

C-41185

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROLOGIA EXPERIMENTAL E NEUROFISIOLOGIA

**PERFIL LONGITUDINAL CLÍNICO-COMPORTAMENTAL
DE NEUROPATIA DIABÉTICA DOLOROSA
EXPERIMENTAL**

José Artur Costa D'Almeida

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

FC-00003310-4

Fortaleza
1997

155 P
17/11/97

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R8D2J31 / 98	
05 / 05 / 98	

**PERFIL LONGITUDINAL CLÍNICO-COMPORTAMENTAL
DE NEUROPATIA DIABÉTICA DOLOROSA
EXPERIMENTAL**

José Artur Costa D'Almeida

Aprovado em 29.04.1997

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa (orientador)

Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale

Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz

À memória de meu pai, José Severino,
que apesar de ter partido tão cedo da minha
vida, deixou um exemplo marcante de caráter,
responsabilidade, de bom pai e bom marido.

À minha mãe, Jeanete, pelo carinho, amizade,
exemplo de coragem, dedicação, e amor na educação
dos filhos.

Aos meus irmãos Fernando, Ana, e Ricardo pelos
momentos bons que passamos juntos, e pela compreensão
nos momentos em que estive ausente.

À Lídia, porque enriqueceu a minha vida, e o
verdadeiro amor quando chega, a gente sente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Maurício por poder contar com seu notório saber humano e científico, e por sua dedicação na orientação deste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, com que tenho o prazer de contar desde os tempos de estudante de medicina quando comecei a frequentar o laboratório de neurologia experimental e neurofisiologia, e despertei o interesse pela pesquisa.

Aos estudantes que participam do laboratório de Neurologia Experimental, especialmente aos futuros colegas : Carina H. Frota, Janaira F. Severo, Tarciso D. dos S. da Rocha, Trícia F. Nogueira por suas importantes participações na realização deste trabalho.

Aos colegas de mestrado, especialmente os com quem convivi mais de perto no laboratório de neurologia experimental: Terezinha, George, Ricardo, e Nilza, pela sua amizade e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia por sua dedicação e competência, fazendo com que a Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará tenha reconhecimento e prestígio a nível nacional.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Ceará, em especial os do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde, pela sua colaboração dedicada e competente durante o meu curso de mestrado.

Ao Prof. Paulo Roberto Carvalho de Almeida por sua gentileza em fazer a leitura das lâminas do histopatológico.

Ao governo do Estado do Ceará, na pessoa do Dr. Anastácio Queiroz, pela liberação de minhas atividades profissionais para realização desta pós-graduação.

À Direção do Hospital Geral de Fortaleza, na pessoa do Dr. Penaforte, pela sensibilidade em compreender minhas aspirações acadêmicas, apoiando a minha liberação para a realização deste curso de mestrado.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro, através de bolsa de estudo.

LISTA DE FIGURAS

	p
Fig. 3.1 - As quatro medidas do Índice Funcional Ciático.....	20
Fig. 4.1 - Evolução do diabetes a longo termo - Ratos.....	28
Fig. 4.2 - Evolução do diabetes a longo termo - Ratas	29
Fig. 4.3 - Efeito longitudinal do diabetes sobre o peso - Ratos	32
Fig. 4.4 - Efeito longitudinal do diabetes sobre o peso - Ratas	33
Fig. 4.5 - Evolução da distância ortogonal em cm até a pata posterior opo- ta - Ratos.....	35
Fig. 4.6 - Evolução do comprimento da impressão plantar - Ratos.....	36
Fig. 4.7 - Evolução da distância entre o 1° e o 5° pododáctilo - Ratos.....	37
Fig. 4.8 - Evolução da distância entre o 2° e o 4° pododáctilo - Ratos.....	38
Fig. 4.9 - Evolução da distância ortogonal em cm até a pata posterior opo- ta - Ratas.....	39
Fig. 4.10- Evolução do comprimento da impressão plantar - Ratas.....	40
Fig. 4.11- Evolução da distância entre o 1° e o 5° pododáctilo - Ratas.....	41
Fig. 4.12- Evolução da distância entre o 2° e o 4° pododáctilo - Ratas.....	42
Fig. 4.13- Teste Térmico a 40°C - Ratos.....	44
Fig. 4.14- Teste Térmico a 40°C - Ratas.....	45
Fig. 4.15- Teste Térmico a 46°C - Grupo Controle - Ratos.....	46
Fig. 4.16- Teste Térmico a 46°C - Grupo Controle - Ratas.....	47
Fig. 4.17- Teste Térmico a 46°C - Grupo Controle - Ratos e Ratas	48
Fig. 4.18- Evidência de dor em Ratos Diabéticos - Hiperalgesia.....	49
Fig. 4.19- Evidência sensitiva de neuropatia diabét.- Hipoalgesia.....	50
Fig. 4.20- Evolução inicial do comportamento de coçar-se.....	52
Fig. 4.21- Evidência comportamental crônica de neuropatia Diabétic. Dolo- rosa subgrupo 1.....	53
Fig. 4.22- Evidência comportamental crônica de neuropatia Diabétic. Dolo- rosa subgrupo 2.....	54
Fig. 4.23- Evidência comportamental crônica de neuropatia Diabétic. Dolo- rosa subgrupo 3.....	55
Fig. 4.24- Evidência comportamental crônica de neuropatia Diabétic. Dolo- rosa (todo o grupo experimental).....	56
Fig. 4.25- Evolução do Comportamento de Limpar-se - G. Experimental.....	58

Fig. 4.26- Evolução do comportamento de limpar-se - subgrupo 1.....	59
Fig. 4.27- Evolução do comportamento de limpar-se - subgrupo 2.....	60
Fig. 4.28- Evolução do comportamento de limpar-se - subgrupo 3.....	61
Fig. 4.29- Evidência motora de neuropatia diabética - comportamento de empinar-se - subgrupo 1.....	62
Fig. 4.30- Evidência motora de neuropatia diabética - comportamento de empinar-se - subgrupo 2.....	63
Fig. 4.31- Evidência motora de neuropatia diabética - comportamento de empinar-se - subgrupo 3.....	64
Fig. 4.32- Evolução do comportamento de farejar - subgrupo 1.....	66
Fig. 4.33- Evolução do comportamento de farejar - subgrupo 2.....	67
Fig. 4.34- Evolução do comportamento de farejar - subgrupo 3.....	68
Fig. 4.35- Evidência comportamental subclínica de dor - comport. de descansar - subgrupo 1.....	69
Fig. 4.36- Evidência comportamental subclínica de dor - comport. de descansar - subgrupo 2.....	70
Fig. 4.37- Evidência comportamental subclínica de dor - comport. de descansar - subgrupo 3.....	71
Fig. 4.38- Evidência comportamental subclínica de dor - comport. de alimentar-se - subgrupo 1.....	72
Fig. 4.39- Evidência comportamental subclínica de dor - comport. de alimentar-se - subgrupo 2.....	73
Fig. 4.40- Evidência comportamental subclínica de dor - comport. de alimentar-se - subgrupo 3.....	74
Fig. 4.41- Comportamento de coçar-se - morfina e naloxona.....	76
Fig. 4.42- Comportamento de limpar-se - morfina e naloxona.....	77
Fig. 4.43- Comportamento de empinar-se - morfina e naloxona.....	79
Fig. 4.44- Comportamento de farejar - morfina e naloxona.....	80
Fig. 4.45- Comportamento de descansar - morfina e naloxona.....	81
Fig. 4.46- Comportamento de alimentar-se - morfina e naloxona.....	83
Fig. 4.47- Comportamento de congelar - morfina e naloxona.....	84

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1.1- Classificação das Neuropatias Diabéticas.....	5
Tabela 5.1- Animais do Grupo Experimental (sexo, mortalidade, diabetes)..	27
Tabela 5.2- Causas da Mortalidade dos animais diabéticos.....	31

SUMÁRIO

	p
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	viii
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1- Introdução.....	1
1.1- Classificação do Diabetes Mellitus.....	1
1.2- Complicações Crônicas.....	2
1.3- Neuropatia Diabética.....	3
1.4- Classificação da Neuropatia Diabética.....	4
1.5- A Dor e a Neuropatia Diabética.....	7
1.5.1- Definição e Tipos de Dor.....	7
1.5.2- Neuropatia Diabética Dolorosa.....	9
1.6- Modelos Animais de Dor.....	11
1.6.1- Modelo Animal de Neuropatia Diabética Dolorosa.....	12
2- Objetivos.....	15
3- Material e Método.....	16
3.1- Animais.....	16
3.2- Ambiente.....	16
3.3- Horário dos Experimentos.....	16
3.4- Dieta.....	17
3.5- Indução do Diabetes Mellitus.....	17
3.6- Dosagem da Glicemia.....	17
3.7- Observações Clínicas Gerais.....	18
3.8- Avaliação da Função Motora.....	18
3.9- Avaliação da Função Sensitiva.....	21
3.10- Observações Comportamentais.....	22
3.11- Teste Farmacológico.....	25
3.12- Análise Estatística.....	25

3.13-	Aspectos Éticos.....	26
4-	Resultados	27
4.1-	Desenvolvimento do Diabetes Mellitus.....	27
4.2-	Observações Clínicas Gerais.....	30
4.3-	Evidências Motoras de Neuropatia Diabética: Resultados das Medidas do Índice Funcional Ciático.....	34
4.4-	Resultados do Teste Térmico.....	43
4.5-	Resultados do Estudo Comportamental.....	51
4.5.1-	Comportamento de Coçar-se.....	51
4.5.2-	Comportamento de Limpar-se.....	57
4.5.3-	Comportamento de Empinar-se.....	57
4.5.4-	Comportamento de Farejar.....	65
4.5.5-	Comportamento de Descansar.....	65
4.5.6-	Comportamento de Alimentar-se.....	65
4.6-	Teste Farmacológico.....	75
4.6.1-	Efeito da Morfina e naloxona sobre o comportamento de Coçar-se.....	75
4.6.2-	Efeito da Morfina e naloxona sobre o comportamento de Limpar-se.....	75
4.6.3-	Efeito da Morfina e naloxona sobre o comportamento de Empinar-se.....	78
4.6.4-	Efeito da Morfina e naloxona sobre o comportamento de Farejar.....	78
4.6.5-	Efeito da Morfina e naloxona sobre o comportamento de Descansar.....	78
4.6.6-	Efeito da Morfina e naloxona sobre o comportamento de Alimentar-se.....	82
4.6.7-	Efeito da Morfina e naloxona sobre o comportamento de Congelar.....	82
4.7-	Resumo.....	82
5-	Discussão	86
5.1-	Indução do Diabetes Mellitus.....	86
5.2-	Alterações Clínicas.....	87
5.3-	Evidências de Neuropatia Motora.....	88
5.4-	Evidências de Neuropatia Sensitiva.....	90
5.5-	Evidências Comportamentais de Dor.....	92
5.5.1-	O Comportamento de Coçar-se.....	92
5.5.2-	O Comportamento de Limpar-se.....	94
5.5.3-	Os Comportamentos Motores.....	94

5.5.4-	O Comportamento de Descansar.....	95
5.5.5-	O Comportamento de Alimentar-se.....	95
5.6-	Evidências Farmacológicas de Dor.....	96
5.6.1-	Efeito Analgésico da Morfina.....	96
5.6.2-	Efeito da Morfina e Naloxona sobre o Comportamento de Limpar-se.....	98
5.6.3-	Efeito da Morfina e Naloxona sobre os Comportamentos Motores.....	99
5.6.4-	Efeito da Morfina e Naloxona sobre o Comportamento de Descansar.....	99
5.6.5-	Efeito da Morfina e Naloxona sobre o Comportamento de Alimentar-se.....	100
5.6.6-	Efeito da Morfina e Naloxona sobre o Comportamento de Congelar-se.....	100
5.7-	O Modelo Experimental de Neuropatia Diabética Dolorosa.....	100
6-	Conclusões	105
7-	Bibliografia Consultada	106



RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica do metabolismo da energia e uma de suas características são as complicações crônicas. A neuropatia está como uma das complicações crônicas mais frequentes do Diabetes Mellitus. A sua fisiopatologia ainda persiste como um desafio a ser resolvido.

A neuropatia diabética apresenta diversos quadros clínicos. Em um desses quadros se manifesta, também de uma forma heterogênea, como dor crônica neuropática de difícil tratamento, provocando grande sofrimento em seus portadores. Dentre os vários tipos de neuropatias diabéticas dolorosas, a polineuropatia simétrica sensitivo-motora se destaca pela sua maior frequência.

A falta de modelos animais que representem fielmente essa condição clínica de dor faz com que ainda se conheça muito pouco a neuropatia dolorosa diabética em termos de sua fisiopatologia e tratamento.

Os dados da literatura sobre dor experimental em ratos diabéticos são conflitantes e em sua grande maioria quantificam somente comportamentos evocados de dor. Além disso, a maior parte desses estudos foi realizada em curtos períodos de duração da doença.

Com o objetivo de estudar as alterações comportamentais espontâneas, que no nosso conhecimento até o momento não foram relatadas na literatura sobre o tema, induzimos diabetes químico em 32 animais através da injeção de estreptozotocina 75 mg/Kg via intraperitoneal. Os animais foram então, acompanhados por até 27 semanas. Nesse estudo procuramos, através da observação clínica, por alterações similares ao diabetes humano e por evidências de neuropatia motora e sensitiva, através da utilização dos parâmetros do índice funcional ciático e do teste térmico com estímulos não nocivo (40° C) e nocivo (46° C), respectivamente. Entretanto, o alvo do nosso estudo foi caracterizar as alterações comportamentais espontâneas que pudessem sugerir indícios de dor crônica, particularmente o comportamento de coçar-se que tem sido proclamado como parâmetro de dor crônica nociceptiva

em ratos artríticos, e neuropática em ratos com mononeuropatia ciática compressiva.

Para comprovar esses possíveis resultados, tentamos reverter tais alterações comportamentais utilizando um analgésico potente (morfina) e antagonizar seus efeitos sobre os comportamentos através de um antagonista específico (naloxona).

Os nossos resultados evidenciaram uma síndrome clínica similar ao diabetes humano (com poliúria, catarata, e perda de peso), neuropatia motora de predomínio distal, neuropatia sensitiva (hipoalgesia em alguns animais e hiperalgesia em outros). A análise comportamental revelou um aumento do comportamento de coçar-se e de descansar, uma redução dos comportamentos motores, e de alimentar-se, e limpar-se. Os testes farmacológicos com morfina mostraram um inibição do comportamento de coçar-se com recíproco aumento das atividades motora e alimentar, e diminuição do repouso. A naloxona antagonizou os efeitos induzidos pela morfina.

Os resultados obtidos nos permitem concluir que os animais diabéticos apresentaram ao longo de 27 semanas, alterações clínicas gerais e neurológicas similares às encontradas em pacientes diabéticos, tais como poliúria, catarata, evidências de disautonomia, perda de peso, neuropatia motora e sensitiva dolorosa. Isto confirma que o modelo representa bem o estado clínico encontrado no Diabetes Mellitus humano. Além disso, os ratos diabéticos apresentaram evidências comportamentais de dor crônica constatada pela diminuição dos comportamentos de farejar, empinar-se, alimentar-se, e limpar-se, e um aumento dos comportamentos de coçar-se, e de descansar. A morfina reduziu o tempo gasto com o comportamento de coçar-se em animais diabéticos e essa ação foi antagonizada pela naloxona, confirmando assim que esse comportamento, possivelmente, também é manifestação de dor nesse modelo de neuropatia diabética dolorosa em ratos.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic disease of energy metabolism and chronic complications are one of its major characteristics. Neuropathy is the most prevalent chronic complication of Diabetes Mellitus. Its physiopathology still remains as a challenge to be solved.

The diabetic neuropathy shows several clinical pictures. In one of these, the diabetic neuropathy manifests itself as a chronic neuropathic pain of difficult control, provoking a great anguish in its bearers. Among the several types of painful diabetic neuropathies, the sensorimotor symmetric polyneuropathy outstands for its greatest frequency.

Animal models that faithfully represent this painful clinical condition are lacking, and this is one of the reasons why we know very little about the physiopathology and treatment of the painful diabetic neuropathy.

The literature about experimental pain in diabetic rats is conflicting, and in its majority concerns only painful evoked behaviors. Moreover, the majority of these works was accomplished in short periods of disease.

With the purpose of studying not yet reported spontaneous behavioral changes in diabetic rats, we induced diabetes in 32 rats with an intraperitoneal injection of streptozotocin in a dose of 75 mg/Kg. The animals were then followed during 27 weeks. In this study, we looked for changes similar to human diabetes, and for sensorimotor neuropathy evidences, through the utilization of clinical observations, sciatic functional index parameters, and thermal tests with non-noxious (40° C) and noxious (46° C) stimulus, respectively. Nevertheless, the aim of our study was to characterize the spontaneous behavioral changes that could suggest signs of chronic pain, particularly the scratching behavior, that has been proclaimed as a parameter of nociceptive chronic pain in arthritic rats, and of neuropathic pain in rats with compressed sciatic mononeuropathy.

With the aim of testing these possible results, we have tried to revert such behavioral changes utilizing a potent analgesic (morphine), and to antagonize the analgesic effects over the behaviors with a specific antagonist (naloxone).

Our results evidenced a clinical syndrome similar to human diabetes (with polyuria, cataract, and weight loss), motor neuropathy of distal predominance, sensory neuropathy (hypoalgesia in some animals, and hyperalgesia in others). The behavioral analysis revealed an increase of scratching and resting behaviors, and a decrease of motor, eating, and grooming behaviors. The pharmacological tests with morphine showed an inhibition of scratching behavior with reciprocal increase in the motor and eating activities, and decrease of resting behavior. Naloxone antagonized the effects induced by morphine.

The results allowed us to conclude that the diabetic animals showed during 27 weeks, general clinical changes and neurological changes similar to the changes found in diabetic patients, such as polyuria, cataract, disautonomy, weight loss, and painful sensorimotor neuropathy. This confirms the similarity of the model with the clinical condition found in human Diabetes Mellitus. Moreover, the diabetic rats showed behavioral signs of chronic pain, evidenced by decrease in sniffing, rearing, eating, and grooming behaviors, and an increase of scratching and resting behaviors. Morphine decreased the time spent in scratching behavior by the diabetic animals and this was antagonized by naloxone, thereby confirming that this behavior, possibly, is also manifestation of pain in this model of painful diabetic neuropathy in rats.

1 - INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é uma doença sistêmica do metabolismo energético. Atualmente é considerada um problema de saúde pública, pois possui importante morbidade e mortalidade, além do que está entre as doenças não transmissíveis mais prevalentes nos países em diversos estágios de desenvolvimento, juntamente com o trauma, as doenças cardiovasculares, e o câncer (Foss, 1991).

A característica central dessa doença é a hiperglicemia secundária à falta de insulina ou à resistência celular ao efeito da insulina, ou a uma combinação de ambas (Windebank & McEvoy, 1995).

Outra característica importante do diabetes mellitus são as complicações crônicas que aparecem durante a evolução da doença. Destacam-se as complicações que envolvem o sistema nervoso, e dentre estas sobressaem-se as que afetam o sistema nervoso periférico, sendo uma delas, a *neuropatia dolorosa diabética* um dos motivos de maior sofrimento dos pacientes diabéticos.

1.1 - Classificação do Diabetes Mellitus

Os pacientes que apresentam os critérios laboratoriais e clínicos para o diagnóstico da doença podem ser subdivididos em várias síndromes conforme a etiologia do diabetes (primária ou secundária), ou conforme a dependência de insulina (Diabetes Mellitus Insulino-dependente- DMID, Tipo 1, ou Diabetes Mellitus Não Insulino-dependente- DMNID, Tipo 2).

No diabetes primário nenhuma causa específica pode ser encontrada que justifique o aparecimento da doença, enquanto que doença pancreática, anormalidades de outros hormônios, uso de medicamentos, síndromes genéticas, e outras patologias podem ser encontradas como causa do diabetes secundário.

Na classificação do diabetes em DMID e DMNID, a dependência à insulina mencionada não se refere ao tratamento, e sim ao risco que os pacientes com DMID têm, de apresentar um quadro metabólico grave denominado de cetoacidose diabética.

A classificação do diabetes mellitus não é perfeita. Tem-se sugerido que os termos *insulino-dependente* e *não insulino dependente* refiram-se somente à tendência ou não de desenvolver cetoacidose, enquanto que os termos *Tipo 1* e *Tipo 2* poderiam se referir aos mecanismos patogênicos da doença (mediados por mecanismo imunológico, e não-imunológico respectivamente). (Foster, 1991).

1.2 - Complicações Crônicas

Como foi referido anteriormente, uma das características do diabetes mellitus são as complicações crônicas da doença envolvendo olhos, rins, vasos sanguíneos, e sistema nervoso periférico. Tais complicações são em geral comuns a ambos os tipos de diabetes mellitus referidos acima.

A causa e a patogênese exatas das complicações acima são desconhecidas até o momento, entretanto parece haver uma correlação entre a incidência de complicações crônicas e o tempo de duração do diabetes, associado também ao nível de hiperglicemia.

Nem todos os pacientes desenvolverão essas complicações mesmo tendo apresentado hiperglicemia por muitos anos. Outros curiosamente desenvolverão tais complicações precocemente, embora em geral elas apareçam entre 15 e 20 anos após o diagnóstico da doença.

Talvez possa existir um mecanismo de lesão comum a todas as complicações crônicas, já que um paciente com retinopatia terá mais chances de apresentar também nefropatia, ou neuropatia diabética (Windebank & McEvoy, 1995).

1.3 - Neuropatia Diabética

A frequência com que o diabetes mellitus afeta o sistema nervoso é tão alta que se pensou no início que o diabetes mellitus era causado por uma doença neurológica. Somente em 1864, Marchal de Calvi reconheceu que o contrário é que era verdadeiro (Thomas & Tomlinson, 1993).

O diabetes afeta o sistema nervoso principalmente comprometendo os nervos periféricos, entretanto também afeta a retina e é responsável pela maior incidência de acidente vascular cerebral isquêmico nos pacientes diabéticos. Segundo Silveira & Silveira (1994) a neuropatia diabética é a complicação neurológica mais freqüente do diabetes mellitus. Essa complicação é um importante fator de invalidez temporária ou permanente, mortalidade (na neuropatia autonômica), e sofrimento intenso (nas neuropatias dolorosas).

A incidência de complicações neuropáticas nos pacientes diabéticos não é totalmente conhecida, e a prevalência em estudos com mais de 100 pacientes varia amplamente entre 50 e 100 por cento. Tal variação pode ser conseqüência dos diversificados critérios para definição de neuropatia diabética, e/ou da realização da pesquisa em grandes centros onde provavelmente os pacientes teriam diabetes mais grave do que a população geral de pacientes diabéticos.

Os fatores de risco para que os pacientes diabéticos desenvolvam neuropatia são desconhecidos, entretanto parece haver uma correlação entre risco de desenvolver neuropatia e os seguintes fatores: duração do diabetes, envelhecimento, sexo masculino, e alta estatura (Thomas & Tomlinson, 1993).

Os mecanismos de lesão, como já foi mencionado, ainda não são totalmente conhecidos, porém sabe-se que anormalidades vasculares, ultra-estruturais, e metabólicas podem estar implicadas.

As anormalidades vasculares se apresentam principalmente por espessamento da membrana basal do capilar, proliferação de células endoteliais, e aumento no número de capilares fechados nos nervos periféricos. O que suporta essa hipótese são os achados de baixa tensão de oxigênio e alta

resistência vascular no nervo ciático em ratos, no entanto a relevância desses achados não nos permite predizer que no nervo humano aconteça a mesma coisa. Embora tais evidências tenham sido aduzidas para dar suporte a teoria da patogênese de causa vascular para a neuropatia diabética, nada ainda foi muito conclusivo (Thomas & Tomlinson, 1993).

As anormalidades ultra-estruturais correspondem às alterações encontradas a nível de estruturas intracelulares, tais como a agregação de tubulina e microtúbulos causada pela glicosilação não enzimática, e o acúmulo anormal de glicogênio nas mitocôndrias do nervo (Bays & Pfeifer, 1988). As alterações nos microtúbulos levariam à anormalidade do transporte axonal fazendo com que ocorresse degeneração distal do axônio devido à falha na entrega de macromoléculas à parte distal (Thomas & Tomlinson, 1993). Entretanto, Weis et al (1995) relataram num estudo eletrofisiológico e morfológico, que pelo menos na fase inicial as anomalias do axônio ocorrem simultaneamente nos segmentos proximais e distais do nervo periférico. Além de tudo isso, existem síntese protéica e captação de aminoácidos diminuídas nos nervos de animais diabéticos (Thomas & Tomlinson, 1993).

As anormalidades metabólicas são relacionadas principalmente à via do poliols, já que a falta de insulina não parece ser causa direta na patogênese, pois o nervo periférico, assim como o sistema nervoso central, não depende de insulina para a captação de glicose. A maior atividade da via poliols, estimulada pelo aumento da concentração de glicose intracelular, leva ao acúmulo de sorbitol. À isso, associa-se uma redução dos níveis de mio-inositol, os quais são necessários para o metabolismo apropriado dos inositol-fosfolípidos da membrana plasmática, que por sua vez são essenciais no mecanismo de resposta celular à estimulação dos receptores de membrana (Bays & Pfeifer, 1988).

Provavelmente o mecanismo de lesão é multifatorial devendo existir uma combinação das hipóteses acima referidas (Bays & Pfeifer, 1988; Tomlinson & Thomas, 1993; Wright & Nukada, 1994; Stevens et al, 1995). Ainda segundo Stevens (1995), o óxido nítrico pode ser a ponte de ligação entre as hipóteses isquêmica e metabólica dos mecanismos de lesão do diabetes mellitus.

1.4 - Classificação da Neuropatia Diabética

Não existe até hoje uma classificação satisfatória para a grande variabilidade de manifestações clínicas das neuropatias diabéticas, embora várias tentativas de classificação tenham sido realizadas.

Um grande problema que impede uma real utilização das classificações é que geralmente há uma sobreposição das características clínicas das síndromes neuropáticas, assim raramente um paciente preencherá os critérios para um determinado tipo isolado de síndrome neuropática.

Dentre as várias classificações apresentamos a de Asbury (1991), (tab.1.1) que achamos melhor atingiu seus objetivos.

Tabela 1.1

CLASSIFICAÇÃO DAS NEUROPATIAS DIABÉTICAS

SIMÉTRICA	ASSIMÉTRICA
Polineuropatia distal primariamente sensitiva (comprometimento de grandes fibras, de pequenas fibras, ou mista) *	Neuropatia motora proximal aguda ou subaguda *
Neuropatia autonômica	Mononeuropatia craniana *
Neuropatia motora proximal evoluindo cronicamente *	Neuropatia de tronco *
	Neuropatia por aprisionamento *

* Associadas a dor

Fonte: Asbury, A K , 1991

Segundo Asbury, a classificação das neuropatias diabéticas não nos diz nada sobre a patogênese da lesão neuropática. Windenbank & McEvoy no entanto, lembram que a classificação provê uma base para o diagnóstico diferencial com neuropatias de outras etiologias. Além disso nos dá uma idéia do prognóstico para determinados tipos de neuropatia diabética.

A neuropatia motora proximal aguda ou subaguda caracteriza-se por dor severa com ou sem atrofia da musculatura da coxa. Ela se desenvolve durante semanas a meses e está muitas vezes associada com perda de peso importante. A fraqueza muscular proximal pode chegar a impedir a deambulação. Esse tipo de neuropatia ocorre numa porcentagem de 5 % segundo Bays & Pfeifer, e acomete pacientes de média idade ou acima. A recuperação geralmente ocorre em seis a doze meses, com recuperação da força muscular e melhora da dor, porém muitos pacientes progridem para outro tipo de neuropatia.

As mononeuropatias cranianas afetam principalmente o VI, III, IV, e VII pares cranianos por ordem decrescente de frequência. O início da paralisia é abrupto e às vezes precedido de dor na região temporal ou supra-orbital. A recuperação total é a regra, acontecendo em geral dentro de três a seis meses.

As neuropatias de tronco manifestam-se principalmente por radiculopatia dolorosa assimétrica, de início súbito, de localização intercostal ou abdominal, em indivíduos diabéticos de média idade ou acima, com longo tempo de diabetes. Geralmente a recuperação ocorre em cerca de três meses.

As neuropatias por aprisionamento (entrapment neuropathies), que têm como protótipo a Síndrome do Túnel do Carpo aparecem em uma porcentagem de 30 %, segundo Bays & Pfeifer (1988). Pode também ocorrer comprometimento do nervo ulnar (Síndrome do Túnel Cubital), ou do nervo peroneal. O comprometimento é progressivo sendo necessário a liberação cirúrgica do nervo.

A neuropatia motora proximal evoluindo cronicamente é apenas uma variante simétrica da homônima subaguda. Ocorre raramente segundo Bays & Pfeifer.

A neuropatia autonômica pode ser demonstrada em 20 a 40 % dos pacientes diabéticos não selecionados (Manço et al, 1991). Além de estar

associada a alta morbidade, a neuropatia autonômica também implica em aumento da mortalidade associada à doença (Waltkins, 1990; Manço et al, 1991). As manifestações clínicas podem ser sintomas vagos, intolerância ao exercício, hipotensão ortostática, disfagia, pirose, anormalidades de esvaziamento gástrico, constipação, diarreia, incontinência fecal e urinária, disfunção urinária, impotência e outras disfunções sexuais, e/ou sudorese prejudicada.

A polineuropatia distal primariamente sensitiva é o tipo mais freqüente dentre as neuropatias diabéticas. Segundo Bays & Pfeifer acontece numa percentagem de 70 % nos pacientes com neuropatia diabética. Os vários subtipos desta neuropatia podem corresponder às várias gradações de um mesmo espectro. Tem sido observado que o comprometimento das fibras de pequeno diâmetro ocorre primariamente (Watkins 1990) e não foi estabelecido ainda se ocorre comprometimento isolado das fibras de grande diâmetro (Barreira et al, 1991). A característica básica desta neuropatia é o distúrbio sensitivo, manifestando-se por perda sensitiva de várias modalidades e aparecimento de dor espontânea debilitante (Bays & Pfeifer, 1988). O comprometimento das fibras motoras é limitado aos músculos intrínsecos das mãos e pés, e sempre está associado ao distúrbio sensitivo. Ao contrário dos tipos de neuropatias diabéticas referidas anteriormente, a dor da polineuropatia diabética pode persistir por muitos anos (Young et al, 1988) levando o paciente a um sofrimento intenso e à depressão.

1.5 - A Dor e a Neuropatia diabética

1.5.1 - Definição e Tipos de Dor

A dor representa um sinal precoce e fisiológico de morbidade, sendo a principal experiência sensorial entre todas as outras pelas quais o indivíduo julga a presença de uma doença nele mesmo. Sua natureza dual é responsável pela dificuldade até então encontrada no seu entendimento (Adams et al, 1997). Se por um lado se resume numa evocação de um nociceptor por um estímulo definido, seguido de transmissão de impulsos nervosos por determinadas vias até o cérebro (Machado 1988, Berne & Levy 1990, Moura 1994, Santos 1995) isto é: nocicepção, por outro envolve respostas afetivas e comportamentais complexas (De Castro Costa, 1986).

Fundamentando-nos em várias características das diversas apresentações clínicas das síndromes dolorosas podemos classificar a dor em aguda ou crônica, nociceptiva ou neuropática.

A dor aguda, em geral breve, é uma consequência normal da injúria tissular. Após tal injúria, a região atingida torna-se dolorosa e sensível. Estas sensações diminuem gradualmente até a cicatrização do processo. A dor aguda tem a importante função biológica de proteger o indivíduo contra lesões através da indução de respostas reflexas segmentares e supra-segmentares. Essas respostas induzem a quebra de glicogênio hepático e a liberação de glicose na corrente sangüínea, aumentam a frequência respiratória, elevam a pressão arterial, aumentam o tônus e a força muscular, aumentam a perfusão sangüínea de órgãos nobres e diminuem a mesma nos órgãos menos prioritários.

A dor crônica pode durar meses ou anos. Pode ser desencadeada por injúria tissular, porém não cessa com a finalização do processo de injúria, portanto não tem função biológica imediata. Está associada a distúrbios do sono, anorexia, diminuição da libido, irritabilidade, depressão, afastamento social, e incapacitação profissional.

A dor nociceptiva é causada pela liberação induzida por lesão tissular, de substâncias tais como histamina, bradicinina, prostaglandinas, serotonina, substância P, as quais estimulam os nociceptores. A dor nociceptiva pode ser aguda ou crônica, como por exemplo no trauma músculo-esquelético e na artrite reumatóide, respectivamente.

A dor neuropática acontece em indivíduos que sofreram lesão no sistema nervoso e persistem com dor durante meses, anos, décadas após essa lesão ter se resolvido. Esses indivíduos tiveram trauma ou doença afetando os nervos periféricos, as raízes sensitivas dorsais, a medula espinhal, ou algumas determinadas regiões cerebrais (Bennett, 1994). Algumas vezes, como na distrofia simpática reflexa, não existe lesão detectável no sistema nervoso. A dor neuropática pode ser espontânea, contínua, ou paroxística. Os sintomas da dor neuropática não são homogêneos. Analisando as diversas características dessa dor, vemos que existem diferentes tipos de sensações dolorosas neuropáticas, e dentre elas vamos caracterizar a hiperalgesia, a alodínia, e a hiperpatia. A hiperalgesia corresponde à intensa sensação dolorosa desproporcional ao estímulo nocivo aplicado. Alodínia se refere à situação

onde um estímulo normalmente inócuo produz uma sensação de dor. A hiperpatia é uma síndrome dolorosa caracterizada por uma reação anormal ao estímulo nocivo ou não, especialmente um estímulo repetitivo, em uma área onde existe perda sensitiva (Bogduk & Merskey, 1994). A hiperpatia portanto seria uma situação onde a alodínia e/ou hiperalgesia coexistem com uma perda sensitiva (Bennett, 1994).

A dor neuropática é de difícil tratamento. Atualmente várias drogas têm sido usadas para o tratamento dessa dor, porém todas possuem eficácia limitada e a ocorrência de efeitos colaterais é alta. Muitos pacientes não obtêm alívio nenhum.

1.5.2 - *Neuropatia Diabética Dolorosa*

Como foi referido anteriormente vários subtipos de neuropatia diabética estão associados à dor. Restringiremo-nos à polineuropatia primariamente sensitiva por ser a mais prevalente e por apresentar dor mais duradoura, angustiante para o paciente, e de mais difícil controle clínico.

A dor presente na neuropatia diabética pode ser classificada como uma dor crônica neuropática. Pode iniciar-se em qualquer estágio na evolução do diabetes, podendo inclusive ser seu primeiro sintoma. Paradoxalmente pode aparecer após melhora do controle glicêmico (Llewelyn et al, 1988; Watkins, 1990; Thomas & Tomlinson, 1993; Windebank & McEvoy, 1995; Castellanos et al, 1996).

Diversas gradações e características de dor podem afligir os pacientes diabéticos variando desde leve parestesia (sensação de formigamento) até uma dor incapacitante e contínua que causa sofrimento intenso aos seus portadores (Watkins, 1990). A dor dessa condição clínica é excepcionalmente angustiante. A sensação dolorosa em queimação descrita às vezes “como sensação de andar sobre areia quente”, pode estar associada à parestesias, sensação de edema no local da dor, e desconforto e dor ao contato com objetos (tanto que os pacientes não podem suportar o contato com a própria roupa do corpo, ou com a roupa de cama, o que traduz alodínia) (Archer et al, 1983). As dores em queimação em geral ultrapassam os limites dos pés, podendo atingir as pernas, coxas, e mãos (Barreira et al, 1991). Geralmente são contínuas, espontâneas, e acontecem no repouso. Por outro lado essas dores podem não ser contínuas, sendo somente desencadeadas pela deambulação. Os sintomas geralmente

pioram à noite causando insônia e depressão, e podem estar também associados à perda de peso (Watkins, 1990).

Outro tipo de dor relatada pelos pacientes é a dor profunda nos membros inferiores, referida como muscular ou óssea em sensação de torção ou facada. É geralmente espontânea, mas pode ser desencadeada pela palpação do examinador. Essa palpação pode inclusive desencadear dores que o paciente não havia percebido até o momento do exame (Barreira et al, 1991).

É interessante referir como alguns pacientes tentam um pouco de alívio para suas dores. Alguns obtêm alguma melhora mergulhando os pés em água gelada e relatam que a água morna ou quente piora os sintomas, outros referem exatamente o contrário, ou seja, a água morna melhora a dor, enquanto a água gelada a piora.

O exame neurológico desses pacientes com neuropatia diabética dolorosa é particularmente interessante. Alguns apresentam dor sem possuir nenhuma alteração perceptível ao exame físico, outros apresentam déficit que varia de leve hipostesia (diminuição da sensibilidade tátil) distalmente, até a anestesia (ausência de sensibilidade tátil), o que traduz hiperpatia. Outros ainda apresentam hipopalestesia (diminuição da sensibilidade vibratória), diminuição ou abolição de reflexos miotáticos, diminuição da força muscular, e atrofia muscular distalmente. Alguns pacientes também apresentam sinais de neuropatia autonômica como ausência de sudorese distal e simetricamente, atrofia da pele, e fissuras plantares. A hiperalgesia e a alodínia estão presentes, e é singularmente intrigante o fato de alguns pacientes apresentarem diminuição ou ausência de sensibilidade dolorosa ao exame físico, e possuírem dor crônica espontânea (anestesia dolorosa) (Castellanos et al, 1996).

A causa da dor na neuropatia diabética ainda é desconhecida. Tem sido sugerida a hipótese de que a regeneração e degeneração de fibras nervosas seja responsável pela geração da dor (Young et al, 1988).

As dores e os fenômenos dolorosos constituem-se em distúrbios incapacitantes e angustiantes para o paciente diabético (Barreira et al, 1991) e o alívio da dor é extremamente difícil de se conseguir (Watkins, 1990). Apesar dos avanços substanciais no entendimento da nocicepção e aumento no armamentário de drogas para opção terapêutica, os resultados atingidos no tratamento desses pacientes ainda são frustrantes e insatisfatórios

(Rowbotham, 1995). É preciso, pois, aprofundar ainda mais o estudo e a pesquisa sobre a neuropatia diabética dolorosa.

As dificuldades que surgem da complexidade da dor humana, juntamente com as limitações éticas para a pesquisa experimental em humanos (de Castro Costa, 1986), impõem-nos a necessidade de desenvolver e utilizar modelos animais de dor.

1.6- Modelos Animais de Dor

O desenvolvimento de modelos experimentais tem contribuído em muito para o entendimento da fisiopatologia da dor, apesar das limitações éticas dessa pesquisa e da extrapolação que tem que ser feita da expressão comportamental e clínica da dor nos animais para a dor humana.

Os modelos de dor aguda empregam estímulos mecânicos, físicos, e químicos. Os métodos de estímulo mecânico (pinçamento da cauda, pressão sobre a pata) derivam dos experimentos de Von Frey que utilizava a pressão mecânica quantificada sobre a pata posterior do animal. Os métodos físicos consistem em estímulos elétricos dos nervos periféricos, e uso de calor ou frio (teste da imersão da pata em água gelada ou quente, imersão da cauda em água quente, uso do calor radiante na cauda, teste da placa quente). Os métodos químicos consistem na indução de dor administrando substâncias irritantes via intraperitoneal (teste do ácido acético), intra-arterial, ou subcutânea (teste da formalina, e da PGE₂). Todos os modelos de dor aguda objetivam observar e quantificar nos animais, da forma mais precisa possível, as respostas comportamentais que sugerem dor, tais como vocalização, reações motoras reflexas, e alterações autonômicas.

Nos modelos de dor crônica é extremamente difícil interpretar as manifestações de dor dos animais, principalmente por não sabermos totalmente como um animal manifesta dor crônica. Tem-se sugerido como tentativa de resolução do problema, uma abordagem comportamental. Assim, aparecimento de comportamentos anormais, ou mudanças em determinados comportamentos são interpretados como possíveis manifestações de dor crônica. Dentre esses comportamentos, os chamados *Comportamentos Autodirigidos*, como limpar-se, morder-se, e coçar-se têm sido relacionados à manifestação de dor crônica.

Os modelos de dor crônica podem ser subdivididos em: Modelos de Dor Crônica Nociceptiva e Modelos de Dor Crônica Neuropática.

No estudo da dor crônica nociceptiva tem sido utilizado o modelo do rato artrítico. Uma emulsão oleosa contendo *Mycobacterium butyricum* é inoculada na derme dos animais, os quais desenvolvem uma poliartrite de causa imunológica. A doença se desenvolve somente em ratos e tem duração de cerca de 8 a 12 semanas (De Castro Costa, 1979). O rato artrítico apresenta o comportamento de coçar-se (scratching) anormalmente aumentado, sendo esse comportamento considerado um parâmetro de dor crônica (De Castro Costa, 1981, 1986, e 1987).

A dor crônica neuropática tem sido provocada através de lesões no sistema nervoso central ou periférico dos animais tais como lesão medular, indução de neuroma, secção de raízes dorsais, compressão do nervo ciático (Bennett & Xie, 1988), compressão parcial do nervo ciático (Seltzer et al 1990), ou lesão metabólica (modelo de neuropatia dolorosa diabética).

1.6.1- *Modelo Animal de Neuropatia Diabética Dolorosa*

Vários animais (cachorro, coelho, rato, camundongo) têm sido utilizados no desenvolvimento do diabetes experimental. Dentre esses, os roedores têm sido escolhidos por seu baixo custo e relativa facilidade de utilização (Thomas & Tomlinson, 1993). Entre os roedores os trabalhos mostram uma predominância da utilização de ratos.

O diabetes mellitus pode ser induzido quimicamente através de drogas como aloxana ou estreptozotocina, tendo esta última suplantado a primeira nos trabalhos mais recentes (Thomas & Tomlinson, 1993). O mecanismo de indução do diabetes através dessas drogas acontece pela destruição das células beta produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, tornando os animais insulino-dependentes.

