

SOLANGE GARCIA GARIBALDI

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área Neurologia.

Campinas, 31 de agosto de 2001.

Anamarli Nucci
Profa. Dra. Anamarli Nucci
Orientadora

**CONTRIBUIÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA CUTÂNEA NA
AVALIAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS NO DIABETE
MELITO TIPO 2**

CAMPINAS/SP

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



649627000

SOLANGE GARCIA GARIBALDI

**CONTRIBUIÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA CUTÂNEA NA
AVALIAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS NO DIABETE
MELITO TIPO 2**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas, área de Neurologia.

ORIENTADOR: ANAMARLI NUCCI

CO-ORIENTADOR: MARIA JÚLIA MARQUES

CAMPINAS/SP

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

G182c Garibaldi, Solange Garcia
Contribuição da imunohistoquímica cutânea na avaliação das
fibras nervosas no diabetes melito tipo 2 / Solange Garcia Garibaldi.
Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores: Anamarli Nucci, Maria Júlia Marques
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biópsia. 2. Imunofluorescência. 3. Neuropatia. 4. Pele. I.
Anamarli Nucci. II. Maria Júlia Marques. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Orientador: Profa. Dra. Anamarli Nucci

Membros:

1. Profa. Dra. Droselly de Castro Silveira
 2. Prof. Dr. Cacary Souza B. Oliveira
 3. Profa. Dra. Elizabeth M. A. B. Guagliato
 4. Profa. Dra. Denise Zantut Wittram
 5. Profa. Dra. Anamarli Nucci
-

Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 31/08/2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SUMÁRIO	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
INTRODUÇÃO	17
1.1. APRESENTAÇÃO	19
1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA EPIDERME	22
1.2.a. Tipos celulares da epiderme	22
1.2.b. Receptores sensoriais e fibras nervosas cutâneas	22
1.2.c. Características morfológicas da inervação cutânea	24
1.2.d. Métodos de quantificação dos nervos cutâneos	25
1.3. DIABETE MELITO	28
1.3.a. Definição	28
1.3.b. Aspectos epidemiológicos	28
1.3.c. Classificação do Diabetes melito	29
1.3.d. Critérios diagnósticos para Diabetes melito	32
1.4. NEUROPATIA DIABÉTICA	32
1.4.a. Definição	32
1.4.b. Prevalência da neuropatia diabética	33
1.4.c. Patogênese	34
1.4.d. Classificação da neuropatia diabética	36
1.4.e. Métodos de avaliação das fibras nervosas na neuropatia diabética	39
OBJETIVOS	45
MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1. POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA	51
3.1.a. Grupo paciente	51
3.1.b. Grupo controle	51
3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO	52
3.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO	53
3.3.a. Anamnese e exame neuromuscular	53
3.3.b. Testes clínico laboratoriais	54
3.3.c. Avaliação autonômica	55

3.3.d. Estudo da condução nervosa	55
3.3.e. Avaliação da biópsia de pele	56
3.4. MÉTODO DIAGNÓSTICO DA NEUROPATIA DIABÉTICA	58
3.5. MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DO ENVOLVIMENTO NEUROPÁTICO NOS DIABÉTICOS, BASEADO NA AVALIAÇÃO CLÍNICA E NEUROFISIOLÓGICA	59
3.6. MÉTODO ESTATÍSTICO	59
RESULTADOS	63
4.1. IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	65
4.1.a. Grupo de diabéticos e grupo controle	65
4.1.b. Subgrupos de diabéticos	66
4.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	68
4.2.a. Grupo de diabéticos	68
4.2.b. Subgrupos de diabéticos	69
4.3. REFLEXO CUTÂNEO SIMPÁTICO	73
4.3.a. Grupo de diabéticos e controle	73
4.3.b. Subgrupos de diabéticos	74
4.4. ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA	74
4.4.a. Grupo de diabéticos e grupo controle	74
4.4.b. Subgrupos de diabéticos	77
4.5. FIBRAS NERVOSAS INTRA-EPIDÉRMICAS	82
4.5.a. Grupo de diabéticos e controle	82
4.5.b. Subgrupos de diabéticos	87
4.6. CONTRIBUIÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA CUTÂNEA NO DIAGNÓSTICO DA NEUROPATIA DIABÉTICA E COMPROMETIMENTO DAS FIBRAS FINAS	88
4.7. MODELO DE ENVOLVIMENTO DAS FIBRAS NERVOSAS NO DIABETE MELITO TIPO 2	89
DISCUSSÃO	91
5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	93
5.2. ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA	94
5.3. FIBRAS NERVOSAS INTRA-EPIDÉRMICAS	96

5.4. MODELO DE ENVOLVIMENTO DAS FIBRAS NERVOSAS NO DIABETE MELITO TIPO 2	99
5.5. CONTRIBUIÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA CUTÂNEA NO DIAGNÓSTICO DA NEUROPATIA DIABÉTICA E COMPROMETIMENTO DAS FIBRAS FINAS	.101
CONCLUSÕES	103
SUMMARY	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	135
ANEXO 1	137
ANEXO 2	141
ANEXO 3	142
ANEXO 4	143
ANEXO 5	152
ANEXO 6	154
ANEXO 7	155
ANEXO 8	157
ANEXO 9	161

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Amplitude
DM	Diabete melito
D.P	Desvio Padrão
ECN	Estudo da condução nervosa
ECNM	Estudo da condução nervosa motora
ECNS	Estudo da condução nervosa sensitiva
FNI	Fibras nervosas intra-epidérmicas
HbGLI	Hemoglobina glicosilada
LD	Latência distal
LDS	Latência distal sensitiva
OF	Onda F
PAMC	Potencial de ação muscular composto
PANS	Potencial de ação nervoso sensitivo
PBS	Tampão fostato de sódio
PGP 9.5	Produto do gene protéico 9.5
PGP-IR	Imunoreativas ao PGP 9.5
PNS	Plexo neural subepidérmico
RCS	Reflexo cutâneo simpático
VCM	Velocidade de condução nervosa motora
VCN	Velocidade de condução nervosa
VCS	Velocidade de condução sensitiva
m/s	Metros por segundo

LISTA DE ABREVIATURAS

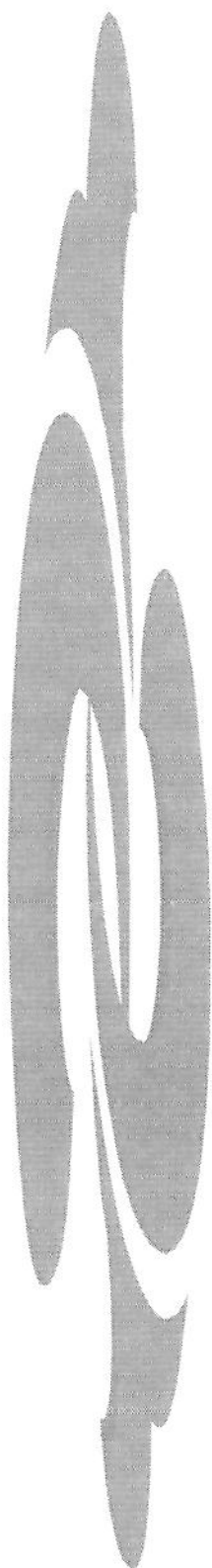
mg	miligramma
dl	decilitro
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
um	micrometro
ms	milisegundos
Hz	Hertz
KHz	Quilohertz
mV	Milivolt
μ V	Microvolt
M	Molar
°C	Graus centígrados
nm	nanometro

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Medidas de posição e dispersão das variáveis para o grupo normal	65
Tabela 2 – Medidas de posição e dispersão das variáveis para o grupo de diabéticos	66
Tabela 3 – Sintomas e sinais neuropáticos em diabéticos	69
Tabela 4 – Distribuição da escala de sintomas e sinais neuropáticos	70
Tabela 5 – Distribuição da frequência dos sintomas e sinais neurológicos nos subgrupos	72
Tabela 6 – Medidas de posição e dispersão dos parâmetros avaliados no ECN	75
Tabela 7 – Distribuição do ECN entre os subgrupos de diabéticos	77
Tabela 8 – Medidas de posição e dispersão dos parâmetros avaliados no ECN	78
Figura 1. Imagens obtidas por microscopia confocal a laser para a análise do padrão de distribuição das fibras intra-epidérmicas PGP-IR em indivíduos normais	83
Figura 2 – Dispersão do número de fibras intra-epidérmicas no grupo controle e nos grupos diabéticos	84
Figura 3. Imagens obtidas por microscopia confocal a laser para a análise do padrão de distribuição das fibras intra-epidérmicas PGP-IR em indivíduos diabéticos. Observa-se ausência das FNI (A) e redução da densidade linear das FNI (B)	85
Figura 4 – Dispersão do número de fibras intra-epidérmicas em função da medida de hemoglobina glicosilada no grupo diabético	86
Figura 5. Dispersão do número de fibras intra-epidérmicas em função do escore de sintomas no grupo diabético	86
Figura 6. Dispersão do número de fibras intra-epidérmicas em função do escore de sinais no grupo diabético	87

Foram avaliados 49 pacientes (20 homens e 29 mulheres), portadores de diabetes melito (DM) tipo 2, com idade média de 56.69 ± 6.44 anos e duração da doença de 0.17 a 30 anos e 18 indivíduos saudáveis (4 homens e 14 mulheres), com idade média de 54.33 ± 7.48 anos. Os objetivos do estudo foram: 1) Avaliar o valor do processamento imunohistoquímico da inervação cutânea com anticorpo policlonal anti produto do gene protéico 9.5 (PGP 9.5), como método de detecção de comprometimento das fibras finas e conseqüente diagnóstico de neuropatia em pacientes portadores de DM tipo 2, 2) Determinar a possibilidade de identificação diagnóstica dos subgrupos de diabéticos, classificados previamente por métodos clínicos e neurofisiológicos, com base nos resultados do número das fibras nervosas intra-epidérmicas (FNI) imunoreativas ao PGP 9.5 (PGP-IR), 3) Verificar o modelo de envolvimento das fibras nervosas no DM tipo 2. Os pacientes foram divididos em 4 subgrupos: classe 1 (n=15), ausência de neuropatia, classe 2 (n=8), neuropatia assintomática, classe 3 (n=8), neuropatia sintomática com estudo da condução nervosa (ECN) normal e classe 4 (n=18), neuropatia sintomática com ECN anormal. No grupo de diabéticos, o ECN, as escalas de sintomas e sinais e o reflexo cutâneo simpático (RCS) estavam alterados em 26 (53.06%) pacientes, 27 (55.1%) pacientes, 38 (77.6%) pacientes e 14 (28.5%) pacientes, respectivamente. Em indivíduos normais e diabéticos, amostras de pele de 3 mm de diâmetro foram retiradas da porção distal da perna direita, 10 cm acima do maléolo lateral e processadas pelo método de imunofluorescência

indireta, usando anti PGP 9.5. A densidade linear, número de fibras intra-epidérmicas por milímetro de epiderme, foi o parâmetro de quantificação empregado. As fibras intra-epidérmicas PGP-IR distribuíram-se por todas as camadas vitais da epiderme, apresentando - se com uma densidade linear de 7.04 ± 2.46 nos controles e de 1.40 ± 0.97 nos diabéticos. Os subgrupos de diabéticos apresentaram densidade linear com os valores de 2.39 ± 0.53 para a classe 1, 1.51 ± 0.49 para a classe 2, 1.36 ± 0.41 para a classe 3 e 0.54 ± 0.79 para a classe 4. A densidade das fibras PGP-IR estavam significativamente ($p=0.001$) reduzidas nos pacientes das classes 3 e 4, quando comparados com os da classe 1. Os resultados obtidos sugeriram que a determinação da densidade linear das FNI, permite a detecção do envolvimento das fibras nervosas finas, contribuindo para o diagnóstico da neuropatia diabética, inclusive em estágios subclínicos, nos pacientes portadores de DM tipo 2, além de possibilitar a diferenciação entre o subgrupo classe 1 dos subgrupos classe 3 e 4. Foi constatado, também, comprometimento das fibras mielínicas grossas em 26 (53.06%) pacientes e da fibras finas em 49 (100%) pacientes, estabelecendo assim dois possíveis padrões de envolvimento de fibras nervosas no DM tipo 2, comprometimento associado das fibras grossas e finas e seletivo das fibras finas.



INTRODUÇÃO

1.1. APRESENTAÇÃO

A neuropatia diabética é uma complicação comum do diabetes melito (DM), associada à considerável morbidade e mortalidade (VINIK et al., 1992). Na neuropatia diabética podem ser acometidas as fibras amielínicas e as mielínicas grossas e finas, determinando padrões clínicos específicos (THOMAS & OCHOA, 1993). Quando a disfunção predomina nas fibras mielínicas grossas, ocorrem diminuição dos reflexos tendinosos profundos, um grau variável de fraqueza motora, anormalidades na discriminação de dois pontos, na sensibilidade vibratória e proprioceptiva. A perda da função das fibras mielínicas finas e amielínicas produzem distúrbios da apreciação da dor, temperatura e das funções autonômicas (BROWN & ASBURY, 1984; VINIK et al., 1992; THOMAS & OCHOA, 1993).

No DM a definição precisa do modelo de envolvimento das fibras finas e grossas, se seletivo e independente ou em associação progressiva, está para ser estabelecido. Alguns autores relataram envolvimento seletivo (LEVY, ABRAHAM, ABRAHAM, 1987; LE QUESNE, FOWLER, PARKHOUSE, 1990), enquanto outros, generalizado das fibras (DYCK et al., 1986b). A diferenciação das classes de fibras afetadas é possível através de testes funcionais e morfológicos específicos. A população das fibras mielínicas grossas é avaliada através das técnicas eletrofisiológicas de condução nervosa (GREENE et al., 1981; DORFMAN et al., 1983; WINEGRAD, SIMMONS, MARTIN, 1983) e das medidas do limiar da percepção vibratória (DYCK et al., 1978, FAGIUS & WAHREN, 1981;

HEIMANS, BERTELSMANN, VAN ROOY, 1986). A avaliação das fibras amielínicas e mielínicas finas inclui métodos tradicionais, como os testes quantitativos sensitivos do limiar da percepção térmica e dolorosa (DYCK et al., 1978; BERTELSMANN et al., 1985), o estudo morfométrico do nervo sural (BEHSE et al., 1975; OCHOA, 1978), a microneurografia intraneural (VALLBO et al., 1979), o reflexo cutâneo simpático (RCS) (SHAHANI et al., 1984), o teste quantitativo do reflexo axônico sudomotor (LOW, 1987a), o teste da função térmica reguladora da sudorese (STEWART, LOW, FEALEY, 1992). Estes métodos, entretanto, apresentam aplicabilidade clínica limitada, devido às dificuldades técnicas de execução (VALLBO et al., 1979) e à baixa especificidade (OCHOA, 1978; JAMAL et al., 1987). Em pacientes portadores de neuropatia diabética, os testes padrões de função autonômica, condução nervosa e sensitivos quantitativos, incluindo o limiar de percepção vibratória e térmica, falharam em demonstrar diferenças significativas na função das fibras mielínicas grossas e finas (VEVES et al., 1994). Como alternativa aos métodos tradicionais, surgiu um novo e promissor método de avaliação das fibras finas, baseado no processamento imunohistoquímico de fragmentos cutâneos, com o anticorpo policlonal anti produto do gene protéico 9.5 (PGP 9.5), e determinação da densidade linear das fibras intra-epidérmicas imunoreativas ao PGP 9.5 (PGP-IR) (WANG et al., 1990; KENNEDY et al., 1996; HOLLAND et al., 1997). O procedimento é minimamente invasivo, de baixa morbidade e custo (MCCARTHY et al., 1995), propicia redução do erro amostral pela retirada dos fragmentos de pele em locais previamente escolhidos, na dependência dos sintomas e dos

achados dos exames clínico e neurofisiológico, além de possibilitar melhor determinação da extensão proximal distal do envolvimento neuropático pela amostragem em mais de um local. Quando aplicado às neuropatias sensitivas de diferentes etiologias, apresentou eficiência diagnóstica em torno de 88% (MCARTHUR et al., 1998).

Especificamente, em relação às neuropatias sensitivas diabéticas, a quantificação imunohistoquímica das fibras nervosas amielínicas e mielínicas de fino calibre revelou-se útil na documentação do diagnóstico, da progressão da doença (KARANTH et al., 1989; SPRINGALL et al., 1991; LEVY et al., 1992; KENNEDY & WENDELSCHAFER-CRABB, 1993; PROPERZI et al., 1993; MCCARTHY et al., 1995) e na avaliação objetiva dos resultados terapêuticos em humanos e modelos animais (DIAMOND, HOLMES, COUGHLIN, 1992; ALBERS, WRIGHT, DAVIS, 1994).

No presente trabalho buscaremos demonstrar o valor do processamento imunohistoquímico da inervação cutânea com anticorpo policlonal anti-PGP 9.5, na detecção do envolvimento das fibras finas e diagnóstico de neuropatia, em 4 subgrupos de pacientes portadores de DM tipo 2, classificados previamente através de métodos clínicos e neurofisiológicos e de acordo com a ausência, presença e características clínicas da neuropatia. Buscaremos também definir se a avaliação isolada das fibras intra-epidérmicas PGP-IR, possibilita a identificação dos subgrupos de diabéticos, além de tentarmos estabelecer o modelo de envolvimento das fibras nervosas na neuropatia diabética, mediante a avaliação conjunta do estudo da condução nervosa (ECN) e das fibras intra-

epidérmicas PGP-IR. Para uma compreensão mais adequada do tema a ser desenvolvido, faremos algumas considerações gerais sobre a epiderme, DM e neuropatia diabética.

