{e}_k^2}{d\theta^2}\end{aligned}\quad (9)$$

cujos termos podem ser computados utilizando as duas últimas equações (8 e 9).

A partir destas derivadas, a fórmula de Newton pode ser aplicada para se encontrar o mínimo da função do erro médio quadrado:

$$\hat{\theta}_{i+1} = \hat{\theta}_i - \frac{\left. \frac{d\hat{e}_{MLE}^2(\theta)}{d\theta} \right|_{\hat{\theta}_i}}{\left. \frac{d^2\hat{e}_{MLE}^2(\theta)}{d\theta^2} \right|_{\hat{\theta}_i}} \quad i = 0, 1, \dots \quad (10)$$

A partir da estimativa grosseira, θ_0 é encontrada por meio da correlação cruzada.

3.6 Análise Estatística

Foi utilizada a média das estimativas de VCFM dos canais diferenciais simples e da dupla-diferenciação. Comparações entre grupos de todas as variáveis antropométricas, clínicas e musculares foram feitas por meio de ANOVAs de um fator e testes post-hoc de Newman-Keuls, com nível de significância de 0,05.

Dado o número amostral avaliado, um erro do tipo I de 5% e um tamanho de efeito de 0.40 (F), o poder estatístico do teste foi de 0.831 para o teste F utilizado.

4. RESULTADOS

Houve um aumento significativo da VCFM (tabela 2) com a progressão da neuropatia para os músculos tibial anterior e vasto lateral. Para o tibial anterior, todos os grupos com diabetes mostraram valores significativamente menores do que o grupo controle, com uma diminuição média de 15% nestes pacientes. O grupo sem neuropatia teve valores 16% menores do que o grupo controle, 15% para neuropatia leve, 17% para neuropatia moderada e 20% para o grupo com neuropatia grave. Para o vasto lateral, uma diminuição significativa foi observada para o grupo moderado em comparação com outros grupos, com uma diminuição média de 20% em valores de VCFM. O grupo moderado apresentou valores 20% menores do que o grupo controle, esta razão foi de 18% em comparação com a neuropatia leve, 21% para neuropatia moderada e 20% para neuropatia grave (figura 10).

Tanto os músculos gastrocnêmio medial como bíceps femoral mostraram uma tendência de diminuição da VCFM conforme a neuropatia diabética progride (Figura 11), embora não significativa. Apesar de não significativo, este aumento foi de maior magnitude para o grupo severo para ambos os músculos. Para o músculo gastrocnêmio, uma diminuição de 16% do grupo controle foi observada nos pacientes graves e para o bíceps femoral uma diminuição de 15% foi observada também em relação ao grupo controle.

Figura 10 - Valores médios e erro padrão da VCFM dos músculos tibial anterior e vasto lateral durante a contração isométrica nos cinco grupos avaliados. Diferenças significativas (post-hoc de Neuman Keuls $p < 0.05$) foram marcadas com um X (comparações entre os grupos). Para o tibial anterior, os valores de p foram: Controle > Ausente $p = 0,02$; Controle > Leve $p = 0,02$; Controle > Moderado $p = 0,03$; Controle > Grave $p = 0,01$. Para o vasto lateral, os valores de p foram: Controle > Moderado $p = 0,03$; Ausente > Moderado $p = 0,02$; Leve > Moderado $p = 0,02$; Grave > Moderado $p = 0,01$.

Figura 11 - Valores médios e erro padrão da VCFM dos músculos gastrocnêmio medial e bíceps femoral durante contração isométrica nos cinco grupos avaliados.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão da VCFM dos músculos tibial anterior, gastrocnêmio medial, vasto lateral e bíceps femoral durante a contração isométrica.

Grupos	Tibial Anterior (m/s)	Gastrocnêmio Medial (m/s)	Vasto Lateral (m/s)	Bíceps femoral (m/s)
Controle (C)	5,78 ± 1,7 [†]	7,62 ± 3,3	6,47 ± 2,0	7,58 ± 3,1
Neuropatia Ausente (Aus)	4,83 ± 1,5	7,30 ± 2,8	6,35 ± 1,8	7,66 ± 2,5
Neuropatia Leve (Lev)	4,91 ± 1,4	6,94 ± 2,8	6,53 ± 2,4	7,14 ± 3,2
Neuropatia Moderada (Mod)	4,79 ± 1,5	7,11 ± 1,9	5,18 ± 1,9 [†]	7,05 ± 2,3
Neuropatia Grave (Grv)	4,64 ± 1,0	6,42 ± 2,7	6,72 ± 2,1	6,44 ± 3,2

Grupos significativamente diferentes estão marcados com [†], para o tibial anterior os valores de p foram: C > Aus p=0.02; C > Lev p = 0.02; C > Mod p=0.03; C > Grv p=0.01. Para o vasto lateral os valores de p foram: C > Mod p=0.03 ; Aus > Mod p=0.02; Lev > Mod p=0.02 Grv > Mod p=0.01.