Outros modelos utilizam animais espontaneamente diabéticos como o rato BB (Lee et al, 1990), o camundongo C57 BL/Ks (db:db) (Thomas & Tomlinson, 1993), o rato WBN/Kob (Narama & Kino, 1989), ou uma espécie de rato, *Psammomys obesus*, que no seu ambiente natural é magro e normoglicêmico, porém no cativeiro torna-se obeso, hiperglicêmico,

hiperinsulinêmico, e geralmente desenvolve catarata, tornando-se assim um modelo de diabetes mellitus tipo 2 (Wuarin-Bierman et al, 1987).

Tem sido argumentado que o diabetes de origem genética apresentaria modelos mais fidedignos do que os induzidos quimicamente, entretanto não se reportou in vivo até o momento nenhum efeito neurotóxico de doses diabetogênicas da estreptozotocina. Além disso o rato BB que é espontaneamente diabético, também apresenta tireotoxicose, prejudicando as conclusões, pois haveria a presença de duas doenças (Thomas & Tomlinson, 1993).

Nenhum modelo é perfeito, e tendo em mente que o rato está longe do homem do ponto de vista filogenético, as extrapolações dos resultados para o homem devem ser cuidadosas.

Vários testes de dor têm sido utilizados no modelo do rato diabético, como o teste da placa quente, o da pressão na pata, o da imersão da pata em água quente ou gelada a várias temperaturas, o da imersão da cauda em água quente, o do calor radiante na cauda, e o do estímulo nocivo químico através da formalina. Os resultados são conflitantes, tendo alguns pesquisadores encontrado hiperalgesia nos animais quando da aplicação desses testes, enquanto outros não observaram tal achado, e já outros relataram diminuição da sensibilidade à dor (Courteix et al, 1993).

O tempo de duração do diabetes, quando esses testes foram realizados, variou de três dias a trinta semanas (Courteix et al, 1993), sendo que a maioria dos trabalhos tem utilizado uma duração de cerca de quatro semanas de diabetes.

O modelo da dor em animais diabéticos tem sido estudado, porém os dados da literatura são conflitantes e a análise comportamental do animal em resposta à dor tem sido incompleta (Lee & McCarty, 1990; Courteix et al, 1993). Segundo Courteix, a razão para essa discrepância são várias: a utilização tanto de ratos como camundongos, o uso do teste da placa quente, o modo de indução do diabetes (não existe diferença entre as várias doses de estreptozotocina, porém animais tratados com aloxana apresentaram menos resultados esclarecedores), o nível de hiperglicemia, o tempo de duração do diabetes, e a falta de pré-seleção dos animais respondedores (Courteix et al, 1993).

Courteix sugeriu ainda as seguintes recomendações esquemáticas no estudo experimental da dor da neuropatia diabética: preferir ratos ao invés de camundongos, usar testes com estímulos localizados (evitando o teste da placa quente), usar estímulos nocivos e não nocivos, trabalhar após pelo menos três ou quatro semanas de diabetes, previamente selecionar os animais respondedores (Courteix et al, 1993).

No nosso conhecimento não há nenhum trabalho utilizando parâmetros comportamentais espontâneos, tais como tempo gasto em alimentação, tempo gasto em descansar, tempo gasto em comportamentos exploratórios, ou tempo gasto em coçar-se na quantificação de dor em ratos diabéticos. Este último comportamento tem sido utilizado como parâmetro de dor crônica nociceptiva em ratos artríticos (De Castro Costa, 1979; De Castro Costa, 1981; De Castro Costa, 1986; De Castro Costa, 1987; Barbosa, 1990;), e em ratos com mononeuropatia ciática compressiva (Kupers et al, 1992; Moura, 1994; Santos, 1995). Além disso, poucos estudos têm tentado demonstrar longitudinalmente o perfil clínico-comportamental desses animais.

A falta na literatura de referências à quantificação da dor crônica no rato diabético, através do tempo de coçar-se principalmente, motivou-nos a determinar se esse comportamento estaria aumentado em ratos diabéticos com sinais de neuropatia, e assim evidenciar de forma comportamental a dor crônica.

2 - OBJETIVOS

2.1- Observar durante longo tempo de evolução, as alterações clínicas apresentadas pelos ratos diabéticos.

2.2 - Quantificar a evolução do tempo gasto nos comportamentos de farejar, alimentar-se, empinar-se, descansar/dormir, congelar-se, limpar-se, e coçar-se em ratos diabéticos durante um longo tempo de evolução do diabetes.

2.3 - Determinar e quantificar através das medidas do Índice Funcional Ciático se há comprometimento motor nesses animais.

2.4- Determinar se há evidências de alodínia, ou hiperalgesia nesses animais, através do teste da imersão das patas em água a 40 e 46° C.

2.5 - Correlacionar os resultados do teste térmico com as alterações comportamentais porventura encontradas.

2.6 - Confirmar ou afastar a possibilidade do comportamento de coçar-se ser manifestação de dor crônica em ratos diabéticos, submetendo tal comportamento ao efeito da morfina e da naloxona.

3 - MATERIAL E MÉTODO

3.1 - Animais

Foram utilizados 85 ratos wistar com cerca de 6 a 7 semanas de idade, pesando entre 100 e 125 g, sendo que desse total 35 foram fêmeas e 50 foram machos. Vinte animais, dez ratos e dez ratas, foram separados para os grupos controles. Os outros 65 animais (25 ratas e 40 ratos) foram utilizados para o grupo experimental.

3.2 - Ambiente

Os ratos foram colocados, em número de aproximadamente 5 a 8 animais, em gaiolas de plástico medindo 40cm de comprimento, 31cm de largura, e 17cm de altura.

O fundo destas gaiolas era coberto por raspas de madeira, e o teto consistia em grade de metal com um espaço para serem colocados comida e água.

Os animais eram deixados em ambiente com temperatura de 25°C, luz natural durante o dia, e acesso à água e comida *ad libitum*.

3.3 - Horário dos Experimentos

Todos os experimentos, observações clínicas, e comportamentais foram realizadas entre 7 e 18 horas.

3.4 - Dieta

Os animais foram alimentados com a ração *Fri-lab Ratos* produzida por DISPA - Ind. de rações Fri-Ribe Ind. Brasil. Tal ração era composta de milho moído, farelo de arroz desengordurado, farelo de arroz integral, farelo de girassol, fosfato monoamônico. Cada 100 g de ração continha 23% de proteína, 22% de água, 4% de extrato etéreo, 8% de fibra, 11% de minerais (ferro, cobalto, cobre, manganês, zinco, iodo), 1% de cálcio, 0,45% de fósforo, e vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, Ac. Nicotínico, Ac. Pantotênico, C, D3, E, K, e folato).

3.5- Indução do Diabetes Mellitus

O diabetes foi induzido com a droga Estreptozotocina (streptozotocin, Sigma Co, St. Louis, MO), um agente alquilante do grupo das nitrosoureas que tem uma especial afinidade pelas células beta das ilhotas de Langerhans (Chabner et al, 1996).

A droga foi diluída numa solução de citrato de sódio 0,1 M em pH 4,5 , e logo após administrada na dose de 75 mg/Kg via intraperitoneal.

3.6 - Dosagem da Glicemia

A glicemia foi medida através de fitas, quinzenalmente na fase inicial e depois mensalmente, utilizando o aparelho Glucometer ENCORE- Blood Glucose Meters produzido por Miles Inc.

Uma pequena amostra de sangue era obtida de cada animal através de mínimo corte na ponta da cauda, que era “ordenhada” para que o sangue contido na mesma pingasse na fita. O corte era realizado com lâmina de bisturi, após anti-sepsia da cauda com álcool a 75%, e sem anestesia. Em seguida era realizada a leitura da fita conforme orientação do fabricante do aparelho.

Os animais que apresentaram glicemia abaixo de 230 mg% foram excluídos da pesquisa.

3.7 - Observações Clínicas Gerais

Diariamente eram realizados exames clínicos atentando para trofismo muscular, coloração e aspecto do pêlo, cor dos olhos, presença de parasitas, sinais de infecção local ou generalizada, vocalização, marcha, e sinais de autotomia.

Os animais foram pesados semanalmente até a 30^a semana de diabetes.

3.8 - Avaliação da Função Motora

Além das observações clínicas utilizamos uma escada de três degraus para avaliar força muscular, e destreza dos animais. Essa escada tinha as seguintes dimensões: 16,5 cm de altura, 22 cm de largura, e 8 cm de comprimento. As alturas dos degraus eram 4 cm para o primeiro, 5,5 cm entre o primeiro e o segundo, e 7 cm entre o segundo e o terceiro, respectivamente. A escada ficava num dos cantos do observatório, e durante as observações comportamentais era anotado quantos degraus cada animal subia.

Para confirmar o comprometimento motor foram utilizados os parâmetros do Índice Funcional Ciático (Medinaceli et al, 1982).

Esse índice consiste num escore encontrado por uma fórmula matemática, onde se colocam valores obtidos de medições nas pegadas impressas das patas posteriores durante a marcha do animal.

Utilizamos tais parâmetros isoladamente, visto que tal índice foi proposto para avaliar neuropatia assimétrica, e na grande maioria dos casos de neuropatia motora causado pelo diabetes o comprometimento é bilateral.

Os parâmetros avaliados foram: distância ortogonal entre a impressão da pata posterior esquerda e direita, comprimento da impressão plantar da

pata, distância entre o primeiro e o quinto pododáctilo, e distância entre o segundo e o quarto pododáctilo.

A primeira medida citada acima corresponde a projeção ortogonal da distância entre a ponta dos dedos da impressão de uma pata até a ponta dos dedos da impressão da pata contralateral (fig.3-1).

A segunda medida corresponde ao comprimento da impressão plantar (do calcâneo até a ponta dos dedos) com a precisão de milímetros de cada pata posterior (fig.3-1).

A terceira medida corresponde a distância linear entre o centro do primeiro e o centro do quinto pododáctilo da impressão da pata de cada lado (fig.3-1).

A quarta medida corresponde a distância linear entre o centro do segundo e o centro do quarto pododáctilo da impressão da pata de cada lado (fig.3-1).

Em cada parâmetro, foi valorizada a maior medida encontrada na pata posterior direita e na esquerda, e foi considerado para a expressão dos dados, a soma das medidas das duas patas.

Para se obter as medidas construímos um pequeno corredor de paredes e chão de madeira, medindo 9 cm de largura, 45 cm de comprimento, e cujas paredes tinham 12 cm de altura. No final do corredor era acoplado uma caixa de madeira com tampa removível. Era realizado com cada animal um “treinamento” prévio antes de cada experimento, a partir daí então, uma vez colocado no corredor, o animal sempre caminhava para o compartimento escuro da caixa.

Na execução do experimento, colocávamos sobre o chão do corredor uma folha de papel em branco com as próprias medidas do mesmo. Em seguida as patas posteriores do animal eram pintadas com tinta guache atóxica (*Acrilex Tintas Especiais S.A- Ind. Brasileira*) de cor azul utilizando um pincel n.º 12. A seguir o animal era colocado no início do corredor e rapidamente caminhava para o final do mesmo, entrando na caixa escura de onde era removido posteriormente. A folha de papel era retirada para secar e após isso fazíamos

as medidas nas impressões das patas, utilizando régua transparente e milimetrada.

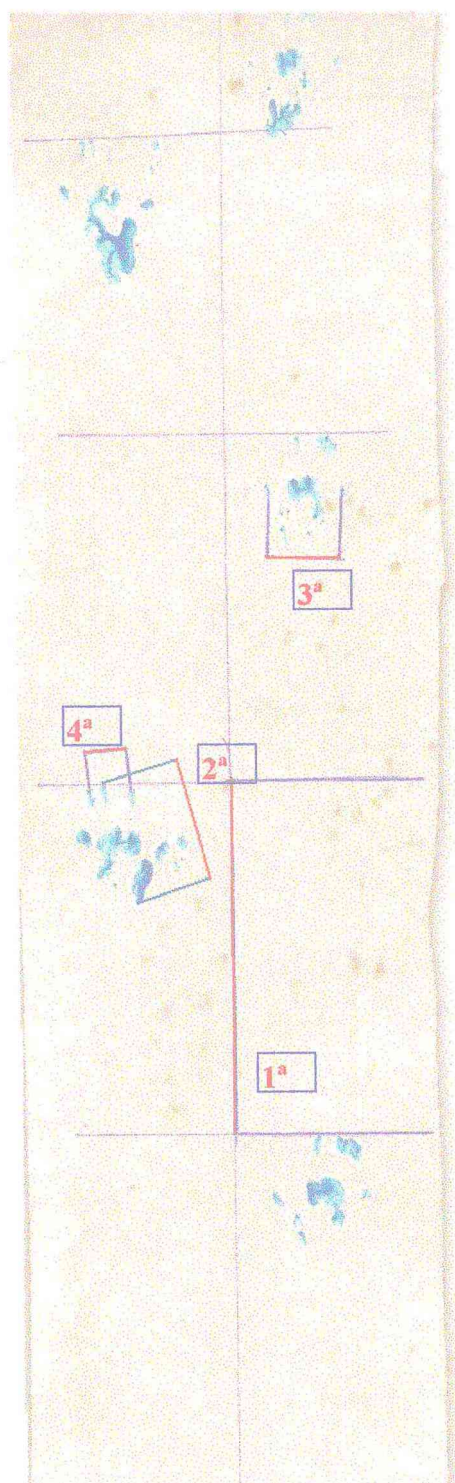


Fig. 3.1

As quatro medidas do índ. funcional na mesma ordem em que são citadas no texto.

Esses experimentos foram realizados mensalmente após a 10^a, e até a 30^a semana para ratos e ratas separadamente, utilizando como grupos controles animais do mesmo sexo respectivamente.

3.9 - Avaliação da Função Sensitiva

Na avaliação da sensibilidade foi utilizado o teste térmico da imersão da pata em banho-maria em temperatura a 40°C (estímulo não nocivo) e 46° C (estímulo nocivo).

O teste térmico foi realizado com intervalo de duas ou três semanas, entre a 12^a e 27^a semanas de diabetes.

Na execução deste teste o rato era envolvido por uma pequena toalha de modo que somente as patas posteriores e a cabeça ficavam descobertas. Isso visava diminuir o estresse do animal. Em seguida uma das patas era imersa em água num aparelho de banho-maria cuja temperatura era monitorada através de termômetro imerso no mesmo. No instante da imersão era acionado um cronômetro (Technos) que era desligado tão logo o animal retirasse a pata. O tempo de latência da retirada da pata era então anotado. O mesmo procedimento era realizado para a outra pata posterior.

O teste era realizado primeiramente em temperatura a 40° C em todos os animais. Após isso, era iniciado o teste térmico a 46°C com o primeiro animal que começou o teste a 40°C, seguindo-se a mesma ordenação.

Para o teste a 40 e 46° C usou-se um cut-off de 15 segundos como tempo máximo registrado. No caso de 46° C, pretendia-se evitar lesão por exposição excessiva ao estímulo térmico nocivo.

Após análise dos dados, o grupo experimental (28 animais, sendo 22 ratos e 6 ratas) foi subdividido em: Subgrupo 1 e Subgrupo 2.

O Subgrupo 1 agrupou os animais cuja latência da retirada da pata ao teste térmico a 46°C foi abaixo de 8 segundos (12 animais, sendo 9 ratos e 3 ratas).

O Subgrupo 2 agrupou os animais cuja latência da retirada da pata ao teste térmico a 46°C foi igual ou acima de 8 segundos (16 animais, sendo 13 ratos e 3 ratas).

Utilizamos esse cut-off de oito segundos para a separação desses subgrupos baseados nos resultados do grupo controle (17 animais, sendo nove ratos e oito ratas), e baseados em possíveis expressões clínicas de hiperalgesia e hipotalgesia respectivamente, nos animais experimentais.

Os resultados das observações comportamentais foram expressos utilizando os subgrupos acima especificados.

Houve um intervalo de pelo menos dois dias entre os testes térmicos e as observações comportamentais descritas a seguir.

3.10 - Observações Comportamentais

As observações comportamentais foram realizadas semanalmente, em sala com pouca luz e o mais silenciosa possível, no horário entre 7 e 18 horas.

Os animais eram colocados um por vez, em um observatório retangular de tamanho 110cm x 50cm x 48cm construído em madeira, exceto por um de seus lados que era de vidro, e iluminado por uma lâmpada de filamento de 40w.

O chão do observatório era coberto com raspas de madeira.

Dentro do observatório foi colocada a escada de três degraus com o objetivo de avaliar a motricidade.

Havia também dentro do observatório, a ração usualmente utilizada pelos animais quando nas gaiolas.

Previamente à observação, o rato era deixado por cerca de cinco minutos para adaptação ao ambiente do observatório. A partir daí então, cada animal era observado durante trinta minutos, e os seus comportamentos eram cronometrados através de um programa específico desenvolvido pelo Prof.

O Subgrupo 2 agrupou os animais cuja latência da retirada da pata ao teste térmico a 46°C foi igual ou acima de 8 segundos (16 animais, sendo 13 ratos e 3 ratas).

Utilizamos esse cut-off de oito segundos para a separação desses subgrupos baseados nos resultados do grupo controle (17 animais, sendo nove ratos e oito ratas), e baseados em possíveis expressões clínicas de hiperalgesia e hipoalgesia respectivamente, nos animais experimentais.

Os resultados das observações comportamentais foram expressos utilizando os subgrupos acima especificados.

Houve um intervalo de pelo menos dois dias entre os testes térmicos e as observações comportamentais descritas a seguir.

3.10 - Observações Comportamentais

As observações comportamentais foram realizadas semanalmente, em sala com pouca luz e o mais silenciosa possível, no horário entre 7 e 18 horas.

Os animais eram colocados um por vez, em um observatório retangular de tamanho 110cm x 50cm x 48cm construído em madeira, exceto por um de seus lados que era de vidro, e iluminado por uma lâmpada de filamento de 40w.

O chão do observatório era coberto com raspas de madeira.

Dentro do observatório foi colocada a escada de três degraus com o objetivo de avaliar a motricidade.

Havia também dentro do observatório, a ração usualmente utilizada pelos animais quando nas gaiolas.

Previamente à observação, o rato era deixado por cerca de cinco minutos para adaptação ao ambiente do observatório. A partir daí então, cada animal era observado durante trinta minutos, e os seus comportamentos eram cronometrados através de um programa específico desenvolvido pelo Prof.

Marcus Raimundo Vale, e executado por um computador IBM-PC 486 SX 33 MHz.

Esse programa associava cada comportamento estudado a uma tecla do teclado, que ao ser acionada começava a cronometrar um comportamento específico até que fosse acionada outra tecla. Ao final de trinta minutos, o programa exibia o tempo gasto pelo animal em cada comportamento.

Os comportamentos estudados e descritos a seguir foram: coçar-se (*scratching*), limpar-se (*grooming*), empinar-se (*rearing*), farejar (*sniffing*), descansar (*resting e sleeping*), alimentar-se (*eating*), e congelar-se (*freezing*).

‘Coçar-se’ foi definido como comportamento determinado por movimentos rítmicos e rápidos das patas posteriores dirigidos à cabeça e ao dorso (Santos, 1995).

‘Limpar-se’ foi determinado como lambe partes do corpo e/ou friccionar as orelhas, a cabeça, ou o focinho com as patas anteriores geralmente de trás para frente em movimentos de vai-e-vem (Moura, 1994; Santos, 1995).

‘Empinar-se’ foi definido como situação na qual o animal levanta o corpo ficando apoiado nas patas posteriores e começa a farejar o ar. Nesse momento, o animal pode ficar parado ou caminhar. As patas anteriores podem ficar livres, ou apoiadas nas paredes do observatório ou na escada colocada no mesmo (Moura, 1994; Santos, 1995).

‘Farejar’ foi conceituado como o comportamento no qual o animal fareja o chão, as paredes, e os objetos do ambiente utilizando o focinho e encostando suas vibrissas nos mesmos. Esses movimentos geralmente são rápidos e ativos (Santos, 1995).

‘Descansar’ foi definido como o comportamento no qual o animal após explorar o ambiente, remove ou junta as raspas de madeira numa região escolhida, em seguida pode realizar alguns movimentos giratórios em torno de si mesmo para após isso deitar-se geralmente com a cabeça entre as patas. A seguir ocorre relaxamento muscular e abaixamento das orelhas. O animal pode a seguir dormir, o quê é geralmente precedido por movimento de fletir a cabeça

sobre o tórax e abdome, fechamento dos olhos, e aumento da frequência respiratória (Moura, 1994).

‘Alimentar-se’ é um comportamento que dispensa caracterização detalhada.

‘Congelar-se’ foi conceituado como o comportamento no qual o animal repentinamente fica imóvel, estático com os olhos abertos e fixos, e orelhas levantadas. Durante esse tempo a cabeça do rato pode ir baixando num movimento leve, contínuo, e suave, como se o animal estivesse em ‘transe’. Além disso podem ocorrer discretos tremores no corpo como se o animal estivesse com frio. Esse comportamento ocorre por curtos períodos de tempo, e é logo seguido por comportamentos exploratórios como ‘farejar’ e ‘empinar-se’.

As observações comportamentais começaram após a 12^a semana, indo até a 27^a semana de diabetes.

O tempo de início ideal das observações foi determinado através de um estudo piloto do comportamento de coçar-se em ratas, de modo a definir os sinais de início da síndrome.

Com os dados resultantes da quantificação do comportamento de ‘coçar-se’ no grupo experimental, criamos mais um subgrupo, denominado Subgrupo 3.

O Subgrupo 3 (20 animais, sendo 14 ratos e seis ratas) agrupou os animais que apresentaram aumento persistente do comportamento de ‘coçar-se’ acima de dez segundos ao longo das semanas de observação, por ser esse o comportamento “alvo” de expressão da dor crônica.

Os comportamentos acima descritos foram quantificados em todos os animais do grupo experimental (28 animais, sendo 22 ratos e seis ratas).

Os resultados foram expressos por subgrupo, exceto para o comportamento de coçar-se, que além dos resultados por subgrupo, teve também os dados expressos para todo o grupo experimental, pelo motivo de ser ele o comportamento “alvo”.

Para grupo controle destas observações utilizamos oito animais, sendo seis ratos e duas ratas.

3.11 - Teste Farmacológico

Com o objetivo de avaliar o efeito de um analgésico potente sobre os comportamentos apresentados pelos animais diabéticos, utilizamos morfina na dose de 2 e 4 mg/kg, e o seu antagonista naloxona na dose de 1 mg /kg.

Foram utilizados como grupo experimental, nove animais (sendo sete ratos e duas ratas) diabéticos do Subgrupo 3. O grupo controle desses experimentos foram os próprios animais acima descritos antes do tratamento com as drogas.

Morfina na dose de 2 mg/kg foi injetada por via intraperitoneal 15 minutos antes das observações comportamentais.

Morfina na dose de 4 mg/kg foi injetada por via intraperitoneal também 15 minutos antes do início das observações comportamentais.

Morfina na dose de 2 mg/kg foi injetada 15 minutos antes das observações comportamentais, a seguir naloxona na dose de 1 mg/kg era injetada 15 minutos após a morfina, logo antes das observações. Ambas as drogas tiveram via de administração intraperitoneal.

Não utilizamos naloxona quando foi utilizada morfina na dose de 4 mg/kg.

Houve um intervalo de no mínimo 48 horas entre cada experimento.

As doses das drogas utilizadas foram baseadas nas referidas pela literatura internacional (Kupers et al.,1992; Courteix et al., 1993; Labrecque & Vanier, 1995).

3.12 - Análise Estatística

Realizamos a análise estatística dos dados através do programa SigmaStat for Windows version 1.0 - Copyright 1992-1994 - Jandel Corporation.

Utilizamos o Teste “t” de Student quando havia distribuição normal e mesma variância das populações de onde as amostras analisadas vieram, caso contrário o programa sugeria um teste não paramétrico, que foi o Mann-Whitney Rank Sum Test. Desta forma foi realizada a análise estatística da glicemia, peso, parâmetros do índice funcional, testes térmicos, e observações comportamentais.

Para a análise estatística dos testes farmacológicos foi usado o Teste de Wilcoxon, visto que queríamos comparar amostras relacionadas (ratos diabéticos antes e após o tratamento farmacológico).

Os dados foram considerados estatisticamente significativos, quando a possibilidade de ocorrência da hipótese nula foi igual ou inferior a 5 %.

3.13 - Aspectos Éticos

Seguimos as orientações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for The Study of Pain - IASP) relativas aos aspectos éticos do uso de animais conscientes em dor experimental (Zimmermann, 1983).

4 - RESULTADOS

4.1- Desenvolvimento do Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus desenvolveu-se em 39 animais (13 ratas e 26 ratos) na primeira semana após a injeção de estreptozotocina, destes, 32 estavam vivos na segunda semana. Dez animais apresentaram níveis glicêmicos, por duas vezes consecutivas, abaixo de 230 mg% e foram excluídos deste estudo. Dezesesseis animais (10 ratas e seis ratos) morreram no segundo dia após a administração da estreptozotocina (tab.4-1).

As glicemias realizadas na segunda semana em diante revelaram valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle até a última dosagem glicêmica na 37^a semana após a injeção da droga. (figs.4.1 e 4.2).

Tabela 4-1

Animais do Grupo Experim. quanto ao sexo, mortalidade, e diabetes

Sexo	Pré-Estreptoz.	Mortos(1 ^a sem.)	Mortos(2 ^a sem.)	Diabét.(2 ^a sem.)	Não Diabét.
M	40	6	5	21	8
F	25	10	2	11	2
TOTAL	65	16	7	32	10

DEFINIÇÃO DE DIABETES A LONGO TERMO

Grupo Controle X Grupo Experim.- Ratos

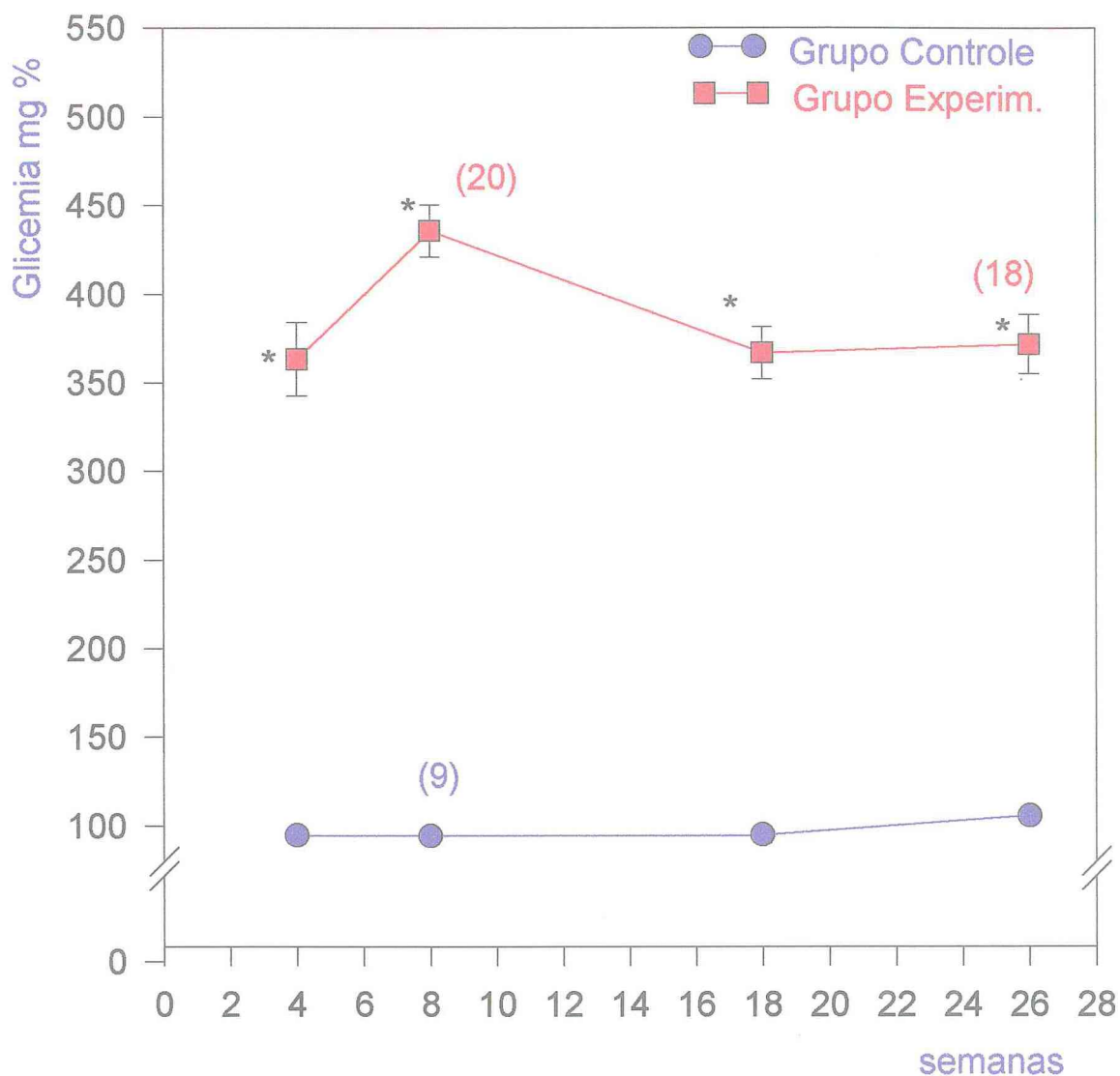


Fig.4.1- Evolução da glicemia média de ratos não diabéticos (grupo controle, n=10) e diabéticos (grupo experim., n=21) após três semanas, e até a 26ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,0001 . Mann-Whitney Rank Sum Test. Valores correspondem à média e erro padrão da média.

DEFINIÇÃO DE DIABETES A LONGO TERMO

Grupo Controle X Grupo Experim.- Ratas

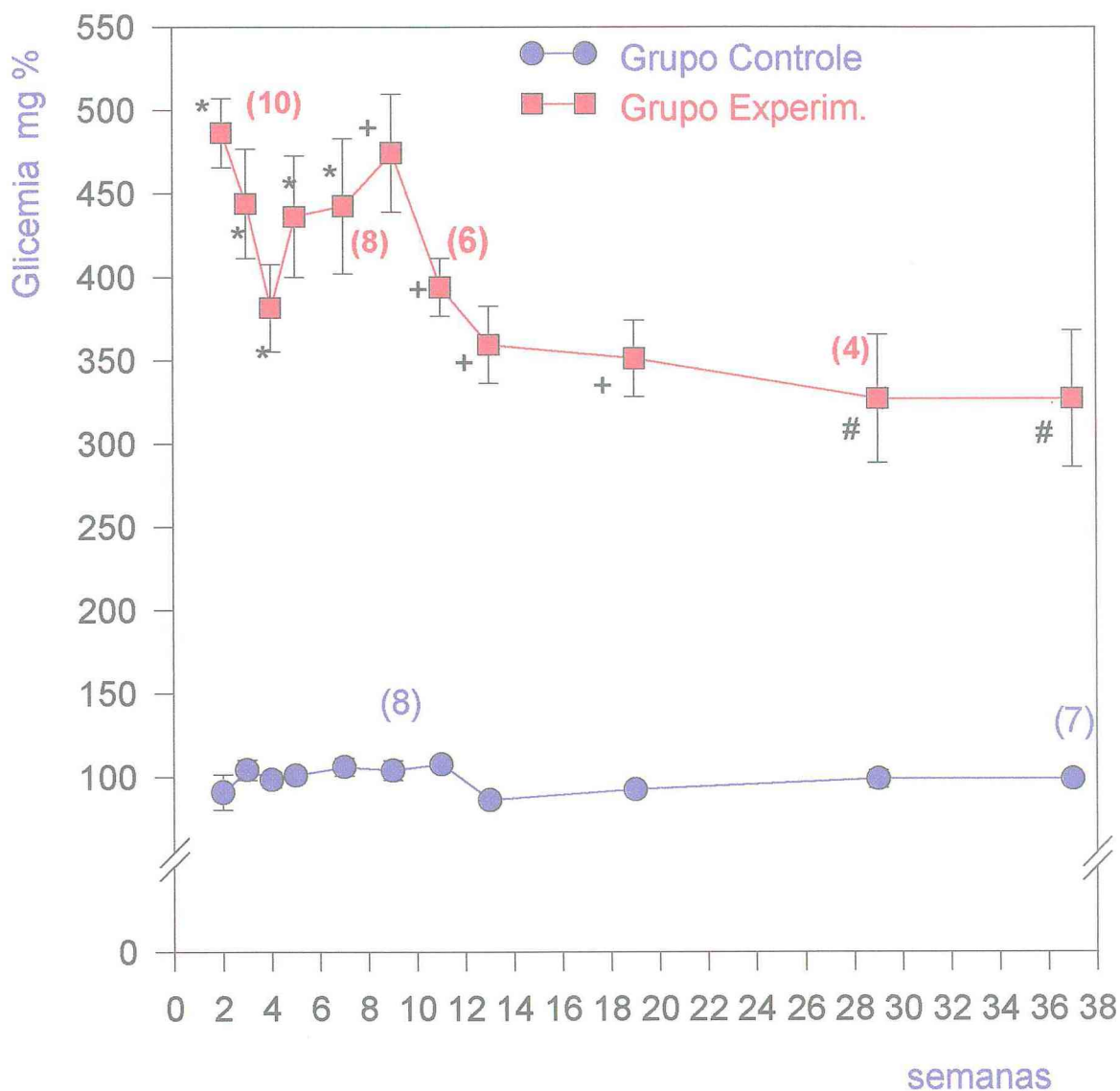


Fig.4.2 - Evolução da glicemia média de ratas não diabéticas (grupo controle, n=9) e diabéticas (grupo experimental, n=11) após a primeira semana, e até a 37ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". * P < 0,0001; + P < 0,001; # P < 0,01. Teste "t" e Mann-Whitney Runk Sum Test. Valores no gráfico correspondem a media e erro padrão da média.

4.2 - Observações Clínicas Gerais

Os animais diabéticos sempre se apresentaram mais dóceis ao manuseio do que os animais do grupo controle.

A partir da quarta semana da doença notamos uma coloração mais amarelada da pelagem dos animais diabéticos em relação aos não diabéticos. Esta mudança de cor aumentou lenta, mas progressivamente até o final da pesquisa, deixando o animal diabético com aparência mais “suja” em relação aos animais normais.

Os animais diabéticos também apresentaram um débito urinário elevado. Esta observação não foi quantificada objetivamente, porém tornou-se evidente durante as observações comportamentais, e também pelo fato de termos que trocar com muito mais frequência as raspas de madeira das gaiolas dos animais diabéticos devido à grande umidade.

Durante as observações constatamos que vários animais diabéticos apresentaram aumento do volume abdominal. Esse aumento era variável de um dia para o outro, e não parecia influenciar nas atividades do animal. O abdome aumentado era flácido e não aparentava ser doloroso.

Houve também um embranquecimento progressivo dos olhos dos animais diabéticos, de grau variável de animal para animal, que atribuímos à opacificação do cristalino.

O grupo experimental mostrou-se bastante sensível, tendo uma mortalidade elevada em relação ao grupo controle. Dos 39 animais com uma semana de diabetes, 24 (61,5%) estavam vivos ao final da 36ª semana. Dos 20 animais iniciais do grupo controle, 17 (85%) estavam vivos ao final da 36ª semana.

Em relação aos quinze animais mortos ao longo das 37 semanas de diabetes, 6 tiveram septicemia como causa da morte, 2 apresentaram vários tumores abdominais, 2 apresentaram granuloma sangrante no olho, e 5 provavelmente morreram de desequilíbrio hidro-eletrolítico ou ácido-básico. A

septicemia foi evidenciada clinicamente por aumento da frequência respiratória e cardíaca, cianose, e calafrios. Os múltiplos tumores abdominais, à necrópsia, revelaram ser volumosos abscessos organizados (tab.4-2).

Tabela 4-2
Causas de mortalidade dos animais diabéticos

	Grupo Controle	Grupo Experim.
Vivos (1ª sem.)	20	39
Vivos (37ªsem.)	17	24
Mortalidade	15%	38,5%
Mortos-sépsis	0	6
Mortos-granuloma	0	2
Mortos-tumores	0	2
Mortos-deseq. ac-básico ?	0	5
Mortos-indeterminado	3	0

O peso dos animais diabéticos evoluiu diferentemente em relação aos controles (fig.4.3 e 4.4). Exceto no dia do tratamento com a estreptozotocina, todas as medidas seguintes são estatisticamente diferentes do grupo controle, tanto para as fêmeas como para os machos.

Não foi observada vocalização espontânea durante todo o tempo de evolução da doença.

Também não observamos em nenhum animal o comportamento de agitar (shaking) a pata num movimento tremulante, nem o comportamento de elevar alguma pata como se tivesse evitando o contato com o chão do observatório com o objetivo de não sentir dor.

Nenhum animal apresentou autotomia, nem paresia localizada de algum membro, ou grupo muscular isolado. Um animal macho apresentou ataxia de marcha, súbita, bem como comportamento de “circling” (rodar em círculo sobre si mesmo) que persistiu até a sua morte devida a tumores intrabdominais.

EFEITO LONGITUDINAL DO DIABETES SOBRE O PESO

Grupo Controle X Grupo Experim.- Ratos

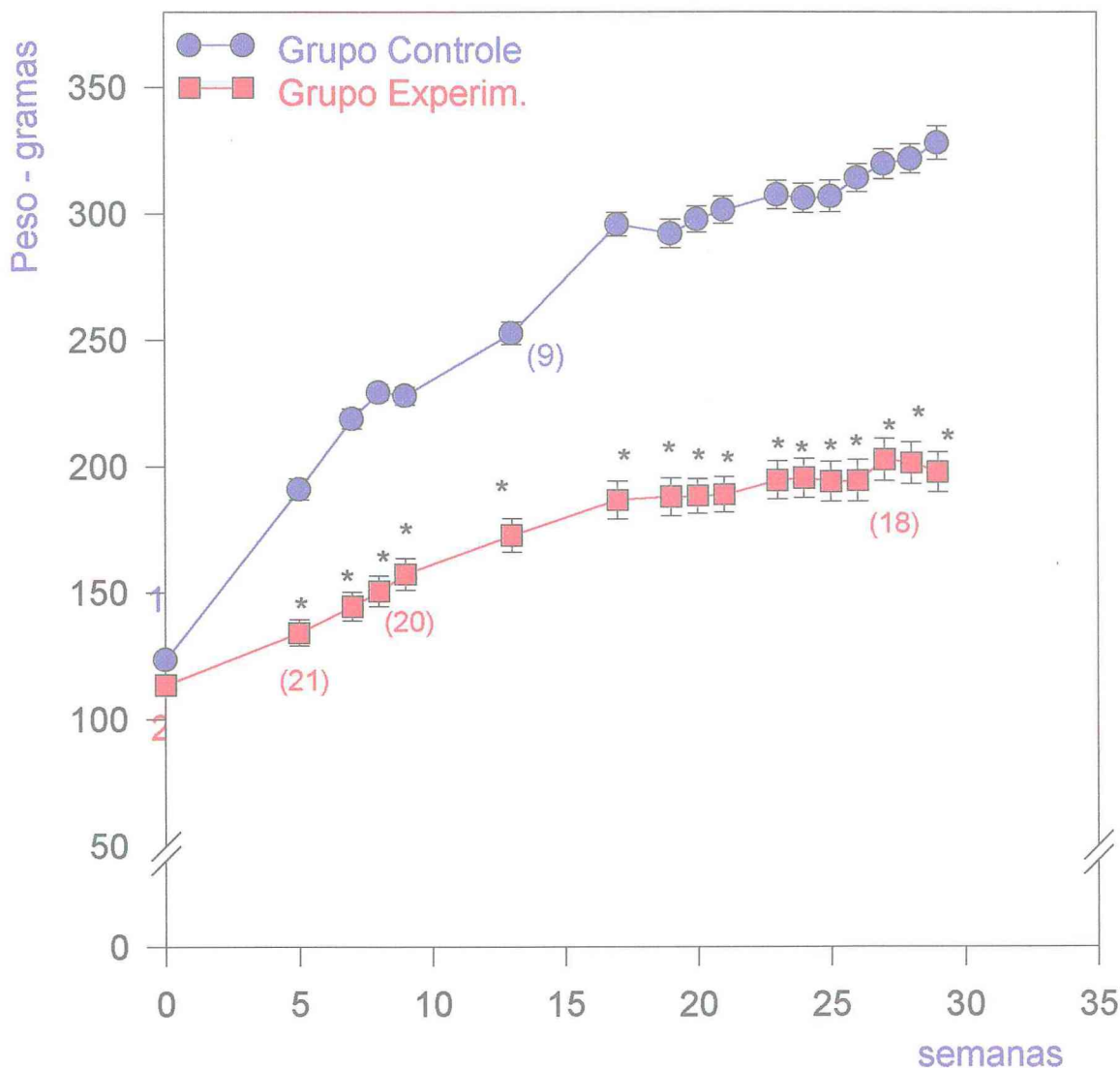


Fig.4.3 - Evolução do peso médio de ratos não diabéticos (grupo controle, n=10) e diabéticos (grupo experimental, n=23) a partir do início do diabetes até a 29ª semana. Números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,0001. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test. Valores correspondem à média e erro padrão da média.