1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA EPIDERME

1.2.a. Tipos celulares da epiderme

A epiderme é constituída por dois tipos celulares: os queratinócitos e as células dendríticas. Os queratinócitos, à medida em que se diferenciam em células cornificadas definem as quatro camadas epidérmicas, basal, espinhosa, granulosa e córnea. A epiderme é separada da derme papilar pela membrana basal dermatoepidérmica, que contém em sua composição colágeno tipo IV e diversas glicoproteínas (MILNE, 1972).

1.2.b. Receptores sensoriais e fibras nervosas cutâneas

Em cada sistema sensorial, o contato inicial com o mundo externo ocorre através de células especializadas denominadas receptores sensoriais, que transduzem e codificam os estímulos em sinais neurais os quais permitem a interpretação do mundo físico exterior (KANDEL, SCHWARTZ, JESSELL, 1997). A especificidade do receptor a um tipo principal de energia de estímulo, define a

modalidade de toda a via sensorial, desde o receptor até o córtex (KANDEL et al., 1997).

O sistema sensorial somático medeia as sensações térmicas provocadas por estímulos frios ou quentes, as táteis, provocadas pela estimulação mecânica da superfície corporal; as proprioceptivas, provocadas pelo deslocamento dos músculos e das articulações; as dolorosas, provocadas por estímulos nocivos químicos, mecânicos ou térmicos. Estas sensações podem ainda se combinarem para produzir experiências sensoriais mais complexas (KANDEL et al., 1997).

Os receptores cutâneos corpusculares e as terminações nervosas livres são os dois tipos, morfologicamente distintos, de órgãos receptores sensitivos presentes na epiderme (CAUDA, 1973). As células de Merkel, representando os receptores cutâneos corpusculares mecânicos de adaptação lenta, estão situadas na base da epiderme e derme e são estruturadas para responderem à deformação mantida da superfície cutânea, desempenhando papel na transmissão da sensibilidade tátil e da pressão (WINKELMANN & BREATHNACH, 1973; LACOUR et al., 1991). As terminações nervosas livres originam-se a partir das fibras amielínicas ou mielínicas finas, que se ramificam extensamente na epiderme (NOVOTNY & GOMMERT-NOVOTNY, 1988; KARANTH et al., 1991; KENNEDY & WENDELSCHAFER-CRABB, 1993), constituindo os receptores sensoriais responsáveis pela percepção térmica e dolorosa (LIGHT & PERL, 1993). Os axônios amielínicos são os constituintes predominantes dos nervos cutâneos, de

três a cinco vezes mais numerosos que as fibras mielínicas. (IGGO & ANDRES, 1982; MUNGER & IDE, 1988).

Em seres humanos, dados experimentais com microneurografia, indicam dois tipos de receptores térmicos cutâneos, um para o frio e outro para o calor. Os receptores para o frio relacionam-se às fibras nervosas mielínicas finas e os receptores para o calor às fibras amielínicas (MACKENZIE et al., 1975; OCHOA & TOREBJÖRK, 1989; LIGHT & PERL, 1993). Os receptores para a dor, unidades aferentes primárias que sinalizam estímulos suficientemente intensos para produzirem danos teciduais, relacionam-se às fibras amielínicas, e em menor escala, às mielínicas finas (MACKENZIE et al., 1975; MUNGER & IDE, 1988; LIGHT & PERL, 1993). O mais comum, relacionado a aproximadamente 80% do total de fibras amielínicas (KANDA et al., 1991), o receptor polimodal, responde a mais de uma forma de energia, ou seja, à mecânica, química ou térmica (LIGHT & PERL, 1993) e apresenta campos receptivos que variam de 1mm a 1cm (TOREBJÖRK & HALLIN, 1974).

1.2.c. Características morfológicas da inervação cutânea

No decorrer dos últimos trinta anos, a avaliação das fibras epidérmicas apresentaram uma longa e controvertida série de estudos. Alguns rejeitando a sua existência (BREATHNACH, 1977), outros a confirmando, porém restringindo-as às camadas basais da epiderme (CHOUCHKOV, 1974; CAUDA, 1980) e, finalmente, estudos que definiram a sua presença em diferentes níveis da epiderme

(NOVOTNY & GOMMERT-NOVOTNY, 1988; WANG et al., 1990; KARANTH et al., 1991; KENNEDY & WENDELSCHAFER- CRABB, 1993; HILLIGES, WANG, JOHANSSON, 1995).

As fibras nervosas intra-epidérmicas (FNI) representam extensões dos nervos sensitivos, amielínicos e finamente mielinizados, do plexo neural subepidérmico (PNS), os quais penetram na epiderme, distribuindo-se através da camadas basal, espinhosa e granulosa (KARANTH et al., 1991; KENNEDY & WENDELSCHAFER- CRABB, 1993; HILLIGES et al., 1995; KENNEDY et al., 1996). KENNEDY et al. (1996) estabeleceram cinco tipos morfológicos de terminações nervosas na epiderme, diferindo em comprimento, padrão de ramificação e território de projeção: a) fibras verticais únicas com ramos terminais curtos, b) fibras curtas que se ramificam imediatamente após entrarem na epiderme, c) nervos com ramos múltiplos antes ou após transporem a membrana basal penetrando na epiderme a distâncias variáveis d) fibras verticais únicas com um ou dois ramos na camada espinhosa e) fibras únicas, curtas, que terminam na camada de células basais. O significado funcional dos diferentes grupos morfológicos não foi estabelecido (KENNEDY et al., 1996).

1.2.d. Métodos de quantificação dos nervos cutâneos

Na tentativa de avaliar a inervação cutânea, estudos empregando diferentes técnicas, impregnação pela prata (NOVOTNY & GOMMERT-

NOVOTNY, 1988), coloração pelo azul de metileno (ARTHUR & SHELLEY, 1959) e, mais recentemente, marcadores imunohistoquímicos (DALSGAARD et al., 1983; BJÖRKLUND et al., 1986; DALSGAARD, RYDH, HAEGERTRAND, 1989; TERENCEHI et al., 1991; KENNEDY et al., 1996), foram utilizados no decorrer das últimas décadas. Os métodos de quantificação dos nervos cutâneos evoluíram em paralelo com o avanço da tecnologia computacional de imagens e da imunohistoquímica, em particular com a recente disponibilidade de anticorpos contra peptídeos neurais específicos (WILSON et al., 1988; KARANTH et al., 1989; KARANTH et al., 1991; TERENCEHI et al., 1991) e marcadores neurais gerais (THOMPSON et al., 1983; HACKER et al., 1985). Diferentes peptídios neuroativos, demonstrados por estudos imunohistoquímicos, foram localizados nas fibras nervosas cutâneas, atuando como mediadores ou moduladores da transmissão nervosa (GIBBINS, WATTCHOW, COVENTRY, 1987; DALSGAARD et al., 1989). Nas fibras sensitivas amielínicas aferentes, expressam-se, principalmente, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e a substância P, envolvidos na percepção dolorosa (DUBNER & BENNETT, 1983), nos processos inflamatórios neurogênicos (FOREMAN, 1987) e como fatores tróficos no crescimento de fibroblastos e queratinócitos (NILSSON, VON EULER, DALSGAARD, 1985; TANAKA et al., 1988). Os marcadores neurais gerais, que se associam a todos os tipos de fibras nervosas, incluem a enolase neurônio específica, os neurofilamentos protéicos e o PGP 9.5 (THOMPSON et al., 1983; HACKER et al., 1985; GULBENKIAN, WHARTON, POLAK, 1987).

A proteína neural de localização citoplasmática, o PGP 9.5, descrita por JACKSON & THOMPSON em 1981, abriu a possibilidade de estudos imunohistoquímicos refinados envolvendo células neuroendócrinas e neurais. O PGP 9.5 é uma hidrolase ubiquitina, não associada com elementos estruturais e secretórios das células, com significado funcional desconhecido (WILKINSON et al., 1989), expressa em todos os tipos de fibras nervosas aferentes e eferentes (GULBENKAIN et al., 1987; LUNDBERG et al., 1988; DALSGAARD et al. 1989; KARANTH et al., 1991).

A imunoreação ao PGP 9.5 é muito consistente, quantitativa e qualitativamente para a visualização das fibras nervosas cutâneas (DALSGAARD et al., 1989; WANG et al., 1990; KARANTH et al., 1991). As fibras nervosas autonômicas e sensitivas PGP-IR, são em maior número e melhor definidas do que aos demais marcadores neurais gerais e peptídeos específicos (DALSGAARD et al., 1989; KARANTH et al., 1991; MOLINA et al., 1992; KENNEDY, WENDELSCHAFER-CRABB, BRELJE, 1994). Em biópsia de pele de indivíduos normais, a imunoreatividade ao PGP 9.5 é observada intensamente nas terminações nervosas livres da derme e epiderme, em torno dos folículos capilares, das glândulas sudoríparas, dos feixes nervosos relacionados aos vasos sanguíneos e dos músculos eretores dos pelos (DALSGAARD et al., 1989; KARANTH et al., 1989; LEVY et al., 1989; KARANTH et al., 1991; LEVY et al., 1992; MOLINA et al., 1992; PROPERZI et al., 1993; WALLENGREN et al., 1995).

1.3. DIABETE MELITO

1.3.a. Definição

O DM é um grupo de doenças metabólicas decorrentes da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina exercer adequadamente os seus efeitos. Caracteriza-se pela presença de hiperglicemia e por complicações crônicas microvasculares, macrovasculares e neurológicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997).

1.3.b. Aspectos epidemiológicos

O DM é um dos mais importantes problemas mundiais de saúde da atualidade, em termos do número de pessoas afetadas, incapacitação, mortalidade prematura, custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações.

A prevalência do DM tende a aumentar, devido à longevidade progressiva das populações e modificações socioculturais induzidas pela urbanização (ZIMMET, 1992; ATKINSON & MACLAREN, 1994), com projeções da existência nos anos 2000 e 2010, respectivamente, de 175 milhões e 239 milhões de diabéticos em todo o mundo.

O DM tipo 1 é mais freqüente entre os descendentes de europeus do norte e menos comum em outros grupos raciais, como negros, nativos americanos

e asiáticos (DIABETES EPIDEMIOLOGY RESEARCH INTERNATIONAL MORTALITY STUDY GROUP, 1991). As diferenças de incidência em populações racialmente distintas são justificadas pela suscetibilidade genética, predominante no tipo 1; entretanto, a dieta e outros fatores ambientais podem também desempenhar papéis importantes (MACLAREN & ATKINSON, 1992).

O DM tipo 2 é a forma mais comum da doença, presente em 85-90% dos diabéticos dos países desenvolvidos. Apresenta uma distribuição global e sua prevalência varia de país para país, em diferentes grupos étnicos no mesmo país, e entre os mesmos grupos étnicos submetidos a migrações interna e externa. O desenvolvimento do DM tipo 2 está associado à interação de fatores genéticos e ambientais. As menores taxas de prevalência ocorrem entre os esquimós e as populações do oriente e as maiores, entre os índios americanos, as populações urbanizadas das ilhas do Pacífico e os emigrantes asiáticos (ZIMMET, 1982).

1.3.c. Classificação do Diabete melito

A nova classificação proposta pela Associação Americana de Diabete (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997) estabelece :

- a) DM tipo 1 - Mediação imune e Idiopática
- b) DM tipo 2
- c) Outros tipos específicos de DM

Diabetes melito tipo 1- Mediação imune

Esta forma de diabetes refere-se a um processo patológico em particular, caracterizado pela destruição imunológica das células beta pancreáticas de indivíduos geneticamente suscetíveis (ATKINSON & MACLAREN, 1994). Indivíduos com alto risco de desenvolverem este tipo de diabetes podem, freqüentemente, ser identificados por marcadores genéticos e evidências sorológicas de processo patológico auto-imune ocorrendo nas ilhotas pancreáticas. Os marcadores da destruição auto-imune das células beta pancreáticas incluem os auto-anticorpos da insulina, das células das ilhotas do pâncreas, da descarboxilase do ácido glutâmico e das fosfatases tirosinas (CHRISTIE et al., 1992; MYERS, RABIN, ROWLEY, 1995). Um ou mais destes auto-anticorpos estão presentes em 85% a 90% dos indivíduos no momento da detecção da hiperglicemia de jejum. Esta doença também apresenta forte associação com os antígenos de histocompatibilidade (CANTOR et al., 1995).

Nesta forma de diabetes, os pacientes geralmente são jovens e magros. O início do quadro é abrupto, com tendência à cetoacidose e há, na maioria das vezes, dependência absoluta à insulina exógena. A taxa de destruição das células beta é muito variável, sendo muito rápida em alguns indivíduos, principalmente crianças e adolescentes, e lenta em outros, usualmente adultos (ZIMMET et al., 1994). A destruição auto-imune das células beta do pâncreas, além de apresentar predisposição genética múltipla, relaciona - se também com fatores ambientais, ainda pouco definidos (MACLAREN & ATKINSON, 1992).

Diabete melito tipo 1- Idiopática

Em algumas formas de DM tipo 1, a etiologia não é definida. Alguns pacientes, usualmente de origem africana ou asiática, apresentam insulinopenia permanente, propensão à cetoacidose, ausência de evidências imunológicas contra as células beta pancreáticas, não associação aos antígenos de histocompatibilidade e caráter fortemente hereditário (BANERJI & LEBOVITZ, 1989).

Diabete melito tipo 2

Esta forma de diabete refere-se a uma condição muito mais prevalente, em que a causa é uma combinação da inadequada resposta secretória compensatória da insulina, com a resistência à ação da insulina (TURNER et al., 1979; POLONSKY, STURIS, BELL, 1996). Os indivíduos portadores desta forma de diabete, freqüentemente, não dependem da administração de insulina exógena para a sua sobrevivência. Provavelmente existem diferentes etiologias, ainda não definidas, para o DM tipo 2, embora a destruição auto-imune das células beta do pâncreas não ocorra. A maioria dos pacientes são obesos, e a obesidade provoca algum grau de resistência à insulina (BOGARDUS et al., 1985; POLONSKY et al., 1996). O risco de se desenvolver DM tipo 2 aumenta com a idade, obesidade, e ausência de atividade física (ZIMMET, 1992). Ocorre mais freqüentemente em mulheres com DM gestacional prévia, indivíduos com hipertensão ou dislipidemia, e sua freqüência varia em diferentes subgrupos étnicos (FUJIMOTO et al., 1987;

JAMEEL, 1986; MCLEOD & TUCK, 1987). A prevalência das anormalidades dos testes das funções autonômicas associa-se com a duração do diabetes e idade do paciente (JEYARAJAH et al., 1986).

1.4.c. Patogênese

A causa da neuropatia diabética é ainda desconhecida. A instalação do processo neuropático no DM, provavelmente requer a interação de alterações metabólicas diretas e indiretas da deficiência de insulina ou hiperglicemia, com fatores ambientais e genéticos (HARATI, 1987; THOMAS & TOMLINSON, 1993). As discussões recentes estão focadas na contribuição dos fatores metabólicos (GREENE et al., 1992), vasculares (LOW, 1987b) e neurotróficos (FARADJI & SOTELO, 1990).

As hipóteses metabólicas envolvem principalmente a hiperglicemia e o acúmulo de poliol. A hiperglicemia crônica é o agente principal nas fases iniciais das complicações da doença. Em animais de laboratório e em seres humanos, as perdas e danos progressivos nas fibras nervosas estão associados ao grau e ou duração da hiperglicemia (GREENE et al., 1992). O controle intensivo da hiperglicemia reduz a incidência da neuropatia clínica em torno de 60% (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP, 1993)

O acúmulo de sorbitol e frutose, originados da glicose não utilizada, através da via do poliol, nos nervos periféricos dos diabéticos conduz a uma cascata de eventos que incluem a redução do nível de mio-inositol nos nervos,

redução da atividade da adenosina trifosfatase sódio-potássio das membranas, acúmulo de sódio intra-neural, redução da velocidade de condução nervosa (VCN) e alterações estruturais dos nervos (GREENE et al., 1992). As evidências dessa hipótese em humanos não foi convincente. DYCK et al. (1980) não encontraram correlação entre neuropatia diabética e o conteúdo de sorbitol dos nervos.

A hipótese vascular considera que os fatores responsáveis pela patogênese da neuropatia diabética relacionam-se à redução do fluxo sanguíneo, da tensão de oxigênio e do aumento da resistência vascular endoneural (LOW, 1987b; GIANNINI & DYCK, 1994; TESFAYE, MALIK, WARD, 1994). Diversos fatores metabólicos, como aumento da atividade dos radicais livres do oxigênio (LOW & NICKANDER, 1991; CAMERON & COTTER, 1995), redução da atividade do óxido nítrico endotelial (BUCALA, TRACEY, CERAMI, 1991; KIHARA & LOW, 1995), formação dos produtos finais da glicosilação avançada (BROWNLEE, 1994), parecem ser os responsáveis pelos danos microvasculares observados no DM. As evidências patológicas que suportam a teoria vascular da neuropatia diabética incluem reduplicação da membrana basal e degeneração pericítica (GIANNINI & DYCK, 1995), edema e proliferação das células endoteliais (LLEWELYN et al., 1991; GIANNINI & DYCK, 1994), trombos plaquetários oclusivos e lesões nervosas proximais isquêmicas multifocais (DYCK et al., 1986a). Há uma relação direta entre o grau de doença endoneural dos vasos e a severidade clínica da neuropatia e os danos estruturais das fibras nervosas (GIANNINI & DYCK, 1995).