5. DISCUSSÃO

Os resultados principais mostraram que pessoas diabéticas possuem uma VCFM alterada mesmo antes do início dos sintomas da neuropatia. No entanto, as alterações observadas não seguiram um padrão gradativo de acometimento conforme a severidade da doença, com o tibial anterior sendo afetado mais precocemente e o vasto lateral, um músculo extensor proximal, sendo afetado apenas no estágio moderado da neuropatia.

Para as alterações sensoriais, a distribuição distal-proximal é bem descrita (22, 73-75). A progressão da diabetes provoca lesões desmielinizantes ao longo dos axônios sensitivos. Logo, axônios de maior comprimento estão mais suscetíveis pois apresentam maior território passível de acometimento, justificando o padrão de acometimento de distal para proximal para os sintomas sensoriais (25). Uma vez que a progressão das perdas motoras observada no estudo não segue estritamente a direção distal-proximal, é possível que outro fator seja responsável pelas alterações motoras observadas nos diabéticos neuropatas. Esta é uma discussão também conduzida em outros estudos com esta população. Andersen et al. (37) e Sachetti et al. (76), por exemplo, observaram uma diminuição de força muscular em articulações distais, porém esta não foi relacionada à presença de alterações da velocidade de condução dos nervos motores.

A VCFM é influenciada por diversos fatores incluindo as propriedades do sarcolema, diâmetro e tipo da fibra muscular, as quais podem ser responsáveis pelo

padrão de alteração observado. A anormalidade nos canais iônicos do sarcolema (77), que pode ser provocada pelo diabetes, faz com que fique diminuída a excitabilidade desta estrutura, que é crítica para a função do músculo esquelético (78) Quanto menor o potencial e maior a resistência da membrana desta organela, menos excitável é a fibra muscular (79), dificultando a condução do potencial de ação e provocando a diminuição da VCFM. A suscetibilidade de cada tipo de fibra muscular a estes efeitos é diferente, sendo que fibras do tipo I são mais sensíveis, tanto a alterações nos canais iônicos como ao influxo de cálcio causado pela hiperglicemia crônica, levando também a danos no aparelho contrátil e posteriormente à apoptose celular (44-46). Portanto, os efeitos do diabetes em cada músculo também podem ditar o padrão de agravamento dos sintomas de neuropatia motora e não apenas sua localização.

Outro fator potencialmente influenciador da VCFM é a retração das terminações nervosas em contato com a placa motora (22, 28), que influenciaria a função neuromuscular independentemente do comprimento do axônio. Esta retração é um dos primeiros efeitos do diabetes no sistema nervoso eferente. A VCFM observada em diferentes músculos do membro inferior dos diabéticos com diferentes velocidades de condução de nervos motores indicam que esta variável é independente de disfunção axonal do nervo motor, mas provavelmente relacionada à mudanças em características funcionais das fibras musculares, tal como já elencado anteriormente (76).

Nossos resultados indicaram uma redução significativa na VCFM do tibial anterior já no estágio inicial do diabetes para pacientes sem neuropatia (Aus) que

perdurou sem grandes variações pelos estágios de progressão da doença. Meijer et al. (18) obteve resultado semelhante por meio de EMG de agulha, notando que diabéticos sem polineuropatia já apresentavam valores menores de VCFM do tibial anterior. Interessantemente, apesar de ser mais distal, o extensor curto dos dedos apresentou menor proporção de diabéticos com alterações na densidade de fibras do que o tibial anterior. Vale ressaltar que o extensor curto dos dedos possui uma porcentagem mais baixa de fibras do tipo I (45,3%) (80), o que poderia justificar a ausência de alterações neste músculo em mais indivíduos.

Da mesma forma, a perda precoce da VCFM do tibial anterior em nosso estudo poderia ser interpretada como uma confirmação de que a sensibilidade diferenciada de cada tipo de fibra aos efeitos da polineuropatia diabética afeta o padrão de progressão desta neuropatia, pois este músculo possui maior porcentagem de fibras do tipo I (73%) em relação aos outros músculos avaliados (80), sendo este tipo de fibra mais sensível à degeneração causada por esta doença.

A sensibilidade mais exacerbada das fibras do tipo I pode ser observada pelos resultados do tratamento com insulina em diferentes tipos de fibras musculares de pacientes com diabetes, onde fibras do tipo I não exibiram aumento de sua área de secção transversa, diferentemente de fibras do tipo IIA e IIB, onde existiu um crescimento de 35% (81) e aumento da expressão do gene para miosina tipo IIX (29), que é a forma principal de miosina em fibras do tipo IIB. O aumento da área de secção transversa das fibras está diretamente relacionado à VCFM e à capacidade de produzir força de cada fibra muscular, evidenciado que músculos

com maior proporção de fibras do tipo I respondem com menos eficiência à insulinoterapia.