EFEITO LONGITUDINAL DO DIABETES SOBRE O PESO

Grupo Controle X Grupo Experim.- Ratas

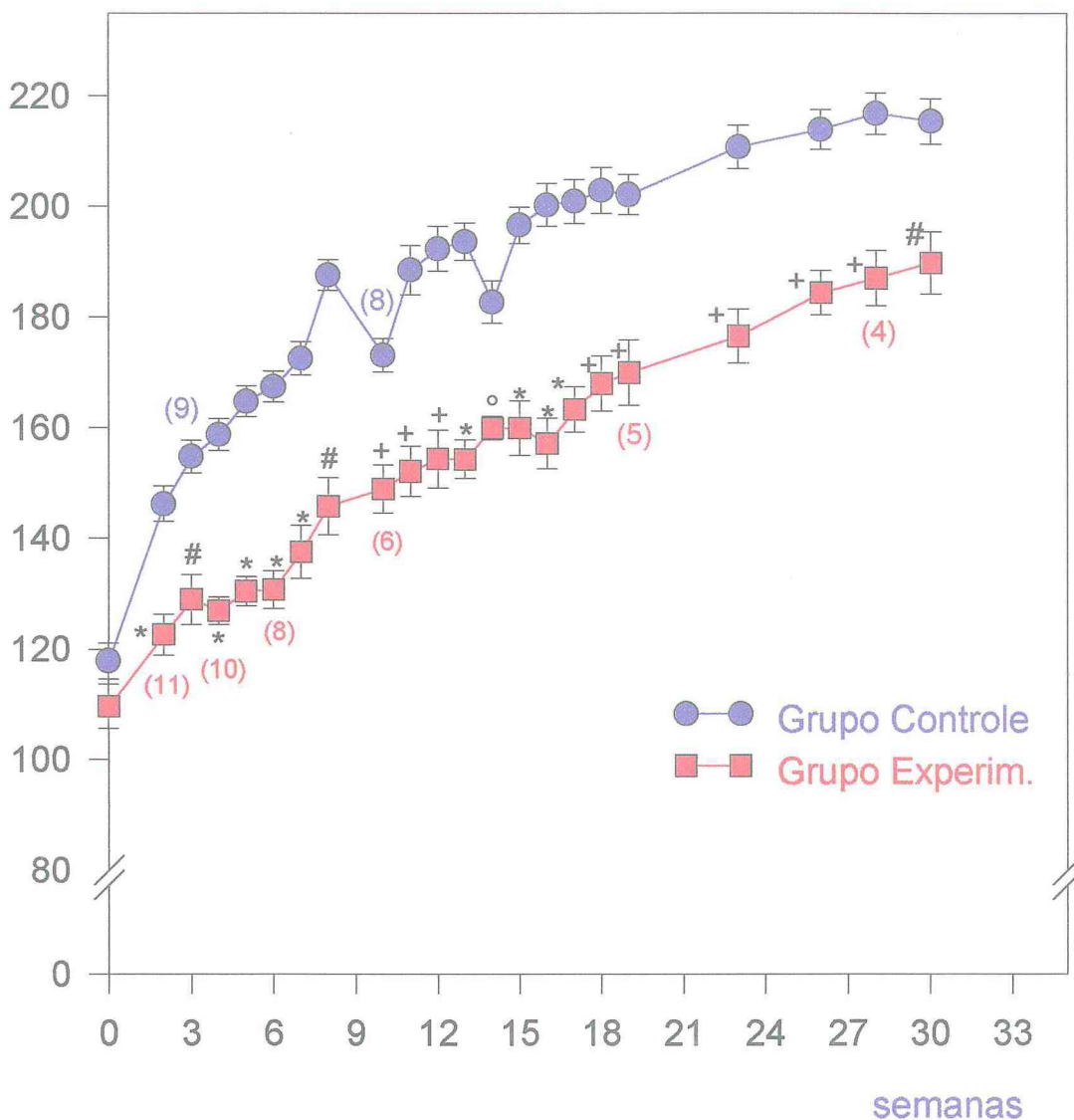


Fig.4.4 - Evolução do peso médio de ratas não diabéticas (grupo controle, n=10) e diabéticas (grupo experimental, n=13) a partir do início do diabetes até a 30ª semana. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,0001; + P < 0,001; # P < 0,01; ° P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test. Valores correspondem à média e erro padrão da média.

Todas essas alterações que observamos, aconteceram independentes do sexo do animal.

4.3 - Evidências Motoras de Neuropatia Diabética: Resultados das Medidas do Índice Funcional Ciático

Os animais diabéticos apresentaram atrofia muscular proximal e distal preponderantemente nas patas posteriores. Enquanto alguns animais apresentaram atrofia muscular mais proximal, outros a apresentaram mais distalmente, sendo estes últimos a maioria.

Não obstante a atrofia muscular observada, nenhum animal ficou impossibilitado de subir os três degraus da escada colocada dentro do observatório. Todos os três degraus da escada, porém, não eram escalados em todas as observações. Havia ocasiões em que o animal chegava somente até o segundo degrau, entretanto em outro dia subsequente de observação, o mesmo animal atingia os três degraus da escada.

A atrofia muscular, embora não tenha sido quantificada objetivamente foi bem evidenciada pela análise da evolução das quatro medidas que compõem o Índice Funcional Ciático: 1- Distância ortogonal até a pata posterior oposta, 2- Comprimento da impressão plantar, 3- Distância entre o 1° e 5° pododáctilo, 4- Distância entre o 2° e o 3° pododáctilo (figs.4.5 a 4.8 - ratos, e figs.4.9 a 4.12 - ratas).

Observa-se que para as duas primeiras medidas (distância ortogonal até a pata posterior oposta e comprimento da impressão plantar) que correspondem à avaliação de força mais proximal, a evolução do grupo experimental embora seja diferente do grupo controle, muito poucas vezes atinge valores estatisticamente significativos.

Já nas medidas das distâncias entre o 1° e 5° , e entre o 2° e 4° pododáctilos, as quais analisam força distal, há diferença estatística em quase todos os pontos da curva ao longo de pelo menos 30 semanas de diabetes.

Não existiram diferenças em relação ao sexo dos animais e as alterações acima descritas.

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução da Distância Ortogonal até a Pata Post. Oposta

Grupo Controle X Grupo Experim.- Ratos

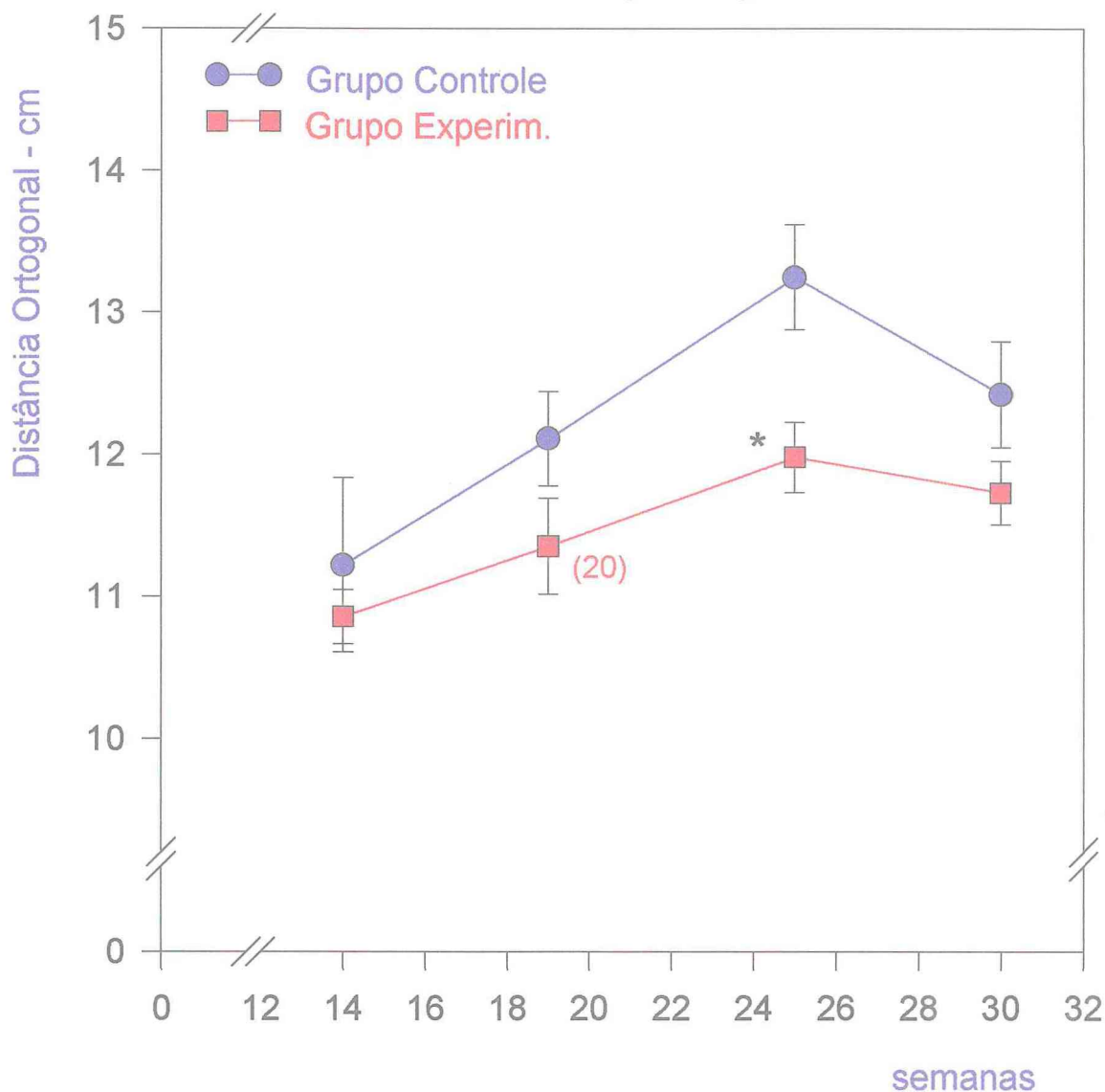


Fig.4.5- Evolução da distância ortogonal em cm até a pata posterior oposta de ratos não diabéticos (grupo controle, n=9) e diabéticos (grupo experim., n=23) , após 14 semanas e até a 30ª semana de diabetes. Valores correspondem à média das medidas das duas patas posteriores, e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,01. Teste " t " .

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução do Comprimento da Impressão Plantar

Grupo Controle X Grupo Experim. - Ratos

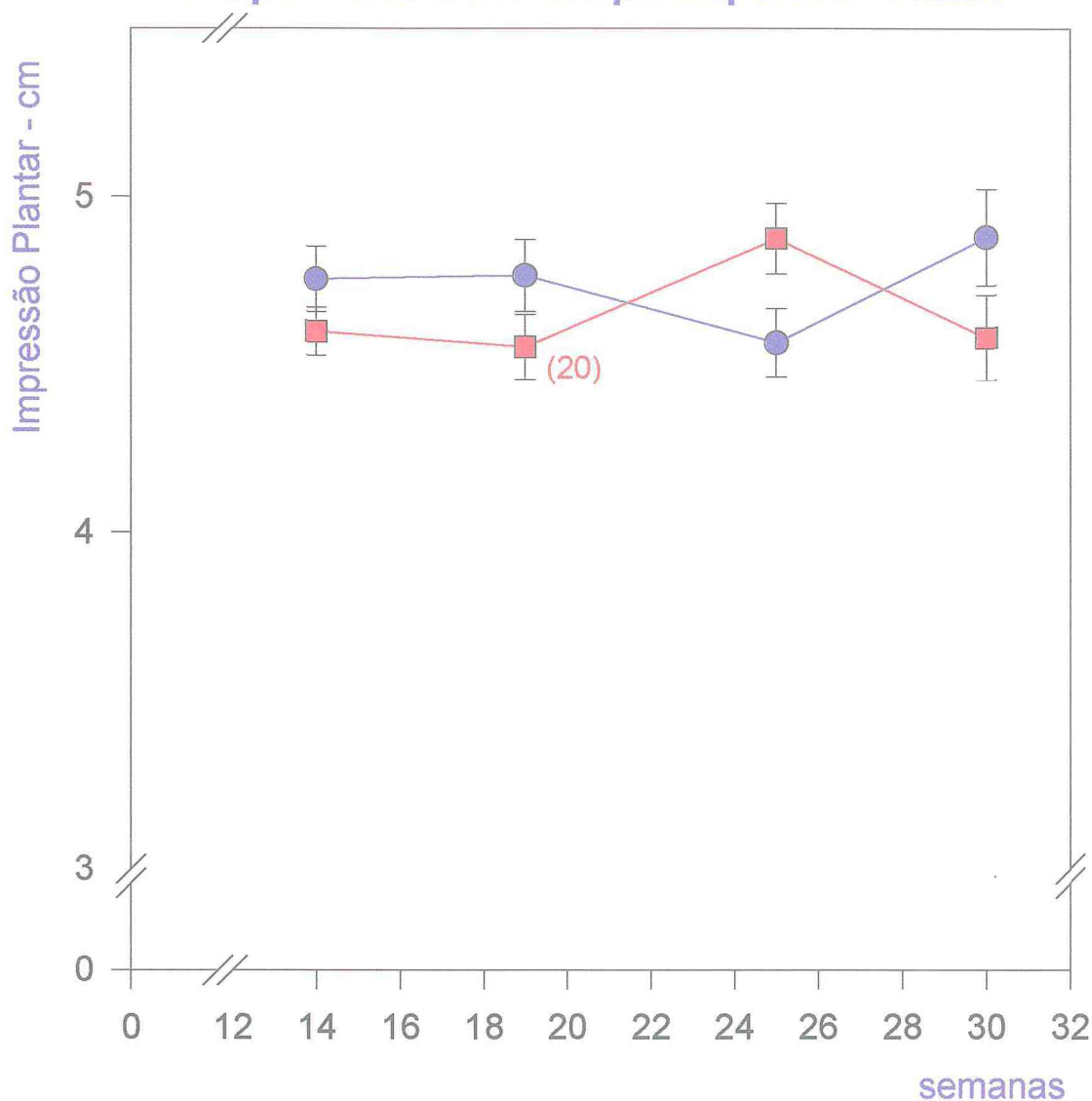


Fig.4.6- Evolução do comprimento da impressão plantar em cm de ratos não diabéticos (grupo controle, n=9) e diabéticos (grupo experim. n=23) após 12 semanas e até a 30ª semana de diabetes. Valores correspondem à média da soma das medidas das duas patas posteriores, e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Não houve significância estatística.

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução da Distância entre o 1º e 5º pododáctilo

Grupo Controle X Grupo Experim. - Ratos

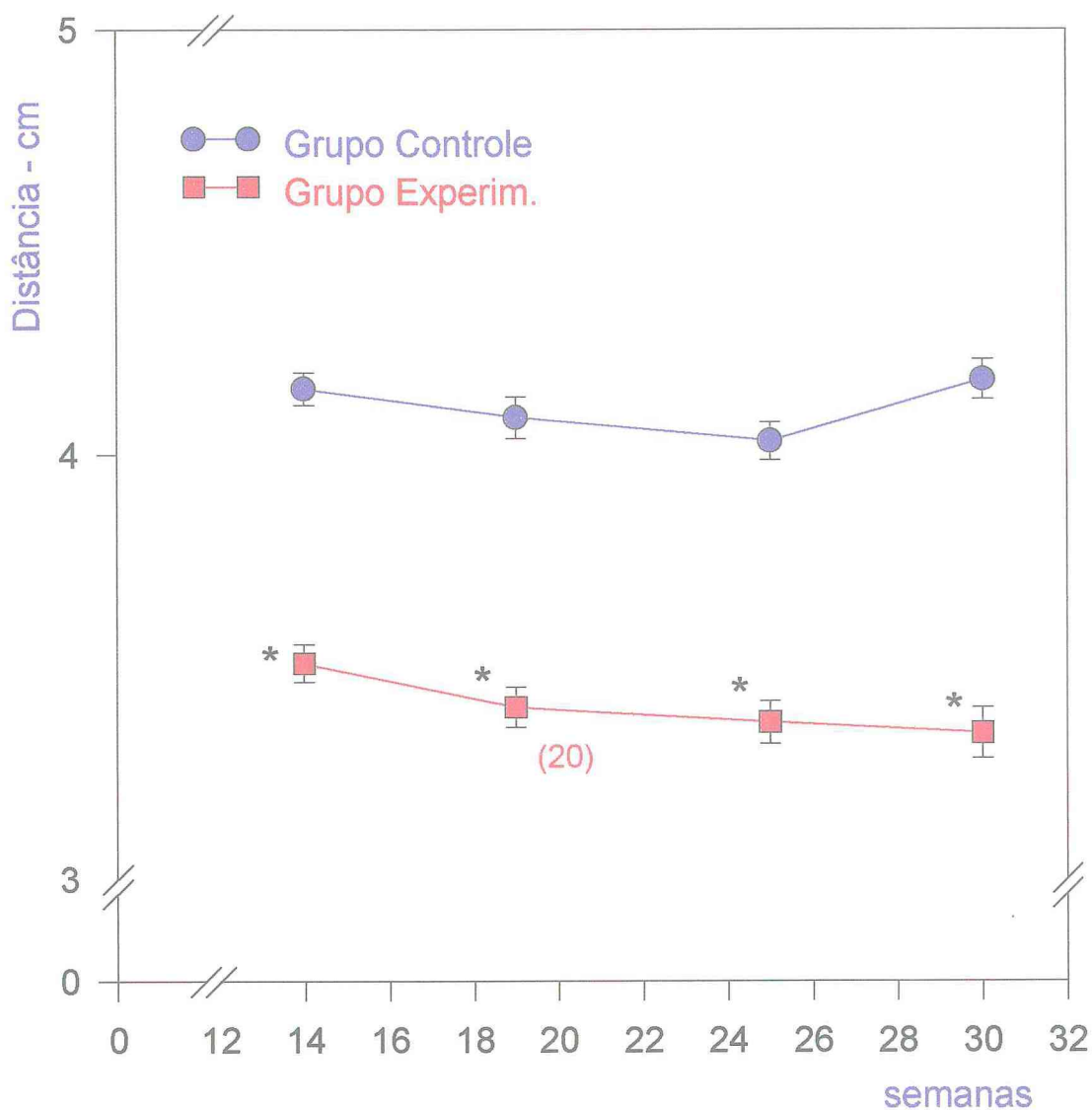


Fig.4.7- Evolução da distância em cm entre o 1º e o 5º pododáctilo de ratos não diabéticos (grupo controle, n=9) e diabéticos (grupo experim., n=23) após 12 semanas e até a 30ª semana de diabetes. Valores correspondem à média das somas das medidas na pata posterior esquerda e direita, e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,001. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução da Distância entre o 2º e o 4º pododáctilo

Grupo Controle X Grupo Experim. - Ratos

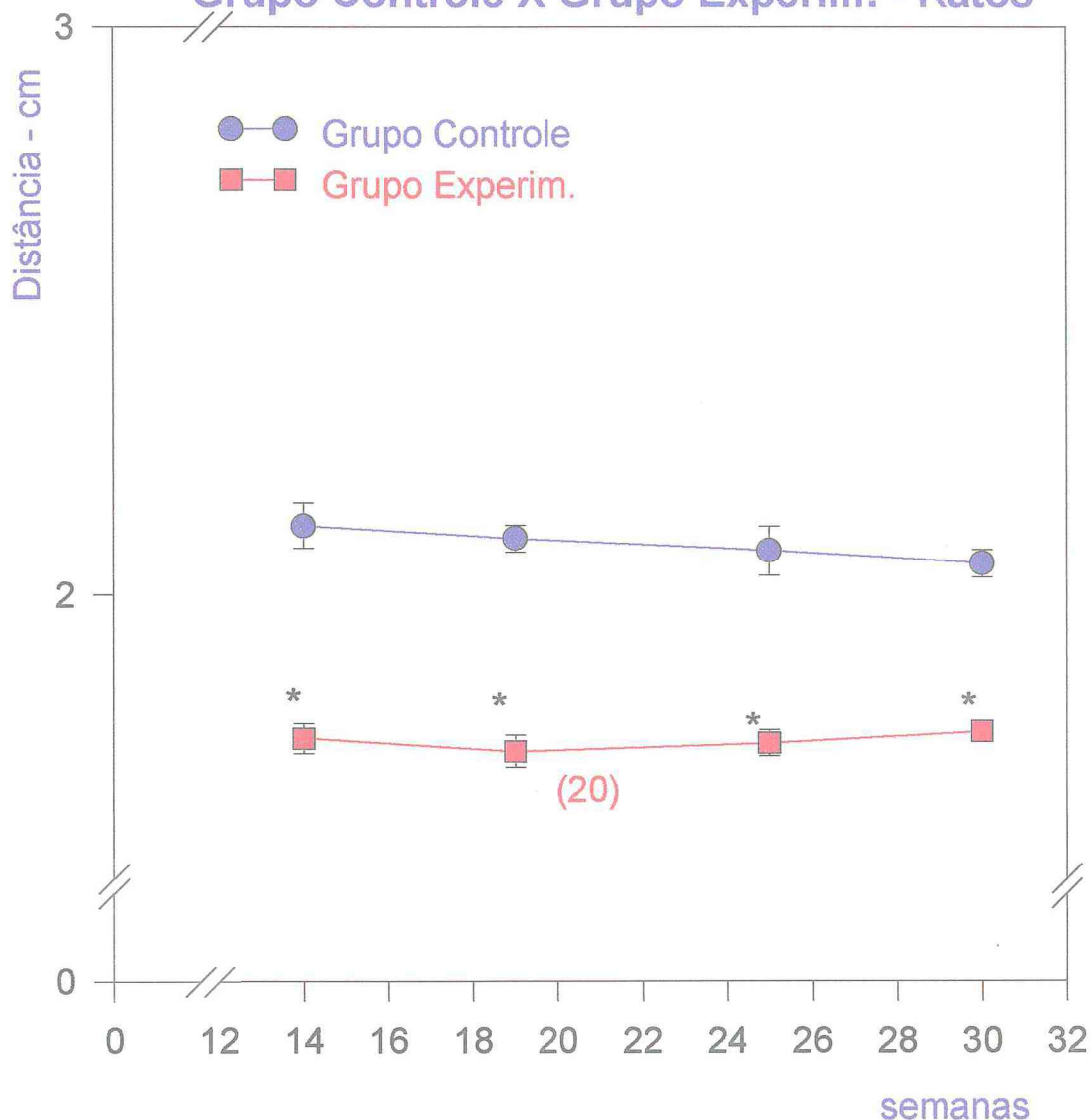


Fig.4.8- Evolução da distância em cm entre o 2º e o 4º pododáctilo de ratos não diabéticos (grupo controle, n=9) e diabéticos (grupo experim., n=23) após 12 semanas e até a 30ª semana de diabetes. Valores correspondem à média das somas das medidas na pata posterior esquerda e direita, e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,001. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução da Distância Ortogonal até a Pata Post. Oposta Grupo Controle X Grupo Experim.- Ratas

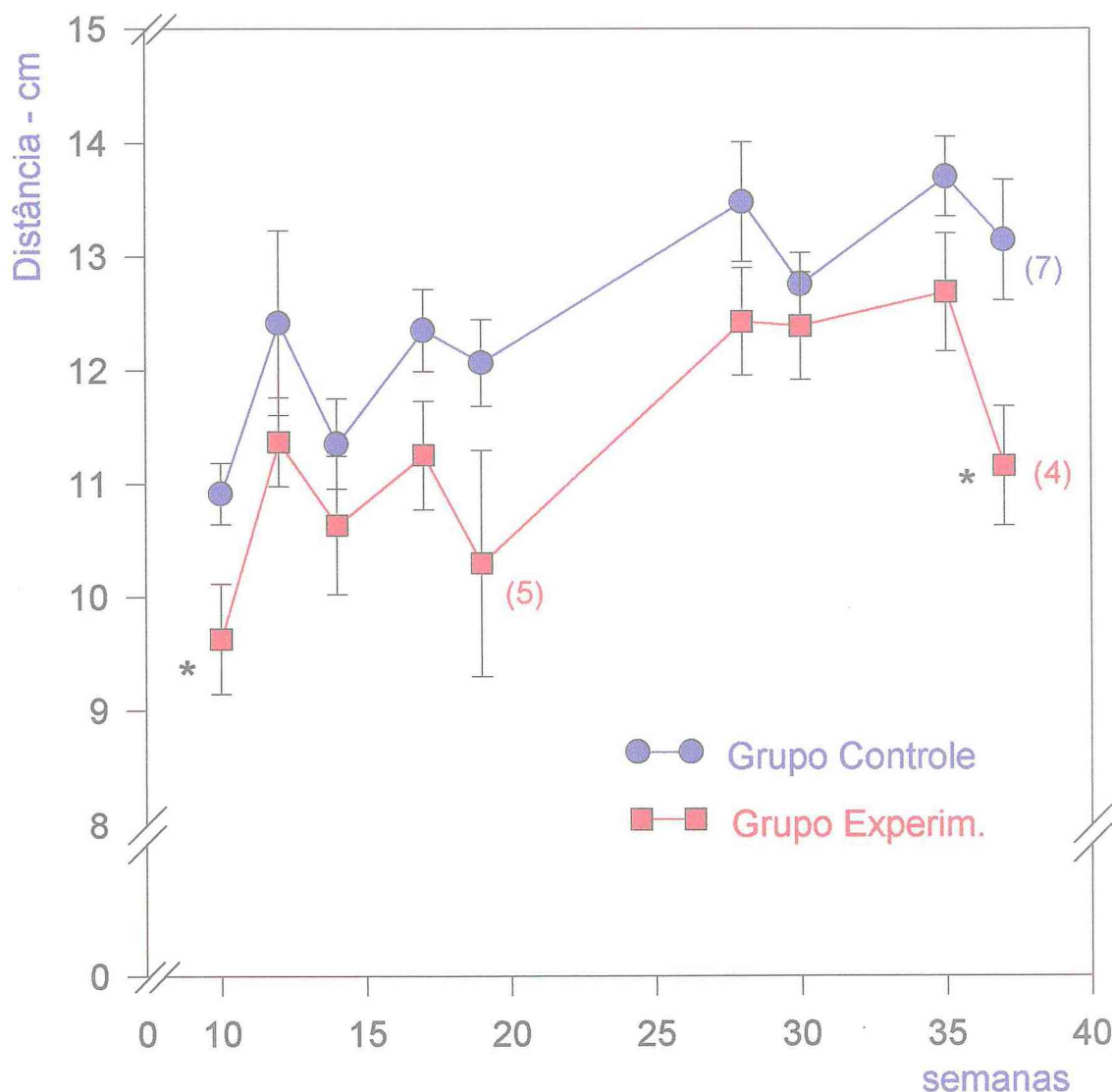


Fig.4.9 - Evolução da distância ortogonal em centímetros até a pata posterior oposta de ratos não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (grupo experimental, n=6) a partir da 10ª, e até a 37ª semana de diabetes. Valores correspondem à média das medidas e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,05. Teste "t".

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução do Comprimento da Impressão Plantar

Grupo Controle X Grupo Experim.- Ratas

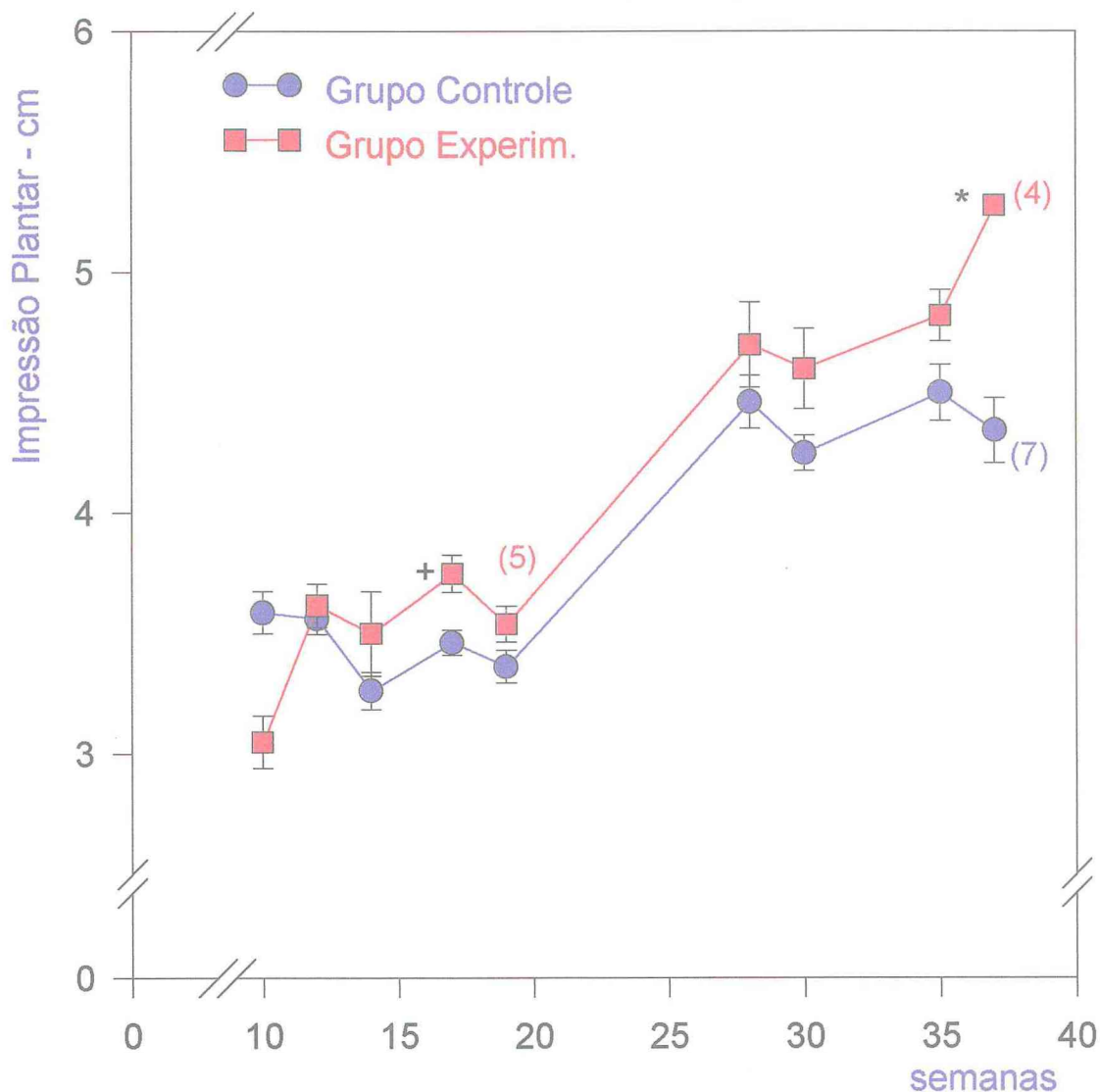


Fig.4.10- Evolução do comprimento da impressão plantar de ratos não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (grupo experim., n=6) após 10 semanas e até a 37ª semana de diabetes. Valores correspondem às médias das medidas e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,001; + P < 0,01. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução da Distância entre o 1º e o 5º pododáctilo

Grupo Controle X Grupo Experim. - Ratas

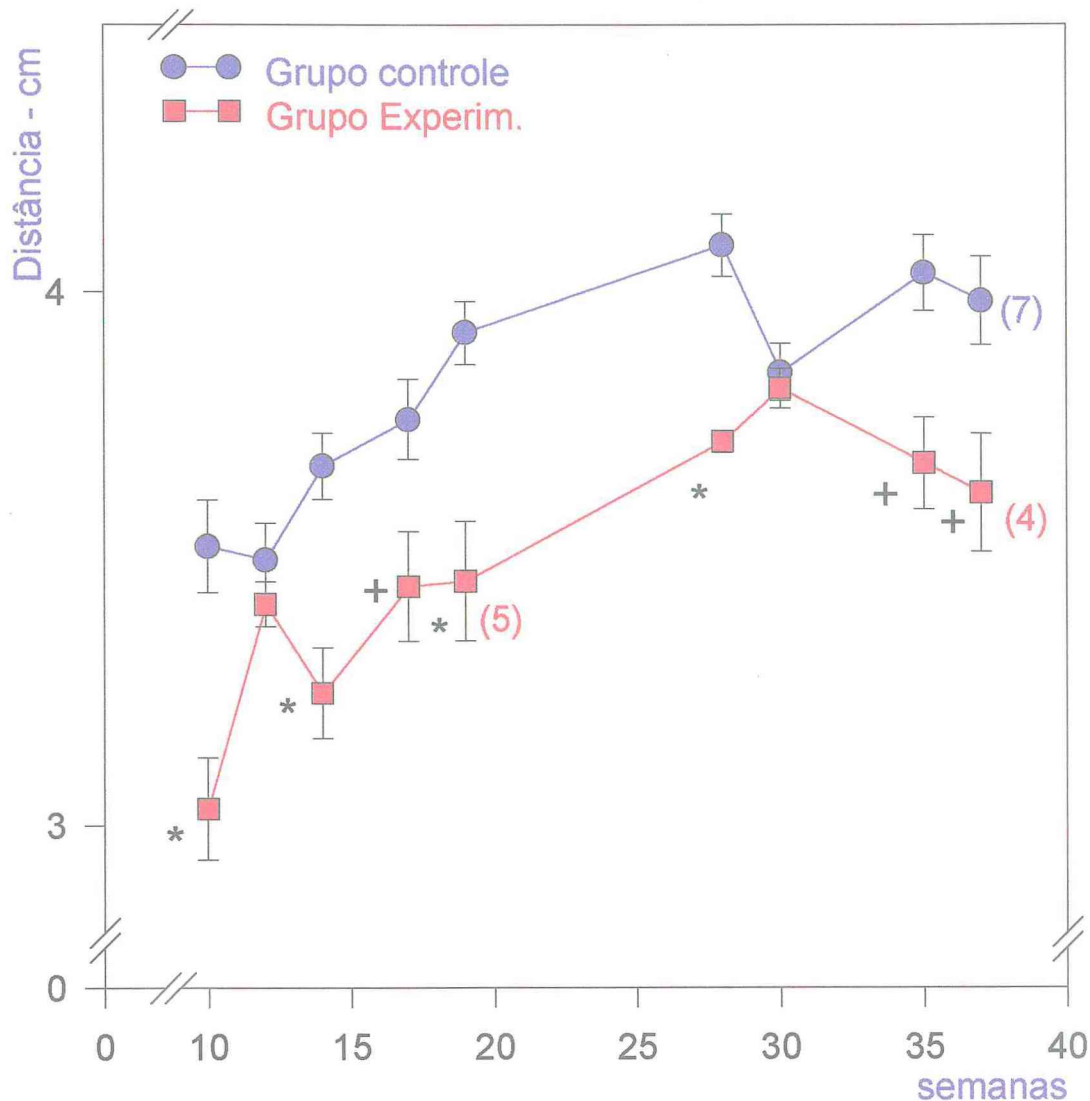


Fig.4.11- Evolução da distância em cm entre o 1º e o 5º pododáctilo de ratas não diabéticas (grupo controle , n = 8) e diabéticas (grupo experim., n = 6) após 10 semanas e até a 37ª semana de diabetes. Valores correspondem à média das somas das medidas na pata posterior esquerda e direita, e as barras ao erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". *P < 0.01, e + P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

EVIDÊNCIAS MOTORAS DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Evolução da distância entre o 2º e o 4º pododáctilo

Grupo Controle X Grupo Experim. - Ratas

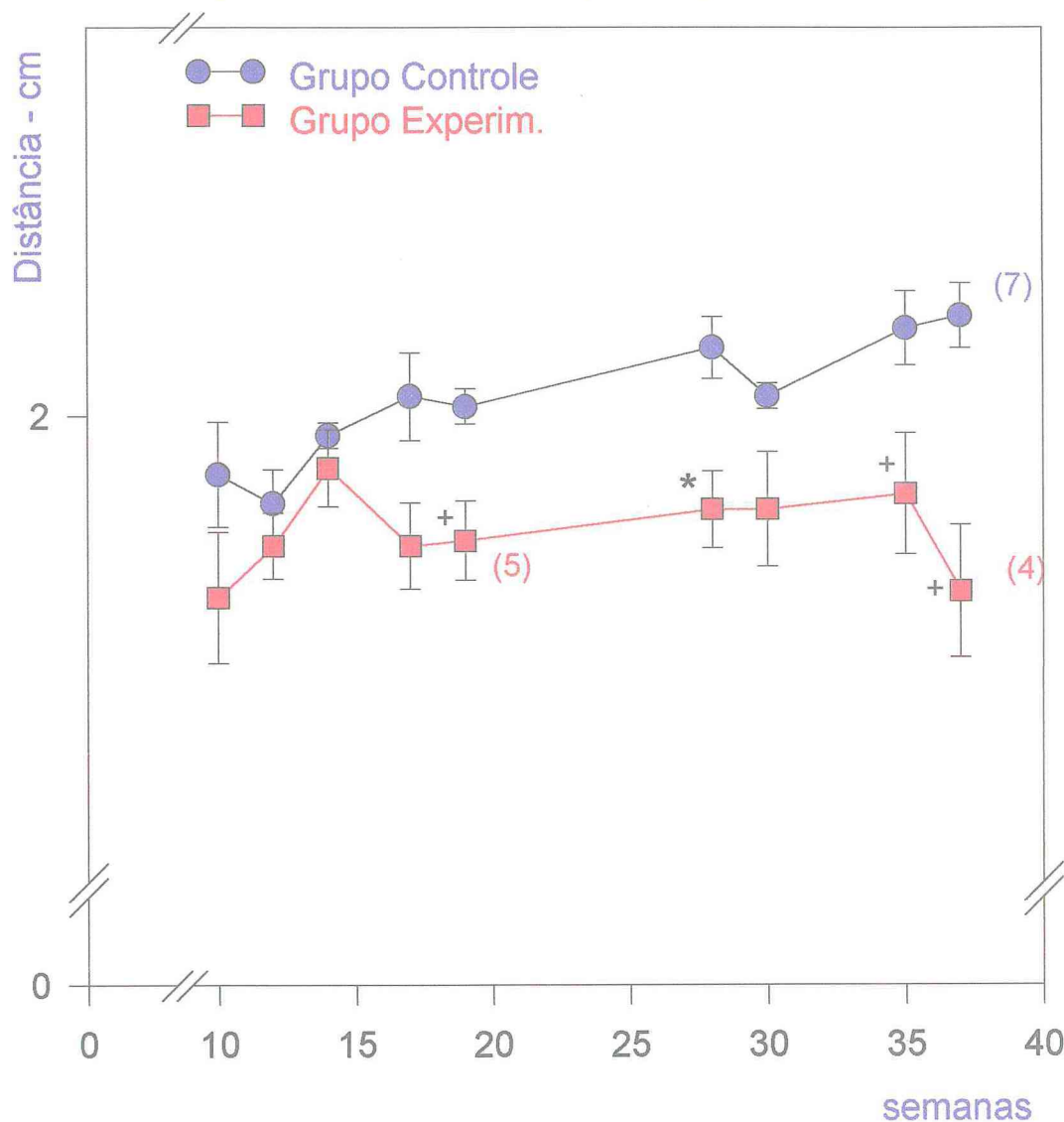


Fig.4.12- Evolução da distância em cm entre o 2º e o 4º pododáctilo de ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) e diabéticas (grupo experim. n=6) após 10 semanas e até a 37ª semana de diabetes. Valores correspondem à média das somas das medidas na pata posterior esquerda e direita, e as barras ao erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". * P < 0,01 e + P < 0,05 . Mann-Whitney Rank Sum Test.

4.4 - Resultados do Teste Térmico

O teste térmico a 40° C não evidenciou resultados diferentes entre os animais diabéticos e os normais ao longo de 26 semanas de acompanhamento (fig. 4.13 e 4.14).

Analisando previamente os dados resultantes do teste térmico a 46° C em ratos e ratas indistintamente, pudemos observar dois subgrupos diferentes: 1- animais que apresentaram uma latência de retirada da pata menor que oito segundos (que chamaremos de Subgrupo 1), e 2- animais que apresentaram uma latência de retirada da pata maior ou igual a oito segundos (que chamaremos de Subgrupo 2).

O escore de oito segundos foi escolhido baseado nos valores apresentados pelos grupos controles seguintes: de machos (n=9, fig. 4.15), de fêmeas (n=8, fig. 4.16), e de machos e fêmeas (n=17, fig. 4.17).

O Subgrupo 1, formado por 12 animais (sendo 9 machos e 3 fêmeas) apresentou valores médios de latência de retirada da pata inferiores aos do grupo controle de machos e fêmeas (n=17, 9 machos e 8 fêmeas), sendo de significância estatística em vários momentos ao longo da pesquisa, e demonstrando desse modo que os animais apresentaram hiperalgesia (fig. 4.18).

O Subgrupo 2, formado por 16 animais (sendo 13 machos e 3 fêmeas) apresentou valores médios de latência de retirada da pata superiores aos do grupo controle de machos e fêmeas, sendo de significância estatística em vários momentos ao longo da pesquisa, e evidenciando desse modo hipoalgesia (fig. 4.19).

Cuidados foram tomados para evitar a lesão por exposição ao estímulo nocivo da temperatura a 46° C, utilizando um cut-off de 15 segundos. Nenhum animal apresentou sinais de lesões nas patas utilizadas para a realização do teste térmico.

As alterações observadas acima foram encontradas indistintamente em machos e fêmeas.