Nos últimos anos, a teoria que implica a redução da concentração endógena dos fatores neurotróficos, particularmente dos fatores de crescimento neural e de crescimento insulino semelhante, na patogênese da neuropatia diabética tem recebido atenção especial (FARADJI & SOTELO, 1990; SAID et al., 1994; THOMAS, 1994). Níveis séricos reduzidos do fator de crescimento neural foram demonstrados em pacientes com neuropatia diabética, correlacionando-se com a severidade da doença (FARADJI & SOTELO, 1990).

1.4.d. Classificação da neuropatia diabética

Diversos esquemas de classificação foram propostos para a neuropatia diabética, normalmente distinguindo formas simétricas difusas, de formas focais e multifocais (CLEMENTS, 1979; BROWN & ASBURY, 1984; THOMAS, 1986; HARATI, 1987). Não está claro se as diferentes síndromes neuropáticas representam um espectro contínuo da doença ou são, de fato, entidades nosológicas distintas (VINIK et al., 1992). A classificação proposta por THOMAS (1986) subdivide as neuropatias em formas simétricas, incluindo as sensitivas ou sensitivo-motoras, as autonômicas e as motoras proximais e em assimétricas, incluindo as multifocais e focais.

Neuropatias sensitivo - motoras ou sensitivas distais

As neuropatias sensitivo - motoras ou sensitivas distais são as formas mais freqüentes. BROWN & ASBURY (1984) sugeriram que as neuropatias

sensitivas distais sejam subclassificadas em neuropatias de fibras mielínicas finas ou grossas, de acordo com o tipo predominante de fibra envolvida. O modelo preciso de envolvimento das diferentes classes de fibras nervosas, na neuropatia diabética, ainda não está estabelecido (HARATI, 1987; HARATI, 1992; VINIK et al., 1992; THOMAS & TOMLINSON, 1993). Os pacientes com envolvimento mais acentuado das fibras sensitivas mielínicas grossas apresentam comprometimento evidente dos reflexos tendinosos e das modalidades sensitivas proprioceptivas (BROWN & ASBURY, 1984; VINIK et al., 1992), resultando em ataxias sensitivas severas. Nas neuropatias de fibras finas, as percepções dolorosa e térmica estão alteradas, preferencialmente em membros inferiores, em distribuição de botas, os reflexos tendinosos profundos e a sensibilidade vibratória e postural são minimamente afetados (SAID, SLAMA, SELVA, 1983; VINIK et al., 1992). As neuropatias diabéticas de fibras finas são clinicamente divididas em três tipos :

a) Neuropatia de fibras finas com envolvimento associado das fibras grossas

Constitui o subgrupo mais comum, com sintomas e sinais caracterizados por disestesias, parestesias, diminuição da sensibilidade térmica e dolorosa, redução do reflexo aquileu e da sensibilidade vibratória em hálux. A maioria dos pacientes deste subgrupo não apresentam disfunção autonômica generalizada, exceto impotência erétil, que pode ser um sintoma precoce (FOWLER et al., 1988; STEWART & LAL, 1990). No ECN, a amplitude do potencial de ação nervoso sensitivo (PANS) do nervo sural, freqüentemente, é anormal, refletindo a disfunção moderada associada das fibras mielínicas grossas

(GIULIANI, STEWART, LOW, 1997). A análise morfométrica da biópsia do nervo sural demonstra perda moderada das fibras mielínicas grossas e uma depleção severa das fibras amielínicas (BROWN, MARTIN, ASBURY, 1976).

b) Neuropatia de fibras finas pseudosiringomiélica

Neste subgrupo, os pacientes apresentam alterações severas das modalidades sensitivas térmica e dolorosa, com preservação das demais; dissociação característica da siringomielia. Os sintomas e sinais autonômicos, bem como as úlceras plantares e artropatias neurogênicas são freqüentes nesta população de diabéticos. A análise morfométrica do nervo sural mostra severa perda das fibras nervosas amielínicas e mielínicas finas e leve das fibras mielínicas grossas (SAID et al., 1983).

c) Neuropatia dolorosa aguda

A neuropatia dolorosa aguda ocorre predominantemente em diabéticos do sexo masculino, no início da doença ou imediatamente após a instituição da terapia com insulina ou agentes hipoglicemiantes. É caracterizada por parestesias e disestesias distais, associadas à perda de peso, impotência erétil, insônia e depressão (ELLENBERG, 1974; ARCHER et al., 1983). Na biópsia do nervo sural, evidências de degeneração ativa das fibras mielínicas e amielínicas são observadas (ARCHER et al., 1983).

1.4.e. Métodos de avaliação das fibras nervosas na neuropatia diabética

Avaliação das fibras mielínicas grossas

Estudo da condução nervosa

O ECN reflete primariamente o estado funcional da fibras nervosas mielínicas de grosso calibre. Resultados dentro dos limites da normalidade não afastam a possibilidade diagnóstica de neuropatia, envolvendo outras classes de fibras (BUCHTHAL & ROSENFALCK, 1971; ARCHER et al., 1983). Em pacientes diabéticos, os nervos das extremidades inferiores são acometidos mais precocemente e as anormalidades sensitivas são mais freqüentes do que as motoras (KIMURA, YAMADA, STEVLAND, 1979). As alterações eletrofisiológicas mais freqüentemente observadas são o decréscimo da amplitude do PANS (REEVES et al., 1984), a redução de leve para moderada na VCN dos nervos sensitivos e motores e prolongamento discreto das latências distais e da onda F (OF) (KIMURA et al., 1979).

Em pacientes com sinais e sintomas clínicos, a amplitude das respostas evocadas geralmente se correlaciona com o prejuízo funcional subsequente ao bloqueio de condução ou degeneração axonal (BEHSE, BUCHTHAL, CARLSEN, 1977). As anormalidades no ECN podem ser observadas, mesmo em pacientes diabéticos sem sinais e sintomas de alterações neuropáticas (DOWNIE & NEWELL, 1961).

Avaliação das fibras finas

O comprometimento das fibras mielínicas finas e amielínicas pode ser determinado através de métodos funcionais sensitivos quantitativos (DYCK et al., 1978; SAID et al., 1983), microneurografia (GIULIANI et al., 1997), potenciais evocados a laser (BROMM, FRIELING, LANKERS, 1991), testes autonômicos (SHAHANI et al., 1984; STEWART et al., 1992; LOW, 1997), métodos morfométricos (BEHSE et al., 1977) e imunohistoquímicos (MCCARTHY et al., 1995).

Testes sensitivos quantitativos

Os testes sensitivos quantitativos, empregando estimulação cutânea elétrica e térmica controlada, permitem a medida das funções aferentes das vias somatossensitivas servidas pelas fibras finas. Em pacientes diabéticos com e sem sintomas neuropáticos, diversos estudos têm demonstrado anormalidades do limiar térmico (BERTELSMANN et al., 1985; HEIMANS et al., 1986; JAMAL et al., 1987) e doloroso (LE QUESNE & FOWLER, 1986). Entretanto, a sensibilidade dos testes sensitivos quantitativos nas neuropatias de fibras finas é ainda assunto de grande controvérsia, com variações reportadas de 40% a 60% (JAMAL et al., 1987; SMITH, ALI, FOWLER, 1991). Estudos para a confirmação da real utilidade destes testes ainda são necessários, segundo DYCK et al. (1996).

Microneurografia

A microneurografia consiste na obtenção de registros, a partir da inserção de agulhas eletrodos em fibras nervosas isoladas ou em fascículos nervosos. Pode ser usado para estudar a função das fibras aferentes sensitivas finas e eferentes simpáticas. É um método invasivo, demorado, com resultados mais adequados no estudo da fisiologia normal dos nervos periféricos do que na detecção de anormalidades (GIULIANI et al., 1997).

Potencial evocado somatosensitivo

O recente desenvolvimento de captação de potenciais evocados corticais, a partir de estimulação, por pulsos de laser, das fibras finas epidérmicas permitiu o estudo seletivo das vias noceptivas, em suas porções centrais e nas periféricas (BROMM et al., 1991).

Testes autonômicos

Os testes autonômicos são utilizados na avaliação das neuropatias de fibras finas. Os principais componentes testados são as fibras simpáticas pós-ganglionares sudomotoras (LOW, 1997). Os testes de envolvimento sudomotor incluem o reflexo axônico sudomotor, resposta cutânea simpática e teste da função reguladora térmica da sudorese.

O reflexo axônico sudomotor testa quantitativamente a função do axônio sudomotor posganglionar e das glândulas sudoríparas. A iontoforese de acetilcolina, com estímulo de corrente constante de 2 mA ativa o terminal nervoso.

O impulso viaja retrogradamente atingindo o ponto de ramificação, para se deslocar para outro terminal nervoso, onde causa liberação de acetilcolina. Este neurotransmissor evoca uma resposta sudorífica, por ligação aos receptores muscarínicos nas glândulas sudoríparas tipo ecrinas. As respostas anormais incluem ausência, redução ou aumento da atividade sudorípara (STEWART et al., 1992).

O teste da função reguladora térmica da sudorese é realizado, observando-se o padrão de sudorese dos pacientes em cabines aquecidas (STEWART et al., 1992). Nas neuropatias de fibras finas, este teste pode ser anormal (STEWART et al., 1992; GIULIANI, TOBIN, LOW, 1996), indicando o envolvimento conjunto das fibras sensitivas e autonômicas.

O RCS consiste na medida da alteração da voltagem da superfície da pele, decorrente da atividade das fibras simpáticas sudomotoras ativadas pela estimulação elétrica. O RCS é um potencial bifásico com um pico inicial negativo. É considerado anormal quando ausente (SHAHANI et al., 1984; SOLIVEN et al., 1987).

Avaliação imunohistoquímica de biópsia de pele

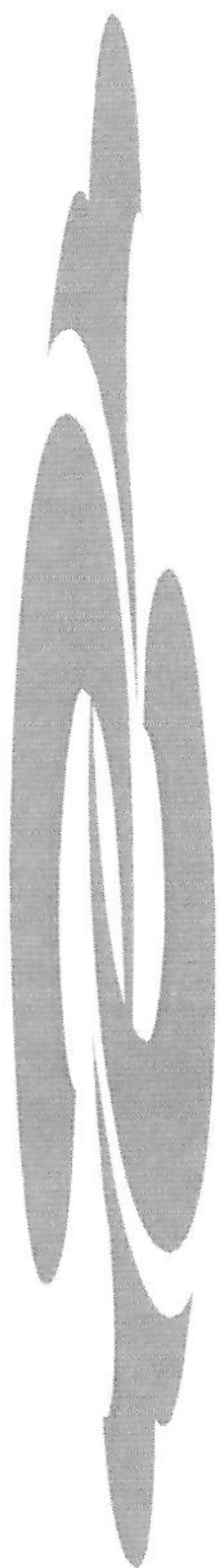
A determinação da distribuição da imunoreatividade aos peptídeos neuroativos cutâneos e ao PGP 9.5, na biópsia de pele, trata-se de um método simples e direto de avaliação da integridade funcional ou morfológica das fibras nervosas autonômicas e sensitivas periféricas, que geralmente estão afetadas na neuropatia diabética (LEVY et al., 1992; PROPERZI et al., 1993; KENNEDY et al.,

1996). Estudos realizados em pacientes diabéticos, constataram redução acentuada das fibras imunoreativas ao PGP 9.5, ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, à substância P e ao polipeptídeo intestinal vasoativo (LEVY et al., 1989; LINDBERGER et al., 1989). A quantificação das fibras epidérmicas pelo PGP 9.5 em pacientes diabéticos, revelou que, além da redução da inervação cutânea, alguns nervos terminam abruptamente abaixo da membrana basal, achado não verificado nos controles normais (KENNEDY et al., 1996), com manutenção do gradiente proximal-distal de fibras (LEVY et al., 1989, MCCARTHY et al., 1995; MCARTHUR et al., 1988).

Avaliação das fibras finas e grossas

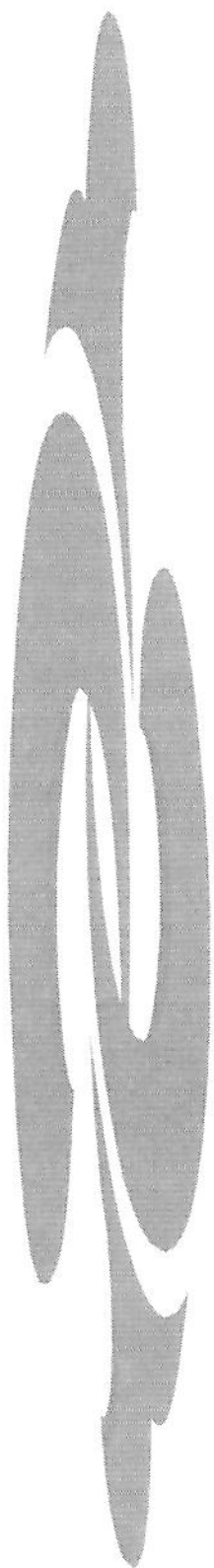
Morfometria do nervo sural

A avaliação morfométrica da biópsia do nervo sural, em pacientes diabéticos, apresentou resultados diversos: a) perdas de fibras mielínicas e amielínicas de todos os diâmetros (BEHSE et al., 1977; ARCHER et al., 1983; DYCK et al., 1986b; LLEWELYN et al., 1991), b) perda predominante de fibras mielínicas finas com excessiva regeneração de fibras amielínicas (BROWN et al., 1976), c) perda severa das fibras amielínicas, antecedendo a das fibras mielínicas grossas (SAID et al., 1983). Esses estudos têm sido úteis na determinação da distribuição das populações de fibras (THOMAS, BERTHOLD, OCHOA, 1993), porém a técnica é invasiva, difícil de ser realizada, além de se correlacionar, às vezes, pobremente com o quadro clínico (BEHSE et al., 1975; OCHOA, 1978).



OBJETIVOS

-
- 2.1. Determinar a validade do processamento imunohistoquímico da inervação cutânea com anticorpo policlonal anti PGP 9.5, na avaliação do envolvimento das fibras finas e no diagnóstico de neuropatia, em pacientes portadores de DM tipo 2.
- 2.2. Verificar se a densidade linear das fibras intra-epidérmicas imunoreativas ao PGP 9.5 permite, isoladamente, a diferenciação entre os subgrupos de diabéticos, classificados previamente por métodos clínicos e neurofisiológicos.
- 2.3. Verificar o modelo de envolvimento das fibras nervosas mielínicas e amielínicas no DM tipo 2, se seletivo ou generalizado, através do estudo imunohistoquímico das fibras intra-epidérmicas e do estudo da condução nervosa.



MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Cômite de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e todos os indivíduos estudados deram seu consentimento por escrito, previamente, à realização dos procedimentos.

3.1. POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA

3.1.a. Grupo paciente

Pacientes com diagnóstico de DM tipo 2, de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabete (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997), com ou sem neuropatia conhecida, em acompanhamento no Ambulatório de Clínica Médica e Endocrinologia, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.1.b. Grupo controle

Médicos, técnicos de apoio operacional da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e participantes do grupo da terceira idade do serviço social da indústria de Campinas .

3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram avaliados quarenta e nove indivíduos portadores de DM tipo 2 e dezoito indivíduos saudáveis, pareados por idade, sexo e duração da doença, no caso dos diabéticos. Os critérios de Inclusão envolveram:

1. Adesão voluntária à pesquisa
2. Disponibilidade para a realização de exame clínico neuromuscular, neurofisiológico e biópsia de pele.
3. Idade entre 45 e 65 anos, inclusive.
4. Exame clínico neuromuscular e neurofisiológico dentro dos limites da normalidade no grupo controle.
5. DM diagnosticada, segundo os critérios da Associação Americana de Diabete (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997).

Os critérios de exclusão envolveram :

1. Doenças ou outras condições (etilismo, acromegalia, amiloidose, neoplasias, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, hipotireoidismo, collagenoses, porfíria, disproteinemias, uremia, infecções crônicas, alterações hepáticas ou renais, exposição a metais pesados, uso de drogas neurotóxicas), com exceção do DM, que predisponham ao aparecimento de neuropatias, detectadas pela história clínica e exames laboratoriais.

-
2. Clínica e/ou exames complementares sugestivos de miopatia, radiculopatia, multineuropatia, mononeuropatia focal, trauma em membros superiores e/ou inferiores.
 3. Doença vascular periférica (venosa ou arterial), de severidade suficiente para expressar-se por sintomas e sinais do tipo claudicação intermitente, cianose.

3.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

3.3.a. Anamnese e exame neuromuscular

Realizados segundo roteiros previamente definidos por DYCK et al. 1980 (ANEXO 1). A escala de sintomas neurológicos foi considerada anormal quando maior ou igual a 1, e a escala de sinais neurológicos, quando maior ou igual a 2. Na anamnese, utilizamos termos relacionados à sensibilidade, de acordo com as definições recomendadas pelo subcomitê da INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (1979) :

Dor - experiência emocional e sensorial desagradável, associada a danos teciduais efetivos ou potenciais.