Neste caso, se as fibras do tipo II são mais sensíveis à insulina e tem seu metabolismo promovido por este hormônio e se este tipo de resposta é constante para todos os estágios de severidade da doença, é natural que a manutenção de fibras do tipo II seja favorecida em pacientes diabéticos sob tratamento.

Uma outra evidência da maior suscetibilidade de músculos com maior proporção de fibras do tipo I é a redução da proporção de fibras oxidativas lentas em diabéticos do tipo 2 (43) que justifica a perda observada na atividade enzimática oxidativa, fortemente relacionada ao controle glicêmico a longo prazo e a sensibilidade à insulina.

Para todos os tipos de fibra, diabéticos do tipo 2 também há menor atividade enzimática oxidativa do que sujeitos saudáveis. A atividade das enzimas glicolíticas não é diferente em indivíduos diabéticos quando comparada com sujeitos sadios. Estes dados sugerem que em diabéticos a atividade oxidativa em todos os tipos de fibras musculares também seja responsável pelas mudanças na qualidade das fibras musculares (82).

É interessante que esta redução da VCFM do tibial anterior tenha ocorrido mesmo sem a presença de sinais ou sintomas típicos de neuropatia diabética. Este achado corrobora com a ideia de que o comprometimento motor acontece precocemente no diabetes, juntamente com alterações sensoriais, embora não seguindo um padrão de acometimento de distal para proximal.

Alterações na atividade e função do tibial anterior também foi observada em neuropatas durante a marcha e a subida de escada, tendo sido verificado atraso em sua atividade (14, 83, 84).

O vasto lateral apresenta uma redução significativa no estágio moderado de neuropatia quando comparado com os outros estágios. O envolvimento tardio deste músculo é esperado devido à sua localização mais proximal no membro inferior em relação aos músculos da perna, onde são esperadas alterações mais precoces. Esse decréscimo mais tardio na VCFM também é consistente com resultados prévios obtidos durante a marcha que mostraram uma atividade alterada do vasto lateral em indivíduos diabéticos com neuropatia, mas principalmente em pacientes nos estágios mais avançados da doença (85, 86).

A menor proporção de fibras do tipo I do vasto lateral (38%) em relação ao tibial anterior (80) pode ocasionar a perda de VCFM observada de forma significativa somente nos estágios mais avançados da neuropatia e, portanto, em momentos posteriores à perda ocorrida no tibial anterior. Ao mesmo tempo, o grupo com neuropatia grave apresentou tendência oposta, com recuperação da VCFM do vasto lateral. No entanto, um aumento isolado da VCFM no grupo com neuropatia grave não significa que a função muscular foi restaurada, uma vez que a perda de força muscular em pacientes com diabetes tipo 2 também é consequência da menor quantidade de tecido muscular ativo (34), que não provocaria diminuição da VCFM.

A recuperação da VCFM do vasto lateral em estágios mais graves da doença pode ser atribuída ao *axonal sprouting*, processo que pode ampliar a área das

placas motoras (73) nos estágios avançados da doença, aumentando a quantidade de potenciais não propagados abaixo do eletrodo e, conseqüentemente, a VCFM. Assim, o vasto lateral pode apresentar uma forma de resistência à neuropatia diabética com base em sua composição de fibras musculares e maior índice de recuperação da função nervosa pelo *axonal sprouting*. Apesar deste processo ocorrer em qualquer musculatura desnervada (37), ele estaria acontecendo de forma mais expressiva no vasto lateral, o que reflete na estimativa da sua VCFM.

Este processo de mudança na organização das unidades motoras foi observado em ratos diabéticos, onde a amplitude do potencial de ação da unidade motora aumentou, indicando perda preferencial de unidades motoras menores, ou seu aumento devido à reinervação compensatória pelo *sprouting* para fibras desnervadas (33). As formas terminais e *sprouts* nodais são mais prevalentes em ratos diabéticos, possivelmente devido à tentativa de reinervação das fibras musculares, levando ao aumento das unidades motoras (87). Este aumento compensatório da inervação pode ser promovido pela insulina, estimulando o aparecimento de *sprouts* nodais (88). Foi observado que esse efeito protetor é dado pela insulina na junção neuromuscular liberando fatores indutores de *sprouting*, provavelmente por fibras musculares denervadas ou inativas, incluindo fatores *insulin-like* de crescimento (89).

Em adição à perda da inervação e ao aumento do potencial de ação da unidade motora, existe uma perda do número de unidades motoras (87). A progressiva redução no número de unidades motoras é acompanhada de um aumento proporcional de reinervação colateral. Há uma correlação positiva entre a

velocidade de condução do nervo e o número de unidades motoras, e negativa entre esta velocidade e a latência motora distal. A eficiência da reinervação colateral que acompanha a disfunção axonal pode mascarar os sintomas de neuropatia motora em casos mais leves (73).