TESTE TÉRMICO 40°C

GRUPO CONTROLE x GRUPO EXPERIMENTAL - RATOS

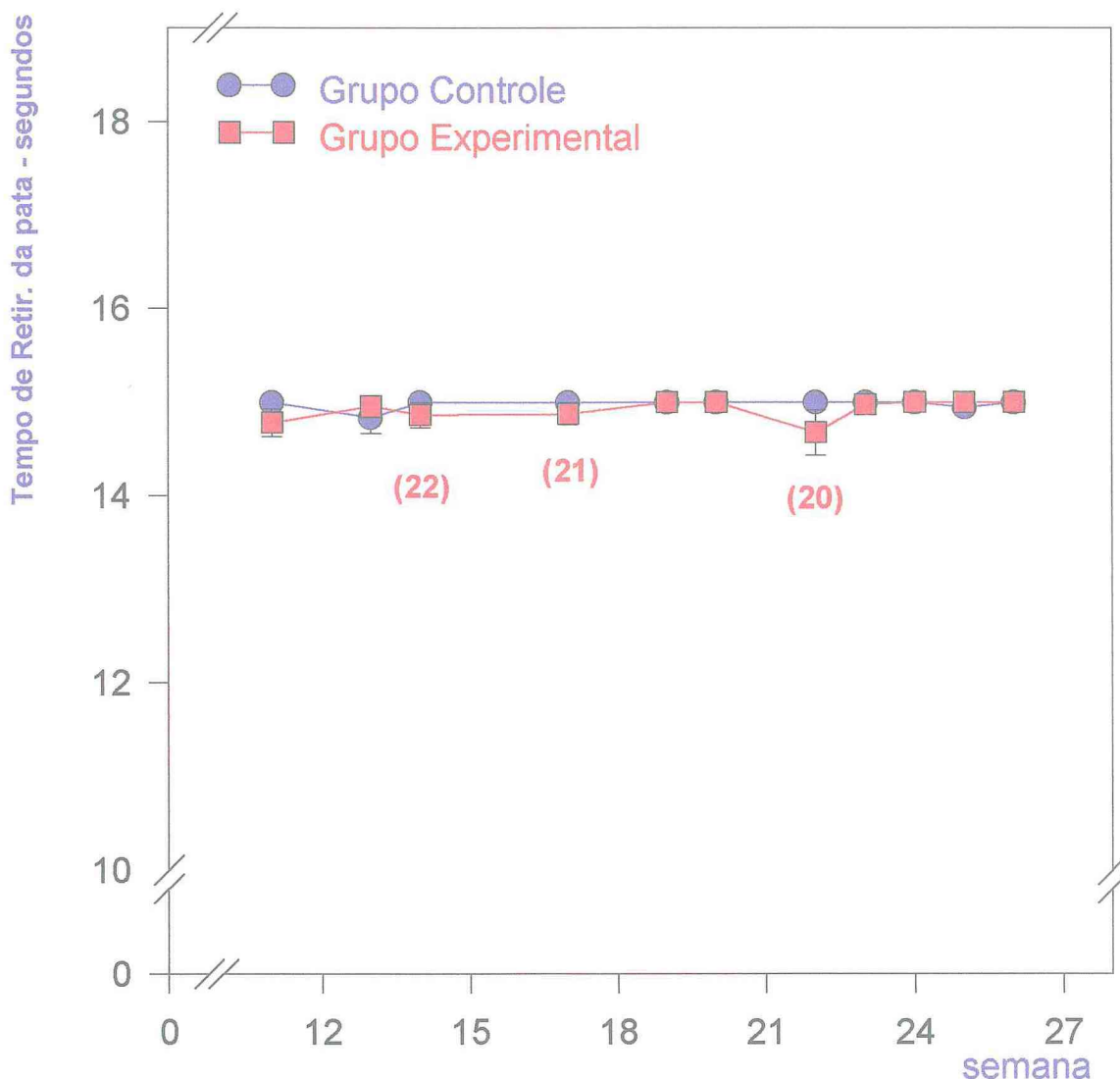


Fig.4.13- Evolução do tempo de latência de retirada da pata no teste térmico a 40°C do grupo controle (ratos não diabéticos, n=9) e grupo experimental (ratos diabéticos, n=23), após 10, e até a 26ª semana de diabetes. Os valores correspondem à média das somas das latências, e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Valores não significativos. Teste "t", e Mann-Whitney Rank Sum Test.

TESTE TÉRMICO 40°C

GRUPO CONTROLE x GRUPO EXPERIMENTAL - RATAS

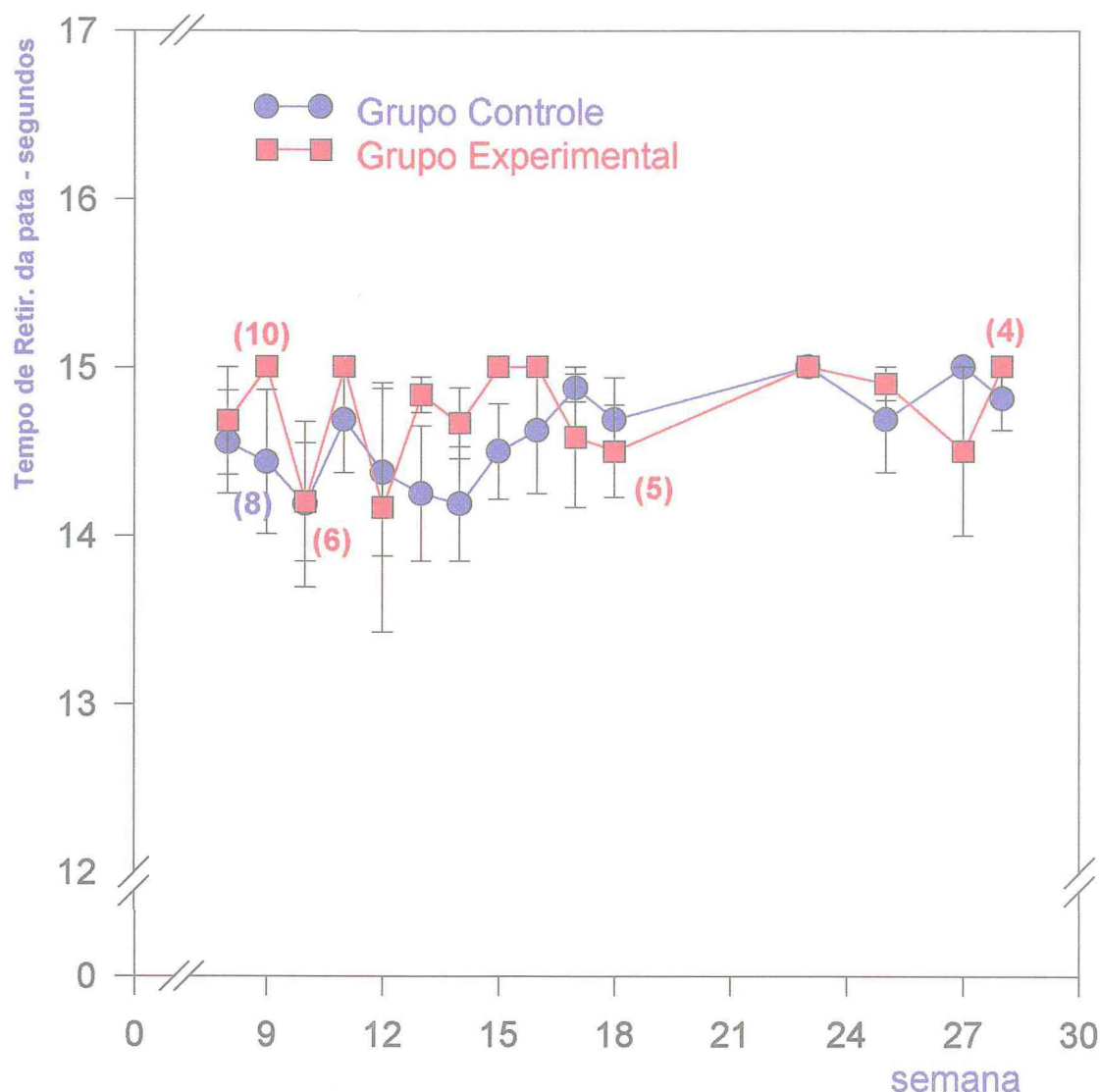


Fig.4.14- Evolução do tempo de latência de retirada da pata no teste térmico a 40°C do grupo controle (ratas não diabéticas, n=9) e grupo experimental (ratas diabéticas, n=11), após 7, e até a 28ª semana de diabetes. Os valores correspondem à média das latências, e erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Valores não significativos. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Teste Térmico 46° - Grupo Controle - Ratos

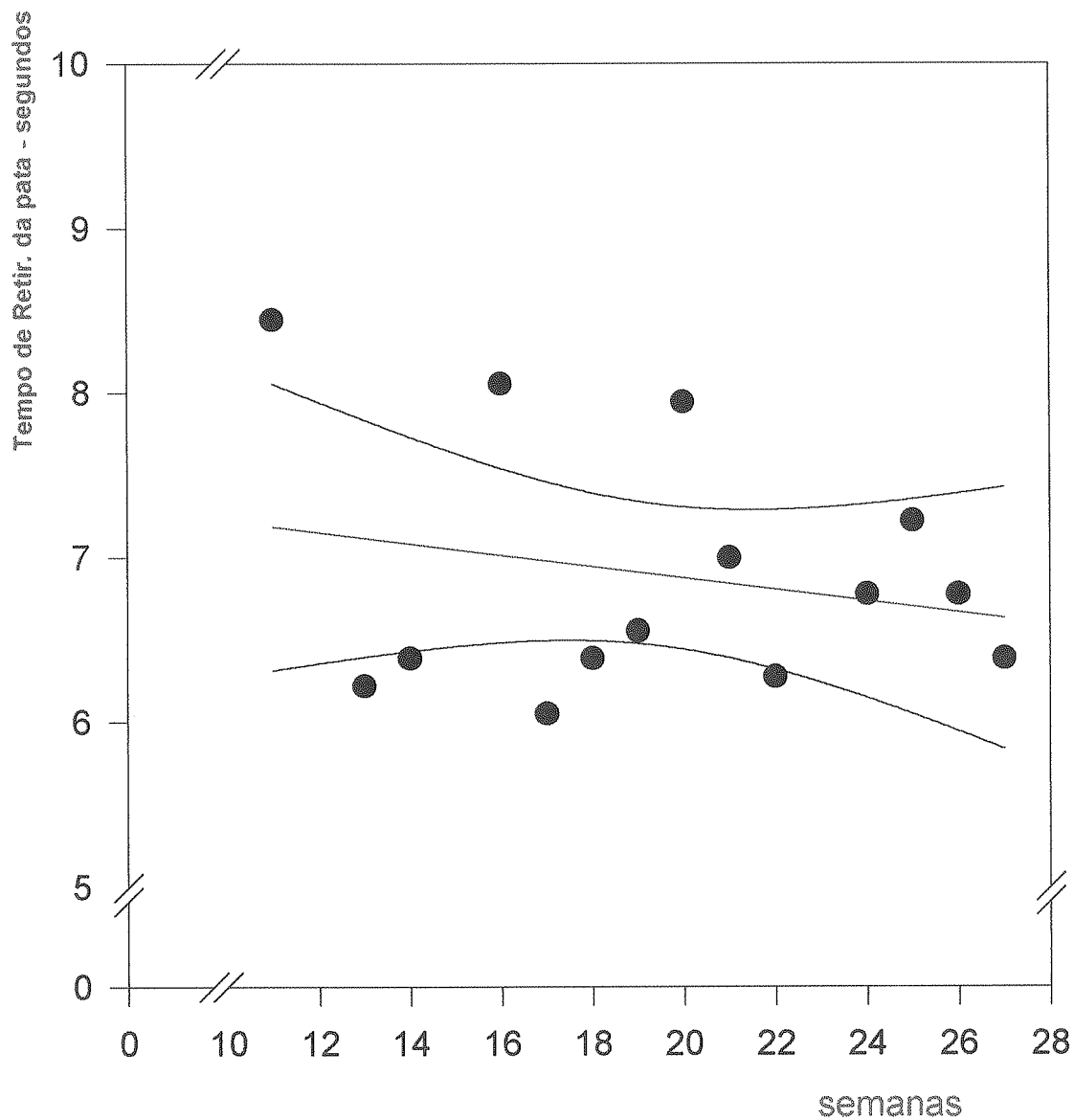


Fig.4.15- Regressão linear das médias dos escores (segundos) obtidos no teste térmico à 46°C, de ratos não diabéticos (grupo controle, n=9) durante 27 semanas.

Teste Térmico 46° - Grupo Controle - Ratas

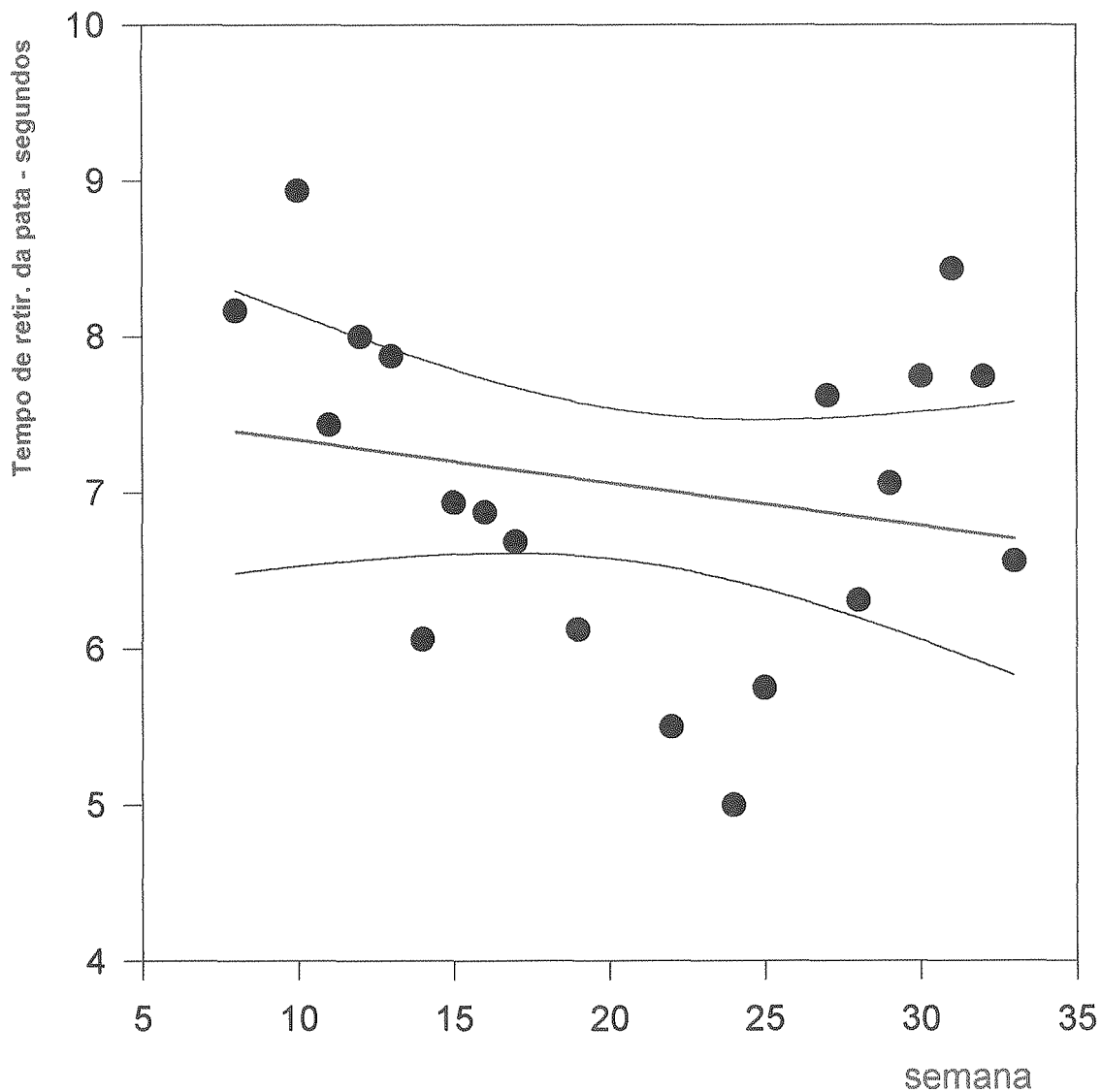


Fig.4.16- Regressão linear das médias dos escores obtidos (segundos) no teste térmico à 46°C, em ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) durante 34 semanas.

Teste Térmico 46° - Grupo Controle - Ratos e Ratas

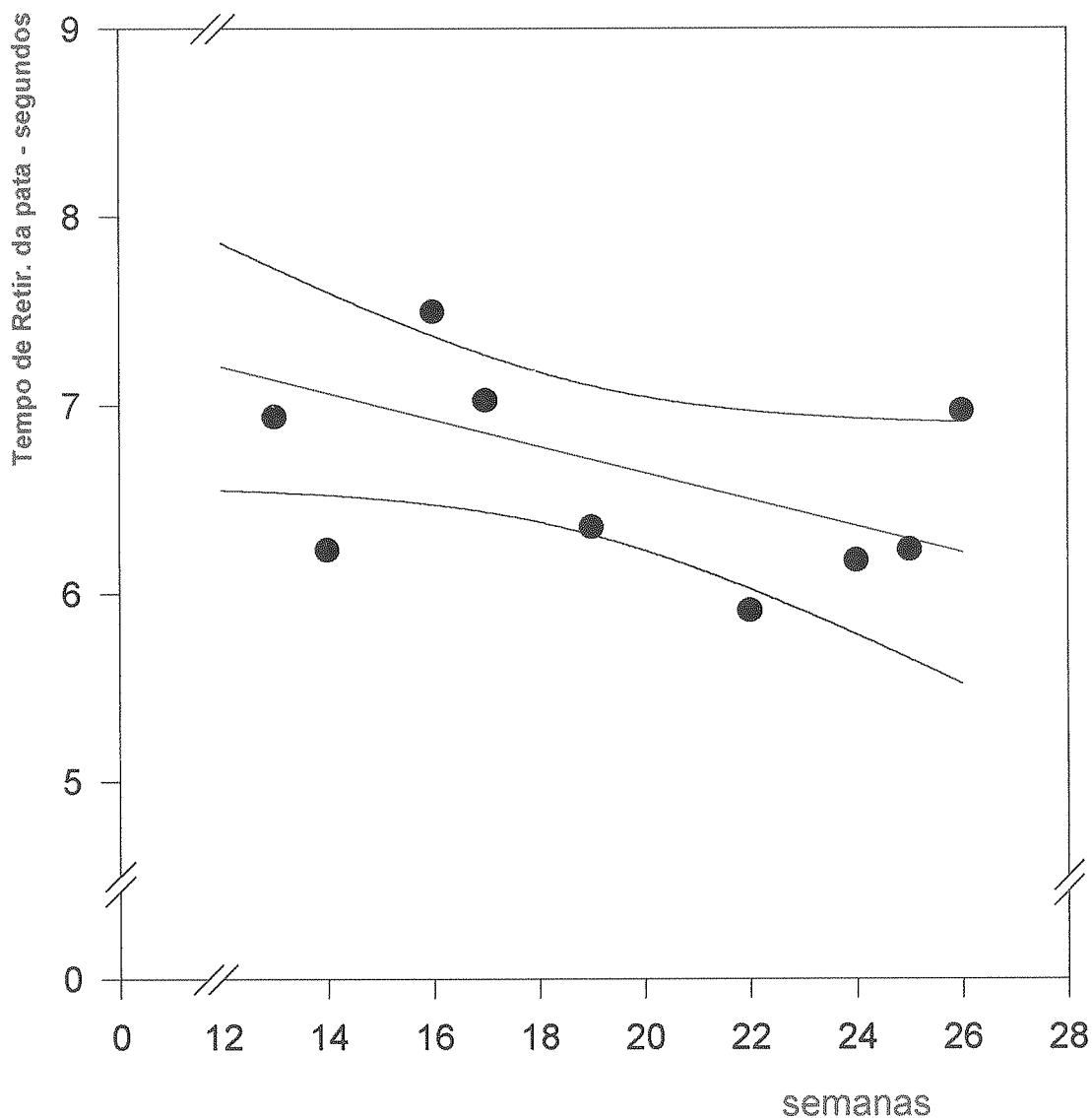


Fig.4.17- Regressão linear dos escores (segundos) obtidos no teste térmico a 46°C, de ratos e ratas não diabéticos (n=17), durante 26 semanas.

Evidência de Dor em Ratos Diabéticos - Hiperalgisia

Teste Térmico Grupo Controle X Subgrupo 1

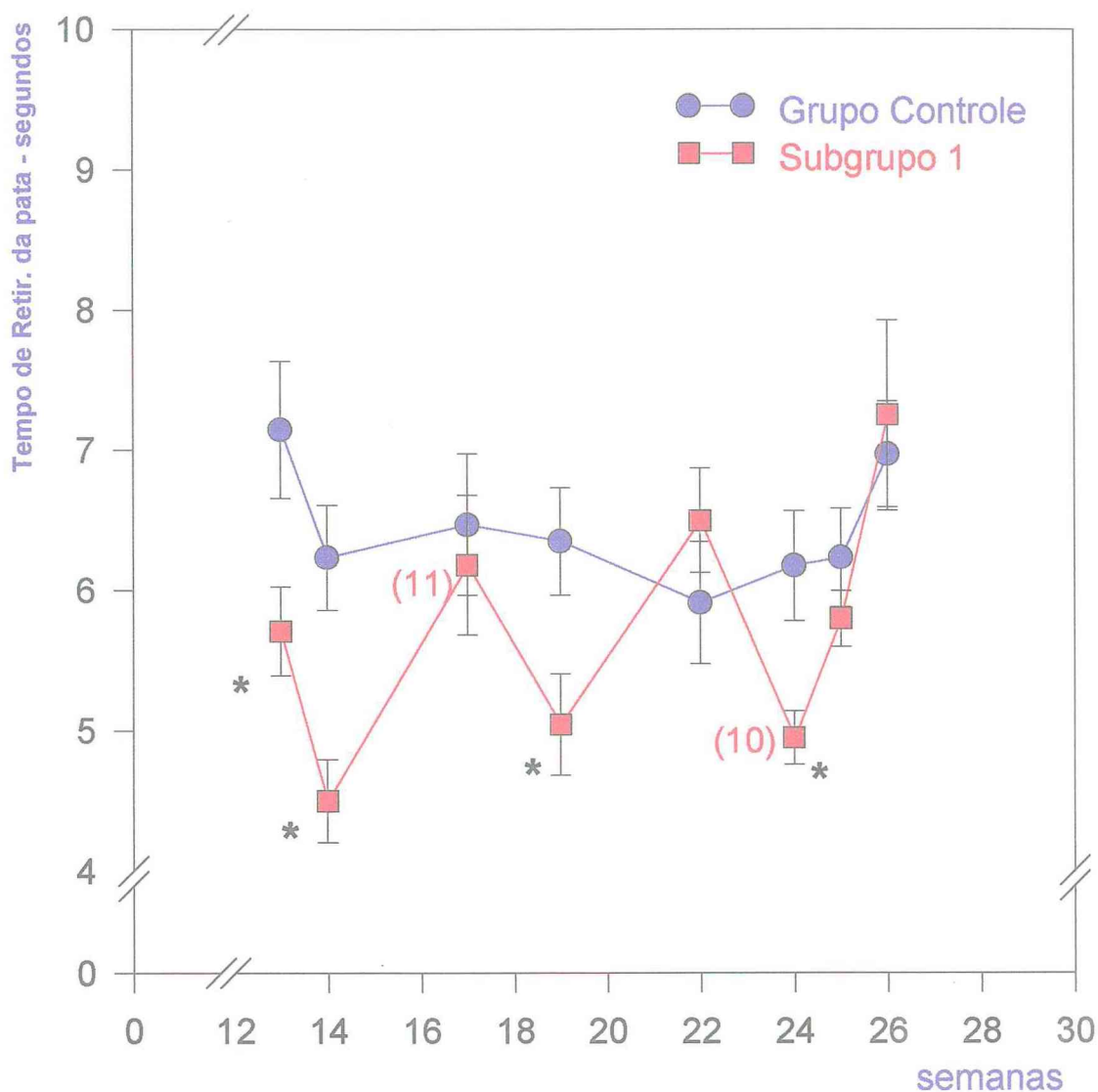


Fig.4.18- Evolução do tempo de latência de retirada da pata no teste térmico a 46°C do grupo controle (ratos e ratas não diabéticos, n=17) e subgrupo 1 (ratos e ratas diabéticos com tempo de retirada da pata < 8 segundos, n=12) após 12, e até a 26ª semana de diabetes. Os valores correspondem à média das latências nas patas posteriores, e ao erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". * P< 0,05. Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Sensitiva de Neuropatia Diabética - Hipoalgesia Teste Térmico a 46°C - Grupo Controle X Subgrupo 2

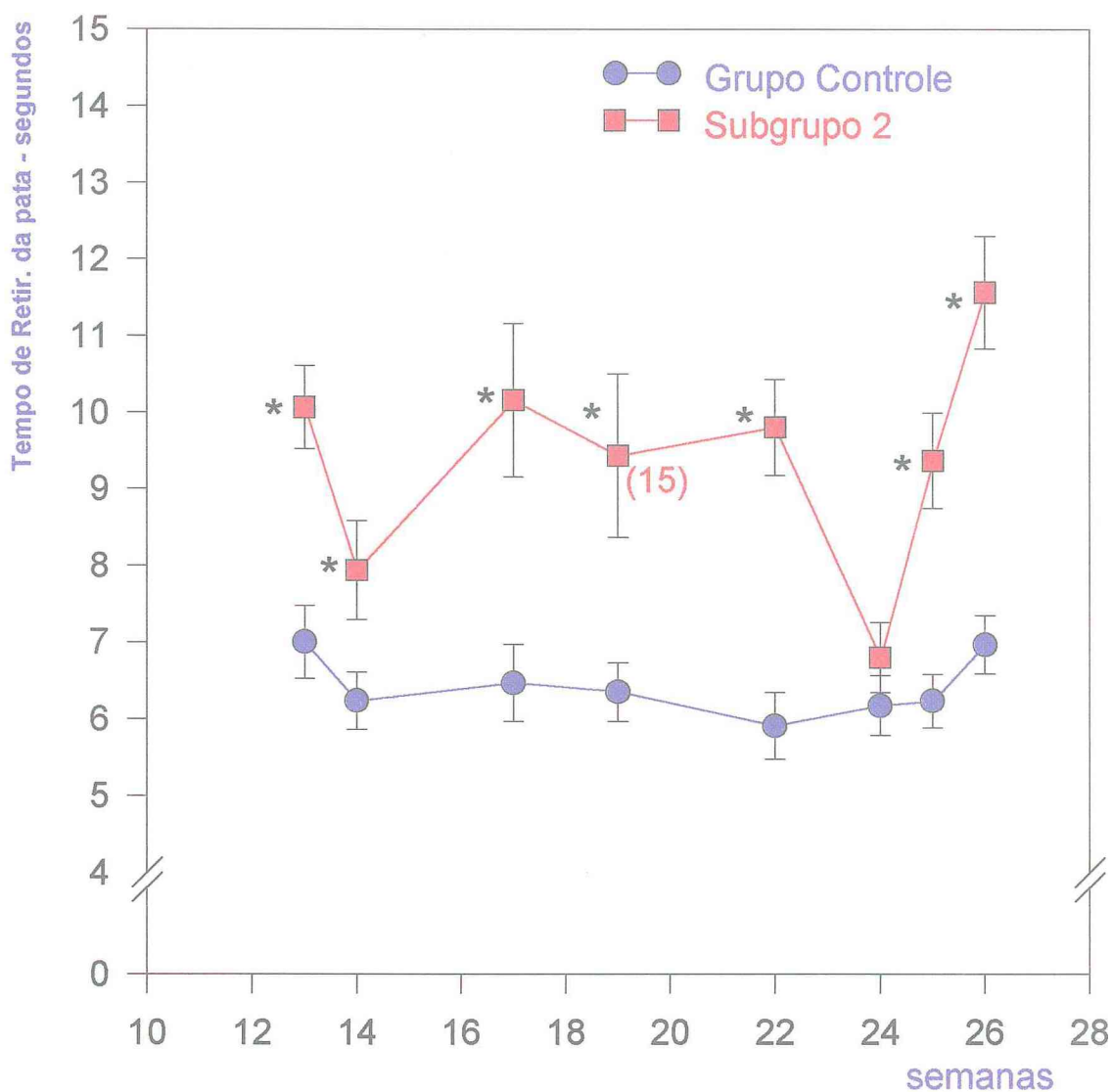


Fig.4.19-Evolução do tempo de latência de retirada da pata no teste térmico a 46°C do grupo controle (ratos e ratas não diabéticos, n=17) e Subgrupo 2 (ratos e ratas diabéticos com tempo de latência da retirada da pata > ou = 8 segundos, n=16) após 12, e até a 26ª semana de diabetes. Valores correspondem ao tempo médio das latências das patas posteriores, e ao erro padrão da média. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. * P < 0,01. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test .

4.5 - Resultados do Estudo Comportamental

4.5.1 - *Comportamento de Coçar-se*

O estudo piloto do comportamento de coçar-se, que foi acompanhado em ratas durante 12 semanas, mostrou que o tempo gasto com esse comportamento começa a aumentar após a 2^a semana, atingindo valores estatisticamente significativos na 12^a semana (fig.4.20).

O Subgrupo 1 apresentou médias de tempo gasto no comportamento de coçar-se superiores ao grupo controle (n=8 animais, sendo 6 machos e 2 fêmeas) com valores significativos em quase toda a duração do estudo (fig.4.21).

O Subgrupo 2 também apresentou valores médios de tempo gasto no comportamento de coçar-se superiores ao grupo controle, sendo que neste subgrupo somente alguns valores foram estatisticamente significativos quando comparados com os do grupo controle.(fig.4.22).

Numa análise prévia dos dados, percebemos que dentre os ratos do grupo experimental (n=28, fêmeas=6 e machos=22) alguns apresentavam o tempo de comportamento de coçar-se persistentemente elevado, enquanto em outros esse tempo era muito variável.

Os ratos que apresentaram tempo de coçar-se maior que 12 segundos ao longo das observações foram agrupados no Subgrupo 3 (n=20, fêmeas=6 e machos=14). Os valores do tempo de comportamento de coçar-se deste subgrupo são quase todos estatisticamente diferentes dos valores do grupo controle ao longo de 27 semanas de observação (fig.4.23).

A comparação da evolução do tempo médio do comportamento de coçar-se de todo o grupo experimental com o grupo controle está representada na fig.4.24. Apenas alguns valores são estatisticamente diferentes entre os dois grupos.

Evidência Comportamental de Neuropatia Diabética Dolorosa

Evolução Inicial do Comportamento de Coçar-se

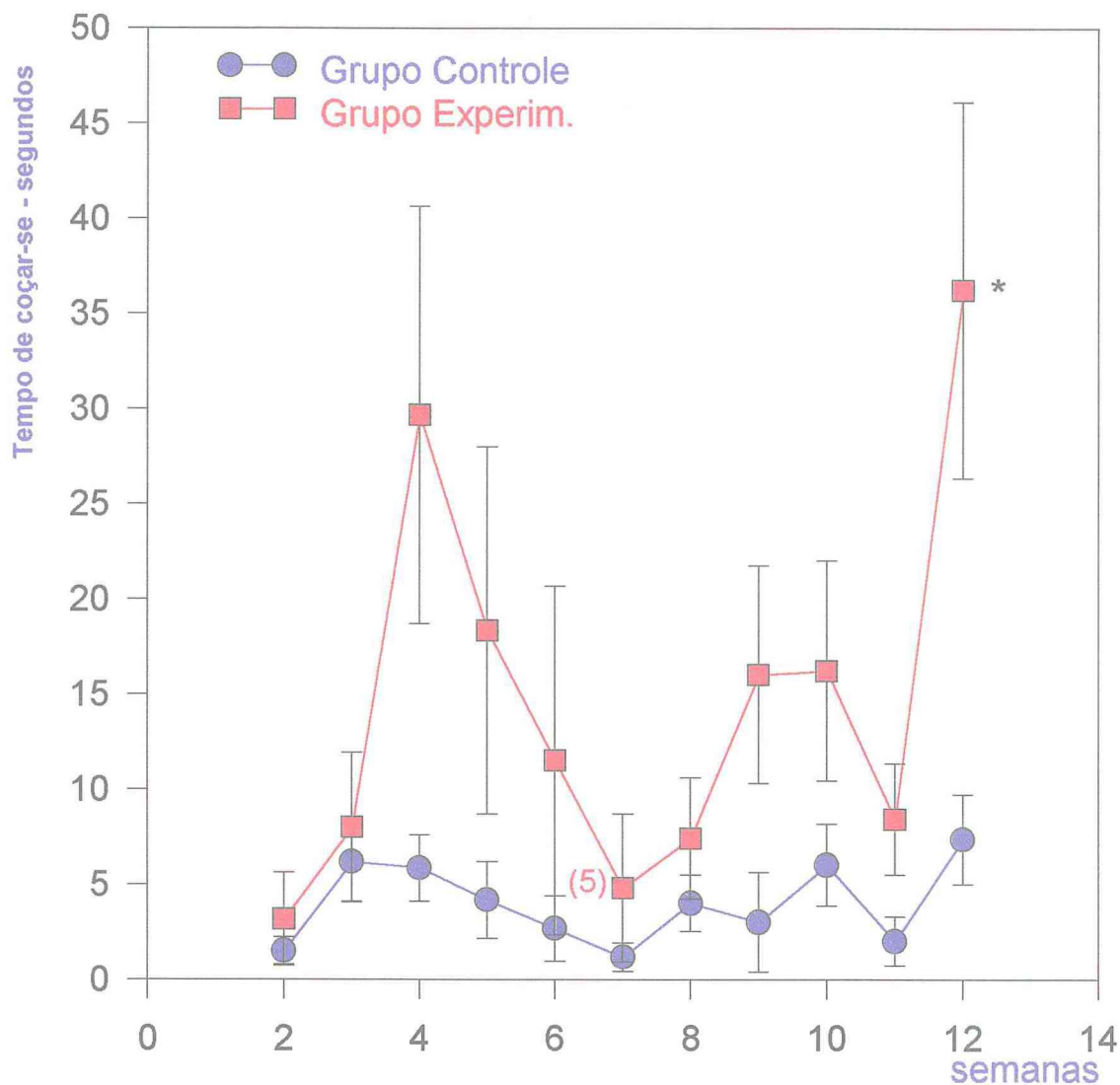


Fig.4.20-Evolução do tempo médio do comportamento de coçar-se de ratas não diabéticas (grupo controle, n=6) e diabéticas (grupo experim.,n=6) durante as primeiras semanas de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem às médias, e erro padrão da média.* $P < 0,05$. Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Crônica de Neuropatia Dolorosa Diabética Comportamento de Coçar-se Grupo Controle X Subgrupo 1

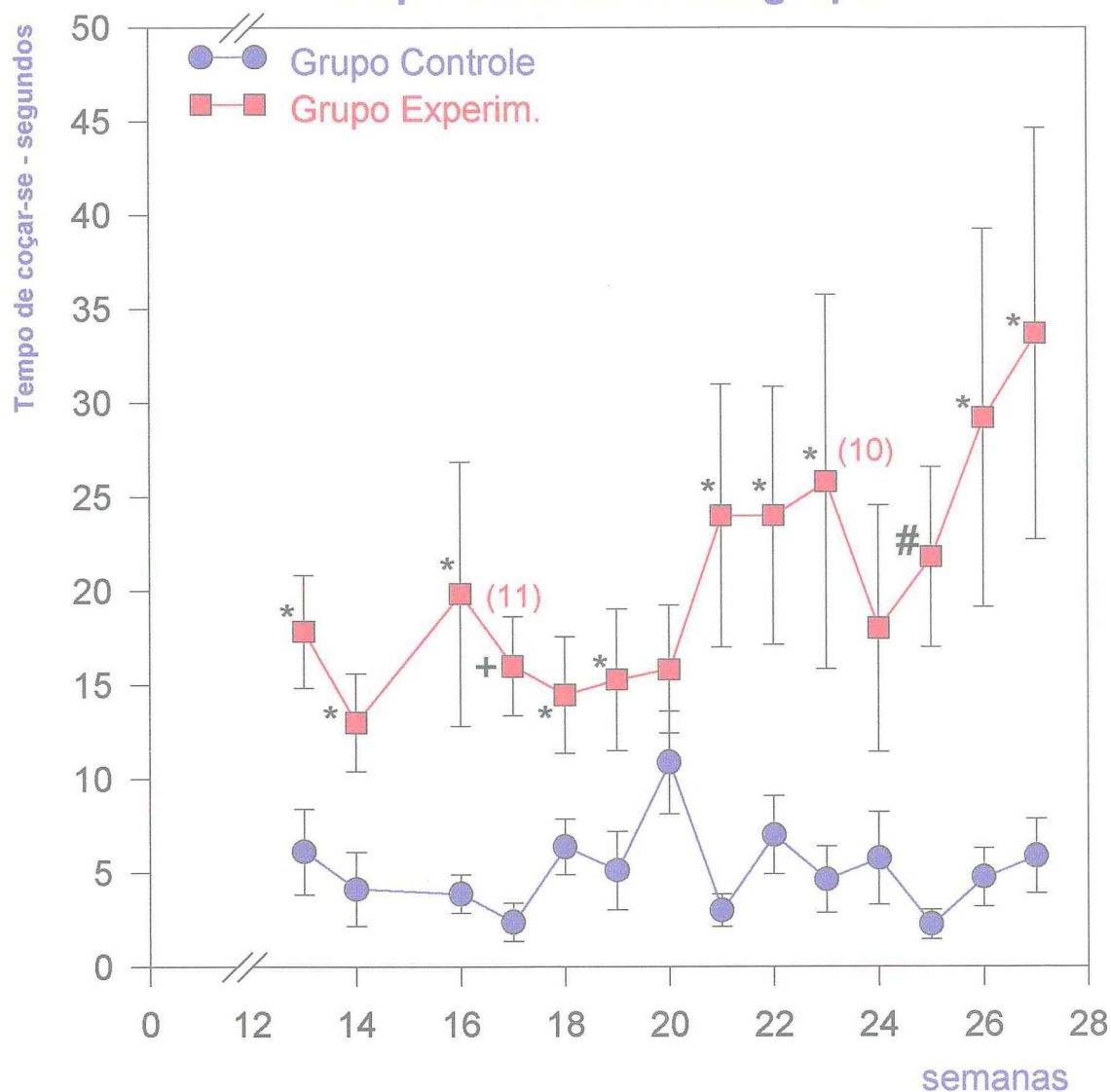


Fig.4.21-Evolução do tempo médio do comportamento de coçar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 1, n=12) após 12 semanas e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Os valores correspondem às médias, e erro padrão da média. + P < 0,001; # P < 0,01; * P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Crônica de Neuropatia Diabética Dolorosa

Comportamento de Coçar-se Grupo Controle X Subgrupo 2

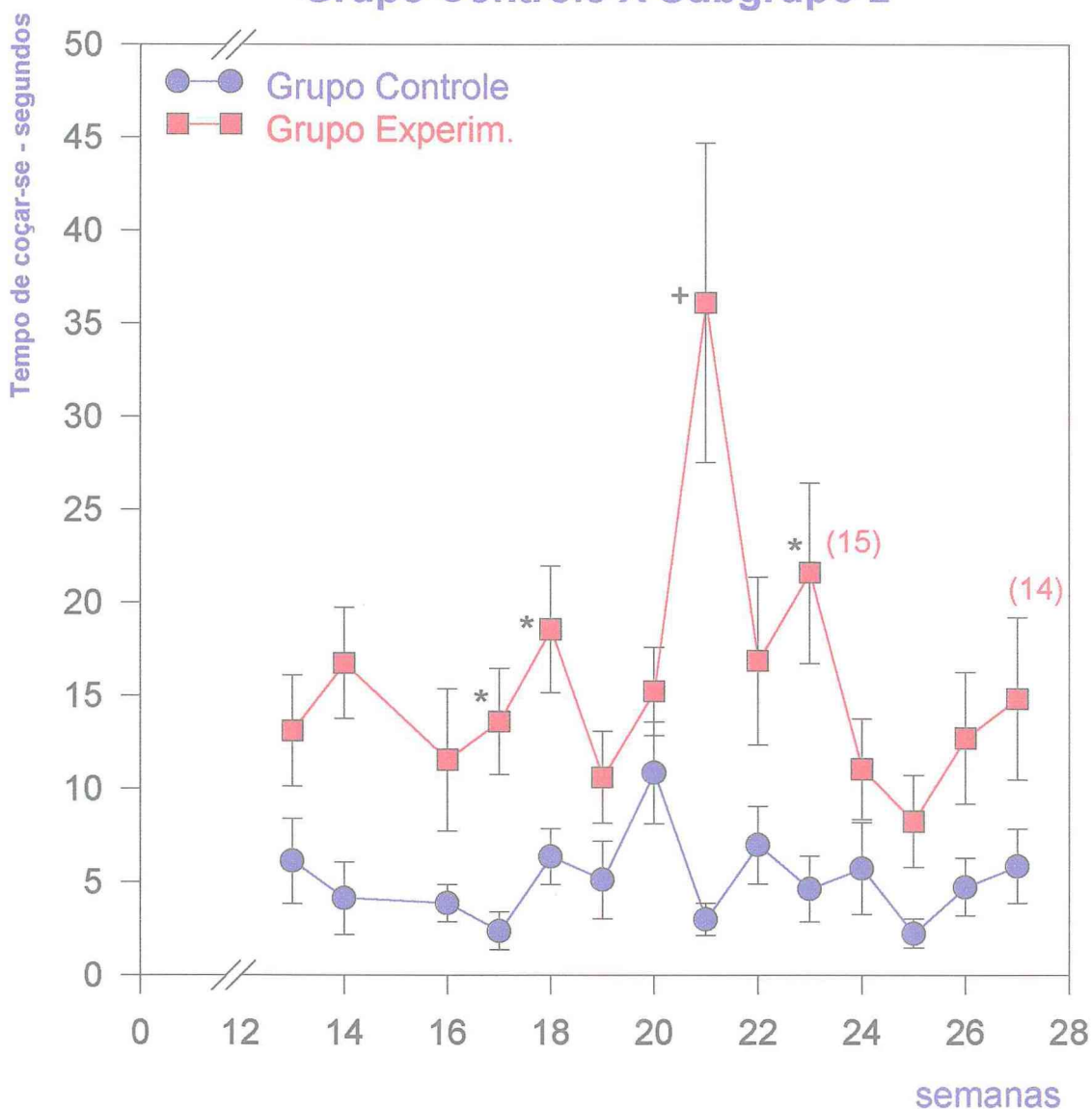


Fig.4.22-Evolução do tempo médio do comportam. de coçar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 2, n=16) após 12 semanas e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os Valores correspondem às médias, e ao erro padrão da média
* P< 0,05; + P< 0,001. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Crônica de Neuropatia Diabética Dolorosa

Comportamento de Coçar-se Grupo Controle X Subgrupo 3

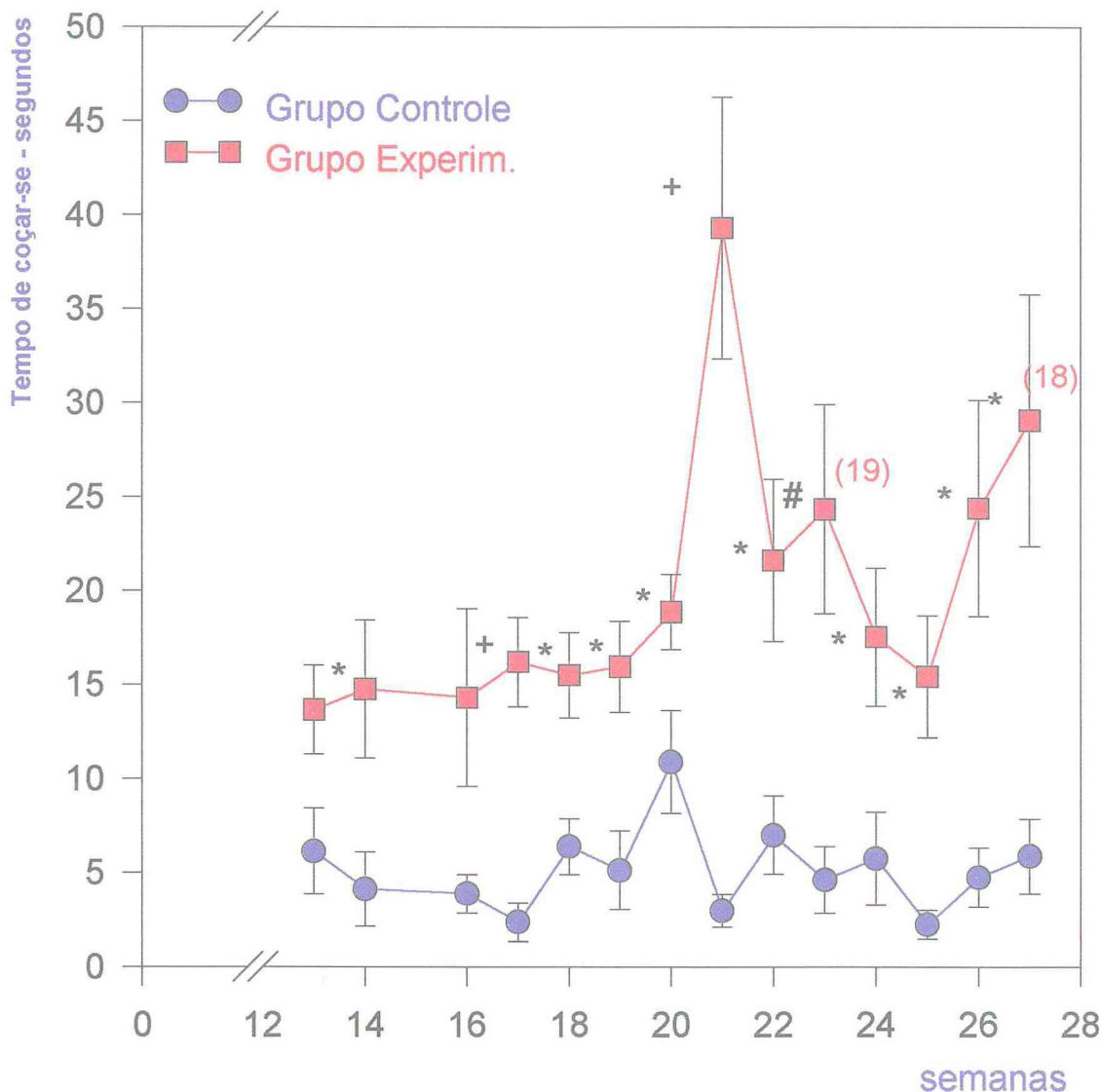


Fig.4.23 - Evolução do tempo médio do comportam. de coçar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 3, n=20) após 12 semanas e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem às médias, e ao erro padrão da média. + P < 0,0001; # P < 0,01; * P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Crônica de Neuropatia Diabética Dolorosa

Comportamento de Coçar-se Grupo Controle X Grupo Experim.