Disestesia - Sensação anormal, desagradável, induzida por estímulo natural, que normalmente não provoca dor.

Parestesia - Sensações subjetivas de formigamento, picadas, queimação, frio, ardor, que se desenvolvem na ausência da estimulação natural dos receptores sensoriais.

Analgesia - Ausência de dor à estimulação nociva.

Hiperalgisia - Sensibilidade aumentada à estimulação nociva.

Hiperestesia - Sensibilidade aumentada à estimulação.

Hipoalgisia - Sensibilidade diminuída à estimulação nociva.

Hipoestesia - Sensibilidade diminuída à estimulação.

Nociceptor - Receptor preferencialmente sensível a estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. As fibras amielínicas (fibras C) e mielínicas de fino calibre (fibras A δ) foram englobadas sob a denominação comum de fibras finas.

3.3.b. Testes clínico laboratoriais-

Os testes laboratoriais foram realizados para a identificação das principais patologias, responsáveis por comprometimentos neuropáticos e para o estabelecimento do grau de controle do DM (ANEXO 2). O valor utilizado da hemoglobina glicosilada foi a média aritmética das três últimas medidas, quando disponíveis.

3.3.c. Avaliação autonômica

A função sudomotora pós ganglionar foi testada através do RCS na região plantar do pé direito, segundo técnica definida por SOLIVEN et al., 1987 (ANEXO 3). A resposta foi considerada anormal se ausente após 4 estímulos e normal, se presente.

3.3.d. Estudo da condução nervosa

O ECN foi realizado pelo mesmo neurofisiologista (SGG), utilizando eletrodos de superfície e de acordo com normas definidas por KIMURA, 1983 e OH, 1993 a (ANEXO 4). Atenção especial foi dada ao posicionamento dos eletrodos de registro e de estimulação, às medidas das distâncias, ao uso de estimulação supramáxima e à manutenção da temperatura dos membros entre 32-34°C.

Os parâmetros estabelecidos no estudo da condução nervosa motora (ECNM) dos nervos ulnar direito, fibular direito e tibial posterior esquerdo foram a latência distal motora, a VCM, a amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC) e a latência da OF. No estudo da condução nervosa sensitiva (ECNS) dos nervos radial direito, ulnar direito e sural esquerdo também foram definidos os parâmetros latência distal sensitiva (LDS), velocidade de condução nervosa sensitiva (VCS) e amplitude do PANS. Os valores encontrados foram

comparados com valores de referências de normalidades obtidos em estudos anteriores de OH (1993b) e GARIBALDI (1996)(ANEXO 4). O ECN foi considerado alterado, quando apresentava anormalidades em um ou mais parâmetros, em dois ou mais nervos dos avaliados.

3.3.e. Avaliação da biópsia de pele

Obtenção do fragmento de pele

As biópsias de pele foram realizadas, sob técnica estéril, com punch (Laboratórios Stiefel) de 3 mm de diâmetro, após anestesia local, com cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Ariston Industrias Químicas, Brasil). O local definido para a realização da biópsia foi a porção distal lateral da perna direita, 10 cm acima do maléolo lateral.

Processamento imunohistoquímico da pele

As biópsias de pele foram fixadas em solução de Zamboni (ZAMBONI & DE MARTINO, 1967) por 18 horas a 4° C, a seguir transferidas para solução de sucrose a 20% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0.1M à 4°C, até serem seccionadas. Cortes congelados de 30µm de espessura, incluídos em gelatina (Tissue-Tek, Miles Inc., USA) foram obtidos utilizando-se o criostato (cryocut 1800, Reichert-Jung), fixados em lâminas silanizadas e mantidos a 4°C até o processamento imunohistoquímico. Para a imunomarcção, os cortes foram

hidratados com PBS (0.1M), durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após, foram incubados durante 60 minutos, com solução bloqueadora (4% de albumina bovina (Sigma, St. Louis, Mo), 0.5 % de Triton x-100 (Sigma, St. Louis, Mo) em PBS 0.1 M) à temperatura ambiente. A seguir, incubados, em anticorpo primário policlonal anti PGP 9.5 (Ultraclone, Wellow, UK; 1:1000 em solução bloqueadora) durante 16 horas a 4° C. Após 3 lavadas, com PBS por 5 minutos, foram colocados no anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado à Rodamina (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 1:100 em PBS 0.1M) por 60 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram lavados por 5 minutos em PBS 0.1 M e montados em meio de montagem para fluorescência (DABCO, Sigma, St. Louis, Mo) sob lamínula.

Análise do padrão de distribuição e quantificação das fibras nervosas intra-epidérmicas

O número de FNI, de cada bloco biópsiado, foi avaliado por um único observador (SGG), não instruído para o estado clínico da amostra. Para a análise do padrão de distribuição das fibras intra-epidérmicas PGP positivas, os cortes foram observados utilizando-se um sistema confocal (BioRad-MRC 1024 uv), equipado com microscópio invertido (Axiovert 100, Zeiss) e laser Argônio-Kriptônio. O comprimento de 568 nm foi utilizado para excitar a rodamina. Os parâmetros de brilho, contraste e abertura de íris foram mantidos constantes, para todas as observações. Foram utilizadas as objetivas 40X 1.4 NA (imersão com

água) e 63X 1.4 NA (imersão com óleo). Cortes confocais foram obtidos e reconstruídos utilizando-se o software "Processing" do fabricante. Para a análise quantitativa do número de fibras intra-epidérmicas, por milímetro de epiderme (densidade linear), os cortes foram observados em microscópio comum de epifluorescência (Nikon EFD-3), objetiva de 40X 1.4 NA, imersão em água, com ocular graduada (Zeiss 464063-9902). A densidade linear foi obtida pela divisão do número de fibras que atravessaram a membrana basal, pelo comprimento em milímetros da epiderme analisada.

3.4. MÉTODO DIAGNÓSTICO DA NEUROPATIA DIABÉTICA

Os critérios para o diagnóstico da neuropatia diabética basearam - se no modelo proposto por DYCK (1988), com algumas modificações. Os critérios mínimos envolveram, em uma primeira fase, a presença de sinais e/ou sintomas neuropáticos simétricos, predominando nos segmentos distais dos membros inferiores e a ocorrência de ao menos duas anormalidades entre o ECN, as escala de sinais e sintomas neurológicos e o RCS. Em uma segunda fase foi introduzida a densidade linear das fibras intraepidérmicas como mais um exame auxiliar de detecção diagnóstica das neuropatias diabéticas. Os critérios mínimos, nesta fase, envolveram a presença de sinais e/ou sintomas neuropáticos simétricos, predominando nos segmentos distais dos membros inferiores e a ocorrência de ao menos duas anormalidades entre o ECN, as escala de sinais e sintomas neurológicos, o RCS e a densidade linear das fibras intra-epidérmicas. A eficiência

diagnóstica da densidade linear das fibras cutâneas PGP-IR na determinação da neuropatia diabética, foi definida a partir do número (porcentagem) dos pacientes portadores de DM tipo 2, em que a densidade linear das FNI ou permitiu o diagnóstico de neuropatia diabética, não obtido anteriormente pelas avaliações clínica e neurofisiológica ou reafirmou o diagnóstico, realizado previamente por estes métodos.

3.5. MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DO ENVOLVIMENTO NEUROPÁTICO NOS DIABÉTICOS, BASEADO NA AVALIAÇÃO CLÍNICA E NEUROFISIOLÓGICA

Esta classificação foi baseada nos achados do ECN, das escalas de sinais e sintomas neurológicos, e do RCS. A densidade linear das FNI não foi levada em consideração nesta classificação.

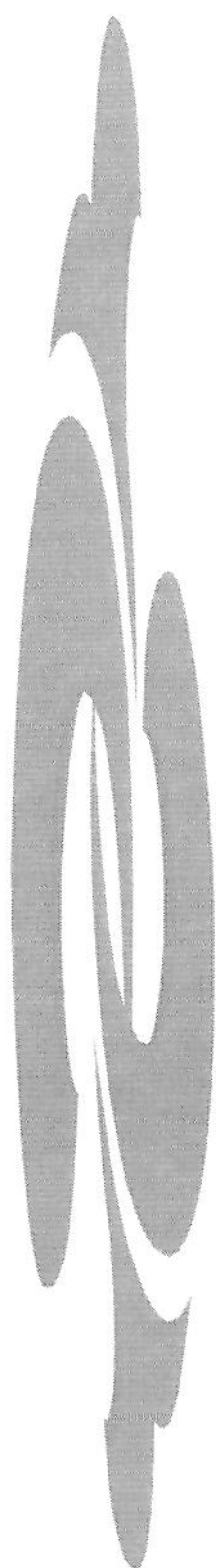
- a) classe 1 - neuropatia ausente.
- b) classe 2 - neuropatia assintomática, isto é, a que apresenta escala de sintomas neurológicos igual a zero.
- c) classe 3 - neuropatia sintomática com ECN normal.
- d) classe 4 - neuropatia sintomática com ECN anormal.

3.6. MÉTODO ESTATÍSTICO

Com o objetivo de descrever os grupos e subgrupos estudados e comparar entre eles, as variáveis idade, sexo, raça, altura, peso, duração do

diabetes, duração dos sintomas neuropáticos, escore dos sintomas, escore dos sinais e hemoglobina glicosilada a metodologia estatística empregada foi a análise descritiva através de tabelas de frequência e medidas de posição e dispersão. Para comparar proporções, foi utilizado o teste Qui-quadrado ou o teste Exato de Fisher, quando os critérios de aplicação do Qui-quadrado não foram satisfeitos. Para comparar medidas contínuas ou ordenáveis entre 2 grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, entre mais de 2 grupos, o teste de Kruskal-Wallis. Com o objetivo de comparar os parâmetros da avaliação do ECN entre os grupos diabéticos, controle normal e subgrupos de diabéticos, a metodologia estatística empregada foi a análise descritiva através de posição e dispersão. Na comparação de medidas contínuas ou ordenáveis entre dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e entre mais de dois grupos o teste de Kruskal-Wallis. Com o objetivo de comparar a presença do RCS com a idade e duração do diabetes, a distribuição de frequência e proporções dos sintomas e sinais no grupo de diabéticos, a metodologia estatística empregada foi a análise descritiva através de tabelas de frequência e medidas de posição e dispersão. O teste Qui-quadrado ou o teste Exato de Fisher, quando necessário, foram utilizados para a comparação de proporções e verificação de associações. O teste de Mann-Whitney foi aplicado na comparação de variáveis ordenáveis ou contínuas entre dois grupos. Com o objetivo de comparar o número FNI entre os grupos normal, diabéticos e subgrupos dos diabéticos, correlacionar o número FNI com o escore das escalas de sintomas e sinais, presença e ausência do RCS e com o valor da hemoglobina glicosilada o método estatístico utilizado foi a análise descritiva

através de medidas de posição e dispersão. Para a comparação de variáveis ordenáveis ou contínuas entre 2 grupos utilizou-se o teste de Mann-Whitney e para 3 ou mais grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para verificar a relação entre 2 variáveis contínuas ou ordenáveis aplicou-se o coeficiente de correlação linear de Spearman. O nível de significância adotado foi sempre de 5%.



RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

4.1.a. Grupo de diabéticos e grupo controle

Para este estudo foram selecionados 49 pacientes portadores de DM tipo 2 (ANEXO 5) e 18 indivíduos saudáveis como controle (ANEXO 6). O grupo de diabéticos era constituído de 20 (40.8%) homens e 29 (59.2%) mulheres e o grupo controle de 4 (22.2%) homens e 14 (77.8%) mulheres. A raça branca apresentou nítido predomínio, com uma percentagem de 94.4% no grupo controle e 89.8% no diabético. A raça negra apareceu no grupo controle e de diabéticos na proporção de 8.2 % e 5.6 % e a amarela apareceu apenas no grupo de diabéticos na percentagem de 2.0 %. A distribuição de sexo e raça entre os grupos estudados, não revelou diferenças estatísticas significantes.

No grupo controle, a estatística descritiva das variáveis idade, altura e peso apresentou-se de acordo com a tabela 1. No grupo de diabéticos, a estatística descritiva das variáveis idade, altura, peso, tempo de duração do diabetes, tempo de duração dos sintomas neuropáticos e valores da hemoglobina glicosilada apresentou-se como na tabela 2.

Tabela 1 – Medidas de posição e dispersão das variáveis para o grupo normal

Variável	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
IDADE(anos)	18	54.33	7.48	55.00	45.00	65.00
ALTURA(cm)	18	160.20	7.27	160.00	143.00	175.00
PESO(Kg)	18	65.87	10.40	65.10	42.00	95.00

N= número de indivíduos

Tabela 2 – Medidas de posição e dispersão das variáveis para o grupo de diabéticos

Variável	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
IDADE (anos)	49	56.69	6.44	58.00	44.00	65.00
ALTURA (cm)	49	163.90	9.15	165.00	147.00	186.00
PESO(Kg)	49	79.20	18.22	74.00	46.00	140.00
TDIAB(anos)	49	8.83	7.02	7.00	0.17	30.00
TNEUROP(anos)	49	1.73	2.80	1.00	0	15.00
HbGLI(%)	49	7.45	1.94	7.40	4.40	11.57

N=número de indivíduos, TDIAB=Tempo de duração do diabetes, TNEUROP=Tempo de duração dos sintomas neuropáticos, HbGLI=Hemoglobina glicosilada

A comparação das variáveis idade ($p=0.2392$) e altura ($p=0.1014$) entre os grupos controle e diabéticos não revelaram valores estatisticamente significativos.

4.1.b. Subgrupos de diabéticos

Classe 1 (ausência de neuropatia)

Nesta classe foram classificados 15 (11 mulheres e 4 homens) indivíduos, com idade média de 57.86 ± 5.92 anos, tempo de duração do diabetes entre 0.25 e 12 anos, com mediana de 5.0 anos e valores de hemoglobina glicosilada de 6.30 ± 1.58 %.

Classe 2 (neuropatia assintomática)

Nesta classe foram classificados 8 (5 mulheres e 3 homens) indivíduos, com idade média de 56.12 ± 6.35 anos, tempo duração do diabetes de 2 a 20 anos com mediana de 8.5 anos e valores de hemoglobina glicosilada de 8.70 ± 2.15 %.

Classe 3 (neuropatia sintomática com ECN normal)

Nesta classe foram classificados 8 (5 mulheres e 3 homens) indivíduos, com idade média de 53.62 ± 5.18 anos, tempo duração do diabetes de 0.16 a 26 anos com mediana de 5.5 anos, tempo de duração dos sintomas neuropáticos de 1 a 15 anos, com mediana de 2.5 anos e valores de hemoglobina glicosilada de 6.62 ± 1.77 %.

Classe 4 (neuropatia sintomática com ECN anormal)

Nesta classe foram classificados 18 (8 mulheres e 10 homens) indivíduos, com idade média de 57.33 ± 7.36 anos, tempo de duração do diabetes de 0.41 a 30 anos, com mediana de 11.50 anos, tempo de duração dos sintomas neuropáticos de 0.16 a 10 anos, com mediana de 2 anos e valores de hemoglobina glicosilada de 8.21 ± 1.59 %.

Na distribuição da proporção de sexo e raça entre os subgrupos de diabéticos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com o teste exato de Fisher. As variáveis idade ($p=0.3672$), altura ($p=0.3063$), peso

(0.4896), tempo de duração do diabetes ($p=0.3254$) entre todos os subgrupos de diabéticos, e tempo de duração da neuropatia ($p=0.5154$), entre os subgrupos sintomáticos, não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Todos os subgrupos apresentaram hemoglobina glicosilada acima dos valores de referência de normalidade. Os subgrupos classe 2 e classe 4, quando comparados à classe 1 também mostraram evidências de diferenças estatisticamente significantes ($p=0.0043$). Anteriormente, a introdução dos resultados da densidade linear das FNI como método de detecção diagnóstica, a neuropatia diabética foi constatada em 34 (69.3%) pacientes da amostra.

4.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

4.2.a. Grupo de diabéticos

No grupo dos diabéticos, 27 (55.1%) pacientes apresentaram escala de sintomas anormal, ou seja, maior ou igual a 1, e 38 (77.6%) pacientes apresentaram escala de sinais maior ou igual a 2, portanto alterada (ANEXO 7). O escore médio das escalas de sintomas foi 1.49 ± 1.60 e o de sinais foi 5.20 ± 4.42 . Os sintomas e sinais neuropáticos mais comumente referidos estão relacionados na tabela 3.