Houve tendência à redução linear da VCFM do gastrocnêmio medial e do bíceps femoral ao longo da progressão da neuropatia, ao contrário do que foi identificado no tibial anterior, o qual demonstrou redução maior entre os grupos C e Grv, mantendo VCFM semelhante nos outros grupos. Ambos, gastrocnêmio medial e tibial anterior, são músculos distais, o que traria a expectativa de que a redução nas velocidades de condução das suas fibras acontecesse acompanhando o agravamento da neuropatia. No entanto, é interessante destacar que o gastrocnêmio medial apresenta menos fibras do tipo I do que o tibial anterior: 51% contra 73% (80) e pode, por isso, ser mais resistente ao acometimento ocasionado pela neuropatia diabética.

Junto a isso, o gastrocnêmio medial se mostra como um músculo de difícil aquisição da VCFM. Como suas fibras possuem maior ângulo de penetração do que os outros músculos avaliados (90) e o direcionamento delas varia abaixo dos eletrodos durante a contração voluntária máxima os potenciais de ação são conduzidos de forma não paralela aos eletrodos. Com isso, aumentos no ângulo de penetração durante as medidas podem superestimar os valores de velocidade de condução das fibras (91). O gastrocnêmio medial também apresenta zona de inervação bastante distal (92) e próxima da placa motora, não sendo fácil captar de forma clara os potenciais de ação da unidade motora (93) e restringindo as possibilidades de

posicionamento dos eletrodos para uma boa aquisição de sinais. A falta de resultados significativos entre os grupos em estágios iniciais da doença neste músculo também pode ser atribuída a esses fatores.

Temos de considerar outros fatores que possam afetar a estimativa da VCFM e que podem ter influenciado nossos resultados. Devido às limitações instrumentais do nosso laboratório, a arquitetura muscular não pode ser observada diretamente antes e depois da contração muscular, e aumentos no ângulo de penetração durante as medidas o que poderia superestimar a VCFM (91). Tentamos minimizar o impacto deste fator posicionando os eletrodos em pontos onde as fibras musculares estavam relativamente paralelas ao eletrodo através da inspeção visual do sinal e checando por assimetria nas ondas (70) e escolhendo pontos bem distais, especialmente para o músculo gastrocnêmio.

Resumindo, nossa primeira hipótese foi confirmada uma vez que conforme a neuropatia progride, um decréscimo geral da VCFM foi observado para todos os músculos, além de uma possível recuperação para o músculo vasto lateral, os valores não retornam para o mesmo nível observado no grupo controle.

Nossa segunda hipótese não foi confirmada, uma vez que nem todos os músculos distais foram afetados antes dos músculos proximais. Devido à natureza da progressão distal para proximal em neuropatia diabética, era esperado que mudanças na dinâmica muscular aparecessem primeiramente em músculos distais, não em proximais. No entanto, a constituição das fibras musculares e capacidade de reinervação parecem ser fatores importantes para determinar a perda da VCFM

além da localização anatômica. Estudos futuros devem abordar se estes fatores realmente afetam a VCFM.

Finalmente nossa terceira hipótese foi confirmada parcialmente, uma vez que os valores de VCFM para os músculos estudados diminuíram primeiramente para o tibial anterior, que possui a maior proporção de fibras do tipo I entre os músculos estudados enquanto que para o músculo vasto lateral, que possui a menor proporção observada apenas apresenta um decréscimo isolado nos valores de MFCV em um momento mais tardio da progressão da doença.

Estudos posteriores devem investigar essas hipóteses durante contrações voluntárias isométricas e isotônicas, comparando diferentes intensidades e sua influência sobre atividades diárias, a fim de compreender mais profundamente o padrão de recrutamento muscular e os efeitos sobre a funcionalidade dos indivíduos diabéticos e neuropatas.

De maneira geral, músculos do membro inferior possuem diferentes respostas à progressão do diabetes melitus e severidade da neuropatia, mas em geral as alterações na VCFM não seguiram um padrão homogêneo ou linear de alteração conforme a progressão da doença, não há um padrão distal para proximal claro do envolvimento muscular, no entanto, músculos com uma maior proporção de fibras do tipo I como o tibial anterior tem um pronunciado e precoce decréscimo na VCFM enquanto músculos como o vasto lateral são afetados em estágios mais severos da doença.

6. CONCLUSÃO

Músculos do membro inferior tem diferentes graus de resposta à progressão do diabetes mellitus e da severidade da neuropatia, em geral as alterações na VCFM não seguiram um padrão homogêneo ou linear de perda conforme a progressão da doença. Não existe um padrão distal-proximal claro para o envolvimento muscular. No entanto, músculos com maior proporção de fibras do tipo I como o tibial anterior apresentam uma perda mais precoce e pronunciada da VCFM, enquanto que músculos com maior proporção de fibras do tipo II, como o vasto lateral, são afetados em níveis de neuropatia mais graves.

ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **08/02/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **522/11** intitulado: **“INFLUÊNCIA DA PROGRESSÃO DA DIABETES NOS PADRÕES DINÂMICOS DE RECRUTAMENTO DE FIBRAS MUSCULARES ANALISADOS ATRAVÉS DA ELETROMIOGRAFIA DE ALTA DENSIDADE”** apresentado pelo Departamento de FISIOTERAPIA, FONOAUDIOLOGIA E TERAPIA OCUPACIONAL

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Isabel de Camargo Neves Sacco

Pesquisador (a) Executante: Marco Kenji Butugan

CEP-FMUSP, 09 de Fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, portador do documento de identidade de nº _____ concordo em participar da pesquisa conduzida pelo pesquisador Marco Kenji Butugan e Profª Drª Isabel de Camargo Neves Sacco no Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Objetivo do estudo: Comparar a atividade muscular da perna durante o andar de pessoas diabéticas com diferentes níveis de neuropatia e não-diabéticas.

Explicação do procedimento: O senhor(a):

1. Será entrevistado através de um questionário sobre o controle da diabetes e da neuropatia periférica diabética e será feita uma avaliação da sensibilidade e aparência dos pés.
2. Irá realizar de três a quatro contrações musculares com cada grupo muscular estudado para que seja determinado o melhor local para colocação de eletrodos adesivos na sua coxa e perna.
3. Será realizada uma preparação prévia da pele (raspagem de pêlos no local e limpeza com álcool) e depois serão colocados eletrodos adesivos nos locais predeterminados, O senhor(a) também receberá marcadores, para determinar a posição da perna.
4. Um eletromiógrafo (aparelho para medir a atividade muscular) será conectado aos eletrodos, e o senhor(a) andará em uma pista enquanto é filmado por câmeras que observam apenas a posição dos marcadores. Um computador gravará todos os dados enquanto o senhor (a) andar.
5. O senhor(a) receberá orientações a respeito dos testes feitos e da condição de seus pés.

Duração do experimento: os testes terão a duração de aproximadamente duas horas e serão realizados uma única vez.

Benefícios: O(a) senhor(a) irá contribuir para o entendimento do andar dos diabéticos e o(a) senhor(a) está ciente que este estudo poderá trazer benefícios para a população diabética.

Desconforto e risco: O experimento será não-invasivo, não há nenhum desconforto e não envolve qualquer risco à sua saúde física e mental, além dos riscos encontrados nas atividades normais de vida.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, podendo entrar em contato com Ft. Marco Kenji Butugan, e/ou Profa. Dra. Isabel de Camargo Neves Sacco (orientadora e coordenadora do Laboratório de Biomecânica). Rua Cipotânea, 51, Cidade Universitária, CEP: 05360-160, São Paulo, SP. Tel: 3091-8426. <http://www.usp.br/labimph/>

Direito de confidencialidade: Os resultados verificados serão guardados com suas devidas identificações e mantidos em confidencialidade, sendo utilizados única e exclusivamente para fins científicos.

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas: O senhor(a) tem o direito de conhecer os resultados de quaisquer procedimentos realizados neste estudo

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer momento do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Liberdade de participação: a sua participação neste estudo é voluntária, o senhor(a) tem o direito de interrompê-la a qualquer momento sem qualquer prejuízo do seu atendimento em sua instituição de saúde, e sua identidade não será revelada. O(a) senhor(a) tem o direito de fazer qualquer pergunta nos intervalos do experimento. Os pesquisadores se prontificam a responder todas as questões sobre o experimento. Sua participação neste estudo é de livre e espontânea vontade.

Eu discuti com o pesquisador responsável sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do Paciente Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para participação neste estudo.

Assinatura do Responsável pelo Estudo Data ____/____/____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IDF Diabetes Atlas: International Diabetes Federation; 2013 [cited 2014 01/03]. 6:[Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
2. Abbott CA, Malik RA, van Ross ER, Kulkarni J, Boulton AJ. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. *Diabetes Care*. 2011;34(10):2220-4.
3. Sociedade Brasileira de Diabetes - Atualização brasileira sobre diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2005.
4. Courtemanche R, Teasdale N, Boucher P, Fleury M, Lajoie Y, Bard C. Gait problems in diabetic neuropathic patients. *Arch Phys Med Rehabil*. 1996;77(9):849-55.
5. Simoneau GG, Derr JA, Ulbrecht JS, Becker MB, Cavanagh PR. Diabetic sensory neuropathy effect on ankle joint movement perception. *Arch Phys Med Rehabil*. 1996;77(5):453-60.
6. Vinik A, Ullal J, Parson HK, Casellini CM. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006;2(5):269-81.
7. Payne C, Turner D, Miller K. Determinants of plantar pressures in the diabetic foot. *J Diabetes Complications*. 2002;16(4):277-83.
8. Hile C, Veves A. Diabetic neuropathy and microcirculation. *Curr Diab Rep*. 2003;3(6):446-51.
9. Barcelo A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bull World Health Organ*. 2003;81(1):19-27.
10. Llewelyn JG. The diabetic neuropathies: types, diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74 Suppl 2:ii15-ii9.
11. Dyck PJ, Karnes JL, Daube J, O'Brien P, Service FJ. Clinical and neuropathological criteria for the diagnosis and staging of diabetic polyneuropathy. *Brain*. 1985;108 (Pt 4):861-80.
12. Malik RA, Tesfaye S, Newrick PG, Walker D, Rajbhandari SM, Siddique I, et al. Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. *Diabetologia*. 2005;48(3):578-85.
13. Richardson JK, Ching C, Hurvitz EA. The relationship between electromyographically documented peripheral neuropathy and falls. *J Am Geriatr Soc*. 1992;40(10):1008-12.
14. Sacco IC, Amadio AC. Influence of the diabetic neuropathy on the behavior of electromyographic and sensorial responses in treadmill gait. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2003;18(5):426-34.
15. Witzke KA, Vinik AI. Diabetic neuropathy in older adults. *Rev Endocr Metab Disord*. 2005;6(2):117-27.
16. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2003;26(5):1553-79.
17. Pickup JC, Williams G. Textbook of diabetes. 2nd ed. Oxford ; Cambridge, Mass., USA: Blackwell Science; 1997.
18. Meijer JW, Lange F, Links TP, van der Hoeven JH. Muscle fiber conduction abnormalities in early diabetic polyneuropathy. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(6):1379-84.