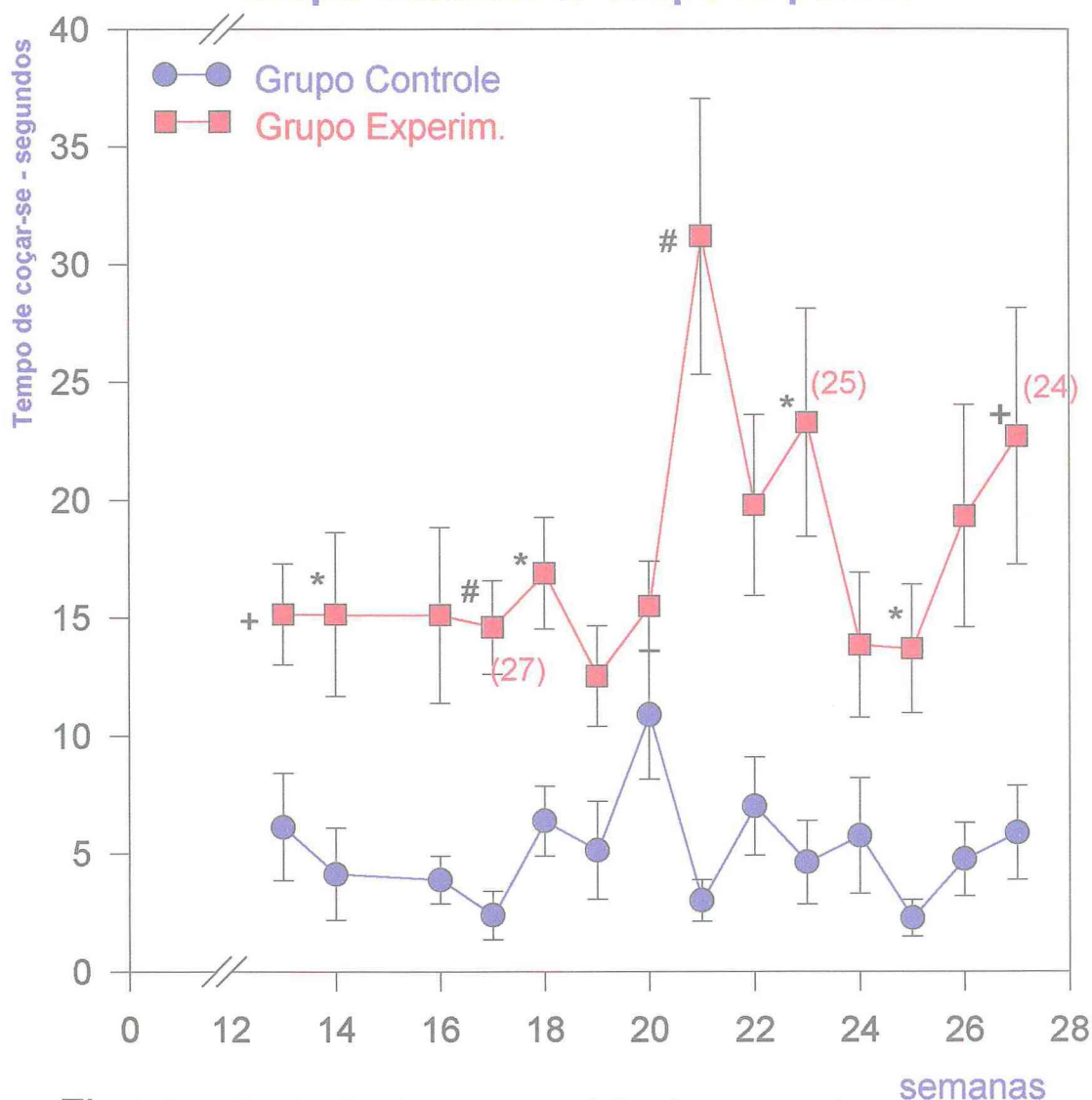


Fig.4.24 - Evolução do tempo médio do comportam. de coçar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (total do grupo experim., n=28) após 12 semanas e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Os valores correspondem à média, e erro padrão da média. +P = 0,05; *P < 0,05; #P < 0,0001. Teste "t" e Mann-Whitney Rank

Whitney Rank Sum Test.

4.5.2 - *Comportamento de Limpar-se*

No comportamento de limpar-se obtivemos resultados semelhantes para os três subgrupos. Os ratos diabéticos em geral apresentaram menos comportamento de limpar-se que os ratos controles. Essa diferença foi pequena e muitas vezes não estatisticamente significativa (fig. 4.25).

O subgrupo 1 apresentou somente discreta diferença em relação ao grupo controle. Esta diferença não foi estatisticamente significativa, apenas é visível no gráfico da fig.4.26.

O subgrupo 2 apresentou tempo médio do comportamento de limpar-se menor que o controle, atingindo valores estatisticamente diferentes somente na 20^a e na 24^a semana (fig. 4.27).

O subgrupo 3 apresentou resultados semelhantes aos do subgrupo 1, embora ainda tenha atingido valores estatisticamente significativos na 24^a e 26^a semanas (fig. 4.28).

4.5.3 - *Comportamento de Empinar-se*

Os ratos diabéticos de uma forma geral apresentaram menos tempo de comportamento de empinar-se (ficar ereto) do que os animais controles.

Os animais do subgrupo 1 apresentaram pequena diferença em relação aos valores do grupo controle. Esta diferença embora não seja estatisticamente significativa em todas as semanas de observação é bem visível graficamente (fig.4.29).

Os animais do subgrupo 2 apresentaram mais valores significativos em relação ao controle, que os animais do subgrupo 1. Os valores começam a ficar estatisticamente diferentes a partir da 21^a semana de diabetes (fig.4.30).

Os animais do subgrupo 3 também apresentaram um tempo médio do comportamento de empinar-se menor do que o controle. Apenas alguns desses valores foram estatisticamente significativos. Isso ocorreu principalmente nas últimas sete semanas de observação (fig.4.31).

Evolução do Comportamento de Limpar-se Grupo Controle X Grupo Experimental

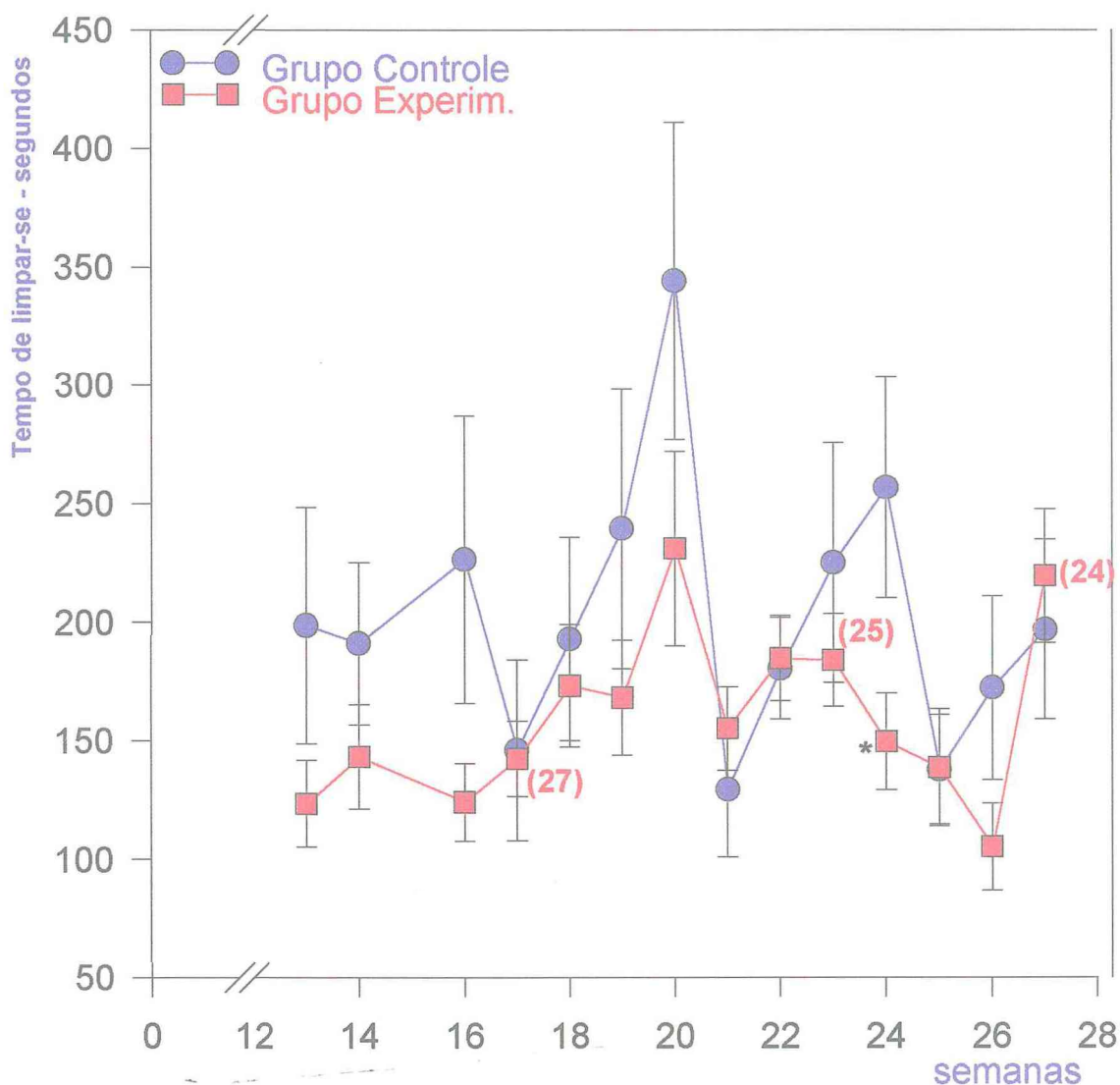


Fig.4.25- Evolução do tempo médio do comportam. de limpar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (grupo Experim.,n=28) após 12 semanas, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Valores correspondem à média, e ao erro padrão da média.
* P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evolução do Comportamento de Limpar-se Grupo Controle X Subgrupo 1

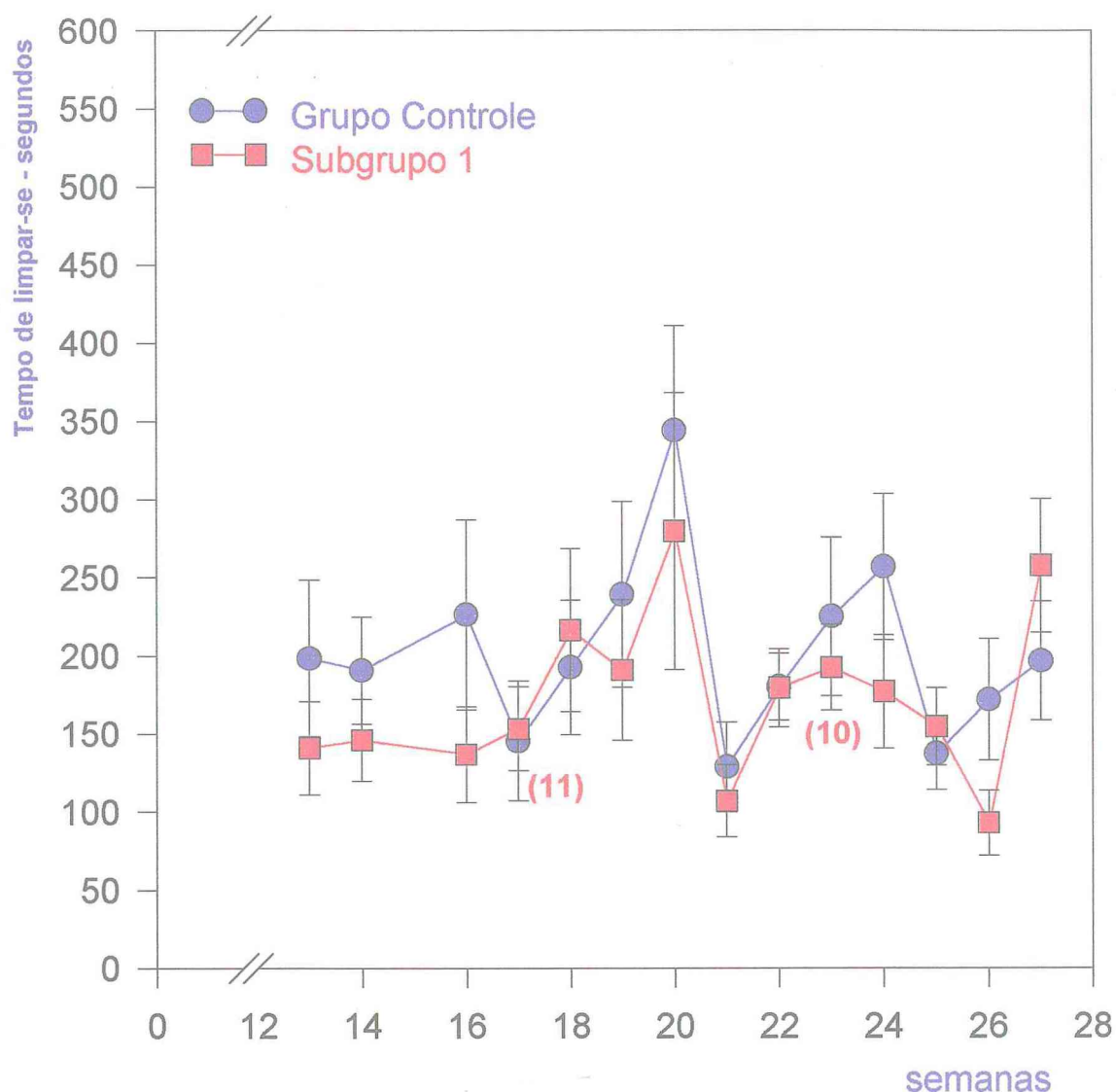


Fig.4.26- Evolução do tempo médio do comportam. de limpar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 1, n=12) após 12 semanas, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Os Valores correspondem às médias, e ao erro padrão da média. Não houve significância estatística. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evolução do Comportamento de Limpar-se Grupo Controle X Subgrupo 2

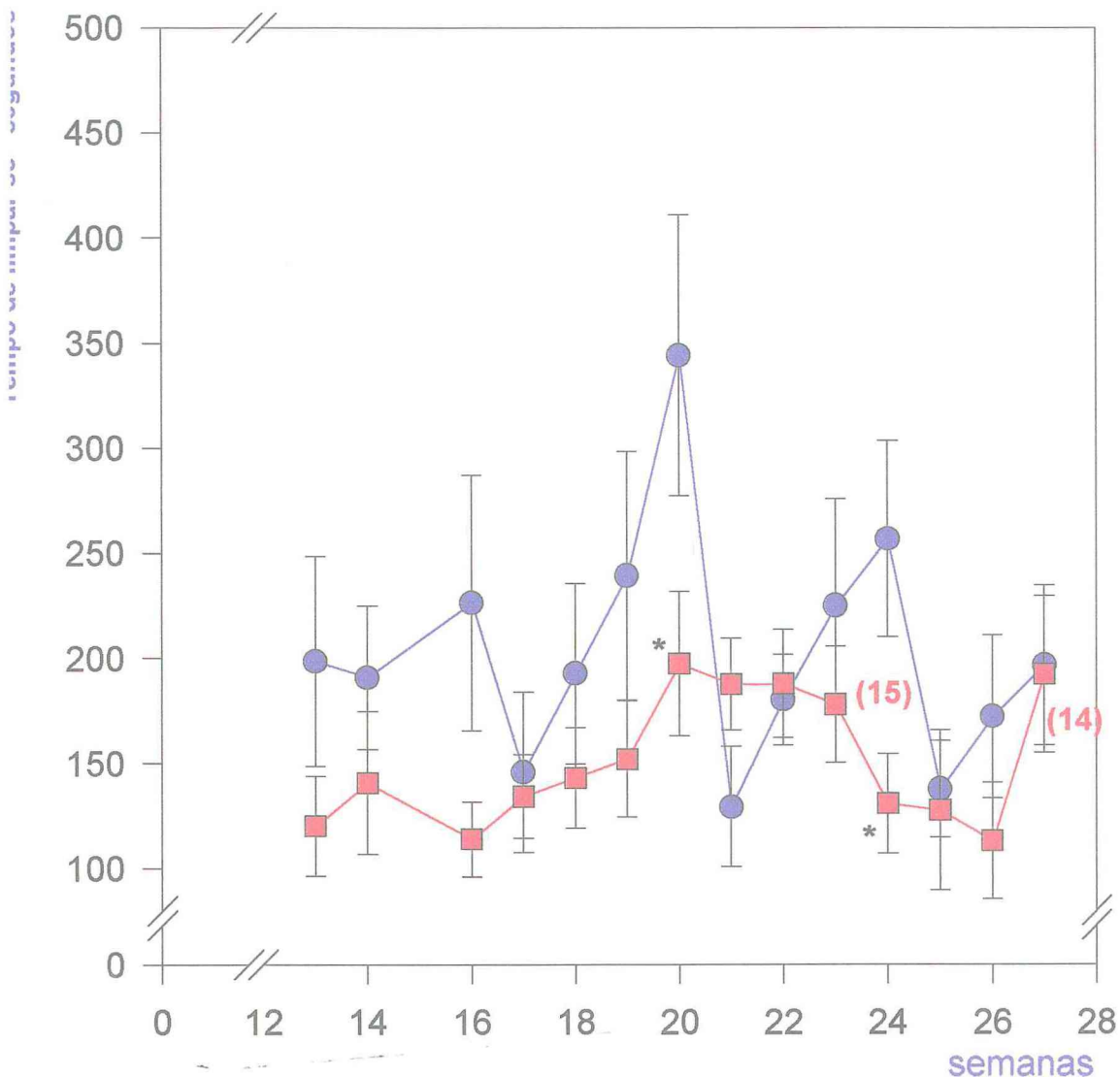


Fig.4.27- Evolução do tempo médio do comportam. de limpar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 2, n=16) após 12 semanas, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média, e ao erro padrão da média. * P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evolução do Comportamento de Limpar-se Grupo Controle X Subgrupo 3

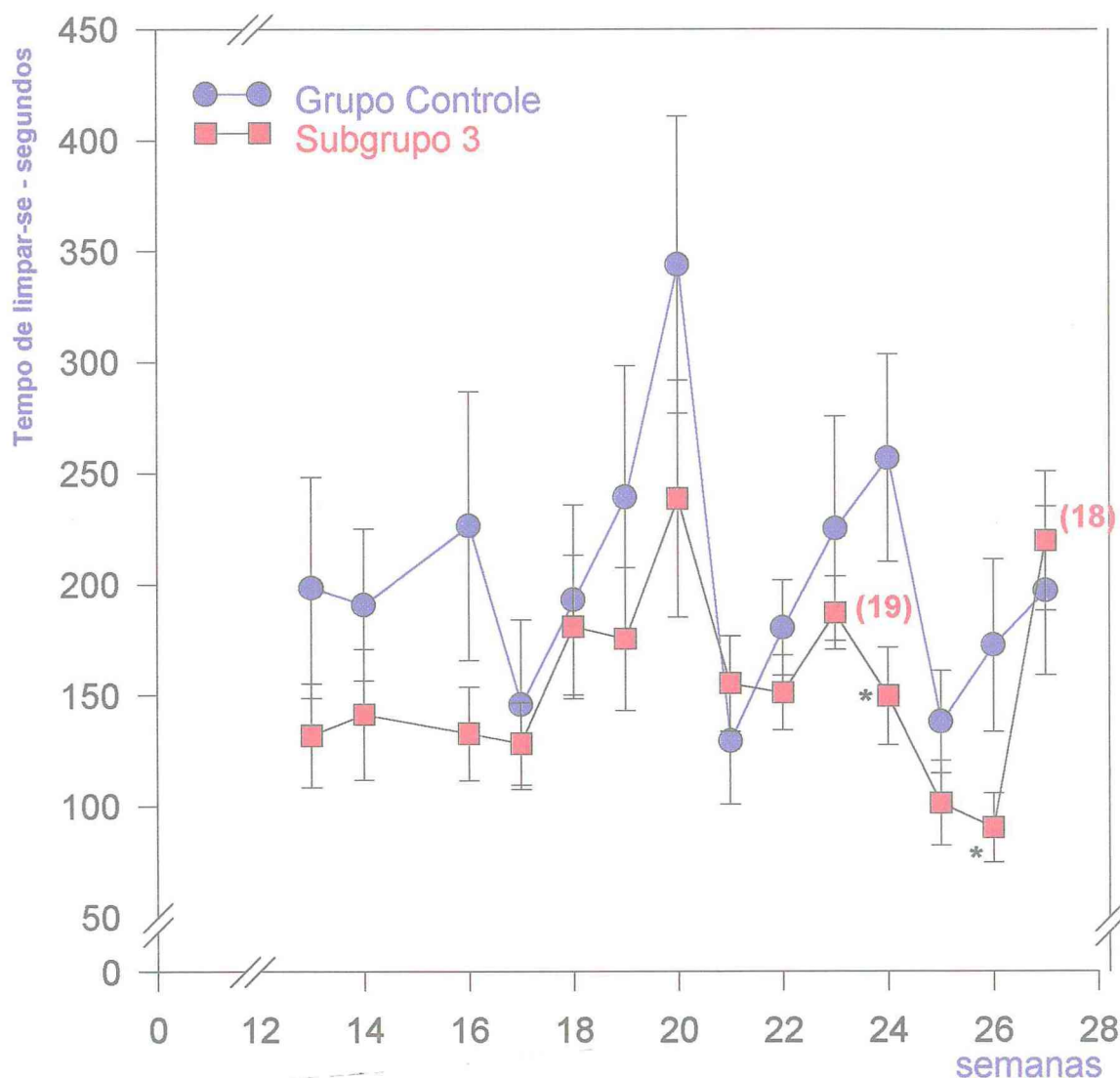


Fig.4.28- Evolução do tempo médio do comportam.de limpar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 3, n=20) após 12 semanas, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda.Os valores correspondem à média,e ao erro padrão da média.
* P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum test.

Evidência motora de Neuropatia Diabética Comportamento de Empinar-se Grupo Controle X Subgrupo 1

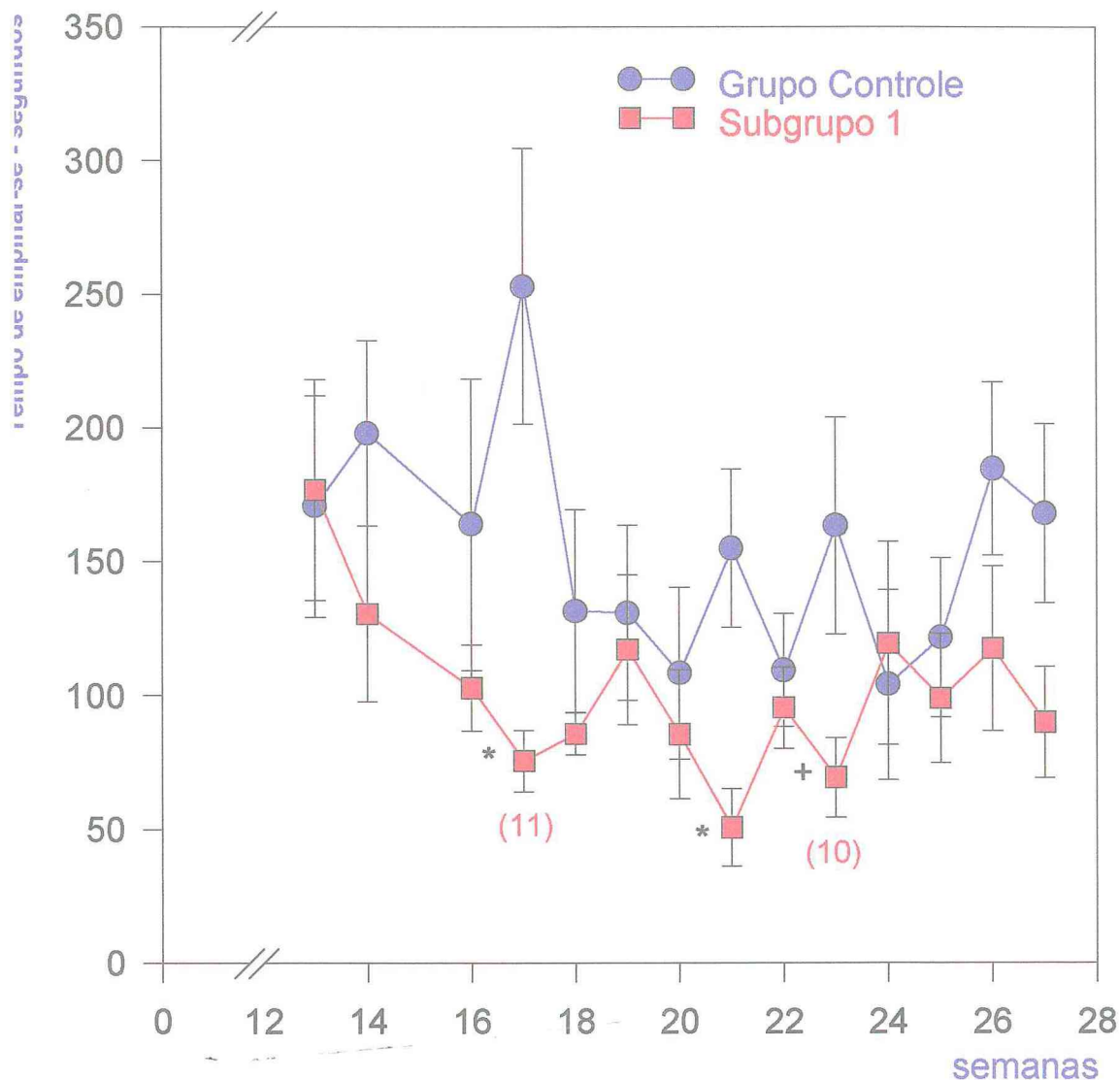


Fig.4.29- Evolução do tempo médio em segundos do comportam. de empinar-se de ratos e ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 1, n=12). Números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Os valores correspondem à média e erro padrão da média. *P<0,01; +P<0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Motora de Neuropatia Diabética Grupo Controle X Subgrupo 2

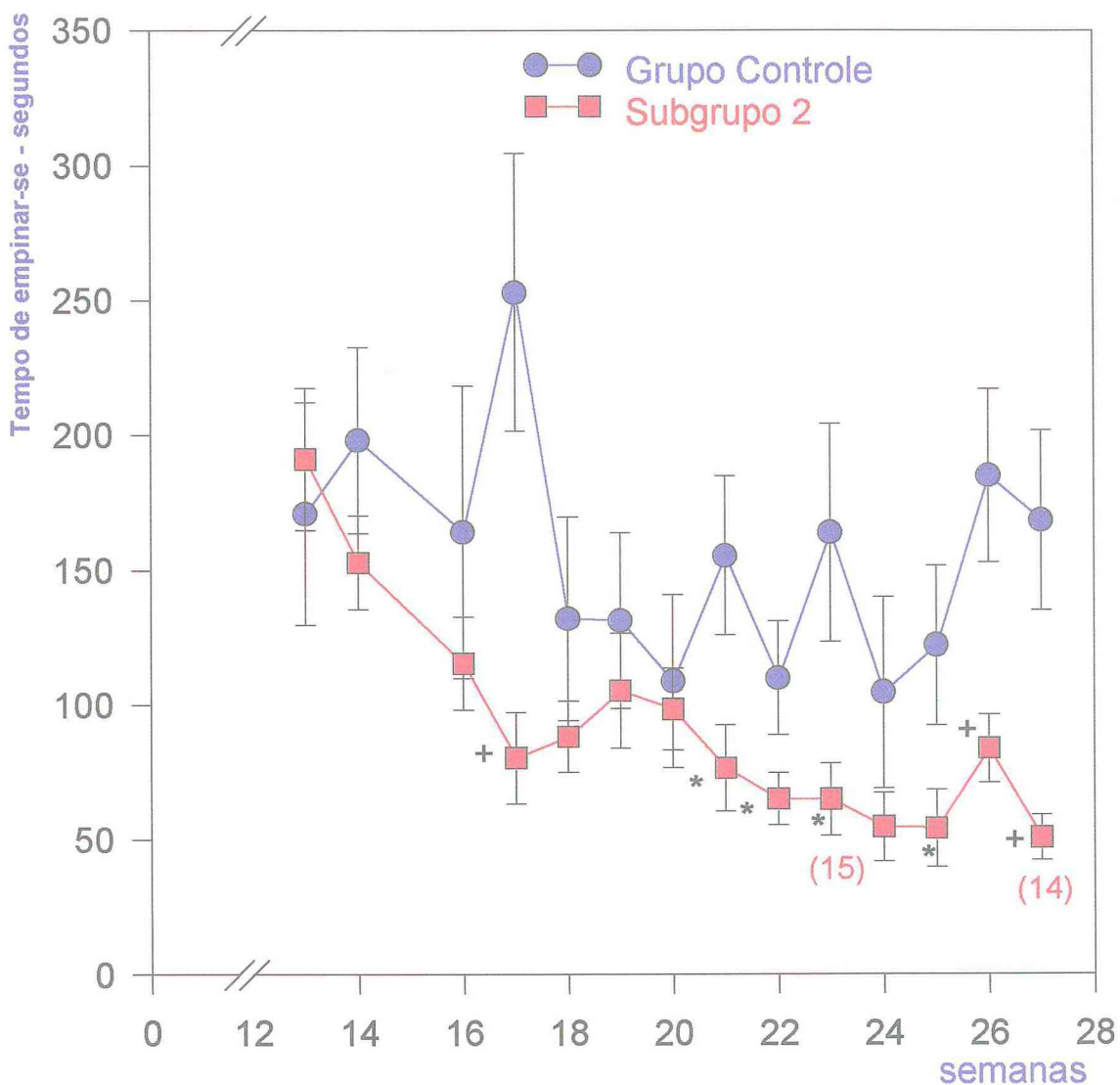


Fig.4-30- Evolução do tempo médio do comportam.de empinar-se de ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 2, n=16). Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda.Os valores correspondem à média e erro padrão da média. + P < 0,01; *P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Motora de Neuropatia Diabética

Comportamento de Empinar-se

Grupo Controle X Subgrupo 3

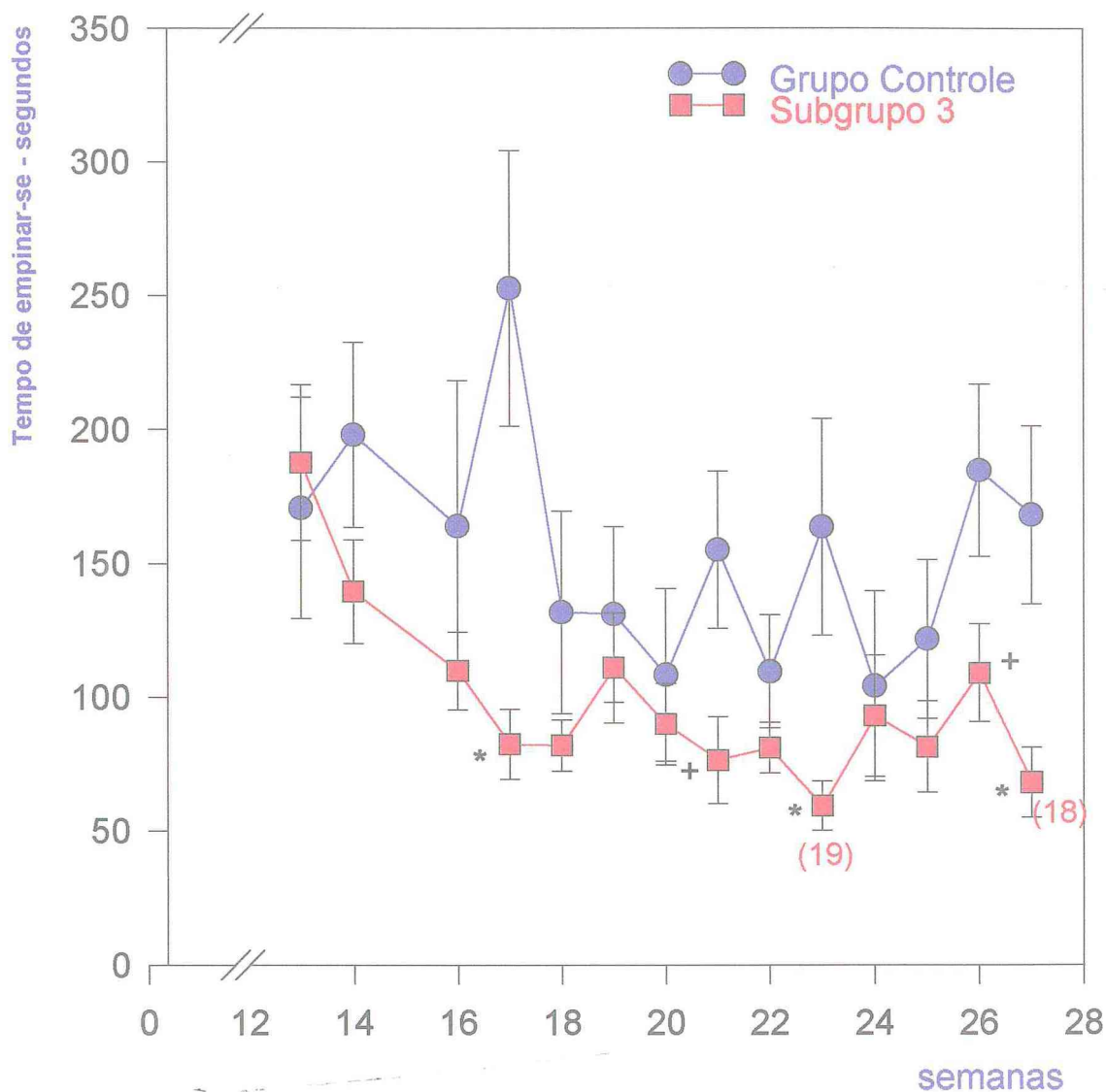


Fig.4.31-Evolução do tempo médio do comportam. de empinar-se de ratos e ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) e diabéticas (subgrupo 3, n=20) após 12 e até a 27ª semana de diabetes. Números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média, e ao erro padrão da média. * P < 0,01; + P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Runk Sum Test.

4.5.4 - *Comportamento de Farejar*

Houve uma diminuição do comportamento de farejar a partir da 20ª semana de diabetes. Os resultados para os três subgrupos são semelhantes, entretanto o subgrupo 1 apresentou valores estatisticamente diferentes na 20ª e 21ª semanas, o subgrupo 2 na 21ª e 23ª semanas, e o subgrupo 3 apenas na 21ª semana. (figs.4.32 a 4.34).

4.5.5 - *Comportamento de Descansar*

Houve um aumento do comportamento de descansar para todos os subgrupos, tendo os animais do subgrupo 1 apresentado esse aumento a partir da 17ª semana, com alguns valores estatisticamente diferentes (fig. 4.35).

Os animais do subgrupo 2 também começaram a apresentar esse aumento a partir da 17ª semana, porém apresentaram mais valores significativos que o subgrupo 1 (fig.4.36).

Os animais do subgrupo 3 iniciaram também, o aumento do tempo gasto no comportamento de descansar na 17ª semana, e apresentaram mais valores significativos que o subgrupo 2 (fig.4.37).

4.5.6 - *Comportamento de Alimentar-se*

O tempo gasto no comportamento de alimentar-se diminuiu em todos os subgrupos, porém não atingiu valores estatisticamente diferentes em todas as semanas.

O subgrupo 1 começou a apresentar diminuição deste comportamento a partir da 18ª semana, alcançando valores significativos na 26ª e 27ª semanas (fig.4.38).

O subgrupo 2 iniciou a diminuição do tempo gasto no comportamento de alimentar-se a partir da 21ª semana, atingindo valor estatisticamente significativo na 27ª semana (fig.4.39).

No subgrupo 3, o tempo gasto com este comportamento diminuiu a partir da 22ª semana, alcançando valores significativos na 26ª e 27ª semanas (fig.4.40).

Evolução do Comportamento de Farejar

Grupo Controle X Subgrupo 1

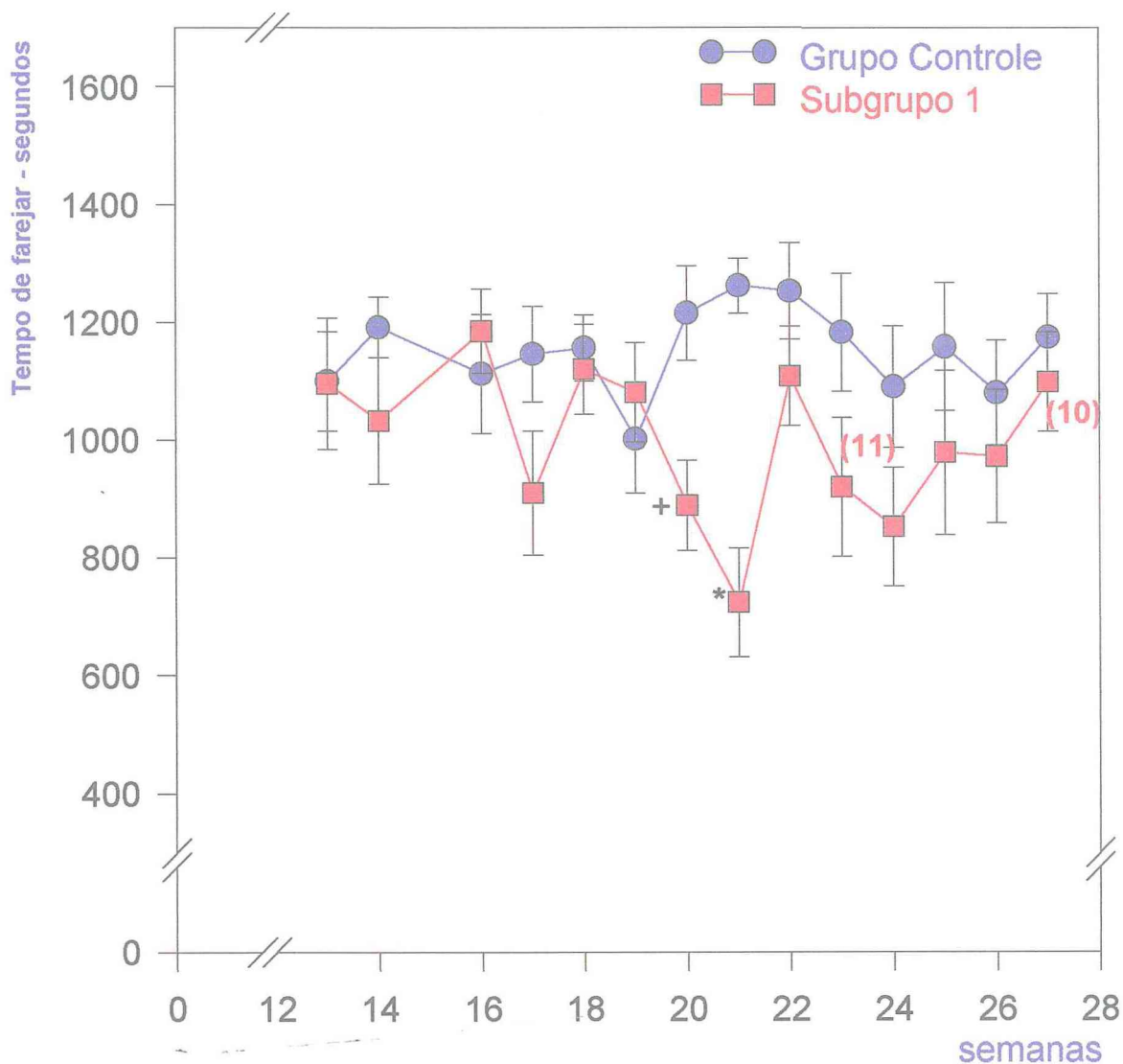


Fig.4.32- Evolução do tempo médio do comportam. de farejar em ratos e ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) e diabéticas (subgrupo 1, n=12) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Os valores correspondem à média e erro padrão da média. *P < 0,001; +P < 0,05. Teste "t".