Tabela 3 – Sintomas e sinais neuropáticos em diabéticos

Sintomas	n pacientes (%)
Queimação nos pés	22 (44.9%)
Adormecimento nos pés	15 (30.6%)
Queimação nas pernas	13 (26.5%)
Adormecimento nas pernas	7 (14.3)
Formigamento nos pés	5 (10.2%)
Câimbras nos pés	3 (6.1)
Formigamento nas pernas	3 (6.1%)
Adormecimento nas mãos	3 (6.1%)
Disestesia pernas/pés	2 (4.1%)
Instabilidade ao andar	2 (4.1%)
Dor em pontada nas pernas	2 (4.1%)
Queimação nas mãos	1 (2.0%)
Formigamento nas mãos	1 (2.0%)
Resfriamento nas pernas	1 (2.0%)
Pele seca nas pernas/pés	1 (2.0%)
Impotência	1 (2.0%)
Sinais	
Reflexos tendinosos(reduzido/ausente)	
Patelar	25 (51%)
Aquileu	35 (71.4%)
Limiar da percepção dolorosa (aumentado/diminuído)	36 (73.5%)
Limiar da percepção vibratória-Hálux (aumentado)	30 (61.2%)

4.2.b. Subgrupos de diabéticos

A distribuição das escalas de sintomas e sinais neuropáticos entre os subgrupos de diabéticos está disposta na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição da escala de sintomas e sinais neuropáticos

	Classe1	Classe2	Classe3	Classe4	Total
Sintomas					
- N	1	0	8	18	27
% / total diab	2.04	0.00	16.33	36.73	55.10
% / diab sint	3.70	0.00	29.63	66.67	
% / subgrup	6.67	0.00	100.00	100.00	
Sinais					
N	6	8	6	18	38
% / total diab	12.24	16.33	12.24	36.73	77.55
% / diab sin	15.79	21.05	15.79	47.37	
% / subgrup	40.00	100.00	75.00	100.00	

N= número de pacientes; % / total diab = porcentagem em relação ao grupo total de diabéticos; % / diab sint = porcentagem em relação ao grupo de pacientes sintomáticos; % / subgrup = porcentagem em relação ao subgrupo específico; % / diab sin = porcentagem em relação ao grupo de pacientes com sinais neurológicos

O escore da escala de sinais neurológicos revelou-se estatisticamente significativo ($p=0.0001$), entre os subgrupos classe 4 e 1, classe 4 e 3 e classe 2 e 1, com valores maiores nas classes 4 e 2, respectivamente. Nos subgrupos de neuropatia sintomática, classe 3 e classe 4, o escore da escala de sintomas apresentou diferenças com significância estatística ($p=0.0301$), com valores maiores na classe 4.

Classe 1 (ausência de neuropatia)

Neste subgrupo, a escala de sintomas neurológicos apresentou-se alterada em 1 (6.7 %) paciente, com escore médio de 0.13 ± 0.51 e a escala de sinais neurológicos em 6 (40%) pacientes com escore médio de 1.26 ± 1.33 . A

distribuição da frequência dos sintomas e sinais neurológicos encontra-se na tabela 5.

Classe 2 (neuropatia assintomática)

Neste subgrupo, todos os pacientes apresentaram escala normal de sintomas neurológicos e escala alterada de sinais neurológicos, com escore médio de 8.37 ± 5.09 e frequência de distribuição definida na tabela 5.

Classe 3 (neuropatia sintomática com ECN normal)

Neste subgrupo, todos os pacientes apresentaram a escala de sintomas neurológicos alterada, com escore médio de 2.0 ± 1.06 e a escala de sinais alterada em 6 (75%) pacientes, com escore médio de 2.62 ± 1.77 . A frequência de distribuição dos sintomas e sinais está definida na tabela 5.

Classe 4 (neuropatia sintomática com ECN anormal)

Neste grupo, a escala de sintomas e sinais neurológicos apresentaram-se alteradas em todos os pacientes, com escore médio de 3.05 ± 1.05 e 8.22 ± 3.22 respectivamente. A distribuição das frequências está definida na tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição da freqüência dos sintomas e sinais neurológicos nos subgrupos

classe 1	
Sintomas	Nº pacientes (%)
Adormecimento pernas/pés	1 (6.66%)
Queimação pernas/pés	1 (6.66%)
Sinais	
Reflexos tendinosos(reduzido/ausente)	
Patelar	2 (13.3%)
Aquileu	6 (40.0%)
Limiar da percepção dolorosa(aumentado/diminuido)	5 (33.3%)
Limiar da percepção vibratória-Hálux (aumentado)	2 (13.3%)
classe 2	
Sinais	Nº de pacientes (%)
Reflexos tendinosos(reduzido/ausente)	
Patelar	6 (75.0%)
Aquileu	8 (100.0%)
Limiar da percepção dolorosa (aumentado/diminuido)	7 (87.5%)
Limiar da percepção vibratória-Hálux (aumentado)	8 (100.0%)
classe 3	
Sintomas	Nº pacientes (%)
Queimação pés	7 (87.5%)
Adormecimento pés	5 (62.5%)
Adormecimento pernas	1 (12.5)
Queimação pernas	1 (12.5)
Queimação mãos	1 (12.5)
Adormecimento mãos	1 (12.5)
Pele seca perna/pés	1 (12.5)
Sinais	
Reflexos tendinosos(reduzido/ausente)	
Patelar	2 (25.0%)
Aquileu	4 (50.0%)
Limiar da percepção dolorosa (aumentado/diminuido)	6 (75.0%)
Limiar da percepção vibratória-Hálux (aumentado)	3 (37.5%)
classe 4	

Sintomas	Nº pacientes (%)
Queimação pés	14 (77.8%)
Queimação pernas	11(61.1%)
Adormecimento pés	9 (50%)
Adormecimento pernas	5 (27.8%)
Formigamento pés	5 (27.8%)
Formigamento pernas	3 (16.7)
Disestesia perna	2 (5.6%)
Instabilidade ao andar	2 (5.6%)
Adormecimento mãos	2 (5.6%)
Sinais	
Reflexos tendinosos(reduzido/ausente)	
Patelar	15 (83.3%)
Aquileu	17 (94.4%)
Limiar da percepção dolorosa (aumentado/diminuido)	17 (94.4%)
Limiar da percepção vibratória-Hálux (aumentado)	17 (94.4%)

4.3. REFLEXO CUTÂNEO SIMPÁTICO

4.3.a. Grupo de diabéticos e controle

No grupo de diabéticos, 14 (28.5%) pacientes apresentaram RCS alterado nos pés (ANEXO 7) e no grupo normal, todos os indivíduos apresentaram exame normal. A duração do diabetes ($p=0.6276$) e a idade dos pacientes ($p=0.4784$) não influenciaram a presença ou ausência do RCS.

4.3.b. Subgrupos de diabéticos

Na classe 1 o RCS foi normal em todos os pacientes; nas classes 2, 3 e 4 foi anormal em 1 (12.5%), 2 (25%) e 11 (61.1%) pacientes respectivamente.

4.4. ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA

4.4.a. Grupo de diabéticos e grupo controle

No grupo dos diabéticos, o ECN estava alterada em 26 (53.1%) pacientes (ANEXO 8). Do grupo total de pacientes com ECN alterada, 18 (69.2%) pacientes apresentaram alterações conjuntas do componente motor e sensitivo, envolvimento isolado do componente sensitivo foi observado em 6 (23.07%) pacientes, e do componente motor em 2 (7.69%) pacientes. No grupo controle, o ECN foi normal em todos os indivíduos. Os resultado da análise descritiva, através das medidas de posição e dispersão dos parâmetros analisados no ECN para o grupo de diabéticos e controle normal, estão relacionados na tabela 6.

Tabela 6 – Medidas de posição e dispersão dos parâmetros avaliados no ECN

Variável	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
ECNS-DIABÉTICOS						
LDRADIAL(ms)	45	2.2284	0.3318	2.2000	1.6400	3.0400
LDULNAR(ms)	44	2.6432	0.4857	2.6200	1.8800	4.0800
LDSURAL(ms)	34	2.5994	0.4111	2.5600	2.0400	3.7200
AMPRADIAL(uV)	45	17.8484	7.4295	17.3000	2.2000	34.0000
AMPULNAR(uV)	44	22.1355	12.0087	22.3500	2.5600	56.0000
AMPSURAL(uV)	34	14.6150	6.9974	14.2500	2.8800	31.4000
VCSRADIAL(m/s)	45	55.1289	9.2133	56.6000	15.0000	66.7000
VCSULNAR(m/s)	44	52.8636	10.1658	52.8500	16.3000	68.4000
VCSSURAL(m/s)	34	45.2941	8.2453	47.0000	9.0000	59.8000
ECNM-DIABÉTICOS						
LDULNAR(ms)	49	2.8963	0.6192	2.8200	1.7400	4.1400
LDFIBIBULAR(ms)	46	4.0683	1.0240	3.8400	2.7600	7.3800
LDTIBIAL(ms)	46	5.8772	0.9590	5.7600	4.2600	9.0000
AMPULNAR(mV)	49	8.4092	2.1569	8.5000	2.5800	12.8000
AMPFIBIBULAR(mV)	46	5.3346	2.6043	4.8800	0.4300	13.0000
AMPTIBIAL(mV)	46	6.2339	3.2563	6.0500	0.0500	13.0000
VCMULNAR(m/s)	49	47.9816	7.9662	49.0000	7.0000	60.4000
VCMFIBULAR(m/s)	46	42.1804	8.1757	43.4000	2.5000	53.8000
VCMTIBIAL(m/s)	46	40.6015	7.7478	41.9000	1.6700	52.5000
OFULNAR(ms)	49	29.7490	3.9349	28.9000	22.4000	43.4000
OFFIBULAR(ms)	45	50.6889	6.3396	51.0000	40.4000	69.1000
OFTIBIAL(ms)	45	53.6067	6.6271	52.1000	40.3000	72.0000
ECNS-NORMAL						
LDRADIAL(ms)	18	2.1644	0.2216	2.1800	1.6400	2.4800
LDULNAR(ms)	18	2.5028	0.2224	2.5000	2.0400	2.8400
LDSURAL(ms)	18	2.3944	0.2465	2.4400	1.7600	2.7200
AMPRADIAL(uV)	18	27.4944	8.7352	24.3500	18.3000	46.7000
AMPULNAR(uV)	18	38.5111	11.5538	35.5000	23.6000	63.3000
AMPSURAL(uV)	18	24.1778	6.3498	23.4000	14.0000	33.0000
VCSRADIAL(m/s)	18	57.1167	3.8930	56.3000	53.0000	65.1000
VCSULNAR(m/s)	18	56.5278	4.9621	54.8500	50.0000	66.0000

VCSSURAL(m/s)	18	52.0667	3.0143	52.0500	46.0000	56.8000
ECNM-NORMAL						
LDULNAR(ms)	18	2.5361	0.2982	2.5500	1.9800	3.1200
LDFIBULAR(ms)	18	3.6311	0.7567	3.6300	2.2800	5.1000
LDTIBIAL(ms)	18	4.8472	0.6550	4.6800	3.9600	6.3000
AMPULNAR(mV)	18	8.1517	1.7125	8.3150	2.3400	10.3000
AMPFIBULAR(mV)	18	6.7739	1.8237	6.4350	3.3000	11.2000
AMPTIBIAL(mV)	18	8.9300	1.9600	8.9500	4.6800	12.7000
VCMULNAR(m/s)	18	57.2222	3.3020	58.8500	51.2000	60.7000
VCMFIBULAR(m/s)	18	50.4111	2.6099	51.1500	45.2000	54.7000
VCMTIBIAL(m/s)	18	49.5278	2.6610	49.4000	44.5000	54.9000
OFULNAR(ms)	18	25.5278	1.9041	25.6000	22.4000	28.8000
OFFIBULAR(ms)	18	44.8611	2.6725	44.3000	40.4000	49.6000
OFTIBIAL(ms)	18	46.7778	1.8634	46.5500	44.0000	50.0000

N= número de pacientes LD=Latência distal Amp=Amplitude VCS=Velocidade de condução nervosa sensitiva OF=Latência onda F VCM=Velocidade de condução nervosa motora

Os PANS do nervo sural não foram obtidos em 15 (30.61%) pacientes diabéticos, em contraste com a não obtenção do PANS do nervo ulnar em 5 (10.2%) e do nervo radial em 4 (8.16%) pacientes. O PAMC do nervo fibular não foi obtido em 3 (6.12%) pacientes e do nervo tibial posterior em 3 (6.12%) pacientes. No grupo dos diabéticos, quando presentes e anormais as amplitudes dos PAMC e dos PANS, as VCN apresentaram-se reduzidas em relação aos valores de referência de normalidade, ao passo que as latências distais e da OF apresentaram-se aumentadas.

Os parâmetros que se revelaram estatisticamente significativos na comparação entre os grupos normal e diabéticos no ECNS foram as amplitudes dos nervos radial ($p=0.0003$), ulnar ($p=0.0001$) e sural ($p=0.0001$) e a VCS do nervo sural ($p=0.0001$) e no ECNM foram a latência distal ($p=0.0429$), a VCM ($p=0.0001$) e a

latência da OF ($p=0.0001$) do nervo ulnar, a amplitude ($p=0.0091$), a VCM ($p=0.0001$) e a latência da OF ($p=0.0003$) do nervo fibular, a latência distal ($p=0.0001$), a amplitude ($p=0.0017$), a VCM ($p=0.0001$) e latência da OF ($p=0.0001$) do nervo tibial.

4.4.b. Subgrupos de diabéticos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
FACULDADE DE FARMÁCIA

A distribuição do ECN entre os subgrupos de diabéticos está disposta na tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição do ECN entre os subgrupos de diabéticos

	Classe1	Classe2	Classe3	Classe4	Total
ECNM					
N	0	7	0	13	20
% / total diab	0.00	14.29	0.00	26.53	40.82
% / ECNM alt	0.00	35.00	0.00	65.00	
% / subgrupo	0.00	87.50	0.00	72.22	
ECNS					
N	0	7	0	17	24
% / total diab	0.00	14.29	0.00	34.69	48.98
% / ECNS alt	0.00	29.17	0.00	70.83	
% / subgrupo	0.00	87.50	0.00	94.44	

N= número de pacientes; % / total diab = porcentagem em relação ao grupo total de diabéticos; % / ECNM alt = porcentagem em relação ao grupo de pacientes com ECNM anormal; % / ECNS alt = porcentagem em relação ao grupo de pacientes com ECNS anormal; % / subgrup = porcentagem em relação ao subgrupo específico

No subgrupo classe 1 e 3, o ECN foi normal em todos os pacientes, tomando por base os valores de referências de normalidades obtidos dos estudos

de OH (1993b) e GARIBALDI (1996). No subgrupo classe 2, o ECNM, bem como o ECNS foram alterados em 7 pacientes (87.5%). No subgrupo classe 4, alteração no ECNM foi constatada em 13 (72.2%) pacientes e do ECNS em 17 (94.4%) pacientes. Os resultados da análise descritiva, através das medidas de posição e dispersão dos parâmetros analisados no ECN dos quatros subgrupos de diabéticos estão definidos na tabela 8.

Tabela 8 – Medidas de posição e dispersão dos parâmetros avaliados no ECN

Variável	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Classe 1-ECNS						
LDRADIAL(ms)	15	2.0053	0.1585	2.0000	1.6400	2.2000
LDULNAR(ms)	15	2.4027	0.3304	2.4800	1.8800	2.8400
LDSURAL(ms)	15	2.3760	0.3000	2.2800	2.0400	2.8800
AMPRADIAL(uV)	15	22.2600	7.4160	24.3000	2.2000	34.0000
AMPULNAR(uV)	15	26.4907	11.6040	27.3000	2.5600	51.3000
AMPSURAL(uV)	15	17.9387	7.2664	19.0000	2.8800	31.4000
VCSRADADIAL(m/s)	15	57.6467	12.6579	61.3000	15.0000	66.7000
VCSULNAR(m/s)	15	55.7800	13.0228	56.8000	16.3000	67.5000
VCSSURAL(m/s)	15	46.5133	11.3741	48.1000	9.0000	59.8000
Classe 1-ECNM						
LDULNAR(ms)	15	2.5360	0.4797	2.5200	1.7400	3.4800
LDFIBIBULAR(ms)	15	3.6680	0.6110	3.6000	2.8200	5.3400
LDTIBIAL(ms)	15	5.6133	0.6980	5.7600	4.5000	6.9600
AMPULNAR(mV)	15	9.1760	2.4195	10.0000	2.5800	12.8000
AMPFIBULAR(mV)	15	6.2913	2.4986	5.4000	3.3600	11.3000
AMPTIBIAL(mV)	15	7.6787	1.9948	7.4000	4.8300	11.5000
VCMULNAR(m/s)	15	51.7200	5.4098	50.7000	43.4000	60.4000
VCMFIBULAR(m/s)	15	46.7733	3.4410	46.6000	41.4000	53.8000
VCMTIBIAL(m/s)	15	45.0467	3.1066	44.8000	40.4000	52.5000
OFULNAR(ms)	15	27.7133	2.7638	27.4000	24.9000	34.8000
OFFIBULAR(ms)	15	46.8600	4.1303	46.2000	41.6000	54.8000
OFTIBIAL(ms)	15	48.1667	3.4735	49.4000	40.3000	52.2000