19. Andreassen CS, Jakobsen J, Andersen H. Muscle weakness: a progressive late complication in diabetic distal symmetric polyneuropathy. *Diabetes*. 2006;55(3):806-12.
20. Andersen H. Reliability of isokinetic measurements of ankle dorsal and plantar flexors in normal subjects and in patients with peripheral neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil*. 1996;77(3):265-8.
21. Andersen H, Nielsen S, Mogensen CE, Jakobsen J. Muscle strength in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(6):1543-8.
22. Zochodne DW, Ramji N, Toth C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. *Neuroscientist*. 2008;14(4):311-8.
23. Bril V, Werb MR, Greene DA, Sima AA. Single-fiber electromyography in diabetic peripheral polyneuropathy. *Muscle Nerve*. 1996;19(1):2-9.
24. Van der Hoeven JH, Zwartz MJ, Van Weerden TW. Muscle fiber conduction velocity in amyotrophic lateral sclerosis and traumatic lesions of the plexus brachialis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1993;89(5):304-10.
25. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013;93(1):137-88.
26. Andersen H, Gjerstad MD, Jakobsen J. Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 2004;27(10):2382-5.
27. Andreassen CS, Jakobsen J, Ringgaard S, Ejksjaer N, Andersen H. Accelerated atrophy of lower leg and foot muscles--a follow-up study of long-term diabetic polyneuropathy using magnetic resonance imaging (MRI). *Diabetologia*. 2009;52(6):1182-91.
28. Ramji N, Toth C, Kennedy J, Zochodne DW. Does diabetes mellitus target motor neurons? *Neurobiol Dis*. 2007;26(2):301-11.
29. Houmard JA, O'Neill DS, Zheng D, Hickey MS, Dohm GL. Impact of hyperinsulinemia on myosin heavy chain gene regulation. *J Appl Physiol* (1985). 1999;86(6):1828-32.
30. Shields RW, Jr. Single-fiber electromyography is a sensitive indicator of axonal degeneration in diabetes. *Neurology*. 1987;37(8):1394-7.
31. Ballantyne JP, Hansen S. A quantitative assessment of reinnervation in the polyneuropathies. *Muscle Nerve*. 1982;5(9S):S127-34.
32. Homs J, Ariza L, Pagès G, Verdú E, Casals L, Udina E, et al. Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD and ICR diabetic mice. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;16(3):213-27.
33. Tam SL, Gordon T. Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*. 2003;32(5-8):961-74.
34. Ijzerman TH, Schaper NC, Melai T, Blijham P, Meijer K, Willems PJ, et al. Motor nerve decline does not underlie muscle weakness in type 2 diabetic neuropathy. *Muscle Nerve*. 2011;44(2):241-5.
35. Yao CH, Chang RL, Chang SL, Tsai CC, Tsai FJ, Chen YS. Electrical stimulation improves peripheral nerve regeneration in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;72(1):199-205.
36. Allen MD, Choi IH, Kimpinski K, Doherty TJ, Rice CL. Motor unit loss and weakness in association with diabetic neuropathy in humans. *Muscle Nerve*. 2013;48(2):298-300.
37. Andersen H, Stålberg E, Gjerstad MD, Jakobsen J. Association of muscle strength and electrophysiological measures of reinnervation in diabetic neuropathy. *Muscle Nerve*. 1998;21(12):1647-54.
38. Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatr Diabetes*. 2011;12(4 Pt 1):345-64.