Evolução do Comportamento de Farejar Grupo Controle X Subgrupo 2

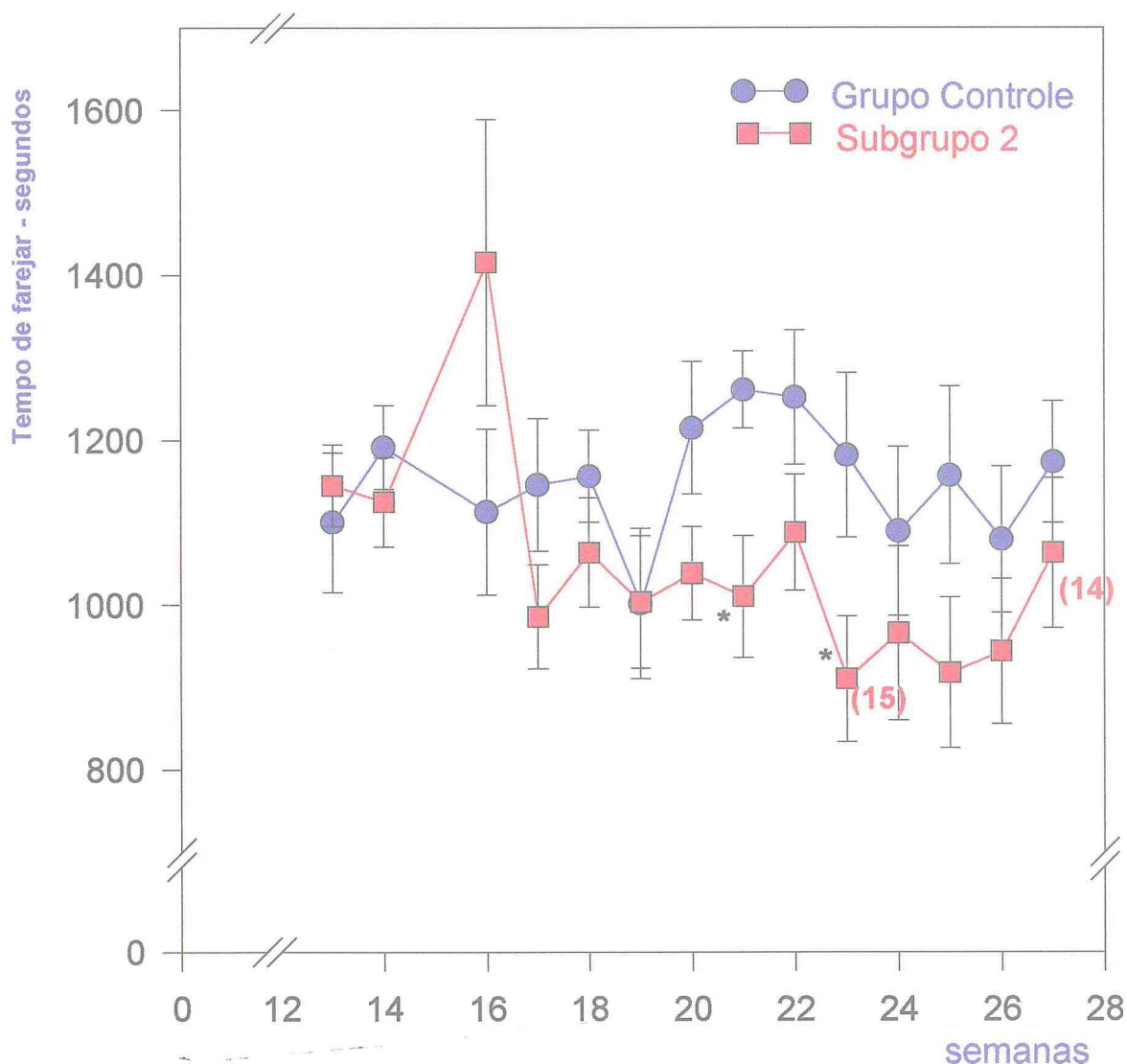


Fig.4.33- Evolução do tempo médio do comportam.de farejar em ratos e ratas não diabéticos (grupo controle,n=8) e diabéticos (subgrupo 2, n=16) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. * P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evolução do Comportamento de Farejar

Grupo Controle X Subgrupo 3

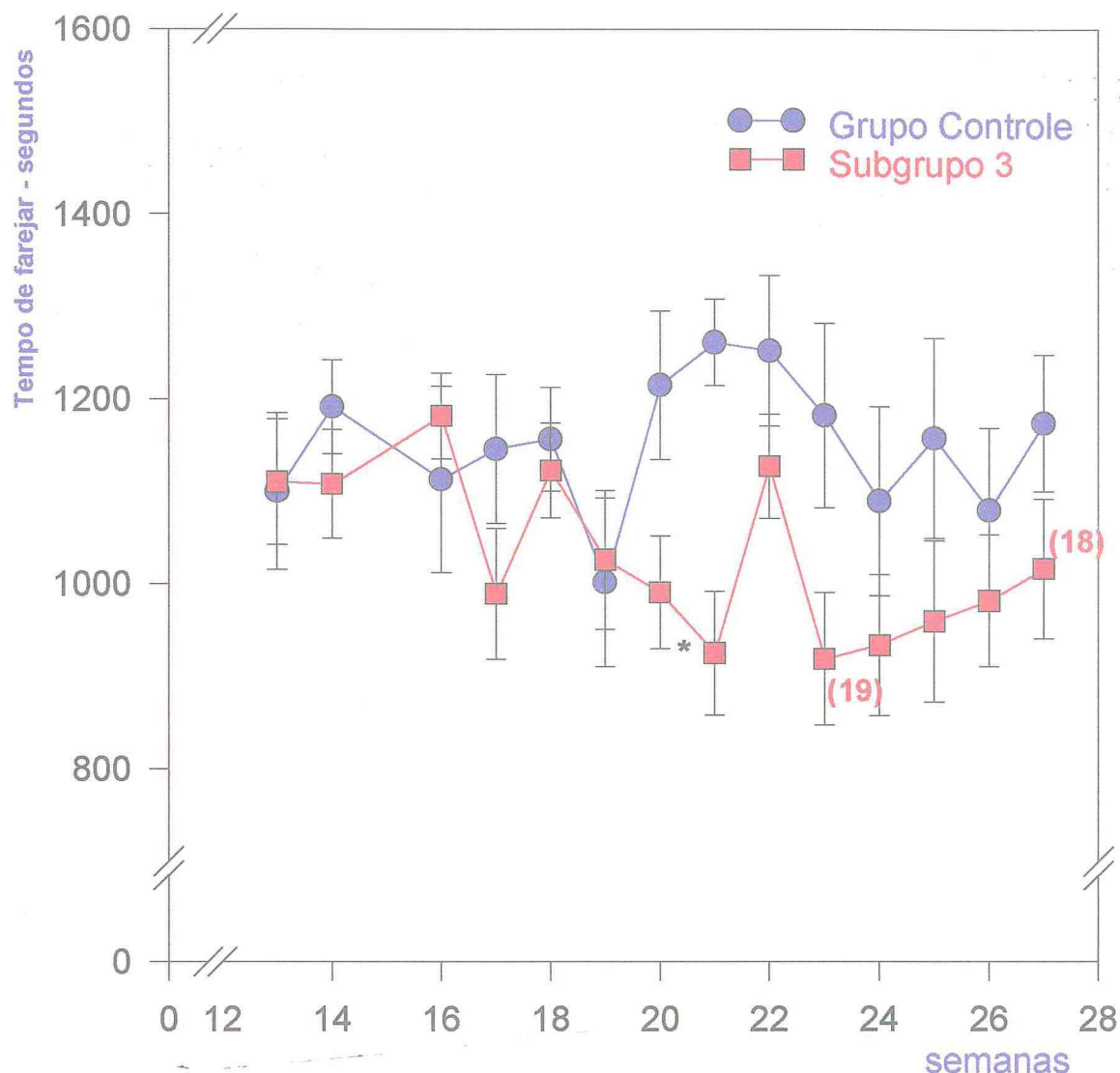


Fig.4.34- Evolução do tempo médio do comportam. de farejar em ratos e ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) e diabéticas (subgrupo 3, n=20) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando muda o "n". Os valores correspondem à média e erro padrão da média. * P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Subclínica de Dor em Neuropatia Diabética: Comportamento de descansar Grupo Controle X Subgrupo 1

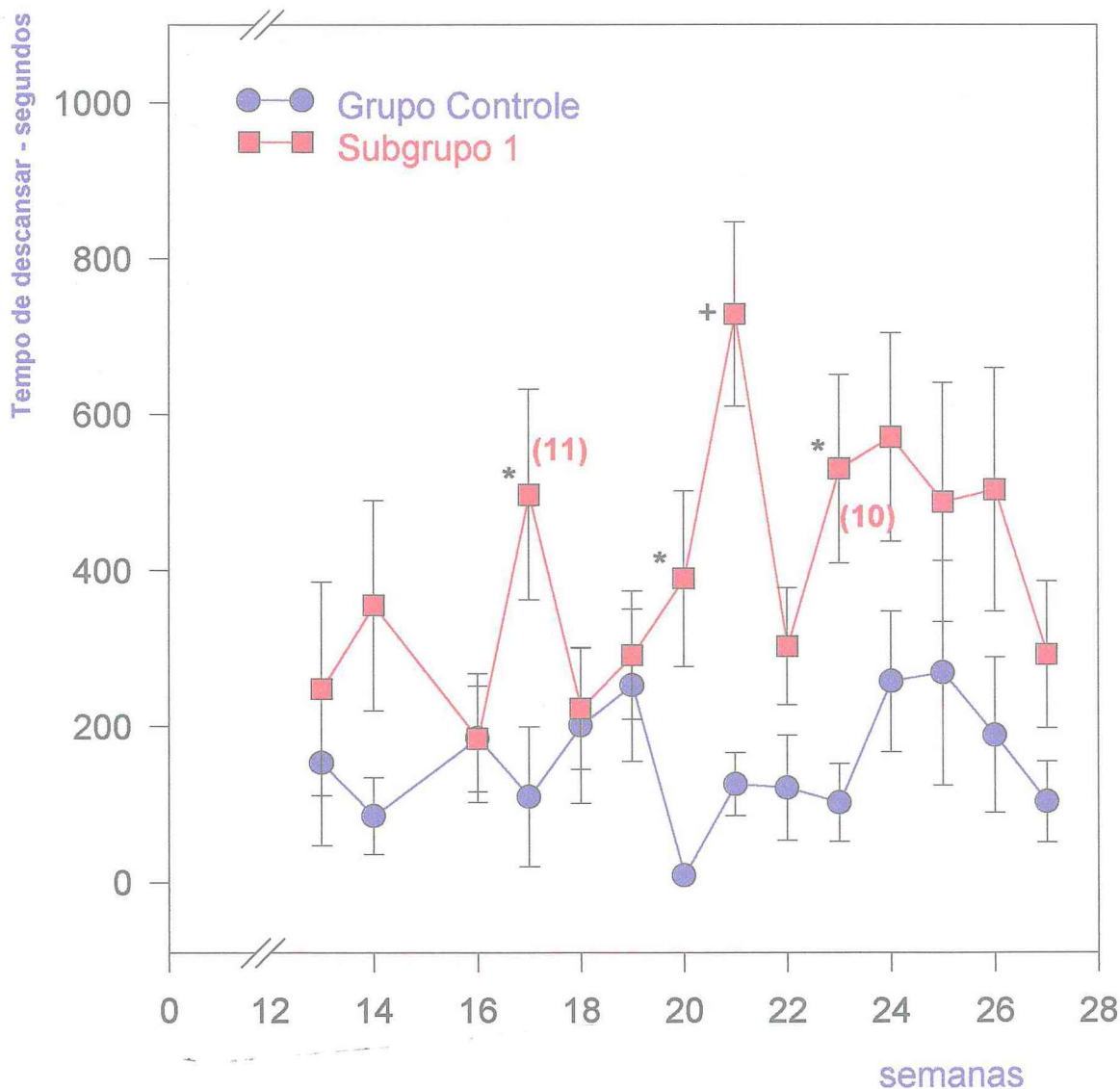


Fig.4.35- Evolução do tempo médio do comportam. de descansar em ratos e ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) e diabéticas (subgrupo 1, n=12) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. + $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Subclínica de Dor em Neuropatia Diabética: Comportamento de Descansar Grupo Controle X Subgrupo 2

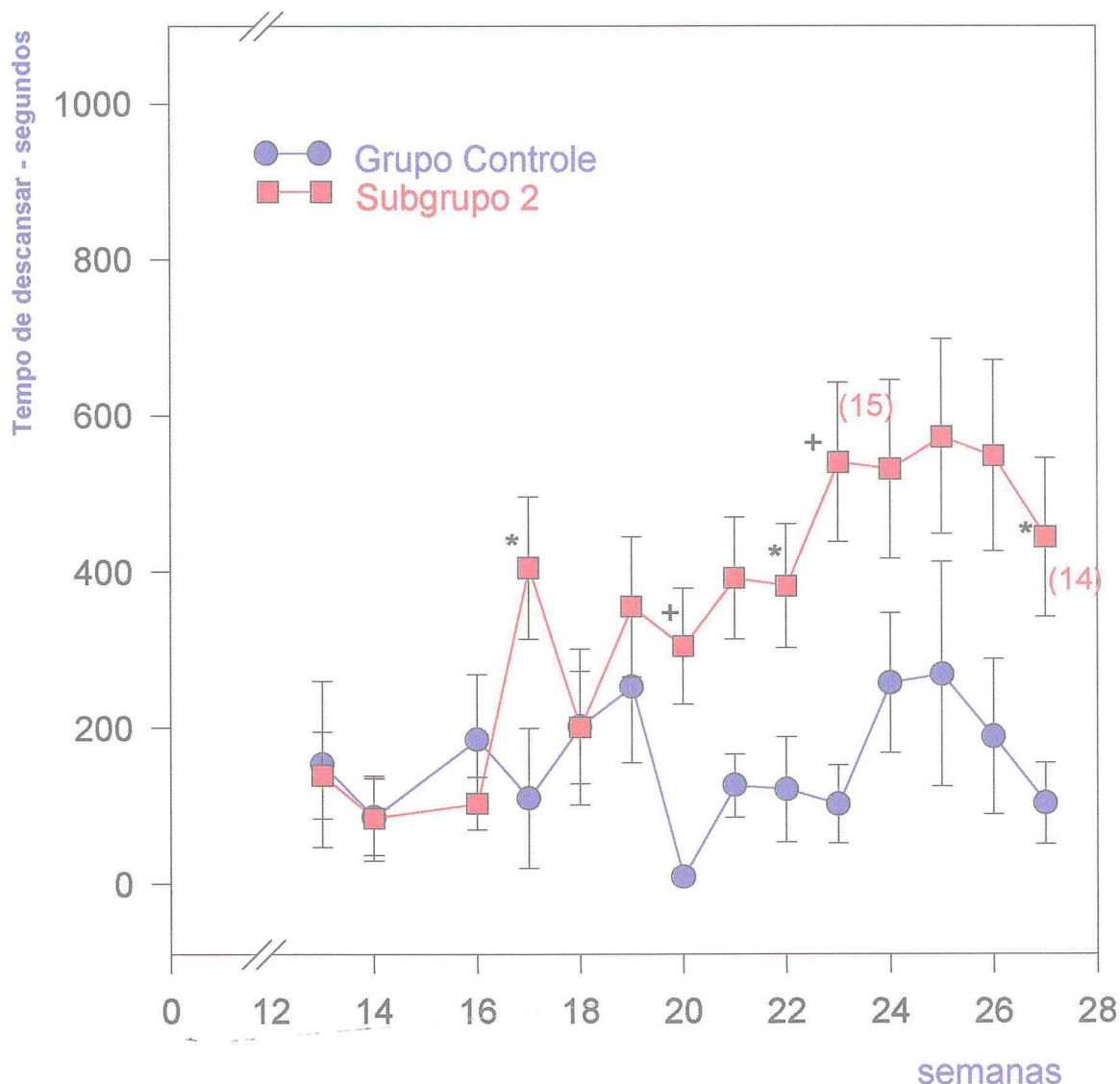


Fig.4.36- Evolução do tempo médio do comportam. de descansar em ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 2, n=16) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. + $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Subclínica de Dor em Neuropatia Diabética: Comportamento de Descansar Grupo Controle X Subgrupo 3

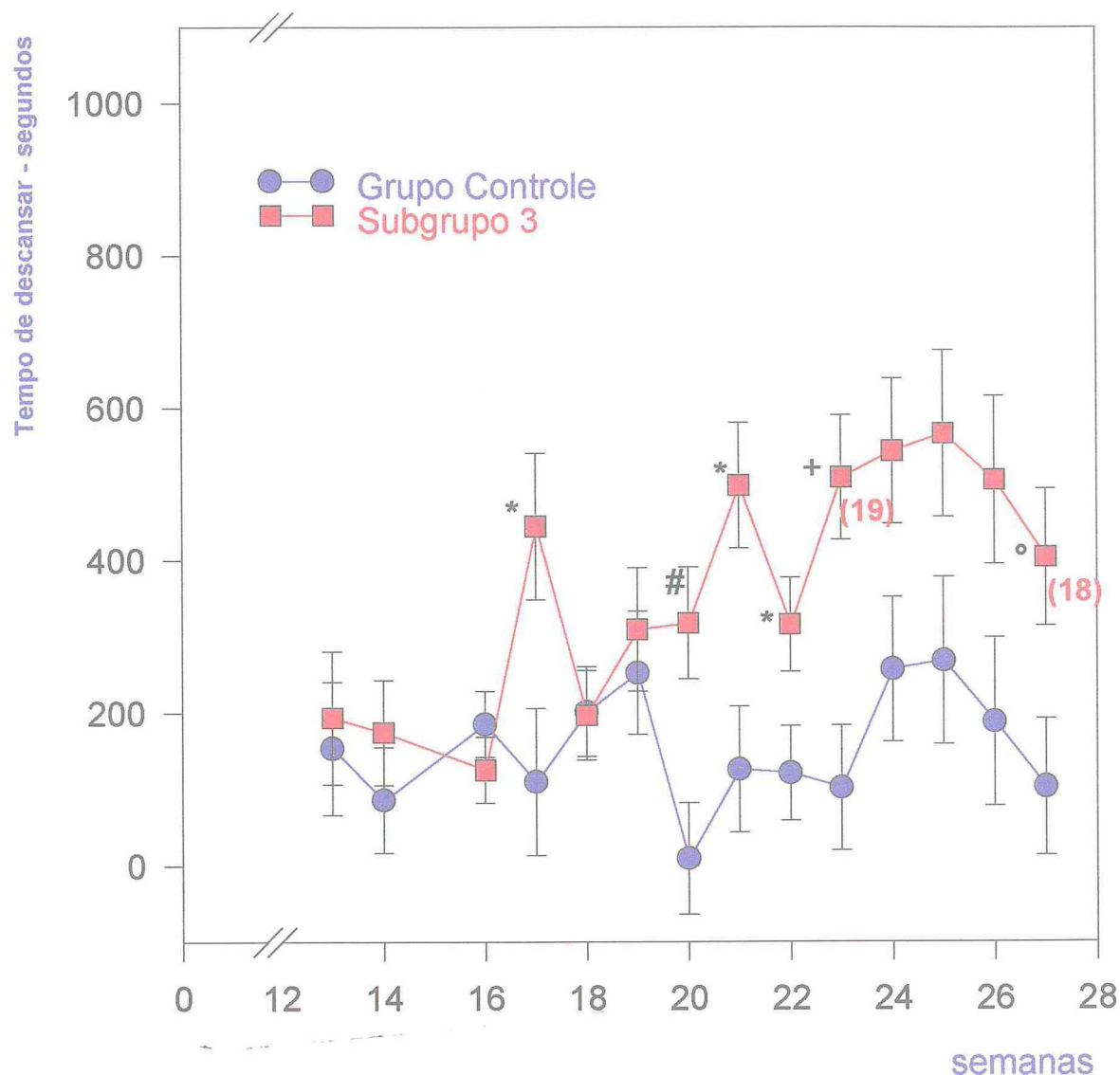


Fig.3.37- Evolução do tempo médio de comportam. de descansar em ratos e ratas não diabéticas (grupo controle, n=8) e diabéticas (subgrupo 3, n=20) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. # $P < 0,0001$; + $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ° $P = 0,0588$. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Subclínica de Dor em Neuropatia Diabética: Comportamento de Alimentar-se Grupo Controle X Subgrupo 1

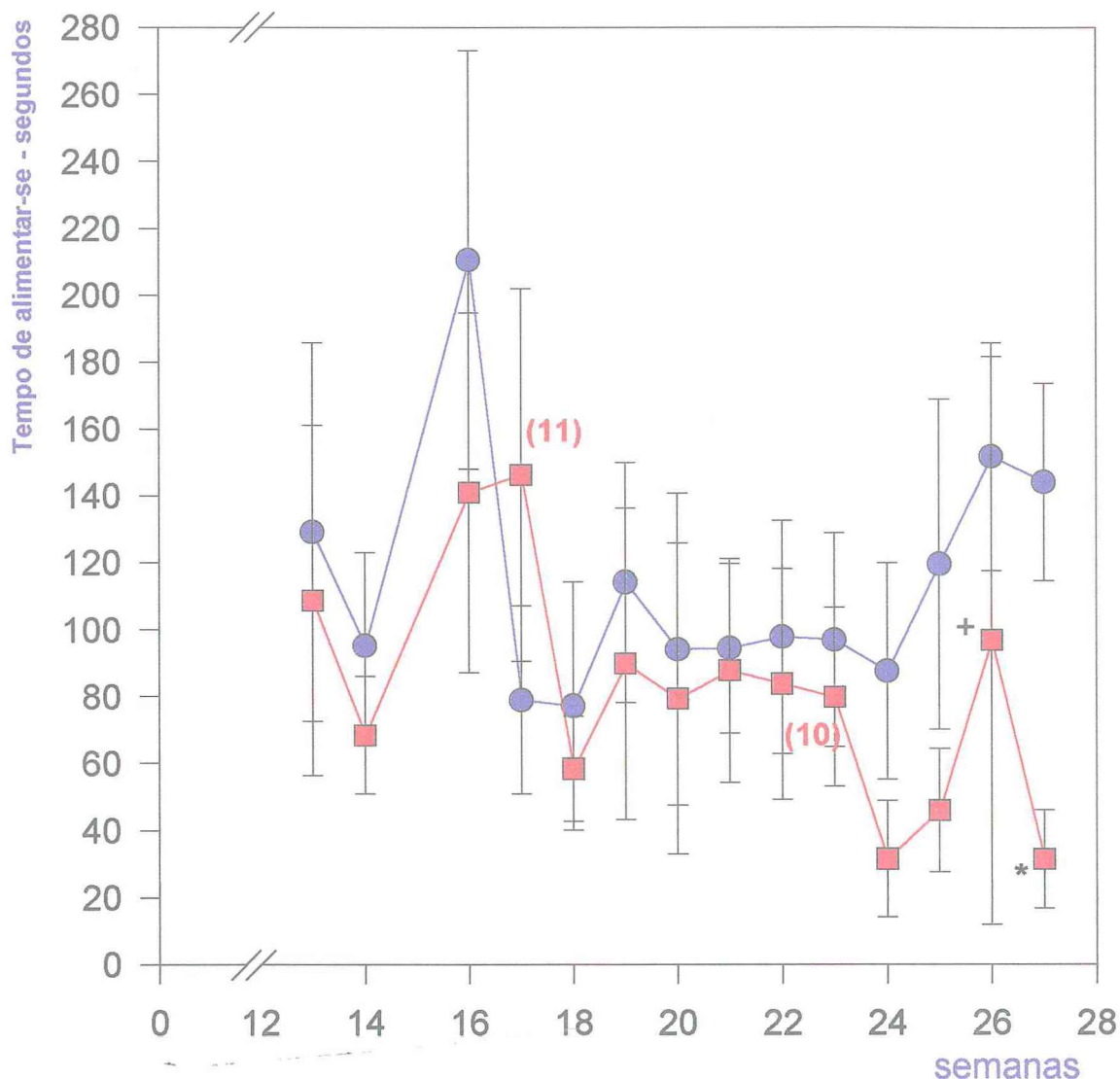


Fig.4.38- Evolução do tempo médio do comportam. de alimentar-se em ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 1, n=12) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média e erro padrão da média.* P < 0,01; + P < 0,05. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Subclínica de Dor em Neuropatia Diabética: Comportamento de Alimentar-se Grupo Controle X Subgrupo 2

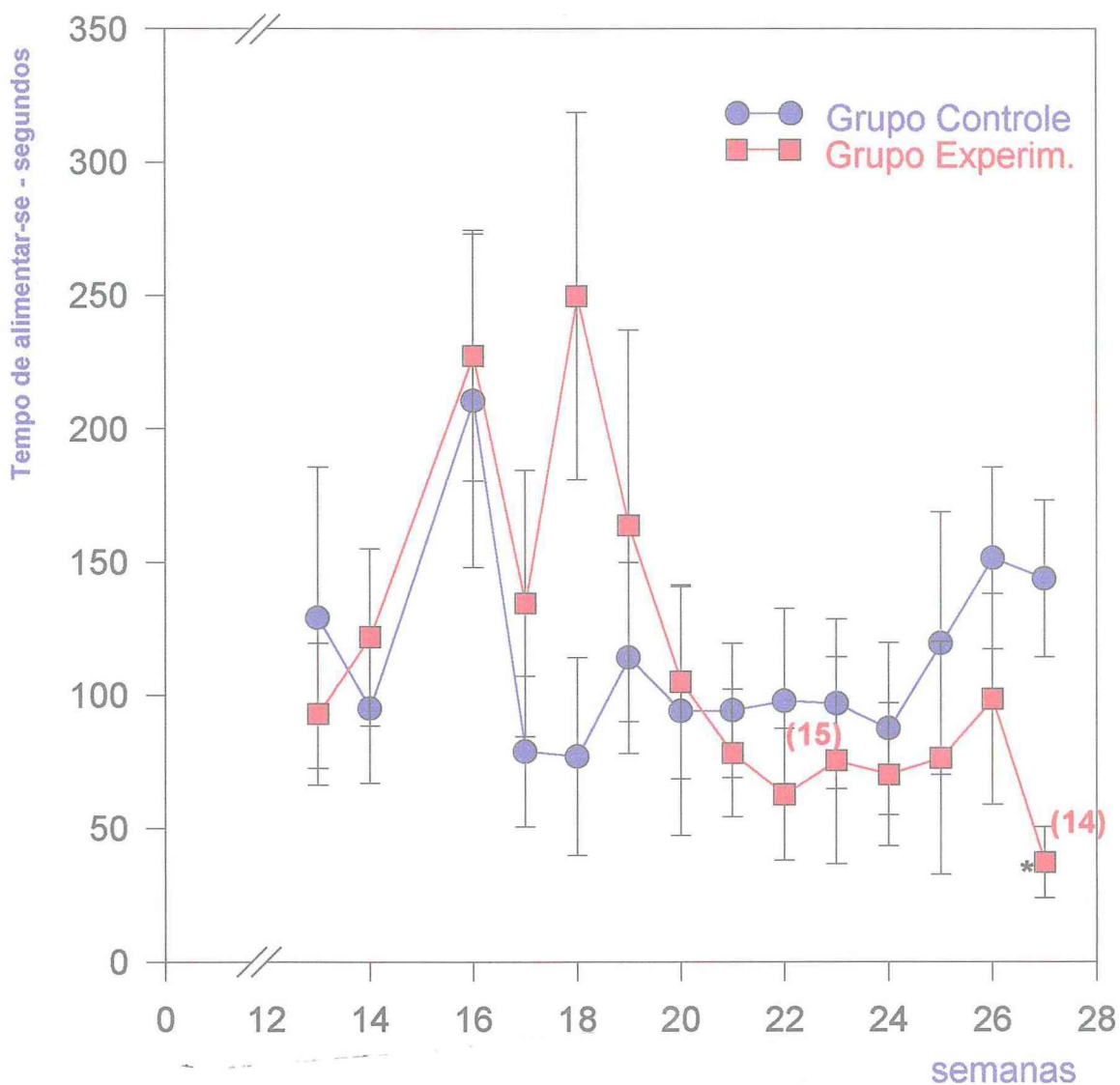


Fig.4.39-Evolução do tempo médio do comportam.de alimentar-se em ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (subgrupo 2, n=16) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. * P < 0,01. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

Evidência Comportamental Subclínica de Dor em Neuropatia Diabética

Grupo Controle X Subgrupo 3

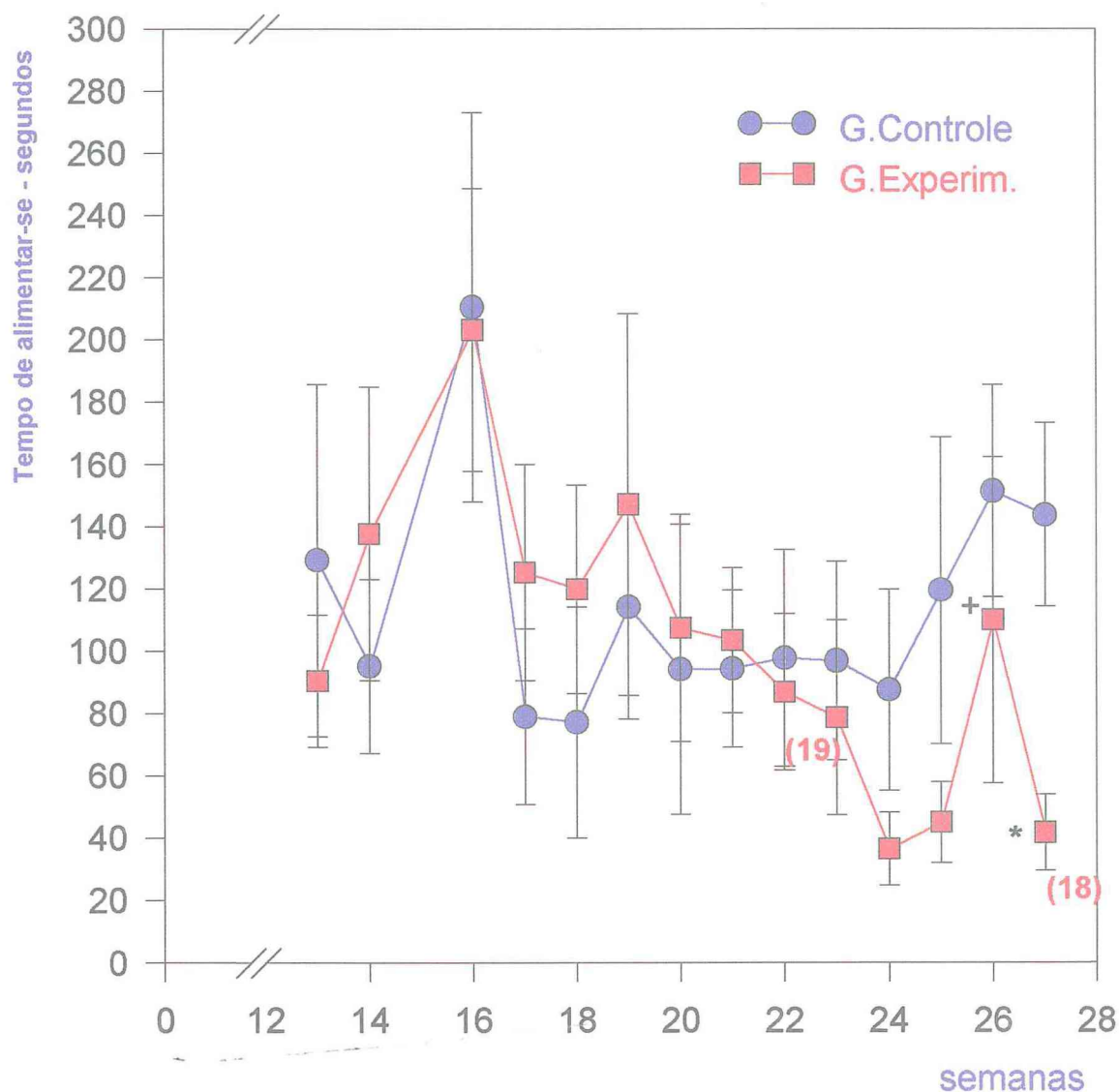


Fig.4.40-Evolução do tempo médio do comportam.de alimentar-se em ratos e ratas não diabéticos (grupo controle, n=8) e diabéticos (Subgrupo 3, n=20) após 12, e até a 27ª semana de diabetes. Os números entre parênteses aparecem quando o "n" muda. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. + P < 0,05 ; * P < 0,01. Teste "t" e Mann-Whitney Rank Sum Test.

4.6 - Teste Farmacológico

4.6.1 - Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Coçar-se

O tempo gasto com o comportamento de coçar-se diminuiu significativamente após o tratamento com morfina na dose de 2 mg/kg, quando comparado aos mesmos animais não tratados com a droga.

Os mesmos animais também apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa do comportamento de coçar-se, após tratamento com uma dose de morfina de 4 mg/kg, quando comparado com uma quantificação prévia deste comportamento sem o uso da droga.

Quando se usou simultaneamente morfina na dose de 2 mg/kg e naloxona na dose de 1 mg/kg não houve diminuição estatisticamente significativa do comportamento de coçar-se em relação aos mesmos animais não tratados com estas drogas (fig. 4.41).

4.6.2 - Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Limpar-se

Morfina na dose de 2 mg/kg diminuiu significativamente o tempo gasto com o comportamento de limpar-se em relação aos mesmos animais não tratados.

Não houve diferença estatística no tempo gasto com este mesmo comportamento entre os animais não tratados e tratados com morfina na dose de 4 mg/kg, embora tenha havido aumento desse tempo.

Morfina e naloxona na dose de 2 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente, aumentaram significativamente o tempo gasto com o comportamento de limpar-se em relação aos animais não tratados (fig.4.42).

Comportamento de Coçar-se - Morfina e Naloxona

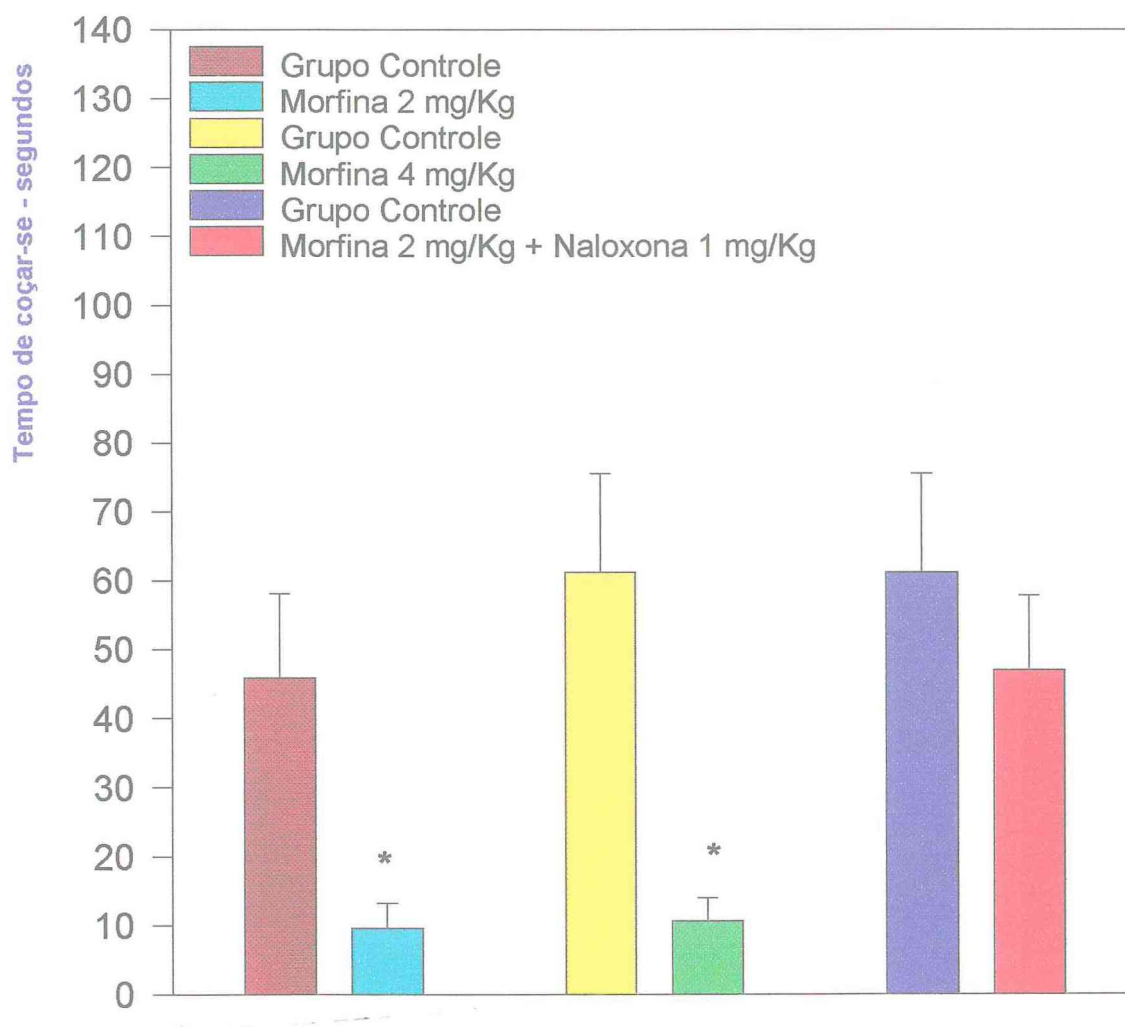


Fig.4.41- Comportamento de coçar-se antes e após morfina 2 e 4 mg/Kg, e morfina 2 mg/Kg + naloxona 1mg/Kg em ratos e ratas diabéticos (n=9) na 27ª semana. Valores correspondem à média, e erro padrão da média. * $P < 0,01$. Wilcoxon Sign Rank Test.

Comportamento de Limpar-se - Morfina e Naloxona

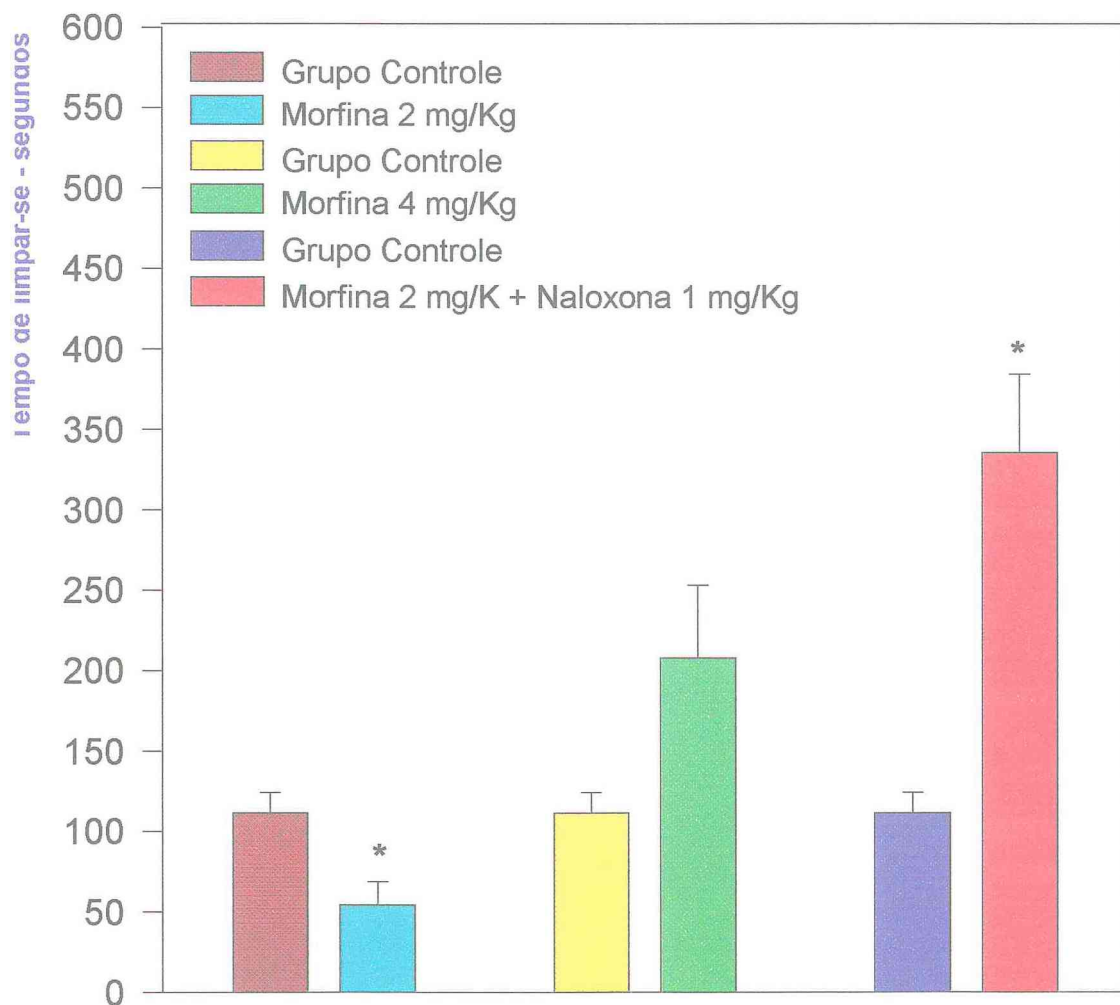


Fig.4.42- Comportamento de limpar-se antes e após morfina 2 e 4mg/Kg, e morfina 2mg/Kg + naloxona 1mg/Kg, em ratos e ratas diabéticos (n=9) na 27^a semana. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. * P<0,01. Wilcoxon Sign Rank Test.