Classe 2-ECNS						
LDRADIAL(ms)	6	2.3400	0.3286	2.3400	1.9600	2.7200
LDULNAR(ms)	7	2.9429	0.6897	3.0400	2.0800	4.0800
LDSURAL(ms)	5	2.9680	0.5502	2.9200	2.2000	3.7200
AMPRADIAL(uV)	6	18.3217	6.2223	19.3000	7.3300	24.7000
AMPULNAR(uV)	7	18.7243	7.8051	21.7000	5.6700	28.0000
AMPSURAL(uV)	5	12.0260	6.5465	9.3300	5.1000	20.7000
VCSRADIAL(m/s)	6	54.4833	6.2630	55.6500	46.6000	61.2000
VCSULNAR(m/s)	7	49.7714	11.6391	48.6000	30.6000	62.5000
VCSSURAL(m/s)	5	42.0600	5.0599	42.3000	37.6000	50.0000
Classe 2-ECNM						
LDULNAR(ms)	8	3.2250	0.5129	3.0900	2.5200	4.1400
LDFIBULAR(ms)	8	4.2750	1.2131	3.9900	2.7600	6.6000
LDTIBIAL(ms)	8	6.6850	1.3219	6.3300	5.4000	9.0000
AMPULNAR(mV)	8	7.9838	2.2317	8.5850	3.8300	10.5000
AMPFIBULAR(mV)	8	3.7875	2.4753	3.7300	0.4300	7.1700
AMPTIBIAL(mV)	8	4.6300	4.3970	4.1650	0.0500	10.8000
VCMULNAR(m/s)	8	45.9000	5.1200	45.9000	37.5000	52.8000
VCMFIBULAR(m/s)	8	37.4250	4.8109	38.8000	30.5000	44.5000
VCMTIBIAL(m/s)	8	36.4000	4.5375	36.0500	29.6000	43.3000
OFULNAR(ms)	8	32.4750	5.5631	30.8000	27.0000	43.4000
OFFIBULAR(ms)	7	54.4571	5.6601	54.4000	47.2000	61.0000
OFTIBIAL(ms)	7	59.1143	4.9137	60.0000	51.6000	64.8000
Classe 3-ECNS						
LDRADIAL(ms)	8	2.1725	0.2647	2.2000	1.7600	2.6000
LDULNAR(ms)	8	2.4750	0.3631	2.4400	2.0000	3.0800
LDSURAL(ms)	8	2.5575	0.2481	2.6000	2.0800	2.8400
AMPRADIAL(uV)	8	19.4750	6.9481	18.1500	12.0000	31.3000
AMPULNAR(uV)	8	30.6625	14.9702	26.7000	16.0000	56.0000
AMPSURAL(uV)	8	15.6125	4.0622	15.6000	9.0000	20.7000
VCSRADIAL(m/s)	8	56.4500	5.3321	55.7000	46.2000	63.7000
VCSULNAR(m/s)	8	55.8000	3.8785	55.4000	51.1000	62.5000
VCSSURAL	8	47.1250	3.3363	48.3500	42.9000	50.8000
Classe 3- ECNM						
LDULNAR(ms)	8	2.5300	0.3525	2.5500	2.0400	3.0600
LDFIBULAR(ms)	8	3.6975	0.2990	3.7200	3.3600	4.0800
LDTIBIAL(ms)	8	5.5625	1.0009	5.5350	4.2600	7.4000
AMPULNAR(mV)	8	9.4300	2.0159	9.1700	6.8300	12.5000

AMPFIBULAR(mV)	8	7.2363	2.8994	6.5000	4.3000	13.0000
AMPTIBIAL(mV)	8	8.9500	2.9279	9.1650	5.1700	13.0000
VCMULNAR(m/s)	8	51.2875	3.5707	51.3500	47.2000	58.3000
VCMFIBULAR(m/s)	8	45.8500	3.9210	44.3000	41.3000	53.6000
VCMTIBIAL(m/s)	8	44.7125	3.3728	44.5500	40.7000	49.5000
OFULNAR(ms)	8	27.8875	2.3430	28.4000	22.4000	29.8000
OFFIBULAR(ms)	8	48.1750	3.7882	49.0500	40.4000	51.8000
OFTIBIAL(ms)	8	50.0750	3.5628	49.9500	43.0000	55.0000
Classe 4 – ECNS						
LDRADIAL(ms)	16	2.4238	0.3655	2.3200	1.8000	3.0400
LDULNAR(ms)	14	2.8471	0.4414	2.9050	1.9200	3.4000
LDSURAL(ms)	6	2.9067	0.3654	2.9600	2.4800	3.2800
AMPRADIAL(uV)	16	12.7219	5.1136	13.1500	2.3200	20.7000
AMPULNAR(uV)	14	14.3021	6.6496	13.1500	5.0000	24.3000
AMPSURAL(uV)	6	7.1333	3.0537	6.5000	3.9300	13.0000
VCSRADIAL(m/s)	16	52.3500	7.5788	53.0500	40.0000	63.9000
VCSULNAR(m/s)	14	49.6071	7.5418	48.5000	41.1000	68.4000
VCSSURAL(m/s)	6	42.5000	4.5546	43.2500	36.4000	47.6000
Classe 4 – ECNM						
LDULNAR(ms)	18	3.2133	0.6314	3.3300	2.0400	4.1400
LDFIBULAR(ms)	15	4.5560	1.2989	4.2000	3.1200	7.3800
LDTIBIAL(ms)	15	5.8780	0.7681	5.7600	4.6200	7.7400
AMPULNAR(mV)	18	7.5056	1.6221	7.6650	3.4800	10.3000
AMPFIBULAR(mV)	15	4.1887	1.5712	4.2000	2.2300	8.0000
AMPTIBIAL(mV)	15	4.1960	1.9436	4.4000	1.4000	8.5000
VCMULNAR(m/s)	18	44.3222	10.2637	46.8500	7.0000	52.6000
VCMFIBULAR(m/s)	15	38.1667	11.1027	40.7000	2.5000	52.1000
VCMTIBIAL(m/s)	15	36.2047	10.2804	39.1000	1.6700	44.3000
OFULNAR(ms)	18	31.0611	3.4377	30.3000	25.6000	39.2000
OFFIBULAR(ms)	15	54.1000	7.0331	53.0000	40.6000	69.1000
OFTIBIAL(ms)	15	58.3600	5.5733	57.6000	52.0000	72.0000

N= número de pacientes LD=Latência distal Amp=Amplitude VCS=Velocidade de condução nervosa sensitiva VCM=Velocidade de condução nervosa motora OF=Latência onda F

A comparação dos parâmetros do ECN entre os subgrupos de diabéticos e o grupo controle não revelou diferenças estatísticas significantes entre os subgrupos classe 1 e 3. Com a classe 2, os valores estatisticamente

significantes foram as reduções da amplitude ($p=0.0001$) e da VCS ($p=0.0001$) do nervo sural, da amplitude ($p=0.0001$) do nervo ulnar sensitivo, da amplitude ($p=0.0001$) e da VCM ($p=0.0001$) do nervo tibial, da amplitude ($p=0.001$) e da VCM ($p=0.0001$) do nervo fibular e da VCM ($p=0.0001$) do nervo ulnar; e os aumentos da latência distal ($p=0.0008$) e da latência da OF ($p=0.001$) do nervo tibial, da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo fibular e da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo ulnar. E finalmente, com a classe 4, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao aumento da latência distal ($p=0.0072$) do nervo sural, da latência distal ($p=0.0008$) e da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo ulnar, da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo fibular, da latência distal ($p=0.0008$) e da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo tibial; e reduções da amplitude ($p=0.0001$) e da VCS ($p=0.0184$) do nervo sural, da VCM ($p=0.0001$) do nervo ulnar, da amplitude ($p=0.0010$) e da VCM ($p=0.0001$) do nervo fibular, e da amplitude ($p=0.0001$) e da VCM ($p=0.0001$) do nervo tibial.

A comparação dos parâmetros no ECN entre os subgrupos diabéticos, revelou diferenças estatisticamente significantes entre as classes 4 e 1, em relação aos aumentos da latência distal ($p=0.0037$) do nervo radial, da latência distal ($p=0.0138$) do nervo ulnar sensitivo, da latência distal ($p=0.0072$) do nervo sural, da latência distal ($p=0.0008$) e da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo ulnar, da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo fibular e da latência da OF ($p=0.0001$) do nervo tibial; e às reduções da amplitude ($p=0.0001$) do nervo radial, da amplitude ($p=0.0001$) e VCS ($p=0.0184$) do nervo ulnar sensitivo, da amplitude ($p=0.0001$)

do nervo sural, da amplitude ($p=0.0393$) do nervo ulnar motor, da VCM ($p=0.0001$) do nervo fibular, da amplitude ($p=0.0001$) e da VCM ($p=0.0001$) do nervo tibial.

4.5. FIBRAS NERVOSAS INTRA-EPIDÉRMICAS

4.5.a . Grupo de diabéticos e controle

Inervação cutânea em indivíduos normais

As FNI originam-se do PNS, que se estende horizontalmente próximo à membrana basal da epiderme. Nos controles normais, as fibras nervosas originadas do PNS, finas e varicosas, distribuíram-se através das camadas basal, espinhosa e granulosa da epiderme, seguindo diferentes modelos (Figura 1). Algumas fibras ramificaram-se em um padrão semelhante a candelabro, com múltiplos ramos por toda a largura da epiderme, outras apresentaram-se como fibras verticais únicas com um ou mais ramos terminais, seguindo em direção à superfície da pele, ou lateralmente, ou retornando à camada basal da epiderme. Nas FNI a tendência é se agruparem, com regiões desprovidas de nervos, entre os agrupamentos. Neste estudo os valores de referência da normalidade da densidade linear das FNI apresentaram uma média de 7.04 ± 2.46 , mediana de 6.76 e valor mínimo e máximo de 4.10 e 14 respectivamente (ANEXO 9).



Figura 1. Imagens obtidas por microscopia confocal a laser para a análise do padrão de distribuição das fibras intra-epidérmicas PGP-IR em indivíduos normais

Inervação cutânea em diabéticos tipo 2

Na totalidade dos pacientes diabéticos, as fibras intra-epidérmicas PGP-IR, apresentaram-se reduzidas em comparação aos valores de referência de normalidade. Achado constatado também, quando se analisava os subgrupos isoladamente (Figura 2).

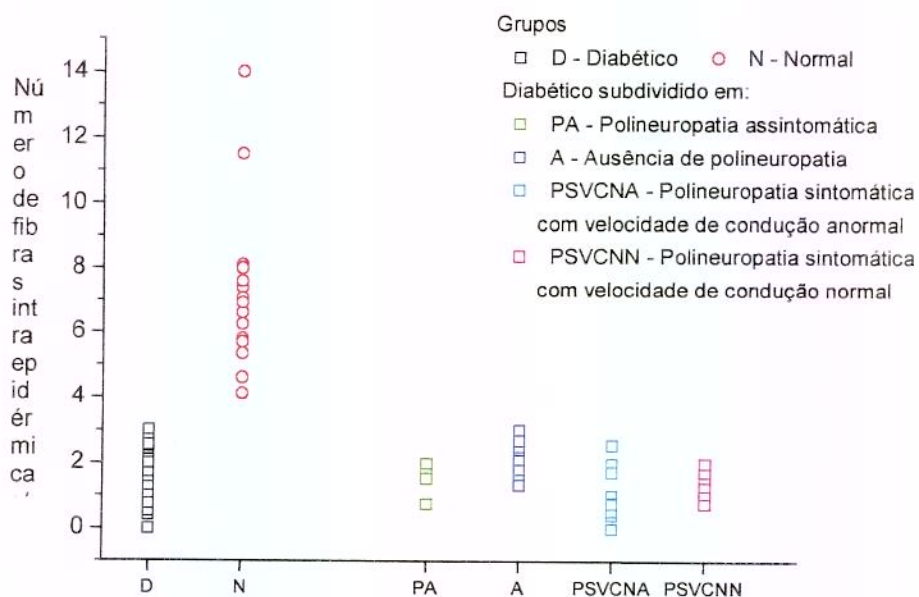


Figura 2 – Dispersão do número de fibras intra-epidérmicas no grupo controle e nos grupos diabéticos

Nos diabéticos observou-se ausência ou redução do número de FNI. Quando presentes, as FNI apresentavam padrão morfológico similar ao do grupo controle normal (Figura 3). A densidade linear das FNI no grupo de diabéticos foi de 1.40 ± 0.97 , mediana de 1.60, e valores mínimo e máximo de 0 e 3 respectivamente (ANEXO 9).

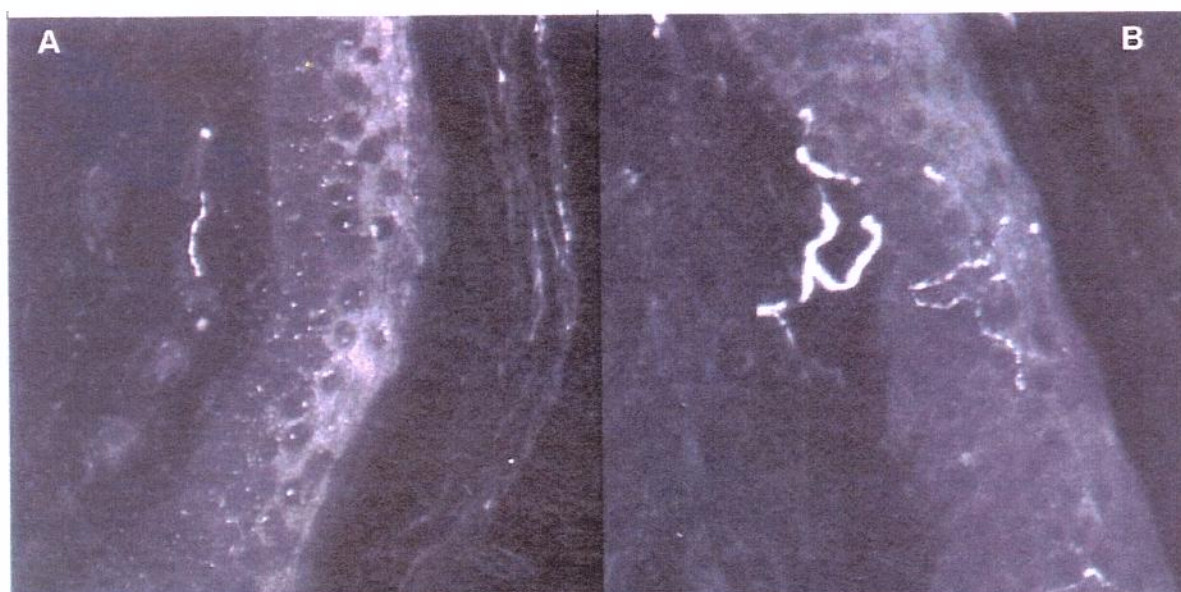


Figura 3. Imagens obtidas por microscopia confocal a laser para a análise do padrão de distribuição das fibras intra-epidérmicas PGP-IR em indivíduos diabéticos. Observa-se ausência das FNI (A) e redução da densidade linear das FNI (B)

A densidade linear das FNI e as variáveis, valores da hemoglobina glicosilada, escores dos sintomas e sinais neurológicos, apresentaram correlações negativas, expressas respectivamente pelo coeficiente de correlação de Spearman de - 0.040 ($p=0.0041$) (Figura 4), - 0.61 ($p=0.0001$) (Figura 5) e - 0.75 ($p=0.0001$) (Figura 6). A comparação entre o número de FNI no grupo de diabéticos com RCS normal e anormal revelou-se estatisticamente significativa ($p=0.0001$), com valores menores encontrados no grupo com RCS ausente. Diferenças estatisticamente significantes em relação à variável número de fibras intra-epidérmicas foram observadas entre o grupo normal e o dos portadores de DM tipo 2 ($p=0.0001$).

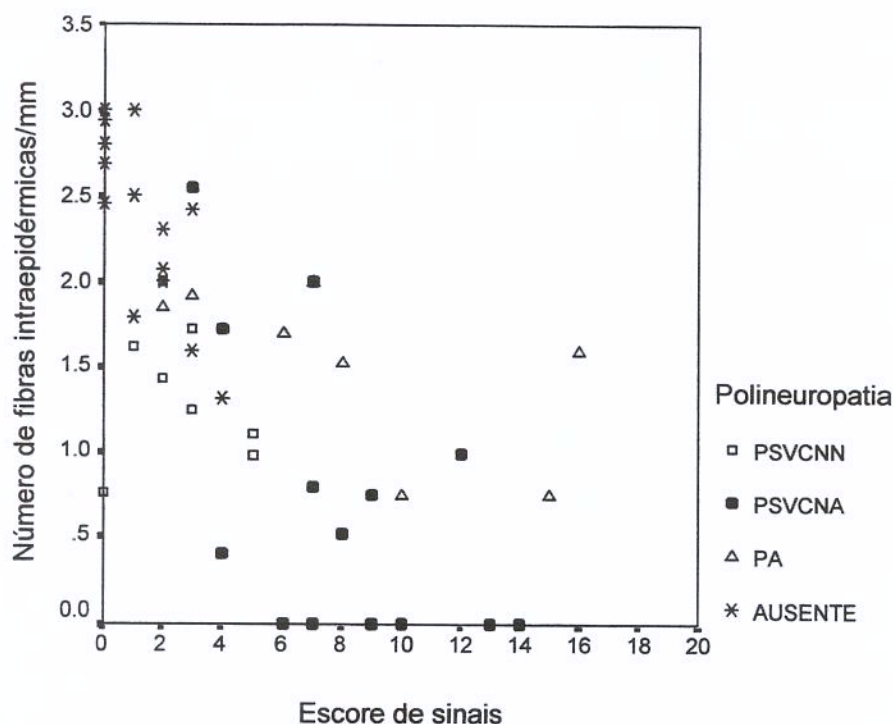


Figura 6. Dispersão do número de fibras intra-epidérmicas em função do escore de sinais no grupo diabético

4.5.b. Subgrupos de diabéticos

Classe1 (Ausência de neuropatia)

A densidade linear das FNI, no subgrupo classe 1 foi de 2.39 ± 0.53 , mediana de 2.46 e valor mínimo e máximo de 1.32 e 3.0 respectivamente. Constatamos redução significativa ($p=0.0001$) da densidade linear das FNI no subgrupo 1 quando comparado com controles normais.