39. Reske-Nielsen E, Harmsen A, Vorre P. Ultrastructure of muscle biopsies in recent, short-term and long-term juvenile diabetes. *Acta Neurol Scand.* 1977;55(5):345-62.
40. Allen MD, Major B, Kimpinski K, Doherty TJ, Rice CL. Skeletal muscle morphology and contractile function in relation to muscle denervation in diabetic neuropathy. *J Appl Physiol* (1985). 2013.
41. Andersen H. Motor dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28 Suppl 1:89-92.
42. Fritzsche K, Blüher M, Schering S, Buchwalow IB, Kern M, Linke A, et al. Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibers are altered in patients with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116(10):606-13.
43. Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, et al. Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29(4):895-900.
44. Nakagawa M, Kobayashi S, Kimura I, Kimura M. Diabetic state-induced modification of Ca, Mg, Fe and Zn content of skeletal, cardiac and smooth muscles. *Endocrinol Jpn.* 1989;36(6):795-807.
45. Ruff RL, Whittlesey D. Ca-, Sr-tension relationships and contraction velocities of human muscle fibers. *Muscle Nerve.* 1991;14(12):1219-26.
46. Widrick JJ, Trappe SW, Costill DL, Fitts RH. Force-velocity and force-power properties of single muscle fibers from elite master runners and sedentary men. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):C676-83.
47. Mogensen M, Sahlin K, Fernström M, Glinborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, et al. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007;56(6):1592-9.
48. Larsen S, Ara I, Rabøl R, Andersen JL, Boushel R, Dela F, et al. Are substrate use during exercise and mitochondrial respiratory capacity decreased in arm and leg muscle in type 2 diabetes? *Diabetologia.* 2009;52(7):1400-8.
49. Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Reggiani C. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J Physiol.* 1996;495 (Pt 2):573-86.
50. Widrick JJ, Trappe SW, Blaser CA, Costill DL, Fitts RH. Isometric force and maximal shortening velocity of single muscle fibers from elite master runners. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):C666-75.
51. Buchthal F, Guld C, Rosenfalck P. Innervation zone and propagation velocity in human muscle. *Acta Physiol Scand.* 1955;35(2):174-90.
52. Zwarts MJ. Evaluation of the estimation of muscle fiber conduction velocity. Surface versus needle method. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1989;73(6):544-8.
53. Troni W, Cantello R, Rainero I. Conduction velocity along human muscle fibers in situ. *Neurology.* 1983;33(11):1453-9.
54. Meijer JW, Bosma E, Lefrandt JD, Links TP, Smit AJ, Stewart RE, et al. Clinical diagnosis of diabetic polyneuropathy with the diabetic neuropathy symptom and diabetic neuropathy examination scores. *Diabetes Care.* 2003;26(3):697-701.
55. Merletti R, Farina D, Gazzoni M. The linear electrode array: a useful tool with many applications. *J Electromyogr Kinesiol.* 2003;13(1):37-47.
56. Bigland-Ritchie B, Donovan EF, Roussos CS. Conduction velocity and EMG power spectrum changes in fatigue of sustained maximal efforts. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1981;51(5):1300-5.
57. De Luca CJ. Physiology and mathematics of myoelectric signals. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1979;26(6):313-25.

58. Lindström L, Kedefors R, Petersén I. An electromyographic index for localized muscle fatigue. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1977;43(4):750-4.
59. Farina D, Negro F. Estimation of muscle fiber conduction velocity with a spectral multidip approach. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2007;54(9):1583-9.
60. Farina D, Fosci M, Merletti R. Motor unit recruitment strategies investigated by surface EMG variables. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92(1):235-47.
61. Masuda T, Miyano H, Sadoyama T. The propagation of motor unit action potential and the location of neuromuscular junction investigated by surface electrode arrays. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1983;55(5):594-600.
62. Farina D, Muhammad W, Fortunato E, Meste O, Merletti R, Rix H. Estimation of single motor unit conduction velocity from surface electromyogram signals detected with linear electrode arrays. *Med Biol Eng Comput*. 2001;39(2):225-36.
63. Michigan Diabetes Research and Training Center | MNSI - Michigan Neuropathy Screening Instrument 2000 [cited 2011 18/08]. Disponível em: http://www.med.umich.edu/mdrtc/profs/documents/svi/MNSI_patient.pdf.
64. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 1994;17(11):1281-9.
65. Watari R, Sartor CD, Picon AP, Butugan MK, Amorim CF, Ortega NR, et al. Effect of diabetic neuropathy severity classified by a fuzzy model in muscle dynamics during gait. *J Neuroeng Rehabil*. 2014;11(1):11.
66. Zou KH, Tuncali K, Silverman SG. Correlation and simple linear regression. *Radiology*. 2003;227(3):617-22.
67. Mamdani EH, Assilian S. An experiment in linguistic synthesis with a fuzzy logic controller. *International Journal of Man-Machine Studies*. 1975;7(1):1 - 13.
68. Hermens HJ, Freiriks B. Surface Electromyography for the Non-Invasive Assessment of Muscles 2011 [citado 2012 05/07]. Disponível em: <http://www.seniam.org/>.
69. Barbero M, Gatti R, Lo Conte L, Macmillan F, Coutts F, Merletti R. Reliability of surface EMG matrix in locating the innervation zone of upper trapezius muscle. *J Electromyogr Kinesiol*. 2011;21(5):827-33.
70. Merletti R, Rainoldi A, Farina D. Surface electromyography for noninvasive characterization of muscle. *Exerc Sport Sci Rev*. 2001;29(1):20-5.
71. Farina D, Pozzo M, Merlo E, Bottin A, Merletti R. Assessment of average muscle fiber conduction velocity from surface EMG signals during fatiguing dynamic contractions. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2004;51(8):1383-93.
72. Hunter IW, Kearney RE, Jones LA. Estimation of the conduction velocity of muscle action potentials using phase and impulse response function techniques. *Med Biol Eng Comput*. 1987;25(2):121-6.
73. Hansen S, Ballantyne JP. Axonal dysfunction in the neuropathy of diabetes mellitus: a quantitative electrophysiological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1977;40(6):555-64.
74. Said G, Baudoin D, Toyooka K. Sensory loss, pains, motor deficit and axonal regeneration in length-dependent diabetic polyneuropathy. *J Neurol*. 2008;255(11):1693-702.
75. Krishnan ST, Baker NR, Carrington AL, Rayman G. Comparative roles of microvascular and nerve function in foot ulceration in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1343-8.
76. Scotto Sacchetti M, Balducci S, Bazzucchi I, Carlucci F, Di Palumbo AS, Haxhi J, et al. Neuromuscular dysfunction in diabetes: role of nerve impairment and training status. *Med Sci Sports Exerc*. 2013;45(1):52-9.