4.6 - Teste Farmacológico

4.6.1 - Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Coçar-se

O tempo gasto com o comportamento de coçar-se diminuiu significativamente após o tratamento com morfina na dose de 2 mg/kg, quando comparado aos mesmos animais não tratados com a droga.

Os mesmos animais também apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa do comportamento de coçar-se, após tratamento com uma dose de morfina de 4 mg/kg, quando comparado com uma quantificação prévia deste comportamento sem o uso da droga.

Quando se usou simultaneamente morfina na dose de 2 mg/kg e naloxona na dose de 1 mg/kg não houve diminuição estatisticamente significativa do comportamento de coçar-se em relação aos mesmos animais não tratados com estas drogas (fig. 4.41).

4.6.2 - Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Limpar-se

Morfina na dose de 2 mg/kg diminuiu significativamente o tempo gasto com o comportamento de limpar-se em relação aos mesmos animais não tratados.

Não houve diferença estatística no tempo gasto com este mesmo comportamento entre os animais não tratados e tratados com morfina na dose de 4 mg/kg, embora tenha havido aumento desse tempo.

Morfina e naloxona na dose de 2 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente, aumentaram significativamente o tempo gasto com o comportamento de limpar-se em relação aos animais não tratados (fig.4.42).

Comportamento de Empinar-se - Morfina e Naloxona

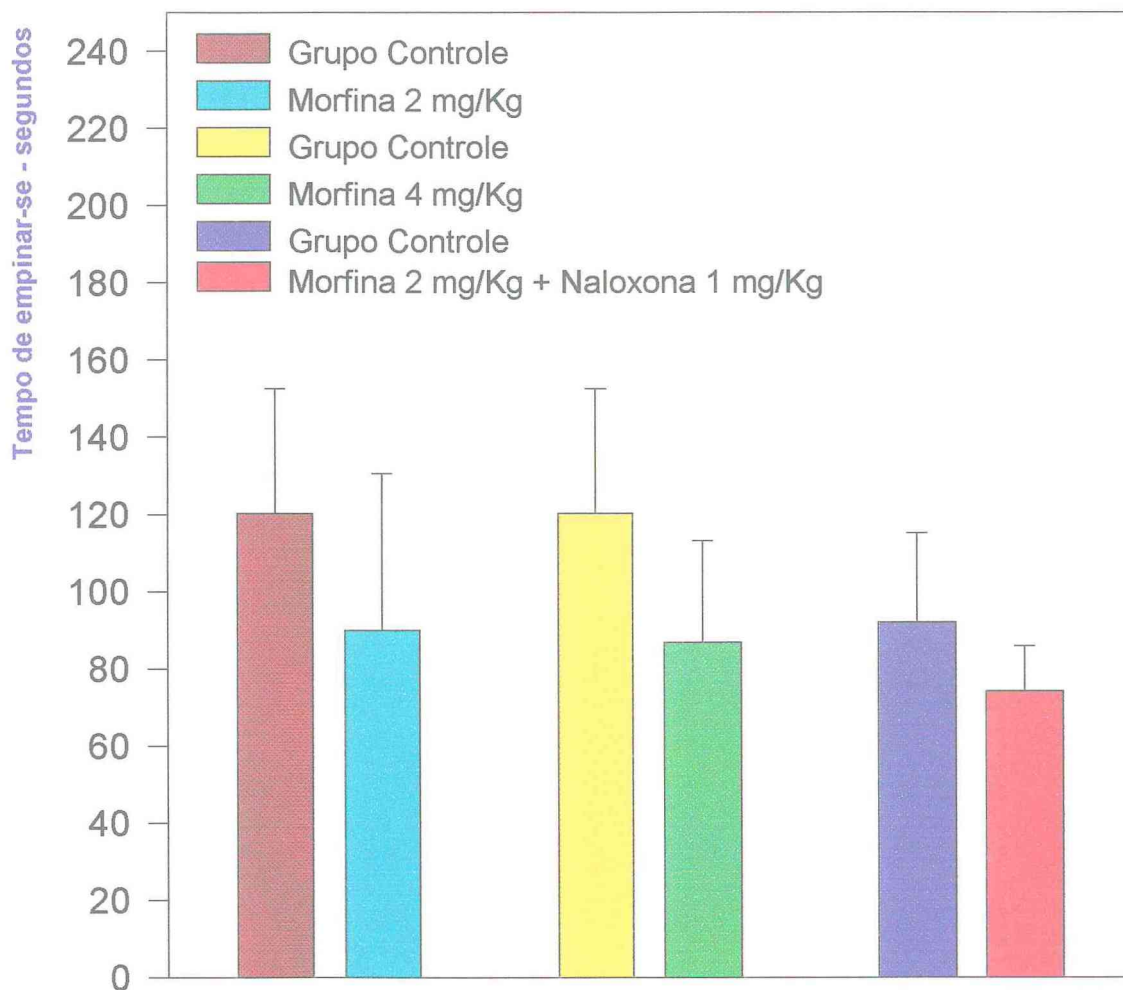


Fig.4.43-Comportamento de empinar-se antes e após morfina 2 e 4mg/Kg, e morfina 2mg/Kg + naloxona 1 mg/Kg, em ratos e ratas diabéticos (n=9) na 27^a semana. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. Não houve significância estatística. Wilcoxon Sign Rank Test.

Comportamento de Farejar - Morfina e Naloxona

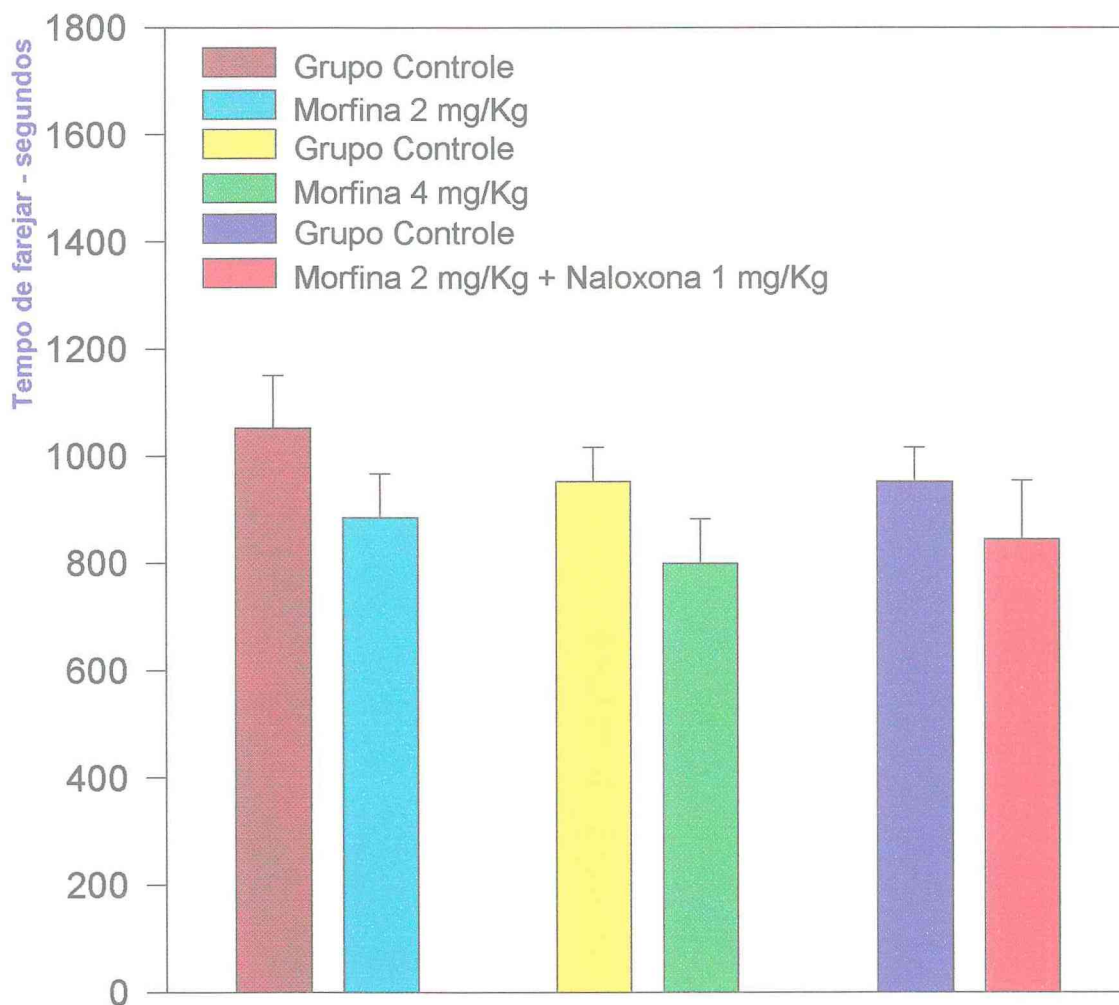


Fig.4.44-Comportamento de farejar antes e após morfina 2 e 4 mg/Kg e morfina 2 mg/Kg + naloxona 1 mg/Kg, em ratos e ratas diabéticos (n=9) na 27^a semana. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. Não houve significância estatística. Wilcoxon Sign Rank Test.

Comportamento de Descansar - Morfina e Naloxona

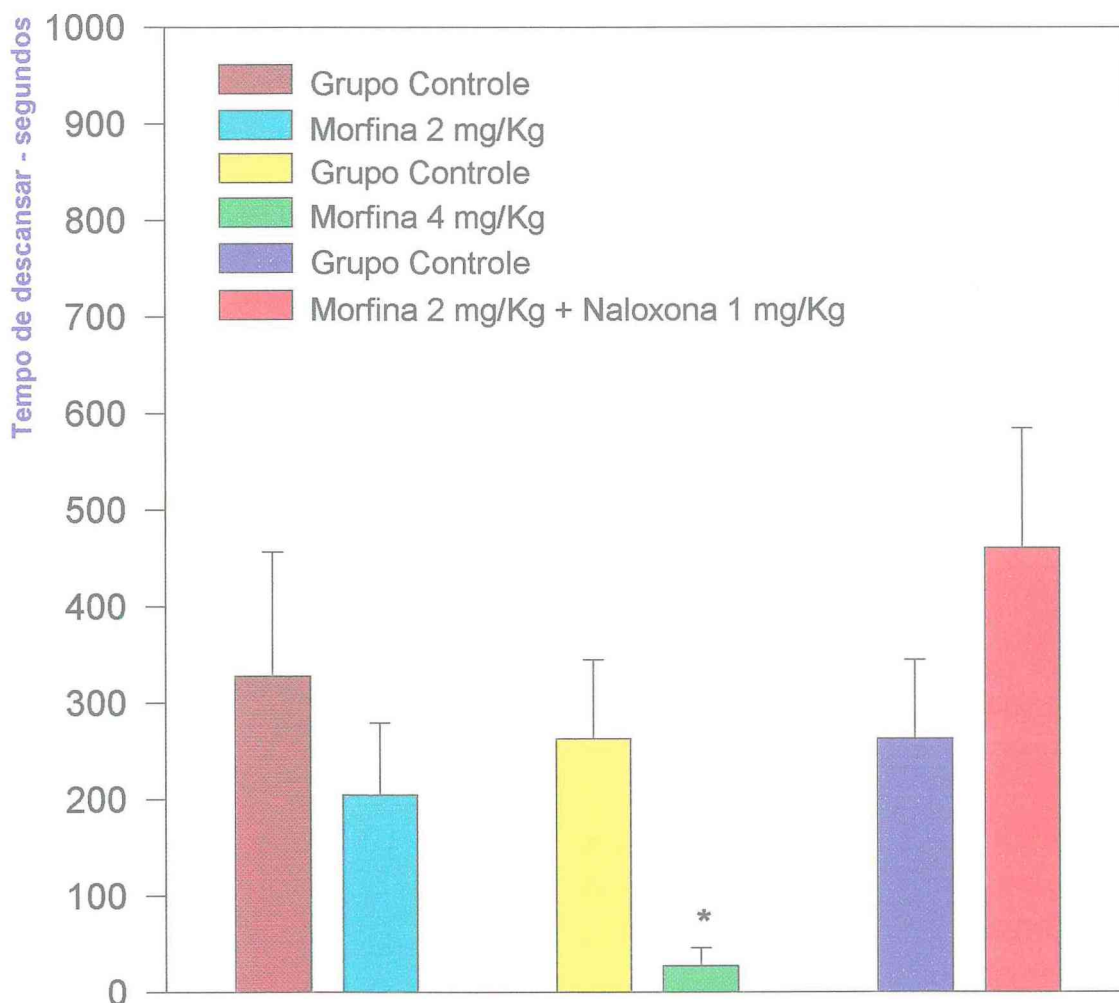


Fig.4.45-Comportamento de descansar antes e após morfina 2 e 4 mg/Kg, e morfina 2mgKg + naloxona 1 mg/Kg, em ratos e ratas diabéticos (n=9) na 27ª semana. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. * P< 0,01. Wilcoxon Sign Rank Test.

4.6.6- *Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Alimentar-se*

Morfina na dose de 2 mg/kg aumentou significativamente o comportamento de alimentar-se dos animais tratados, em relação ao tempo gasto em 'alimentar-se' por estes mesmos animais quando não tratados com esta droga.

Morfina na dose de 4 mg/kg também aumentou bastante o tempo gasto neste comportamento pelos animais tratados, porém esse aumento não é estatisticamente significativo.

O tratamento dos animais com morfina e naloxona na dose de 2 mg/kg, e 1 mg/kg, respectivamente, diminuiu significativamente o tempo gasto em 'alimentar-se' (fig. 4.46).

4.6.7- *Efeito da Morfina, e da Naloxona sobre o Comportamento de Congelar*

Morfina na dose de 2 mg/kg aumentou o tempo gasto no comportamento de congelar dos animais tratados, porém este aumento não é estatisticamente significativo.

Morfina na dose de 4 mg/kg aumentou bastante, e significativamente, o tempo gasto no comportamento de congelar pelos animais tratados em relação a estes mesmos animais quando não tratados.

Morfina e naloxona, na dose de 2 mg/kg e 1 mg/kg respectivamente, não alteraram significativamente o comportamento de congelar dos animais tratados com estas drogas, em relação a estes mesmos animais quando não tratados (fig. 4.47).

4.7 - Resumo

Em resumo, nos animais diabéticos os parâmetros do índice funcional ciático revelaram comprometimento motor distal (fig.4.7, 4.8, 4.11, e 4.12); os resultados dos testes térmicos revelaram que existiam animais com hiperalgesia (fig.4.18) e animais com hipoalgesia (fig.4.19); a análise comportamental

Comportamento de Alimentar-se - Morfina e Naloxona

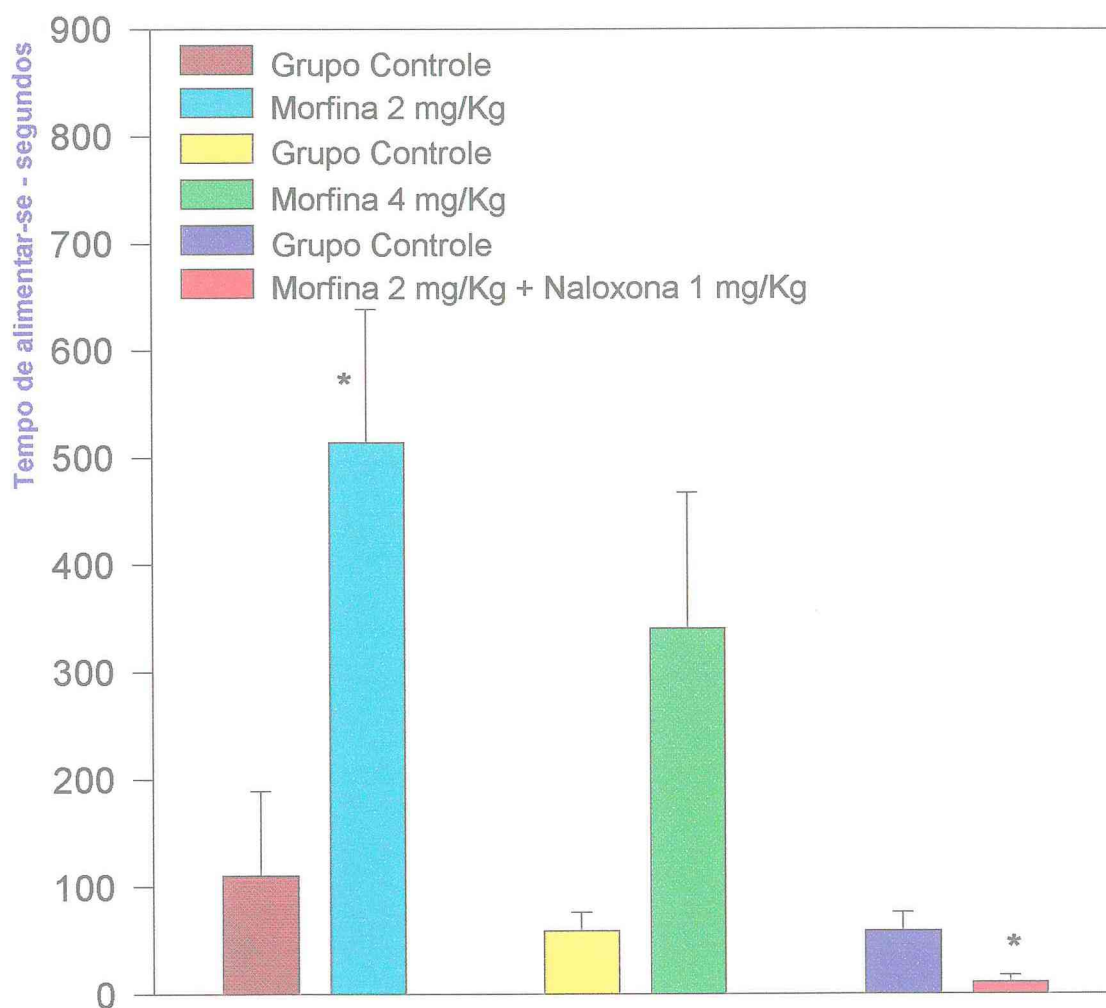


Fig. 4.46- Comportamento de alimentar-se antes e após morfina 2 e 4 mg/Kg, e morfina 2 mg/Kg + naloxona 1 mg/Kg, em ratos e ratas diabéticos (n=9) na 27ª semana. Os valores correspondem à média e erro padrão da média. * $P < 0,01$. Wilcoxon Sign Rank Test.

Comportamento de Congelar - Morfina e Naloxona

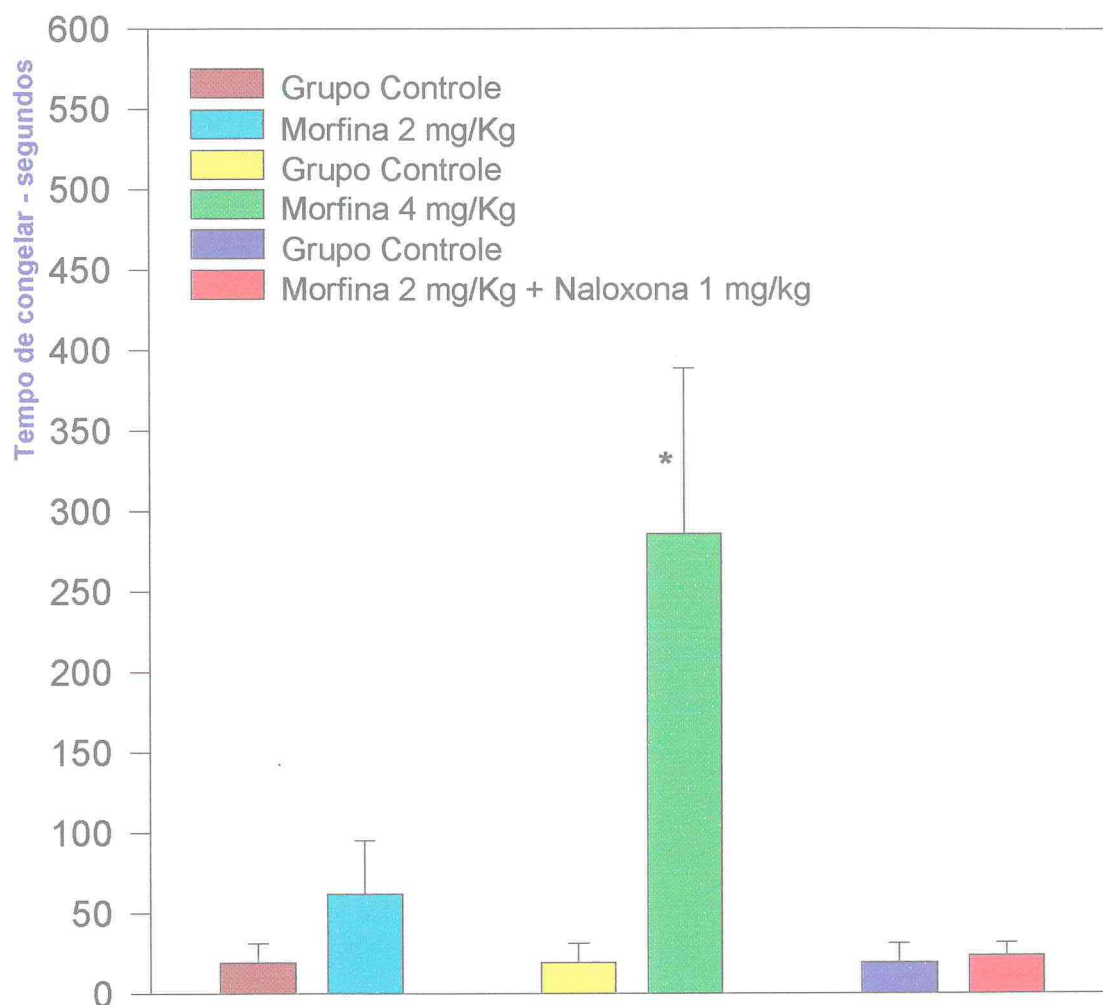


Fig.4.47- Comportamento de congelar antes e após morfina 2 e 4 mg/Kg, e morfina 2 mg/Kg + naloxona 1 mg/Kg, em ratos e ratas diabéticas (n=9) na 27^a semana. Os valores correspondem à média e erro padrão da média.* P< 0,05. Wilcoxon Sign Rank Test.

revelou um aumento dos comportamentos de coçar-se (fig.4.20 a 4.24) e descansar (fig.4.35 a 4.37), e uma diminuição dos comportamentos motores (fig.4.29 a 4.34), de alimentar-se (fig.4.38 a 4.40), e limpar-se (fig.4.25 a 4.28); os testes farmacológicos com morfina mostraram um inibição do comportamento de coçar-se, com recíproco aumento das atividades motora e alimentar, e diminuição do repouso; e a naloxona antagonizou os efeitos produzidos pela morfina (figs.4.41 a 4.47).

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Indução do Diabetes Mellitus

A estreptozotocina na dose de 75 mg/Kg mostrou certa toxicidade, a julgar pelos animais mortos no segundo dia após a injeção da droga. Não encontramos na literatura, referências da sua toxicidade na indução do diabetes experimental quando são utilizadas doses que variam de 50 a 75 mg/Kg. Thomas & Tomlinson (1993) afirmam que nas doses diabetogênicas a estreptozotocina não é neurotóxica. A estreptozotocina também é menos tóxica, e mais específica em relação à ação sobre as células beta do pâncreas, do que a aloxana (Bitar et al, 1986). Lackovic & Salkovic (1990) relataram um aumento nos níveis cerebrais de serotonina, noradrenalina, e dopamina, após injeção intraventricular de estreptozotocina em doses não diabetogênicas durante um estudo de longa duração. Estes pesquisadores não conseguiram explicar e nem ao menos fazer hipóteses em relação ao achado.

O seu efeito em destruir as células beta das ilhotas de Langerhans não parece ser igual para todos os animais, visto que alguns animais não desenvolveram diabetes e outros apresentaram por duas vezes consecutivas nível hiperglicêmico abaixo de 230 mg %, valor previamente escolhido para o animal poder fazer parte do grupo experimental. Entretanto, a estreptozotocina tem boa eficácia em induzir diabetes mellitus, pois excetuando-se os animais mortos, a maioria dos restantes desenvolveu diabetes. Outra vantagem da estreptozotocina é o fácil manuseio e as várias opções de vias para a administração da droga: intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, ou intravenosa.

Uma vez induzido o diabetes, os níveis hiperglicêmicos permaneceram altos por 37 semanas. Isso permitiu a observação do modelo por longo tempo, o que é muito interessante, tendo em vista que o diabetes mellitus é uma doença crônica no homem.

5.2 - Alterações Clínicas

As nossas observações de maior docilidade por parte dos animais diabéticos também foram relatadas por Courteix et al (1993) que não sugeriram nenhuma hipótese para explicar tal fato. Achamos que essa maior cooperação por parte dos animais diabéticos pode ser fruto da lassidão causada pela doença. Além disso, pode ser um comportamento decorrente das alterações bioquímicas cerebrais encontradas em ratos diabéticos. Chu et al (1986) encontraram níveis diminuídos de serotonina no hipotálamo e no tronco cerebral de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Esses mesmos animais apresentavam baixo conteúdo de catecolaminas no hipotálamo e alto conteúdo, especialmente de dopamina, no corpo estriado. Por outro lado, Bitar et al (1986) encontraram uma elevação nos níveis de noradrenalina no hipotálamo e tronco cerebral, contrastando com ausência de alterações significativas dos níveis de dopamina e serotonina nessas mesmas regiões.

Os animais diabéticos apresentaram alterações clínicas similares às humanas, ou seja, poliúria, catarata progressiva e variável de animal para animal, e aumento ocasional e variável do volume abdominal. Esta última alteração pode ser devida à neuropatia autonômica correspondente à gastroparesia diabética vista no homem. Neste estudo não correlacionamos dor com aumento do volume abdominal, porém Lanting et al (1989) concluíram que disfunção autonômica e neuropatia diabética dolorosa é uma associação freqüente.

Achamos que a mudança de coloração da pelagem dos animais diabéticos para um tom mais amarelado deveu-se à diminuição relativa na quantidade do comportamento de limpar-se.

Os animais diabéticos também mostraram-se mais sensíveis à doenças. Isso pode ser decorrente das condições gerais de acomodação desses animais no nosso biotério, e / ou do estado deprimido do sistema imunológico causado pela doença crônica. Os abscessos intrabdominais encontrados em alguns ratos diabéticos podem ter sido causados por bactérias inoculadas durante a injeção da estreptozotocina, apesar de cuidadosa técnica de anti-sepsia utilizada. Não sabemos explicar a razão da síndrome atáxica apresentada por um animal diabético. Afastamos a possibilidade de que tenha sido causada por intoxicação pela estreptozotocina, pois a ataxia desenvolveu-se cerca de trinta

dias após a injeção da droga e permaneceu até a morte do animal, o qual tinha na época 40 semanas de diabetes. O exame do encéfalo desse animal à microscopia óptica revelou calcificações cerebelares inespecíficas.

As alterações encontradas na evolução do peso concordam com as observações de Wuarin-Bierman et al (1987), Lee & McCarty (1992), e Courteix et al (1993), que encontraram diferenças estatísticas em relação aos controles a partir de uma semana, 72 horas, e duas semanas respectivamente. Essa diminuição do peso pode decorrer da presença de uma doença crônica, como também pode ter sido causada por diminuição da ingesta alimentar devido à dor crônica.

O fato de não termos observado vocalização espontânea, pode significar que os animais não estão submetidos à dor intensa. Isso faz com que este modelo siga um dos critérios sugeridos pela IASP: “os animais devem ser submetidos a um nível de dor mínimo que satisfaça os objetivos do experimento” (Zimmermann, 1983).

Também não houve sinais de autotomia nos ratos diabéticos. Esse comportamento é relatado em alguns modelos de dor neuropática (Santos, 1995), e é controverso se significa manifestação de dor. Santos (1995) não encontrou correlação entre autotomia e maior presença de alodínia, ou do comportamento de coçar-se, fenômenos relacionados com dor.

É importante salientar que os achados acima ocorreram sem predileção de sexo, pois animais de ambos os sexos apresentaram alterações com intensidade e características similares.

5.3 - Evidências de Neuropatia Motora

Os ratos diabéticos apresentaram de forma visível, atrofia discreta a moderada que ocorreu principalmente nas patas posteriores. Este fato também foi descrito por Courteix et al (1993). Tal atrofia foi variável de animal para animal, havendo inclusive três animais diabéticos que não a apresentaram. Isso denota a variabilidade individual na síndrome desenvolvida neste modelo. Fato similar ocorre nas manifestações do diabetes no homem (Bays & Pfeifer, 1988; Watkins, 1990; Thomas & Tomlinson, 1993).

Em alguns animais a atrofia foi mais importante nas porções proximais, em outros, que representaram a maioria, a atrofia muscular foi mais marcante nas partes distais das patas posteriores. Seria interessante que em experimentos futuros se estudasse separadamente os animais com atrofia de predominância proximal e os que a tivessem com predominância distal. Pode ser que, como acontece no diabetes mellitus humano, essa variação tenha diferentes manifestações clínicas dolorosas.

A utilização dos parâmetros do Índice Funcional Ciático, desenvolvido por Medinaceli et al (1982), confirma as observações de atrofia muscular. Esse índice foi desenvolvido para avaliar comparativamente as condições de um nervo ciático sã com o nervo doente da pata contralateral. Como no diabetes o comprometimento é bilateral, não seria possível utilizar as medidas obtidas nos animais diabéticos para se chegar ao índice. Por isso utilizamos de forma isolada, as medidas que lhe dão origem.

A distância ortogonal entre as patas posteriores mede o alcance das passadas das patas posteriores do animal durante a marcha. A nosso ver, a força responsável por essas ações provém da musculatura da bacia e coxas, isto é, músculos proximais. Os resultados mostram que embora haja uma diferença visível graficamente, não há significância estatística.

O comprimento da impressão plantar é pequeno em animais normais que, como o rato, utilizam o ante-pé como apoio durante a marcha. A força para essa ação é proveniente da musculatura posterior das patas traseiras, portanto, da musculatura mais proximal. Não há diferença estatística entre os animais diabéticos e os controles em relação a essa medida, embora como na medida anterior, a diferença seja visível graficamente, particularmente nas ratas.

As duas últimas medidas, distância entre o 1° e 5°, e entre o 2° e o 4° pododáctilos, refletem a ação dos músculos mais distais inervados por ramos peroneais (Medinaceli et al, 1982). Essas duas medidas estão alteradas nos ratos diabéticos, alcançando significância estatística ($P < 0,05$). Dessa forma comprova-se que nesse modelo existe comprometimento de músculos distais. Tal comprometimento é provavelmente secundário à lesão de fibras nervosas motoras causada pelo diabetes, como as alterações descritas por Narama & Kino (1989) à microscopia óptica e eletrônica nos nervos motores de ratos

WBN/Kob, uma variedade da espécie que inicia espontaneamente diabetes mellitus aos 12 meses de idade.

Os animais diabéticos não ficaram impossibilitados de subir os três degraus da escada que havia durante as observações, apesar das alterações motoras acima descritas. As alterações motoras secundárias à neuropatia diabética desse modelo, portanto, são discretas a moderadas. Isso tem várias vantagens: 1- permite uma observação dos comportamentos espontâneos, pois o animal não fica incapacitado para a vida diária; 2- permite quantificação de dor pelas respostas motoras evocadas; 3- permite ao animal cuidar de si próprio, diminuindo de certa forma a morbidade da doença e aumentando a sobrevivência.

Com o objetivo de afastar a influência das diferenças constitucionais entre macho e fêmea nos resultados da avaliação da função motora, fizemos as medições dos parâmetros acima separadamente em ratos e ratas. Não existiram diferenças substanciais entre os resultados apresentados por machos e fêmeas. Constata-se assim que ambos os sexos são afetados igualmente.

5.4 - Evidências de Neuropatia Sensitiva

Os animais diabéticos não apresentaram dor no teste térmico a 40° C que é um estímulo não nocivo. Esse resultado não exclui a possibilidade de que o rato diabético apresente alodínia, pois não utilizamos outros estímulos não nocivos como teste. Courteix et al (1993) também não encontraram manifestação de alodínia no teste térmico da retirada da cauda a 40° C, em ratos com diabetes de quatro semanas, mas constataram alodínia à temperatura de 42° C. Esses pesquisadores também demonstraram alodínia com estímulo térmico (frio) e mecânico. Seria interessante, em experimentos futuros, utilizar 42° C como estímulo não nocivo e/ou testar um estímulo não nocivo de origem mecânica.

À demonstração de hiperalgesia em ratos diabéticos relatada em vários trabalhos (Wuarin-Bierman, 1987; Lee & McCarty, 1990; Ahlgren & Levine, 1993; Nakamura-Craig & Follenfant, 1995), junta-se a constatação de hipoalgesia encontrada por alguns autores (Chu et al, 1986). Já Kamei et al (1991) relataram em camundongos com duas e oito semanas de diabetes, hiperalgesia ao estímulo mecânico nocivo, mas não ao térmico. Ahamos que

essa discrepância de resultados da literatura, deve-se em parte à forma como essa manifestação de dor é pesquisada.

Em nosso estudo conseguimos visualizar claramente dois tipos de respostas dos animais diabéticos ao estímulo nocivo de 46° C. Um subgrupo de animais apresentou latência de retirada da pata menor que oito segundos, evidenciando desse modo hiperalgesia em relação aos animais normais. O outro subgrupo apresentou um tempo de latência maior ou igual a oito segundos, denotando hipoalgesia relativamente aos animais normais. Baseamos no “cut off” de oito segundos por que esse foi o tempo médio de retirada da pata observado nos animais normais deste estudo e de outros realizados no nosso laboratório.

É possível que a controvérsia existente na literatura, em relação à hiperalgesia de ratos diabéticos, seja devida à não separação dos animais nesses dois subgrupos antes de realizar os testes álgicos.

Courteix et al (1993) aconselham separar os ratos “respondedores” (animais que apresentam variação maior que 10 % nos escores dos testes álgicos em relação aos escores desses mesmos testes realizados antes do diabetes) dos “não respondedores”. Entretanto, não se pode afastar a possibilidade desses animais “não respondedores” sentirem dor somente pelo fato de eles não apresentam um comportamento evocado de dor. Tais animais podem estar apresentando o fenômeno de anestesia dolorosa, visto também em humanos (Ziegler et al, 1988), quando perde-se a sensação tátil ou dolorosa mas existe a dor espontânea. Isso pode fazer com que alguns animais não reajam a uma temperatura de 46° C, ou a outro estímulo nocivo, induzindo os pesquisadores a resultados heterogêneos.

Nos nossos animais normais, nota-se uma tendência progressiva com a idade do animal, de diminuição do limiar de sensibilidade ao estímulo térmico a 46° C. Isso pode ser causado por dois fatores: 1- o amadurecimento do sistema nervoso permitindo detecção mais precoce do estímulo nocivo, e/ou 2- o fator aprendizagem, conseqüente às repetições do teste ao longo de várias semanas. Kim et al (1995) relataram que a alodínia é manifestada mais fortemente em ratos velhos num modelo animal de neuropatia periférica, porém não fizeram comentários sobre hiperalgesia.

5.5 - Evidências Comportamentais de Dor.

5.5.1 - O Comportamento de Coçar-se

A avaliação motora e os testes térmicos foram realizados após a oitava semana, pois já há na literatura dados suficientes sobre a evolução desses parâmetros até a oitava semana.

Entretanto, o estudo do comportamento de coçar-se foi acompanhado desde a segunda semana de diabetes por ser nossa intenção cronometrar o seu início, visto que não há estudos anteriores sobre a evolução desse comportamento no modelo do rato diabético.

Fizemos um estudo piloto com ratas diabéticas e vimos que o tempo gasto com o comportamento de coçar-se já está aumentado na segunda semana de diabetes, porém só atinge valores estatisticamente significativos na 12^a semana de doença. A partir dos dados desse estudo piloto realizamos as observações comportamentais após a 12^a semana de diabetes.

Além de analisar os dados comportamentais separadamente nos dois subgrupo criados durante o teste térmico a 46°C, criamos mais um subgrupo (subgrupo 3) ao analisar os dados do comportamento de coçar-se. Observamos que alguns animais (20 animais, dos 28 do grupo experimental, portanto a maioria dos animais) apresentavam esse comportamento persistentemente elevado, enquanto outros não.

O subgrupo 1 (animais com tempo de latência ao teste térmico menor que 8 segundos) formado por 12 animais (43% do grupo experimental) apresentou aumento do comportamento de coçar-se estatisticamente significativo ($P < 0,05$) durante quase toda a duração do estudo. Isto se correlaciona com os valores do teste térmico sugestivos de hiperalgesia.

O subgrupo 2 (animais com tempo de latência ao teste térmico maior ou igual a 8 segundos) formado por 16 animais (57% do grupo experimental) também apresentou aumento do comportamento de coçar-se, que é visível graficamente, porém os resultados não são tão significativos como o subgrupo 1. Existe, portanto, indício de comportamento sugestivo de dor nesse

subgrupo, apesar da hipoalgesia evidenciada ao teste térmico, e que provavelmente está relacionada à neuropatia sensitiva.

O subgrupo 3 (animais com tempo de comportamento de coçar-se elevado em mais de 10 segundos, em mais de quatro ocasiões consecutivas ou não) formado por 20 animais (71,5% do grupo experimental) mostrou aumento desse comportamento que foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$) em relação ao controle. Esse resultado confirma o significado nociceptivo do comportamento de coçar-se.

O aumento desse comportamento em todo o grupo experimental também pode ser visível graficamente, mas apresenta apenas alguns valores com diferença estatística em relação ao grupo controle.

Esses resultados podem ser explicados da seguinte forma. Poderia haver animais do subgrupo 2 que não tinham dor espontânea, diminuindo assim a significância do comportamento de coçar-se nesse subgrupo e no total do grupo experimental.

Yoon et al (1996) propõem separar a dor neuropática num componente de dor espontânea e de dor evocada tanto nas pesquisas básicas quanto nos estudos clínicos. Courteix et al (1993) sugeriram selecionar previamente os ratos “respondedores”. Se selecionássemos os animais apenas pelo fator hiperalgesia, estaríamos deixando de incluir nesse grupo, animais que sentem dor espontânea e apresentam hipoalgesia. Se não selecionássemos os animais por nenhum critério, teríamos um grupo experimental com uns animais apresentando hiperalgesia, outros apresentando hipoalgesia sem dor espontânea, e ainda outros apresentando hipoalgesia e dor espontânea. Acreditamos que esse fato é um dos fatores responsáveis pelos resultados contraditórios encontrados na literatura.

No homem tal variabilidade na expressão clínica da neuropatia diabética também é encontrado (Bays & Pfeifer, 1988; Atkins, 1990; Thomas & Tomlinson, 1993; Benbow et al, 1994; Baron & Maier, 1995).

O aumento do comportamento de coçar-se foi persistente por 27 semanas, quando então encerramos as observações.

O comportamento de coçar-se presente nos ratos diabéticos não é tão intenso como o descrito nos ratos artríticos (De Castro Costa, 1979; De Castro Costa, 1981; De Castro Costa, 1986; De Castro Costa, 1987; Barbosa, 1990) ou nos ratos com mononeuropatia ciática compressiva (Kupers et al, 1992; Moura, 1994; Santos, 1995), porém tem duração e magnitude o suficiente para ser distinguido e quantificado como alteração comportamental.

5.5.2 - *O Comportamento de Limpar-se*

Esse comportamento está aumentado no modelo de dor do animal artrítico (De Castro Costa, 1986), porém, embora aumentado, não se apresentou estatisticamente diferente entre ratos normais e ratos com compressão ciática (Kupers et al, 1992; Moura, 1994).

Em geral os ratos diabéticos apresentaram pequena diferença em relação ao comportamento de limpar-se, quando comparados ao grupo controle. Não existiram diferenças importantes entre os subgrupos. Houve uma tendência à redução desse comportamento de forma não estatisticamente significativa em relação aos animais não diabéticos.

Courteix et al (1993) relataram diminuição do tempo de lambar em ratos diabéticos que sofreram injeção de formalina na pata, em relação aos animais não diabéticos. Os mesmos pesquisadores sugerem que tal fato poderia ser explicado pelo aparecimento de alodínia, fazendo os animais diabéticos evitarem o estímulo doloroso decorrente da ação de limpar-se.

A observação da mudança na cor da pelagem dos animais diabéticos, tornando-os com uma aparência mais “suja”, poderia ser decorrente da redução do comportamento de limpar-se, como já foi referido.

5.5.3 - *Os Comportamentos Motores*

Houve uma diminuição do comportamento de empinar-se em todos os subgrupos. O subgrupo 2 apresentou valores mais significativos que o subgrupos 1 e 3. Essa diminuição relativa mais intensa no subgrupo 2 é coerente com as alterações encontradas no teste térmico. Os animais desse subgrupo também devem ter comprometimento importante de fibras de grande diâmetro, (daí terem apresentado anestesia dolorosa) atingindo também fibras motoras.

Os resultados em relação ao comportamento de farejar também mostraram diminuição em relação aos controles. Os achados são semelhantes para os três subgrupos, entretanto nota-se uma diferença em relação ao comportamento de empinar-se. Nos animais diabéticos a diminuição do comportamento de farejar aparece incontestavelmente após a 19ª semana de diabetes, enquanto no comportamento de empinar-se essa diminuição é notada desde a 13ª semana. Uma explicação para esse fato seria que o comportamento de empinar-se exige mais força e destreza por parte do animal, sendo o primeiro a ser comprometido em consequência do acometimento de fibras motoras.