Classe 2 (neuropatia assintomática)

A densidade linear das FNI no subgrupo classe 2 foi de 1.51 ± 0.49 , mediana de 1.65, e valor mínimo e máximo de 0.75 e 2.0 respectivamente.

Constatamos redução significativa ($p=0.0001$) da densidade linear das FNI no subgrupo 2 quando comparado com controles normais.

Classe 3 (neuropatia sintomática com ECN normal)

A densidade linear das FNI no subgrupo classe 3 foi de 1.36 ± 0.41 , mediana de 1.34, e valor mínimo e máximo de 0.76 e 2.0 respectivamente. Encontramos uma importante diminuição da densidade linear das FNI nos indivíduos do subgrupo 3. Evidências de diferenças estatísticas significantes ($p=0.0001$) em relação a densidade das FNI foram constatadas entre este subgrupo e o de classe 1 e controle normal.

Classe 4 (neuropatia sintomática com ECN anormal)

A densidade linear das FNI no subgrupo classe 4 foi de 0.54 ± 0.79 , mediana de 0, e valor mínimo e máximo de 0 e 2.5 respectivamente. Diferenças estatísticas significantes foram constatadas entre este subgrupo e o de classe 1 e controle normal ($p=0.0001$).

4.6. CONTRIBUIÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA CUTÂNEA NO DIAGNÓSTICO DA NEUROPATIA DIABÉTICA E COMPROMETIMENTO DAS FIBRAS FINAS

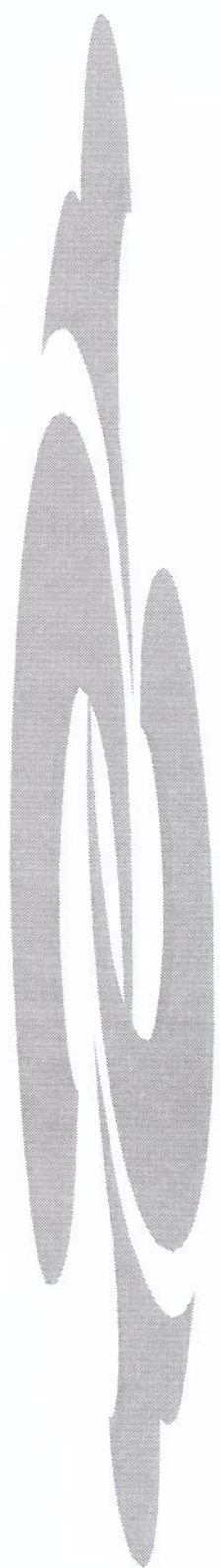
Previamente a introdução dos resultados da densidade linear das FNI como mais um método de detecção diagnóstica, a neuropatia diabética foi constatada em 34 (69.3%) pacientes. O estudo imunohistoquímico das FNI

evidenciou redução do número de fibras intra-epidérmicas em todos os pacientes diabéticos, possibilitando a reclassificação de 07 pacientes da classe 1 como portadores de neuropatia de fibras finas. Ao final, 41 (83.67%) pacientes foram diagnosticados como portadores de neuropatia diabética.

4.7. MODELO DE ENVOLVIMENTO DAS FIBRAS NERVOSAS NO DIABETE MELITO TIPO 2

A totalidade (100%) de pacientes portadores de DM tipo 2, apresentaram comprometimento das fibras finas e 26 (53.1%) pacientes, envolvimento das fibras mielínicas grossas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



DISCUSSÃO

5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Os sintomas e sinais da neuropatia periférica depende, entre outros fatores, da classe, nível e distribuição dos axônios afetados, do curso e severidade do processo patológico, do grau de regeneração dos nervos afetados, do tempo de duração do processo (DYCK, GIANNINI, LAIS, 1993). A combinação destes fatores resulta na variabilidade dos padrões clínicos observados na neuropatia periférica diabética.

Neste estudo foi observado uma correlação positiva entre o número de sinais neurológicos e o de sintomas. Fato similar foi relatado por DYCK et al. (1985), que descreveram uma associação significativa entre o número de sintomas e o escore das anormalidades neurológicas nas neuropatias. Entre os subgrupos de neuropatia sintomática, classes 3 e 4, os escores das escalas de sintomas e sinais demonstraram diferenças estatísticas significativas, com valores maiores na classe 4, demonstrando que o comprometimento associado das fibras finas e grossas promovem um maior grau de envolvimento clínico nestes subgrupos.

O controle glicêmico menos efetivo, expresso por valores mais elevados da hemoglobina glicosilada, correlacionou-se positivamente a comprometimentos mais significativos das funções nervosas sensitiva e motora, e autonômica, avaliadas respectivamente através do ECN e RCS e à redução mais acentuada do número de fibras intra-epidérmicas PGP-IR. Estas conclusões são compatíveis com estudos anteriores que definem que o controle da glicemia previne as

complicações do DM (YOUNG et al., 1986; DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP, 1993).

5.2. ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA

O ECN reflete o estado das fibras mielínicas de grosso calibre, que constituem uma pequena fração da população total das fibras dos nervos (GREENE et al., 1981). No grupo dos diabéticos, alterações do ECN foram constatadas em 26 (53.06%) indivíduos, inclusive em pacientes sem sintomas neuropáticos, em conformidade com estudos prévios (DOWNIE & NEWELL, 1961; LAMONTAGNE & BUCHTHAL, 1970; HEIMANS et al., 1986). Anormalidades isoladas da condução sensitiva foram observadas em 6 (23.07%) pacientes; o inverso, comprometimento motor isolado, em 2 (7.69%) pacientes e envolvimento conjunto motor e sensitivo em 18 (69.24%) pacientes. O PANS do nervo sural não foi obtido em 15 (30.61%) pacientes, em contraste com a ausência dos PAMC do nervo tibial posterior em apenas 3 (6.12%) pacientes do grupo total de diabéticos. Portanto na avaliação global do envolvimento das fibras nervosas, houve predomínio do comprometimento sensitivo sobre o motor. LAMONTAGNE & BUCHTHAL (1970) estabeleceram que na neuropatia diabética, na maioria das vezes, os sinais eletrofisiológicos do envolvimento sensitivo ocorrem mais precocemente e com maior gravidade. Não foram detectadas diferenças significativas no ECN entre a classe 2, assintomática e a classe 4, sintomática, portanto a presença ou ausência de

sintomas não interferiram diretamente com os valores do ECN na neuropatia diabética. Observamos no ECN, três modelos possíveis de envolvimento dos nervos analisados, amplitudes normais e velocidades alteradas, amplitudes alteradas e velocidades normais e amplitudes e velocidades alteradas. Nossos achados, portanto, sugeriram a ausência de uma conexão direta entre as alterações da velocidade de condução, que expressam mais especificamente anormalidades da mielina, e as alterações da amplitude dos potenciais, que expressam anormalidades dos axônios. O comprometimento da mielina e do axônio, na neuropatia diabética, devem ocorrer em tempos diferentes ou concomitantes, para determinarem os três modelos de envolvimento. A possível explicação destes padrões, repousa na existência de mecanismos patogênicos diversos e múltiplos para a neuropatia diabética. Enquanto, por exemplo, a redução da condução nervosa pode estar relacionada às alterações metabólicas, como acúmulo de sódio intraneural ou a migração dos canais de sódio dos nódulos de Ranvier (CHERIAN et al., 1996), as alterações axonais podem ser secundárias à redução nos neurofilamentos axonais e conteúdo dos microtúbulos, proporcionados pela deficiência do transporte axonal lento (MACIOCE et al., 1989) ou pelo decréscimo da expressão das proteínas citoesqueléticas pelo ácido ribonucleico mensageiro (SCOTT, CLARK, ZOCHODNE, 1999).

5.3. FIBRAS NERVOSAS INTRA-EPIDÉRMICAS

No grupo controle, o modelo de distribuição das FNI, foi similar ao de estudos anteriores de biópsia de pele na mesma região (LEVY et al., 1992; MCCARTHY et al., 1995; HIRAI et al., 2000), embora com densidade linear menor, provavelmente em função das técnicas de quantificação utilizadas nos diferentes estudos. No grupo dos diabéticos constatou-se ausência ou redução significativa da densidade linear das FNI, quando comparados com a pele de indivíduos normais em concordância com estudos prévios (LINDBERGER et al., 1989; LEVY et al., 1989; LEVY et al., 1992; KENNEDY et al., 1996).

Nos diabéticos observou-se uma correlação negativa entre o comprometimento clínico, expresso pelos escores dos sinais e sintomas, e a densidade linear das FNI. Uma redução mais acentuada do número de fibras intra-epidérmicas PGP-IR em quadros clínicos e neurofisiológicos indicativos de envolvimento neuropático mais severos já havia sido observada em outros estudos com diabéticos (LEVY et al., 1992; PROPERZI et al., 1993; KENNEDY et al., 1996). A redução ou ausência de fibras intra-epidérmicas PGP 9.5-IR é mais indicativo de degeneração nervosa do que da perda da imunoreatividade por outras razões, porque a imunoreatividade ao PGP 9.5 é robusta e pode invariavelmente ser demonstrada em nervos periféricos humanos normais e patológicos (KARANTH et al., 1989; KARANTH et al., 1991). No subgrupo classe 1 de diabéticos, primariamente classificados como não portadores de neuropatia, ou seja, pacientes que não preenchem os critérios diagnósticos mínimos de

envolvimento do sistema nervoso periférico pelos métodos clínicos e neurofisiológicos, uma redução significativa do número de FNI foi constatada, quando comparados com o controle normal. Na presença de uma média de apenas 34% da inervação normal, os pacientes portadores de DM tipo 2, não apresentaram sintomas e sinais de comprometimento sensitivo, suficientemente consistentes para suportarem o diagnóstico de neuropatia. Portanto, relativamente poucas fibras epidérmicas são necessárias para a detecção dolorosa. Afirmção suportada por estudos realizados por OCHOA & TOREBJÖRK (1989) em humanos, com microneurografia, em que a ativação de um pequeno número de fibras aferentes primárias nociceptivas evocaram claramente uma sensação dolorosa ou por SIMONE et al.(1998), que, com o uso de capsaicina intradérmica em indivíduos normais, demonstraram que na presença de 17% da inervação epidérmica normal, a magnitude das sensações dolorosas térmica e mecânica eram de 61% e 77% respectivamente. Portanto, a redução da densidade linear das FNI podem indicar a presença de neuropatia em pacientes com alterações nervosas subclínicas, antes dos métodos clínicos e neurofisiológicos padrões, opinião compartilhada por KENNEDY et al. (1999).

O subgrupo classe 2, portadores de neuropatia assintomática, apresentou redução significativa das FNI em relação ao grupo controle, porém não em relação à classe 1, revelando-se aí, uma diferença com os grupos sintomáticos, classe 3 e 4, que foram estatisticamente diferentes tanto em relação ao grupo controle, quanto ao subgrupo classe 1. Nossos achados foram condizentes com a hipótese que nas neuropatias dolorosas há proporcionalmente

maior envolvimento das fibras finas (HEIMANS et al., 1986; ZIEGLER et al., 1988). Entretanto há relatos contrários a esta hipótese, que estabelecem que a presença de sintomas neuropáticos dolorosos não definem a população de fibras acometidas, uma vez que, tanto o envolvimento de fibras finas como das grossas podem acarretar ou não, a ocorrência de dores neuropáticas (VEVES et al., 1994; GIULIANI et al., 1997).

No subgrupo classe 3, a redução das FNI pela análise quantitativa dos nervos cutâneos PGP-IR possibilitou o diagnóstico objetivo das denominadas neuropatias de fibras finas. A disfunção seletiva ou predominante das fibras finas resulta em um quadro clínico distinto de dores cutâneas espontâneas, hiperestesia, sem evidências clínicas, eletrofisiológicas ou patológicas de disfunção importante das fibras nervosas mielínicas de grosso calibre (HOLLAND et al., 1997; HOLLAND et al., 1998), o que quase sempre acarreta dificuldades de comprovação diagnóstica objetiva. A presença desta modalidade de neuropatia foi constatada em 9 (18.3%) pacientes da amostra de diabéticos, se a necessidade do quadro clínico característico for considerada como critério diagnóstico, caso contrário, com os critérios estabelecidos no presente estudo, a ocorrência aumenta para 15 (30.6%) pacientes, com o acréscimo dos pacientes da classe 1, que apresentaram envolvimento seletivo das fibras finas. Segundo BROWN & ASBURY (1984) a neuropatia sensitiva de fibras finas, compreende em torno de 10% das diferentes variedades de neuropatia periférica diabética, estimativa inferior à nossa.

A quantificação da densidade linear das FNI imunoreativas ao PGP 9.5 permitiu a distinção de todas as classes de neuropatia diabética com o grupo normal. Entre os subgrupos de diabéticos possibilitou a diferenciação entre os subgrupos sintomáticos (classe 3 e 4) e o subgrupo classe 1, o subgrupo classificado como não portador de neuropatia pelos métodos clínicos e neurofisiológicos.

5.4. MODELO DE ENVOLVIMENTO DAS FIBRAS NERVOSAS NO DIABETE MELITO TIPO 2

Foi observado alteração neural associada das fibras finas e grossas em 26 (53.1%) pacientes e seletiva das fibras finas em 23 (46.9%) pacientes. Detectou-se, portanto, dois padrões principais de envolvimento das fibras nervosas no DM tipo 2:

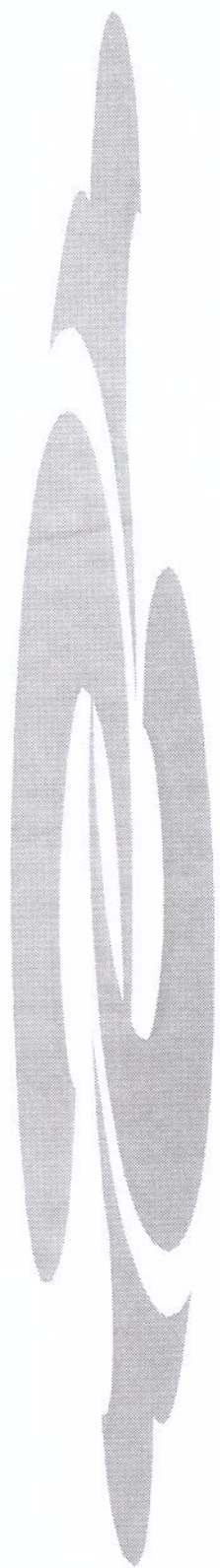
- a) Comprometimento concomitante das fibras finas e mielínicas grossas, expresso por redução ou ausência das FNI e ECN anormal
- b) Comprometimento das fibras finas, com preservação das fibras mielínicas grossas, expresso por redução ou ausência das FNI e ECN dentro dos limites da normalidade.

Considerando estas evidências, intui-se que os subconjuntos de fibras constituintes dos nervos, frente às alterações gerais e específicas promovidas pelo DM tipo 2, respondem de acordo com as suas características

individuais de vulnerabilidade, de forma totalmente independente uns dos outros. Às vezes, com alterações simultâneas, estabelecendo uma correlação temporal de envolvimento das fibras finas e grossas, outras vezes, com envolvimento predominante das fibras finas. Em consonância com estes dados, estudos clínicos prévios (HEIMANS et al., 1986; JAMAL et al., 1987; LEVY et al., 1987; LE QUESNE et al., 1990) observaram que o envolvimento das fibras grossas e finas pode ocorrer concomitantemente ou pode haver predomínio de um subconjunto sobre o outro. Outros estudos clínicos demonstraram a ausência de correlação entre o limiar vibratório e VCN, que expressam a função das fibras grossas, com a quantificação dos nervos intraepidérmicos, relacionadas a fibras finas, em pacientes diabéticos (LEVY et al., 1992; PROPERZI et al., 1993). Recentes estudos experimentais também confirmaram estas conclusões, ao demonstrarem que na neuropatia diabética, independentemente do mecanismo básico do dano neural, a administração exógena do fator de crescimento neural protege ou restaura a função das fibras sensitivas finas, mas não apresenta efeito sobre as fibras grossas (APFEL et al., 1994; ELIAS et al., 1998), enquanto a neurotrofina 3 reverte a VCN, sem atuação sobre as fibras finas (MIZISIN et al., 1999), intuindo-se assim mecanismos diversos de envolvimento e sensibilidade das fibras nervosas finas e grossas.

5.5. CONTRIBUIÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA CUTÂNEA NO DIAGNÓSTICO DA NEUROPATIA DIABÉTICA E COMPROMETIMENTO DAS FIBRAS FINAS.