77. Lesniewski LA, Miller TA, Armstrong RB. Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 2003;28(4):493-500.
78. Jurkat-Rott K, Holzherr B, Fauler M, Lehmann-Horn F. Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Pflugers Arch*. 2010;460(2):239-48.
79. Grossie J. Contractile and electrical characteristics of extensor muscle from alloxan-diabetic rats. An in vitro study. *Diabetes*. 1982;31(3):194-202.
80. Johnson MA, Polgar J, Weightman D, Appleton D. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sci*. 1973;18(1):111-29.
81. Cederholm T, Sylvén C, Esbjörnsson-Liljedahl M, Jansson E. Insulin treatment increases skeletal muscle fibre area in patients with diabetes mellitus type 2. *Clin Physiol*. 2000;20(5):354-9.
82. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2001;50(4):817-23.
83. Abboud RJ, Rowley DI, Newton RW. Lower limb muscle dysfunction may contribute to foot ulceration in diabetic patients. *Clin Biomech* (Bristol, Avon). 2000;15(1):37-45.
84. Onodera AN, Gomes AA, Pripas D, Mezzarane RA, Sacco IC. Lower limb electromyography and kinematics of neuropathic diabetic patients during real-life activities: stair negotiation. *Muscle Nerve*. 2011;44(2):269-77.
85. Sacco IC, Akashi PM, Hennig EM. A comparison of lower limb EMG and ground reaction forces between barefoot and shod gait in participants with diabetic neuropathic and healthy controls. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11:24.
86. Akashi PM, Sacco IC, Watari R, Hennig E. The effect of diabetic neuropathy and previous foot ulceration in EMG and ground reaction forces during gait. *Clin Biomech* (Bristol, Avon). 2008;23(5):584-92.
87. Francis GJ, Martinez JA, Liu WQ, Zochodne DW, Hanson LR, Frey WH, et al. Motor end plate innervation loss in diabetes and the role of insulin. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(5):323-39.
88. Messi ML, Delbono O. Target-derived trophic effect on skeletal muscle innervation in senescent mice. *J Neurosci*. 2003;23(4):1351-9.
89. Caroni P, Schneider C, Kiefer MC, Zapf J. Role of muscle insulin-like growth factors in nerve sprouting: suppression of terminal sprouting in paralyzed muscle by IGF-binding protein 4. *J Cell Biol*. 1994;125(4):893-902.
90. Manal K, Roberts DP, Buchanan TS. Optimal pennation angle of the primary ankle plantar and dorsiflexors: variations with sex, contraction intensity, and limb. *J Appl Biomech*. 2006;22(4):255-63.
91. Mesin L, Damiano L, Farina D. Estimation of average muscle fiber conduction velocity from simulated surface EMG in pinnate muscles. *J Neurosci Methods*. 2007;160(2):327-34.
92. Saitou K, Masuda T, Michikami D, Kojima R, Okada M. Innervation zones of the upper and lower limb muscles estimated by using multichannel surface EMG. *J Hum Ergol* (Tokyo). 2000;29(1-2):35-52.
93. Gallina A, Ritzel CH, Merletti R, Vieira TM. Do surface electromyograms provide physiological estimates of conduction velocity from the medial gastrocnemius muscle? *J Electromyogr Kinesiol*. 2013;23(2):319-25.