Os comportamentos motores de empinar-se e farejar são considerados atividades exploratórias e geralmente são apresentados nos primeiros 15 a 20 minutos após o animal ser colocado no observatório. A diminuição da atividade exploratória poderia ser um indicativo indireto de dor crônica, pois o animal perderia o interesse na exploração de um novo ambiente devido ao estado persistente de dor. Essa hipótese é muito difícil de ser provada, no entanto, alguns pacientes com neuropatia diabética dolorosa apresentam afastamento social e das atividades profissionais, bem como depressão, em consequência do sofrimento intenso causado pela dor crônica.

Além da hipótese acima, as evidências motoras se coadunam com os déficits motores decorrentes da neuropatia diabética, estando portanto, a atividade exploratória comprometida pelo diabetes.

5.5.4- O Comportamento de Descansar

Houve um aumento no tempo gasto neste comportamento nos três subgrupos, sendo relativamente mais significativos no subgrupo 3, 2, e 1 por ordem decrescente de intensidade, respectivamente.

Essa aumento no tempo gasto em “descansar” pode ser conseqüente ao comprometimento motor apresentado pelos animais diabéticos. Por outro lado, a dor crônica também induziria os animais a aumentar o seu tempo de repouso, como o faz com pacientes com neuropatia diabética dolorosa.

5.5.5- O Comportamento de Alimentar-se

Assim como no homem existe anorexia acompanhando os estados de dor crônica, poderia-se esperar que os animais diabéticos com dor, apresentassem diminuição do tempo gasto com o comportamento de alimentar-se.

O tempo gasto com esse comportamento diminuiu em todos os subgrupos. Nos Subgrupos 2, e 3, acontece um discreto aumento apenas visível graficamente até a 20ª semana, a partir daí ocorre diminuição. No subgrupo 1, a redução já é notada após a 12ª semana.

Em geral nota-se que esse comportamento diminui de forma progressiva em todos os subgrupos apresentando valores estatisticamente significativos na 27ª semana.

O comportamento de alimentar-se está portanto comprometido em ratos diabéticos, provavelmente devido ao estado de dor crônica que esses animais apresentam.

5.6 - Evidências Farmacológicas de Dor

Segundo Kupers et al (1992), induzir mudanças comportamentais que possam ser quantificadas nos animais e além disso, que essas mudanças sejam afetadas por um analgésico, é um pré-requisito necessário para um modelo animal ser adequado ao estudo de dor. Além disso seria importante que as alterações provocadas pelo analgésico, fossem revertidas por um antagonista específico (De Castro Costa, 1986).

No intuito de confirmar as evidências comportamentais de dor, submetemos nove animais diabéticos que apresentaram aumento persistente do comportamento de coçar-se, à analgesia com doses de morfina de 2 e 4 mg/Kg. Tentamos também reverter a ação analgésica da morfina na dose de 2 mg/Kg, utilizando seu antagonista específico, naloxona.

5.6.1- Efeito Analgésico da Morfina

O comportamento de coçar-se diminuiu significativamente com o uso de morfina na dose de 2 e 4 mg/Kg. Esses resultados sugerem um efeito analgésico da morfina sobre os animais com neuropatia diabética dolorosa.

O tratamento dos animais com morfina 2 mg/Kg e naloxona 1 mg/Kg não alterou significativamente o comportamento de coçar-se, mostrando desse modo que a naloxona antagonizou a ação analgésica da morfina.

A escolha das doses de morfina foram baseadas nas relatadas pela literatura acerca de experimentos com ratos (De Castro Costa, 1979; De Castro Costa, 1986; Kupers et al, 1992; Moura, 1994; Courteix et al 1994; Labrecque & Vanier, 1995), e no relato de alguns pesquisadores a respeito do efeito depressor da morfina, em doses acima de 5 mg/Kg, sobre os comportamentos espontâneos dos animais (De Castro Costa, 1986; Kupers et al, 1992; Moura, 1995).

O uso de opióides na dor neuropática é motivo de controvérsia (Arnér & Meyerson, 1988b; Fields, 1988), e estudos experimentais e clínicos reportam resultados contraditórios (Arnér & Meyerson, 1988a; Portenoy et al, 1990; Kupers et al 1992; Kupers & Gybels, 1995).

Existem várias hipóteses sugeridas na tentativa de explicar a relativa pouca eficácia de opióides na dor neuropática. Um delas seria que os diferentes mecanismos subjacentes responsáveis pela fisiopatologia da dor neuropática fariam com que uns modelos experimentais respondessem à morfina e outros não. Outra possibilidade seria que os ritmos biológicos da dor influenciariam os efeitos dos opióides (Labrecque & Vanier, 1995). Mao et al (1995) sugerem que a tolerância à morfina e a hiperalgesia poderiam ter o mesmo mecanismo: ativação de receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e a subsequente ativação de proteína quinase C e formação de óxido nítrico. Nos estudos clínicos, Portenoy et al (1990) afirmam que os fatores intrínsecos relacionados ao paciente (predisposição aos efeitos colaterais dos opióides, o grau de sofrimento psicológico, exposição prévia aos opióides), e relacionados à dor (características temporais, influência da fisiopatologia) podem determinar a resposta aos opióides.

Em relação ao diabetes mellitus, existem várias referências na literatura a respeito do efeito antinociceptivo reduzido da morfina (Simon & Dewey, 1981; Simon et al, 1981). Foi demonstrado que a hiperglicemia aguda ou crônica, simplesmente, reduz o efeito analgésico da morfina. Assim sugeriu-se que a glicose poderia interferir na ligação da morfina com os receptores opióides μ , pois animais diabéticos foram normalmente responsivos à

estimulação de receptores opióides δ e κ por outras drogas. Além disso, Kamei et al (1995) demonstraram que no efeito nociceptivo da mexiletina em camundongos diabéticos ou não, havia o envolvimento de receptores opióides δ_1 .

Os nossos resultados estão em acordo com os obtidos por Courteix et al (1994), os quais confirmaram que a morfina é eficaz em ratos diabéticos, porém a dose tem que ser o dobro das utilizadas em ratos normais. Esses pesquisadores utilizaram morfina em doses que variaram de 0,5 a 4 mg/Kg, e constataram que a menor dose efetiva de morfina foi 2 mg/Kg. Baseando-nos inclusive nesse dado, planejamos utilizar doses de 2 e 4 mg/Kg de morfina, porém a dose de 2 mg/Kg já apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Achamos então, suficiente usar a naloxona para antagonizar apenas essa dose, visto que a simples constatação de analgesia nos bastava. A naloxona foi utilizada da mesma forma como relatado por Kupers et al (1992).

Apesar da controvérsia sobre o uso de opióides em dor neuropática parece existir um consenso de que não se deveria falar que a dor neuropática não é responsiva aos opióides e sim que algumas subcategorias de dor neuropática são menos sensíveis aos opióides ((Portenoy et al, 1990; Kupers et al, 1992; Courteix et al, 1994).

5.6.2 - *Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Limpar-se*

A diminuição significativa do comportamento de limpar-se quando utilizamos morfina na dose de 2 mg/Kg merece um comentário. É possível que nessa dose a morfina não tenha tido nenhum efeito sobre esse comportamento, e estaríamos vendo então, a resposta comportamental não alterada o suficiente pela droga. Já relatamos que houve por parte dos animais diabéticos uma tendência à diminuição não significativa desse comportamento. O fato de termos selecionado os animais com maior tempo de comportamento de coçar-se (supostamente os que sentiam mais dor) pode ter causado significância estatística em tal diminuição. Achamos que essa redução, como já referimos anteriormente, pode ter sido causada pela presença de alodínia, fazendo com que os animais evitassem o ato de limpar-se.

A morfina na dose de 4 mg/Kg aumentou, porém de forma não estatisticamente significativa, o tempo gasto no comportamento de limpar-se

em relação aos mesmos animais antes da droga. Se estivermos certos no que afirmamos no parágrafo anterior, o dobro da dose de morfina portanto, mostrou indício indireto de analgesia nesse modelo de dor.

Kupers et al (1992) também encontraram um aumento desse comportamento, causado pela morfina, em ratos com mononeuropatia ciática compressiva. Entretanto as doses de morfina que produziram tal resultado foram 1 e 2 mg/Kg. Entretanto Moura (1994), utilizando o mesmo modelo, encontrou resultado semelhante ao nosso para morfina na dose de 2 mg/Kg.

Em relação ao efeito morfina 2 mg/Kg + naloxona 1 mg/Kg, parece ter havido somação de efeito analgésico. Barbosa (1990) relatou um efeito analgésico da naloxona em dose baixa, sobre ratos artríticos. Moura (1994) também encontrou um efeito analgésico, baseado na redução do comportamento de coçar-se, em ratos com mononeuropatia ciática compressiva, quando utilizou doses de morfina 1 mg/Kg e naloxona 0,5 mg/Kg. Além disso, também obteve aumento do comportamento de limpar-se nos mesmos animais, quando utilizou morfina 2 mg/Kg e naloxone 1 mg/Kg.

5.6.3 - Efeito da Morfina, e Naloxona sobre os Comportamentos Motores

A morfina 2 e 4 mg/Kg, e a morfina 2mg/Kg antagonizada por naloxona 1 mg/Kg, não alteraram de forma estatisticamente significativa os comportamentos motores dos animais. Comprovamos assim, que a redução do comportamento de coçar-se, referido anteriormente, não é produzida por efeito sedativo da morfina. Isso está de acordo com os resultados de De Castro Costa (1986), Kupers et al (1992), e Moura (1994).

5.6.4 - Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Descansar

A morfina diminuiu o tempo gasto com o comportamento de descansar de forma dose dependente, alcançando significância estatística ($P < 0,01$) para a dose de 4 mg/Kg. Essa redução foi antagonizada, para morfina na dose de 2 mg/Kg, pela naloxona.

Esses resultados são indícios indiretos de que os animais estavam sentindo dor, e sob a ação analgésica da morfina puderam realizar outras atividades que antes estavam diminuídas pelo estado persistente de dor. Além disso, esses achados confirmam ainda mais que não houve efeito sedativo da

morfina.

5.6.5- *Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Alimentar-se*

O aumento do tempo gasto no comportamento de alimentar-se, que foi induzido pela morfina 2 mg/Kg de forma significativa ($P < 0,01$), e 4 mg/Kg de forma não significativa, demonstra que com a diminuição da dor os animais aumentaram o interesse em alimentar-se. Essa alteração induzida pela morfina na dose de 2 mg/Kg foi antagonizada pela naloxona.

Não se pode afirmar com certeza se a perda ponderal observada nos animais diabéticos deve-se apenas à redução da alimentação causada pelo estado de dor crônica. No homem com neuropatia dolorosa diabética, a perda de peso e anorexia acompanham o sofrimento intenso causado pela dor. Em alguns casos, essa perda ponderal é tão importante que desvia a atenção do médico assistente para a inútil e exaustiva procura de doenças malignas (Watkins, 1990).

5.6.6- *Efeito da Morfina, e Naloxona sobre o Comportamento de Congelar-se*

Decidimos introduzir a observação do comportamento de congelar-se na fase de teste farmacológico com morfina porque existe informação de que esse comportamento está aumentado pelo uso da morfina (De Castro Costa, 1986; Moura, 1995).

Os nossos resultados confirmam os dados acima. Houve aumento do tempo gasto no comportamento de congelar-se de forma dose dependente com o uso da morfina. O estado de hiperglicemia ou outras alterações causadas pelo diabetes mellitus, não influenciaram o efeito da morfina sobre esse comportamento. A naloxona antagonizou o efeito da morfina utilizada na dose de 2 mg/Kg.

5.7 - O Modelo Experimental de Neuropatia Diabética Dolorosa

A dor neuropática persiste como um desafio para pesquisa básica e clínica, não somente para o delineamento de sua fisiopatologia, mas também do seu tratamento.

Uma possibilidade que talvez explique essa dificuldade dos pesquisadores na obtenção de resultados coerentes, seria a existência de vários subtipos de dor neuropática, cada subtipo apresentando algum detalhe diferente na sua fisiopatologia. Além disso, outro fator que complica mais ainda a investigação e o entendimento da dor neuropática, é a sua natureza dinâmica ao longo do tempo. Se essa característica é consequência das alterações que ocorrem em neurônios da medula espinhal e de outras áreas do sistema nervoso central ainda é motivo de especulação. Existe uma enorme quantidade de informação sobre a morfologia de centrais terminais de aferência primária, neurônios dorsais e sistemas descendentes, sua neuroanatomia, neurobioquímica, a disposição das suas sinapses, entretanto não há ainda total compreensão dos princípios de organização e funcionamento do corno dorsal da medula espinhal. Imagina-se, no entanto, que o circuito neuronal do corno dorsal pode ser permanentemente alterado ou reorganizado após lesão do sistema nervoso central ou periférico (McMahon & Koltzenburg, 1990; Woolf, 1994; Dubner & Basbaum, 1994).

A neuropatia diabética ainda é de fisiopatologia desconhecida. Várias tentativas têm sido feitas no sentido de reverter ou prevenir o aparecimento dessa complicação tão comum do diabetes mellitus, partindo da hipótese metabólica, (como o aumento da via poliol causando redução da atividade da ATPase de sódio-potássio), da hipótese vascular, e dos achados estruturais e neurobioquímicos no nervo (Tomlinson et al, 1986; Greene et al, 1987; MacLean, 1987; Cameron et al, 1994; Ido et al, 1994; Suzuki et al, 1994; Ress et al, 1994; Wright & Nukada, 1994; Donadoni et al, 1995; Stevens, 1995; Stevens et al, 1995; Thurston et al, 1995; Weis et al, 1995).

A dor da neuropatia diabética também tem seus mecanismos subjacentes desconhecidos. Tem-se sugerido que a regeneração de fibras nociceptivas amielínicas pudesse ser a origem da dor, porém estudos clinicopatológicos mostram que degeneração e regeneração axonal ocorrem em pacientes com ou sem neuropatia dolorosa. Outra possibilidade seria a eletrogênese ectópica que acontece em axônios que sofreram desmielinização segmentar, mas mantiveram sua continuidade (Devor, 1994). Aachamos que esses mecanismos podem participar em conjunto ou isoladamente numa forma aleatória na iniciação das alterações neuroplásticas que provavelmente acontecem no sistema nervoso central desses pacientes.

Outras hipóteses implicadas seriam a diminuição de beta-endorfinas causado pelo diabetes (Forman et al, 1986) e a alteração da sensibilidade à dor causada pela hiperglicemia (Lee & McCarty, 1992). Talvez a heterogeneidade de síndromes dolorosas vista no paciente diabético seja devido a esses múltiplos mecanismos fisiopatológicos.

Vários estudos clínicos têm sido realizados com o intuito de encontrar uma melhor terapia para a dor da neuropatia diabética, que em muitos pacientes é de difícil controle (Kastrup et al, 1986; Dejgard et al, 1988; Kastrup et al, 1989; Bach et al, 1990; Boulton et al, 1990; Ackerman III et al, 1991; Basha et al, 1991; Max et al, 1991; Quatraro et al, 1992; Stracke et al, 1992; Horrobin, 1993; Anghinah et al, 1994; Byas-Smith et al, 1995; Goto et al, 1995; McQuay et al, 1995; Wieman & Patel, 1995).

Diante da necessidade de se encontrar tratamentos mais eficazes para a dor da neuropatia diabética, é necessário utilizar modelos animais. Achamos repreensível que o tratamento medicamentoso para a dor dessa condição clínica geralmente seja feita de uma forma tentativa - erro (Takeshita et al, 1995), pois como já referimos anteriormente as limitações éticas nos impõem o desenvolvimento de modelos animais de dor.

Ratos com diabetes mellitus induzido por estreptozotocina ou aloxana têm sido usados para estudo da dor da neuropatia diabética, como também para outras complicações do diabetes (Nakamura-Craig & Follenfant, 1995).

O modelo do rato diabético tem apresentado resultados contraditórios e somente tem avaliado respostas comportamentais evocadas à dor. Yoon et al (1996) propuseram separar a dor neuropática em dois componentes: dor espontânea e dor evocada. A distinção entre esses dois componentes poderia ajudar a elucidar melhor os mecanismos de dor neuropática.

As alterações encontradas no modelo do rato diabético pareceram ser persistentes e progressivas por pelo menos 37 semanas. A evidência de alodínia (Courteix et al, 1993) e hiperalgesia, dois sintomas encontrados em pacientes diabéticos, mostram que esse modelo se assemelha à condição clínica para a qual é proposto. Outras alterações como poliúria, hiperglicemia persistente, catarata, evidências de disautonomia, perda de peso, algum grau de amiotrofia, e hipoalgesia fazem com que esse modelo represente bem a síndrome diabética. Outra vantagem apresentada por esse modelo é o fato de

não haver mutilações por parte dos animais diabéticos. Um fato que deveria ser observado nos próximos experimentos é se a indução do diabetes mellitus no animal adulto produz diferenças clínicas importantes em relação à indução da doença no animal de quatro semanas de idade (Malone et al, 1996).

Courteix et al (1993) não encontraram “desordens tróficas óbvias” nem nenhuma clara mudança no comportamento que pudessem sugerir dor espontânea no rato diabético, mas apenas dor evocada. Os nossos resultados, utilizando alterações comportamentais evocadas como parâmetro de dor, mostraram alguns aspectos que concordam com os achados de Courteix e al (1993). Entretanto, no nosso estudo pudemos utilizar a quantificação do comportamento de coçar-se como parâmetro de dor, com a vantagem de quantificar dor sem a interferência direta do pesquisador.

O comportamento de coçar-se, parâmetro principal das nossas observações, tem sido utilizado em vários modelos de dor crônica nociceptiva e neuropática.

Esse comportamento tem sido encontrado em ratos que receberam uma injeção intratecal de agonistas da substância P (Papir-Kricheli et al, 1987), como também em ratos que receberam substância P via intracerebroventricular (Greidanus & Maigret, 1988). Além dessas evidências relacionadas à substância P, um já bem definido mediador de dor, o comportamento de coçar-se também é evocado pela injeção intratecal de substâncias excitatórias (Frenk et al, 1988), e pela administração de antagonistas de receptores GABA (ácido gama-aminobutírico). Por outro lado, a administração intratecal de glicina e agonistas dos receptores GABA, atenua ou bloqueia o comportamento de coçar-se induzido por substância P em ratos (Beyer et al, 1989).

Segundo Kupers et al (1992) o comportamento de coçar-se é o primeiro parâmetro de dor descrito até o momento que ocorre em muitos modelos experimentais presumíveis de dor. Além disso, esse comportamento é fácil de quantificar, é uma medida muito objetiva, e permite o uso de análise estatística convencional.

Assim como Courteix et al (1993), achamos que o modelo do rato diabético merece maior e mais aprofundado estudo. É possível que os animais diabéticos também apresentem uma heterogeneidade de síndromes como as encontradas no diabetes mellitus humano. Acrescentaríamos às suas

recomendações para o planejamento de estudos de dor em ratos diabéticos citadas na introdução deste trabalho, a utilização também do comportamento de coçar-se como parâmetro de dor. Aconselharíamos a restrição das pesquisas com modelos de dor aos ratos da variedade Wistar, e a realização de estudos sempre de forma longitudinal com no mínimo oito semanas de diabetes, visto que o diabetes é uma doença crônica no homem, e a síndrome dolorosa que o modelo representa aparece no homem depois de vários anos de doença.

Achamos portanto, pelos resultados do nosso estudo e pelas evidências de estudos anteriores, que o comportamento de coçar-se está aumentado em ratos diabéticos com neuropatia dolorosa e que o mesmo pode ser utilizado como possível parâmetro de dor desse modelo animal.

6 - CONCLUSÕES

6.1 - Os ratos diabéticos apresentaram ao longo de 27 semanas de observações, alterações clínicas similares às vistas em pacientes diabéticos, tais como poliúria, catarata, evidências de disautonomia, e perda de peso. Isto confirma que o modelo representa bem o estado clínico encontrado no Diabetes Mellitus humano.

6.2 - Os ratos diabéticos apresentaram evidências comportamentais de dor crônica constatada pela diminuição do tempo gasto nos comportamentos de farejar, empinar-se, alimentar-se, e limpar-se, e um aumento no tempo gasto com os comportamentos de coçar-se, e descansar.

6.3 - Houve desenvolvimento de neuropatia motora, por parte dos animais diabéticos, confirmada pelos parâmetros do Índice Funcional Ciático.

6.4 - Houve também desenvolvimento de neuropatia sensitiva, com 43% dos animais apresentando hiperalgesia, e 57% dos animais apresentando hipoalgesia ao teste térmico a 46°C. Não encontramos presença de Alodínia ao teste térmico a 40°C.

6.5 - A morfina reduziu o tempo gasto com o comportamento de coçar-se em animais diabéticos, e essa ação foi antagonizada pela naloxona, confirmando assim que esse comportamento, possivelmente, também é manifestação de dor nesse modelo de neuropatia dolorosa diabética em ratos.

7 - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA *

- ACKERMAN III, W.E. et al. The management of oral mexiletine and intravenous lidocaine to treat chronic painful symmetrical distal diabetic neuropathy. KMA Journal, 89 : 500-501, outubro, 1991.
- ADAMS, R.D. et al. Pain and other disorders of somatic sensation, headache, and backache. In: _____ . Principles of Neurology. 6ª edição, McGraw-Hill, 1997. Capítulo 8, p.127-147.
- ADVOKAT, C. Naltrexone and the tail flick reflex. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 15 : 677-680, 1981.
- AHLGREN, S.C. & LEVINE, J.D. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. Neuroscience, 52 (4) : 1049-1055, 1993.
- ALVES, N.D. Estudo Comportamental do Possível Efeito Analgésico da Vigabatrina, gama-vinil-GABA, em Dor Neuropática Crônica Experimental. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, janeiro, 1997.
- ANGHINAH, R. et al. Effect of baclofen on pain in diabetic neuropathy. Muscle & Nerve, p.958-959, agosto, 1994.
- ARCHER, A.G. et al. The natural history of acute painful neuropathy in diabetes mellitus. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 46 : 491-499, 1983.
- ARNÉR, S. & MEYERSON, B.A. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. Pain, 33 : 11-23, 1988a.
- ARNÉR, S. & MEYERSON, B. Reply to Howard L. Fields on 'Can opiates relieve neuropathic pain' ?. Pain, 35 : 366-367, 1988b.

* De Acordo com a ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

- ASBURY, A.K. Diseases of The Peripheral Nervous System. In: WILSON, J.D. et al. HARRISON'S Principles of Internal Medicine. 12^a edição McGraw-Hill, 1991. 2 v. capítulo 363, p.2096-2107.
- BACH, F.W. et al. The effect of intravenous lidocaine on nociceptive processing in diabetic neuropathy. Pain, 40 : 29-34, 1990.
- BARBIERE, C.H. Síndrome do Túnel do Carpo. Rev bras Neurol, 27 (supl.1) : 39S-42S, 1991.
- BARBOSA, V.L.F. Possível alteração do sistema nociceptivo pela dor crônica animal (uma análise comportamental-farmacológica) Dissertação de Mestrado, Universid. Federal do Ceará, Fortaleza, 1990.
- BARON, R. & MAIER, C. Painful Neuropathy: C-Nociceptor Activity May Not Be Necessary to Maintain Central Mechanisms Accounting for Dynamic Mechanical Allodynia. The Clinical Journal of Pain, 11 : 63-69, 1995.
- BARREIRA, A.A. Aspectos epidemiológicos das neuropatias diabéticas. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 7S-8S, 1991a.
- BARREIRA, A.A. Classificação das neuropatias diabéticas. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 9S-11S, 1991b.
- BARREIRA, A.A. Manifestações clínicas das polineuropatias diabéticas. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 12S-16S, 1991.
- BASHA, K.M. et al. Capsaicin: A Therapeutic Option for Painful Diabetic Neuropathy. Henry Ford Hosp Med J, 39 (2) :138-140, 1991.
- BAYS, H.E. & PFEIFER, M.A. Peripheral Diabetic Neuropathy. Medical Clinics of North America, 72 (6): 1439-1464, novembro, 1988.
- BELLUSH, L.L. & REID, S.G. Altered Behavior and Neurochemistry During Short-Term Insulin Withdrawal in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Diabetes, 40 : 217-222, fevereiro, 1991.

- BENBOW, S.J. et al. A Prospective Study of Painful Symptoms, Small-fibre Function and Peripheral Vascular Disease in Chronic Painful Diabetic Neuropathy. Diabetic Medicine, 11 : 17-21, 1994.
- BENNETT, G.F. Neuropathic pain. In: WALL, P.D & MELZACK, R. Textbook of pain, 3ª edição. Londres, Churchill Livingstone Inc., 1994. Capítulo 10, 201-224.
- BERNE, R.M. & LEVY, M.N. The Somatosensory System. In: _____ Physiology, 3ª edição, Mosby Year Book, 1993. Capítulo 8, p.121-140.
- BEYER, C. et al. Blockage of Substance P-Induced Scratching Behavior in Rats by the Intrathecal Administration of Inhibitory Amino Acid Agonists. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 34 : 491-495, 1989.
- BITAR, M. et al. Diabetes-Induced Alteration in Brain Monoamine Metabolism in Rats. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 236 (2) : 432-437, 1986.
- BOULTON, A.J.M. et al. A multicentre trial of the aldose-reductase inhibitor, tolrestat, in patients with symptomatic diabetic neuropathy. Diabetologia, 33: 431-437, 1990.
- BRITLAND, S.T. et al. Acute and remitting painful diabetic polyneuropathy: a comparison of peripheral nerve fibre pathology. Pain, 48 : 361-370, 1992.
- BURCHEL, K.J. et al. Spontaneous Activity of Primary Afferent Neurons in Diabetic BB/Wistar Rats, A Possible Mechanism of Chronic Diabetic Neuropathic Pain. Diabetes, 34 : 1210-1213, novembro, 1985.
- BYAS-SMITH, M.G. et al. Transdermal clonidine compared to placebo in painful diabetic neuropathy using a two-stage 'enriched enrollment' design. Pain, 60 : 267-274, 1995.
- CAMERON, N.E. et al. Aldose reductase inhibition, nerve perfusion, oxygenation and function in streptozotocin-diabetic rats: dose-response considerations and independence from a myo-inositol mechanism. Diabetologia, 37 : 651-663, 1994.

- CASTELLANOS, F. et al. Acute painful diabetic neuropathy following severe weight loss. Muscle & Nerve, 19 : 463-467, 1996.
- CEPERO, O.F. & CONCEPCIÓN, J.C.M. Algunas características clínicas de la vejiga neurogénica en el diabético, com especial referencia a sus manifestaciones urinarias. Rev Cub Med, 25 : 40-46, janeiro, 1986.
- CHABNER, B.A. et al. Antineoplastic Agents. In: HARDMAN, J.G et al. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª edição, Pergamon Press, 1996. Capítulo 51, p.1233-1287.
- CHU, P.C. et al. Alterations in Physiologic Functions and in Brain Monoamine Content in Streptozotocin-Diabetic Rats. Diabetes, 35 : 481-485, 1986.
- CLARK, C.M. & LEE, D.A. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. The New England Journal of Medicine, 332 (18) : 1210-1217, maio, 1995.
- COURTEIX, C. et al. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioral evidence for a model of chronic pain. Pain, 53 : 81-88, 1993.
- COURTEIX.C. et al. Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. Pain, 57 : 153-160, 1994.
- DE CASTRO COSTA, C.M. Adjuvant Arthritis in Rats: a Possible Model of Animal Chronic Pain. Dissertação de Mestrado. Katholieke Universiteit Leuven. Bélgica, 1979.
- DE CASTRO COSTA, C.M et al. Adjuvant-Induced Arthritis in Rats: a Possible Animal Model of Chronic Pain. Pain, 10 : 173-185, 1981.
- DE CASTRO COSTA, C.M. Scratching Behavior in Adjuvant-Induced Arthritic Rats: A Parameter of Animal Chronic Pain. Tese de Doutorado. Katholieke Universiteit Leuven. Bélgica, 1986.
- DE CASTRO COSTA, C.M. et al. Scratching behavior in arthritic rats: a sign of chronic pain or itch ?. Pain, 29 : 123-131, 1987.

- DEJGARD, A. et al. Mexiletine for treatment of chronic painful diabetic neuropathy. The Lancet, 9 : 9-11, janeiro, 1988.
- DEVOR, M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: WALL, P.D & MELZACK, R. Textbook of pain, 3ª edição. Londres, Churchill Livingstone Inc., 1994. Capítulo 4, p.79-100.
- DONOVANI, M.L. et al. Experimental Diabetic Neuropathy. Inhibition of Protein Mono-ADP-Ribosylation Prevents Reduction of Substance P Axonal Transport. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 274 (1) : 570-576, 1995.
- DUBNER, R. & BASBAUM, A.I. Spinal dorsal plasticity following tissue or nerve injury. In: WALL, P.D & MELZACK, R. Textbook of pain, 3ª edição. Londres, Churchill Livingstone Inc., 1994. Capítulo 11, p.225-241.
- FIELDS, H.L. Can opiates relieve neuropathic pain ? Pain, 35 : 365, 1988.
- FORMAN, L.J. et al. Streptozotocin Diabetes Alters Immunoreactive β -Endorphin Levels and Pain Perception After 8 wk in Female Rats. Diabetes, 35 : 1309-1313, dezembro, 1986.
- FOSS, M.C. Diabetes mellitus e suas complicações crônicas. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 3S-6S, 1991.
- FOSS, N.T. & FOSS, M.C. Lesões plantares do paciente diabético - Pé diabético. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 37S-38S, 1991.
- FOSTER, D.W. Diabetes Mellitus. In: WILSON, J.D. et al. HARRISON'S Principles of Internal Medicine. 12ª edição. McGraw-Hill, 1991. 2 v. Capítulo 319, p.1739-1759.
- FRENK, H. et al. Is substance P a primary afferent neurotransmitter for nociceptive input ? Analysis of pain-related behaviors resulting from intrathecal administration of substance P and 6 excitatory compounds. Brain Research, 455: 223-231, 1988.

- GALLO JR, J.C.M.L. et al. Função autonômica dos sistemas cardiovascular e respiratório no diabetes mellitus. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 22S-28S, 1991.
- GOTO, Y. et al, Effects of an aldose reductase inhibitor, epalrestat, on diabetic neuropathy. Clinical benefit and indication for the drug assessed from the results of a placebo-controlled double-blind study. Biomed & Pharmacother, 49 : 269-277, 1995.
- GREENE, D.A. et al. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. The New England Journal of Medicine, 316 (10) : 599-606, março, 1987.
- GREIDANUS, T.B.V.W. & MAIGRET, C. Grooming behavior induced by substance P. European Journal of Pharmacology, 154 : 217-220, 1988.
- HORROBIN, D.F. The effects of gamma-linolenic acid on breast pain and diabetic neuropathy: possible non-eicosanoid mechanisms. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 48 : 101-104, 1993.
- IDO, Y. et al. Neural Dysfunction and Metabolic Imbalances in Diabetic Rats. Diabetes, 43 : 1469-1477, dezembro, 1994.
- KAMEI, J. et al. Involvement of δ_1 -opioid receptors in the antinociceptive effects of mexiletine in mice. Neuroscience Letters, 196 : 169-172, 1995.
- KAMEI, J. et al. Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice Reduces the Nociceptive Threshold, as Recognized After Application of Noxious Mechanical Stimuli But Not of Thermal Stimuli. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 39 : 541-544, 1991.
- KASTRUP, J. et al. Lidocaine Treatment of Painful Diabetic Neuropathy and Endogenous Opioid Peptides in Plasma. The Clinical Journal of Pain, 5 : 239-244, 1989.
- KASTRUP, J. Treatment of chronic painful diabetic neuropathy with intravenous lidocaine infusion. British Medical Journal, 292 : 173, 1986.

- KIM, Y.I. et al. Mechanical allodynia is more strongly manifested in older rats in an experimental model of peripheral neuropathy. Neuroscience Letters, 199 : 158-160, 1995.
- KUPERS, R.C. et al. A time course analysis of the changes in spontaneous and evoked behavior in a rat model of neurophatic pain. Pain, 50 : 101-111, 1992.
- KUPERS, R.C. & GYBELS, J. The consumption of fentanyl is increased in rats with nociceptive but not with neuropathic pain. Pain, 60 : 137-141, 1995.
- LABRECQUE, G. & VANIER, M. Biological Rhythms in Pain and in the Effects of Opioid Analgesics. Pharmac. Ther., 68 (1) : 129-147, 1995.
- LACKOVIC, Z. & SALKOVIC, M. Streptozotocin and Alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. Life Sciences, 46 (1) : 49-54, 1990.
- LANTING, P. et al. Autonomic and somatic peripheral nerve function and the correlation with neuropathic pain in diabetic patients. Journal of The Neurological Sciences, 94 : 307-317, 1989.
- LEE, J.H. et al. Effect of hyperglycemia on pain threshold in alloxan-diabetic rats. Pain, 40 : 105-107, 1990.
- LEE, J.H. & McCARTY, R. Glycemic Control of pain Threshold in Diabetic and Control Rats. Physiology & Behavior, 47 : 225-230, 1990.
- LEE, J.H. & McCARTY, R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. Pain, 50 : 231-236, 1992.
- LEIPHART, J.W. et al. A comparison of intrathecally administered narcotic and nonnarcotic analgesics for experimental chronic neuropathic pain. J Neurosurg, 82 : 595-599, 1995.
- LLEWELYN, J.G. et al. Acute Painful Diabetic Neuropathy. Diabetes Care, 11 (9) : 748-749, outubro, 1988.

- MACHADO, A.B.M. Nervos em geral, terminações nervosas, nervos espinhais. In: _____ . Neuroanatomia Funcional. Rio de Janeiro, Atheneu, 1988. Capítulo 10, p. 81-93.
- MacLEAN, D.B. Substance P and Somastostatin Content and Transport in Vagus and Sciatic Nerves of the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. Diabetes, 36 : 390-395, março, 1987.
- MALONE, J.I. et al. The Effect of Hyperglycemia on Nerve Conduction and Structure Is Age Dependent. Diabetes, 45 : 209-215, fevereiro, 1996.
- MAO, J. et al. Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. Pain, 61 : 353-364, 1995.
- MASSON, E. A. et al. A novel approach to the diagnosis and assessment of symptomatic diabetic neuropathy. Pain, 38 : 25-28, 1989.
- MAX, M.B. et al. Efficacy of desipramine in painful diabetic neuropathy: a placebo-controlled trial, Pain, 45 : 3-9, 1991.
- McMAHON, S. & KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurones in pain. Pain, 43 : 269-272, 1990.
- McQUAY, H. et al. Anticonvulsant drugs for management of pain: a systematic review. BMJ, 311 : 1047-1052, 1995.
- MEDINACELI, L. et al. An Index of the Functional Condition of Rat Sciatic Nerve Based on Measurements Made from Walking Tracks. Experimental Neurology, 77 : 634-643, 1982.
- MERSKEY, H. & BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain, 2ª edição, Seattle, IASP Press, 1994.
- MORLEY, G.K. et al. Mechanism of Pain in Diabetic Peripheral Neuropathy. The American Journal of Medicine, 77 : 79-82, 1984.

- MOURA, F. E. A. Estudo Comportamental-Farmacológico de Ratos Portadores de Mononeuropatia Ciática Compressiva Crônica: Um Modelo Animal de Dor Neuropática. Dissertação de Mestrado. Universid. Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.
- NAKAMURA-CRAIG, M. & FOLLENFANT, R.L. Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE₂ and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin -induced diabetes. Pain, 63 : 33-37, 1995.
- NARAMA, I. & KINO, I. Peripheral motor neuropathy in spontaneous diabetic WBN/Kob rats: a morphometric and electron microscopic study. Acta Neuropathol, 79 : 52-60, 1989.
- NASCIMENTO, O. Susceptibilidade à compressão e maior resistência ao bloqueio de condução isquêmico dos nervos periféricos nos pacientes diabéticos. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 17S-19S, 1991.
- OLIVEIRA, R.B. Disfunções gastrintestinais nas neuropatias diabéticas. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 29S-31S, 1991.
- PAPIR-KRICHELI, D. et al. Behavioral effects of receptor-specific substance P agonists. Pain, 31 : 263-276, 1987.
- PARTANES, J. et al. Natural History of Peripheral Neuropathy in Patients with Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus. The New England Journal of Medicine, 333 (2) : 89-94, 1995.
- PORTENOY, R.K. et al. The nature of opioid responsiveness and its implications for neuropathic pain: new hypotheses derived from studies of opioid infusions. Pain, 43 : 273-286, 1990.
- QUATRARO, A. Calcitonin in painful diabetic neuropathy. The Lancet, 339 : 746-747, março, 1992.
- QUESNE, P.M. & FOWLER, C.J. A study of pain threshold in diabetics with neuropathic foot lesions. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 49 : 1191-1194, 1986.

- RESS, A.M. et al. Free Radical Damage in Acute Nerve Compression. Ann Plas Surg, 34 : 388-395, 1995.
- ROCHA, J.N. Disautonomia da bexiga urinária e seu tratamento em pacientes diabéticos. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 32S-36S, 1991.
- ROWBOTHAM, M. Chronic Pain: From theory to practical management. Neurology, 45 (suppl 9) : S5-S10, 1995.
- SANTOS, T.J.T. Efeito Analgésico do Baclofeno (beta-p-clorofenil GABA) em Dor Neuropática Experimental. Dissertação de Mestrado. Universid. Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.
- SILVEIRA, E.M. & SILVEIRA, P.R. Neuropatia Periférica Diabética. JBM, 66 (6) : 80-106, 1994.
- SIMON, G.S. & DEWEY, W.L. Narcotics and Diabetes I. The effects of Streptozotocin-Induced Diabetes on the Antinociceptive Potency of Morphine. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 218 (2) : 318-323, 1981.
- SIMON, G.S. et al. Narcotics and Diabetes II. Streptozotocin-Induced Diabetes Selectively Alters the Potency of Certain Narcotic Analgesics. Mechanism of Diabetes: Morphine Interaction. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 218 (2) : 324-329, 1981.
- SOUZA, N.V. Alterações da motricidade extrínseca e pupilares nas neuropatias diabéticas. Rev bras Neurol, 27 (supl 1) : 20S-21S, 1991.
- SUZUKI, E. et al. H-NMR analysis of nerve edema in the streptozotocin-induced diabetic rat. J Lab Clin Med, 124 (5) : 627-637, novembro, 1994.
- STEVENS, M.J. Nitric Oxide as a Potencial Bridge Between the Metabolic and Vascular Hypotheses of Diabetic Neuropathy. Diabetic Medicine, 12 : 292-295, 1995.
- STEVENS, M.J. et al. The Aetiology of Diabetic Neuropathy: the Combined Roles of Metabolic and Vascular Defects. Diabetic Medicine, 12 : 566-579, 1995.

- STRACKE, H. Mexiletine in the treatment of diabetic neuropathy. Diabetes Care, 15 (11) : 1550-1555, 1992.
- TAKESHITA, N. et al. Tiapride Attenuates Pain Transmission Through an Indirect Activation of Central Serotonergic Mechanism. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275 (1) : 23-30, 1995.
- THOMAS, P.K. & TOMLINSON, D.R. Diabetic and Hypoglycemic Neuropathy. In: DICK, P.J. & THOMAS, P.K. Peripheral Neuropathy. W.B. Saunders Company, 1993. 2 v. capítulo 64, p. 1219-1250.
- THURSTON, J.H. et al. Effects of Acute, Subacute, and Chronic Diabetes on Carbohydrate and Energy Metabolism in Rat Sciatic Nerve. Diabetes, 44 : 190-195, fevereiro, 1995.
- TOMLINSON, D.R. et al. Slow Component-a of Axonal Transport, Nerve myo-Inositol, and Aldose Reductase Inhibition in Streptozotocin-Diabetic Rats. Diabetes, 35 : 398-402, abril, 1986.
- WALL, P. D. Neuropathic Pain. Pain, 43 : 267-268, 1990.
- WATKINS, P.J. Natural History of the Diabetic Neuropathies. Quartely Journal of Medicine, 77 (284) : 1209-1218, 1990.
- WEIS, J. et al. Nerve conduction changes and fine structural alterations of extra- and intrafusal muscle and nerve fibers in streptozotocin diabetic rats. Muscle & Nerve, 18 : 175-184, fevereiro, 1995.
- WIEMAN, T.J. et al. Peripheral somatic sensory neuropathy and skin galvanic response in the feet of patient with diabetes. Surgery, Gynecology, & Obstetrics, 168 : 501-506, junho, 1989.
- WIEMAN, T.J. & PATEL, V.G. Treatment of Hyperesthetic Neuropathic Pain in Diabetics. Annals of Surgery, 221 (6) : 660-665, 1995.
- WINDEBANK, A.J. & McEVOY, K.M. Diabetes and The Nervous System. In: AMINOFF, M.J. Neurology and General Medicine, 2ª edição, Churchill Livingstone, 1995. Capítulo 19, p.349-381.

- WOOLF, C.F. The dorsal horn: state-dependent sensory processing and the generation of pain. In: WALL, P.D & MELZACK, R. Textbook of pain, 3^a edição. Londres, Churchill Livingstone Inc., 1994. Capítulo 5, p.101-112.
- WRIGHT, R.A. & NUKADA, H. Vascular and metabolic factors in the pathogenesis of experimental diabetic neuropathy in mature rats. Brain, 117: 1395-1407, 1994.
- WUARIN-BIERMAN, L. et al. Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. Diabetologia , 30 : 653-658, 1987.
- YOON, Y.W. et al. Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model. Pain, 64 : 27-36, 1996.
- YOUNG, R.J. et al. Chronic and Remitting Painful Diabetic Polyneuropathy, Correlations With Clinical Features and Subsequent Changes in Neurophysiology. Diabetes Care, 11 (1) : 34-40, janeiro, 1988.
- ZIEGLER, D. et al. Assesment of small and large fiber function in long-term type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without painful neuropathy. Pain, 34 : 1-10, 1988.
- ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. Pain, 16 : 109-110, 1983.