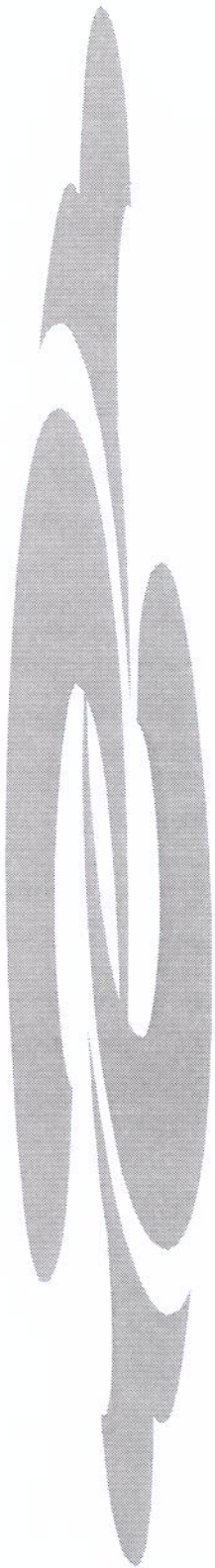
O método de imunofluorescência indireta para o marcador neural geral, PGP 9.5, visando à avaliação das FNI revelou-se extremamente adequado para a detecção de envolvimento neuropático, inclusive subclínico, das fibras finas em pacientes portadores de DM tipo 2. Todos os pacientes apresentaram comprometimento das fibras finas. Previamente à utilização dos resultados da avaliação imunohistoquímica, a incidência de neuropatia era subestimada. Obedecendo aos mesmos critérios diagnósticos, 07 pacientes foram reclassificados, ampliando de 34 (69.3%) pacientes para 41 (83.67%) pacientes os portadores de neuropatia no grupo total de diabéticos. Este método foi de especial importância no subgrupo classe 1 (ausência de neuropatia), no qual possibilitou o diagnóstico de neuropatia em 07 (46.66%) pacientes, além de confirmar o comprometimento das fibras finas nos restantes. Observamos, portanto, que no DM tipo 2, a definição clínica do envolvimento das fibras finas foi imprecisa, com a presença de pacientes com extensas perdas de fibras intra-epidérmicas, sem perdas sensitivas clinicamente consistentes.



CONCLUSÕES

Em nosso estudo, concluímos:

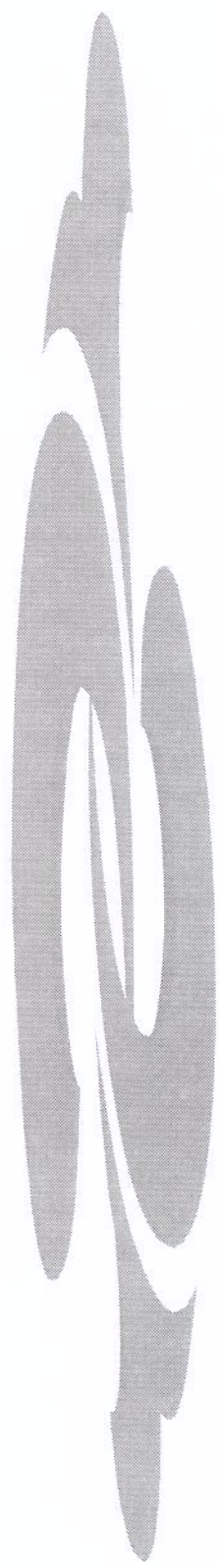
1. A determinação da densidade linear (número de fibras/mm) das fibras intra-epidérmicas PGP-IR, em pacientes portadores de DM tipo 2 foi um método diagnóstico sensível e específico para a detecção de comprometimento das fibras finas. A totalidade (100%) dos pacientes, inclusive os clinicamente dentro dos limites da normalidade, apresentaram ausência ou redução do número de fibras intra-epidérmicas em relação ao grupo controle. A eficiência diagnóstica do método para a definição da neuropatia diabética foi de 83.67% no grupo estudado.
2. Os resultados do processamento imunohistoquímico da inervação cutânea com anticorpo policlonal anti PGP 9.5 permitiu a diferenciação, definida estatisticamente, entre os subgrupos de diabéticos classificados clínica e neurofisiologicamente como não portadores de neuropatias (classe 1) dos subgrupos classificados como portadores de neuropatia sintomática, com ECN normal (classe 3) e alterada (Classe 4).
3. O modelo de envolvimento das fibras nervosas no grupo estudado de portadores de DM tipo 2, obedeceu ou ao padrão de envolvimento predominante das fibras finas ou ao de disfunção neural concomitante das fibras grossas e finas.



SUMMARY

Forty-nine patients (20 male and 29 female) with diabetes mellitus type 2 (DM-2) and 18 healthy individuals (controls; 4 male and 14 female) were evaluated. The mean age between patients with DM-2 and controls were 56.69 ± 6.44 and 54.33 ± 7.48 years, respectively. The aims of this study were as follows: 1) To evaluate the usefulness of immunohistochemistry with rabbit polyclonal antibody to protein gene product 9.5 (PGP 9.5) on the diagnosis of neuropathy in DM-2; 2) To determine by skin biopsy whether the number of epidermal nerve fibers (ENFs) immunoreactive (IR) to PGP 9.5 differ significantly between subgroups of patients with DM, that were previously investigated clinically and electrophysiologically; 3) To determine the pattern of involvement of nerve fibers in patients with DM-2. The patients were divided in four groups: Class 1 ($n = 15$), absence of neuropathy; Class 2 ($n = 8$), neuropathy without symptoms; Class 3 ($n = 8$), symptomatic neuropathy with normal nerve conduction study (NCS); Class 4, symptomatic neuropathy with abnormal NCS. Clinical symptoms, NCS, and sympathetic skin response were altered in 26 (53.06%), 27 (55.1%), 38 (77.6%), and 14 (28.5%) patients, respectively. Skin biopsies (3mm in diameter) were obtained from the distal part of the right leg in both patients and controls. Skin biopsies were processed using immunofluorescence with anti-PGP 9.5. The linear density (number of ENFs per millimeter of epidermal length) was used for quantification. The nerve fibers PGP-IR were distributed throughout all the epidermal layers. The ENFs densities were 1.40 ± 0.97 and 7.04 ± 2.46 in patients with DM-2 and controls, respectively. The linear densities between groups of patients with DM-2 were as follows: Class 1, 2.39 ± 0.53 ; Class 2, 1.51 ± 0.49 ;

Class 3, 1.36 ± 0.41 ; Class 4, 0.54 ± 0.79 . The densities of fibers PGP-IR were significantly ($p = 0.001$) reduced in patients from classes 3 and 4 when compared to those in the class 1. Our result suggest that measuring of nerve fibers PGP-IR densities allows early detection of the involvement of unmyelinated (C nociceptive) and small myelinated (A δ) nerve fibers in patients with DM-2, including those without clinical symptoms. In addition, it allows distinction between several degrees of involvement of small fibers into classes 1, 3, and 4. We also found that while all patients (100%) had unmyelinated and small myelinated fibers dysfunction, only 26 (53.06%) patients had large myelinates fibers dysfunction. This finding indicates that two patterns of involvement of nervous fibers are found in patients with DM-2, the first associated with dysfunction of both small e large nerve fibers, and the second selective to small nerve fibers.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ALBERS, K.M.; WRIGHT, D.E.; DAVIS, B.M. – Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. **J. Neurosci.**, **14**:1422-1432, 1994.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - Consensus statement : report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. **Diabetes Care**, **11**:592-597, 1988.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, **20**:1183-1197, 1997.
- APFEL, S.C.; AREZZO, J.C.; BROWNLEE, M.; FEDEROFF, H.; KESSLER, J.A. – Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy. **Brain Research**, **634**:7-12, 1994.
- ARCHER, A.G.; WATKINS, P.J.; THOMAS, P.K.; SHARMA, A.K.; PAYAN, J. – The natural history of acute painful neuropathy in diabetes mellitus. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **46**:491-499, 1983.
- ARTHUR, R.P. & SHELLEY, W.B. – Innervation of human epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, **32**:397-410, 1959.
- ATKINSON, M.A. & MACLAREN, N.K. - The pathogenesis of insulin dependent diabetes. **N. Engl. J. Med.**, **331**:1428-1436, 1994.
- BANERJI, M. & LEOVITZ, H. - Insulin sensitive and insulin resistant variants in IDDM. **Diabetes**, **38**:784-792, 1989.
- BEHSE, F.; BUCHTHAL, F.; CARLSEN, F.; KNAPPEIS, G.G. - Unmyelinated fibres and Schwann cells of sural nerve in neuropathy. **Brain**, **98**:493-510, 1975.

-
- BEHSE, F.; BUCHTAL, F.; CARLSEN, F. - Nerve biopsy and conduction studies in diabetic neuropathy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **40**:1072-1082, 1977.
- BERTELSMANN, F.W.; HEIMANS, J.J.; WEBER, E.J.M.; VAN DER VEEN, E.A.; SCHOUTEN, J.A. - Thermal discrimination thresholds in normal subjects and in patients with diabetic neuropathy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **48**:686-690, 1985.
- BJÖRKLUND, H.; DALSGAARD, C.J.; JONSSON, C.E.; HERMANSSON, A. - Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy human skin : an immunohistochemical study. **Cell. Tissue Res.**, **243**:51-57, 1986.
- BOGARDUS, C.; LILLIOJA, S.; MOTT, D.M.; HOLLENBECK, C.; REAVEN, G. - Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. **Am. J. Physiol.**, **248**:E286-E291, 1985.
- BREATHNACH, A.S. - Electron microscopy of cutaneous nerves and receptors. **J. Invest. Dermatol.**, **69**:8-26, 1977.
- BROMM, B.; FRIELING, A.; LANKERS, J. - Laser-evoked brain potentials in patients with dissociated loss of pain and temperature sensibility. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, **80**: 284-291, 1991.
- BROWN, M.J. & ASBURY, A.K. - Diabetic neuropathy. **Ann. Neurol.**, **15**:2-12, 1984.
- BROWN, M.J.; MARTIN, J.R.; ASBURY, A.K. - Painful diabetic neuropathy : a morphometric study. **Arch. Neurol.**, **33**:164-171, 1976.
- BROWNLEE, M. - Glycation and diabetic complications. **Diabetes**, **43**:836-841, 1994.

-
- BUCALA, R.; TRACEY, K.J.; CERAMI, A. - Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. **J. Clin. Invest.**, **87**:432-438, 1991.
- BUCHTHAL, F. & ROSENFALCK, A. - Sensory potentials in polyneuropathy. **Brain**, **94**:241-262, 1971.
- CAMERON, N.E. & COTTER, M.A. - Neurovascular dysfunction in diabetic rats. **J. Clin. Invest.**, **96**:1159-1163, 1995.
- CANTOR, A.B.; KRISCHER, J.P.; CUTHBERTSON, D.D.; SCHATZ, D.A.; RILEY, W.J.; MALONE, J.; SCHWARTZ, S.; QUATTRIN, T.; MACLAREN, N.K. - Age and family relationship accentuate the risk of IDDM in relatives of patients with insulin dependent diabetes. **J. Clin. Endocrinol. metab.**, **80**:3739-3743, 1995.
- CAUDA, N. – The free penicillate nerve endings of the human hairy skin. **J. Anat.**, **115**:277-288, 1973.
- CAUDA, N. – Fine morphological characteristics and microtopography of the free nerve ending of the human digital skin. **Anat. Rec.**, **198**:643-656, 1980
- CHERIAN, P.V.; KAMIJO, M.; ANGELIDES, K.J.; SIMA, A.A. – Nodal Na(+)-channel displacement is associated with nerve-conduction slowing in the chronically diabetic BB/W rat : prevention by aldose reductase inhibition. **J. Diabetes Complications**, **10**:192-200, 1996.
- CHOUCHKOV, C.N. – An electron microscopic study of the intraepidermal innervation of human glabrous skin. **Acta Anat.**, **88**:84-92, 1974.

-
- CHRISTIE, M.R.; TUN, R.Y.; LO, S.S.S.; CASSIDY, D.; BROWN, T.J.;
HOLLANDS, J.; SHATTOCK, M.; BOTTAZZO, G.F.; LESLIE, R.D.G. -
Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct
markers for development of IDDM : studies with identical twins. **Diabetes**,
41:782-787, 1992.
- CLEMENTS, R.S. - Diabetic neuropathy : new concepts of its etiology. **Diabetes**,
28:604-611, 1979.
- DALSGAARD, C.J.; JONSSON, C.E.; HÖKFELT, T.; CUELLO, A.C. - Localization
of substance P-immunoreactive nerve fibers in the human digital skin.
Experientia, **39**:1018-1020, 1983.
- DALSGAARD, C.J.; RYDH, M.; HAEGERTRAND, A. - Cutaneous innervation in
man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies.
Histochemistry, **92**:385-389, 1989.
- DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP - The effect
of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-
term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**,
329:977-986, 1993.
- DIABETES EPIDEMIOLOGY RESEARCH INTERNATIONAL MORTALITY STUDY
GROUP. Major cross-country differences in risk of dying for people with IDDM.
Diabetes Care, **14**:49-54, 1991.
- DIAMOND, J.; HOLMES, M.; COUGHLIN, M. - Endogenous NFG and nerve
impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the
adult rat. **J. Neurosci.**, **12**:1454-1466, 1992.

-
- DORFMAN, L.J.; CUMMINS, K.L.; REAVEN, G.M.; CERANSKI, J.; GREENFIELD, M.S.; DOBERNE, L. - Studies of diabetic polyneuropathy using conduction velocity distribution (DCV) analysis. **Neurology**, **33**:773-779, 1983.
- DOWNIE, A.W. & NEWELL, D.J. - Sensory nerve conduction in patients with diabetes mellitus and controls. **Neurology**, **11**:876-882, 1961.
- DUBNER, R. & BENNETT, G.J. - Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Ann. Rev. Neurosci.**, **6**:381-418, 1983.
- DYCK, P.J. - Detection, characterization, and staging of polyneuropathy : assessed in diabetics. **Muscle Nerve**, **11**:21-32, 1988.
- DYCK, P.J.; GIANNINI, C.; LAIS, A. - Pathologic alterations of nerves. In: DYCK, P.J.; THOMAS, P.K.; GRIFFIN, J.W.; LOW, P.A.; PODUSLO, J.F., ed.- **Peripheral Neuropathy**. 3.ed. Philadelphia, W.B.SAUNDERS, 1993. p.514-595.
- DYCK, P.J.; KARNES, J.L.; DAUBE, J.; O'BRIEN, P.; SERVICE, F.J. - Clinical and neuropathological criteria for the diagnosis and staging of diabetic polyneuropathy. **Brain**, **108**:861-880, 1985.
- DYCK, P.J.; KARNES, J.L.; O'BRIEN, P.; OKAZAKI, H.; LAIS, A.; ENGELSTAD, J. - The spatial distribution of fiber loss in diabetic polyneuropathy suggests ischemia. **Ann. Neurol.**, **19**:440-449, 1986a.
- DYCK, P.J.; KRATZ, K.M.; KARNES, J.L.; LITCHY, W.J.; KLEIN, R.; PACK, J.M.; WILSON, D.M.; O'BRIEN, P. C.; MELTON, L.J. - The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy

-
- in a population-based cohort : the Rochester diabetic neuropathy study. **Neurology**, **43**:817-824, 1993.
- DYCK, P.J.; KRATZ, K.M.; LEHMAN, K.A.; KARNES, J.L.; MELTON, L.J.; O'BRIEN, P. C.; LITCHY, W.J.; WINDEBANK, A.J.; SMITH, B.E.; LOW, P.A.; SERVICE, F.J.; RIZZA, R.A.; ZIMMERMAN, B.R. - The Rochester diabetic neuropathy study : design, criteria for types of neuropathy, selection bias, and reproducibility of neuropathic tests. **Neurology**, **41**:799-807, 1991.
- DYCK, P.J.; LAIS, A.; KARNES, J.L.; O'BRIEN, P.; RIZZA, R. - Fiber loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. **Ann. Neurol.**, **19**:425-439, 1986b.
- DYCK, P.J.; SHERMAN, W.R.; HALLCHER, L.M.; SERVICE, F.J.; O'BRIEN, P.C.; GRINA, L.A.; PALUMBO, P.J.; SWANSON, C.J. - Human diabetic endoneural sorbitol, fructose, and myo-inositol related to sural nerve morphometry. **Ann. Neurol.**, **8**:590-596, 1980.
- DYCK, P.J.; ZIMMERMAN, I.R.; JOHNSON, D.M.; GILLEN, D.; HOKANSON, J.L.; KARNES, J.L.; GRUENER, G.; O'BRIEN, P.C. - A standard test of heat-pain responses using case IV. **J. Neurol. Sci.**, **136**:54-63, 1996.
- DYCK, P.J.; ZIMMERMAN, I.R.; O'BRIEN, P.C.; NESS, A.; CASKEY, P.E.; KARNES, J.; BUSHEK, W. - Introduction of automated systems to evaluate touch-pressure, vibration, and thermal cutaneous sensation in man. **Ann. Neurol.**, **4**:502-510, 1978.

-
- ELIAS, K.A.; CRONIN, M.J.; STEWART, T.A.; CARLSEN, R.C. – Peripheral neuropathy in transgenic diabetic mice : restoration of C fiber function with human recombinant nerve growth factor. **Diabetes**, **47**:1637-1642, 1998.
- ELLENBERG, M. – Diabetic neuropathic cachexia. **Diabetes**, **23**:418-423, 1974.
- ERLANGER, J. & GASSER, H.S. – The action potential in fibers of slow conduction in spinal roots and somatic nerves. **Am. J. Physiol.**, **92**:43-82, 1930.
- EWING, D.J. & CLARKE, B.F. - Diabetic autonomic neuropathy : present insights and future prospects. **Diabetes Care**, **9**:648-665, 1986.
- FAGIUS, J. & WAHREN, L.K. – Variability of sensory threshold determinations in clinical use. **J. Neurol. Sci.**, **51**:11-27, 1981.
- FARADJI, V. & SOTELO, J. - Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. **Acta Neurol. Scand.**, **81**:402-406, 1990.
- FEDELE, D.; COMI, G.; COSCELLI, C.; CUCINOTTA, D.; FELDMAN, E.L.; GHIRLANDA, G.; GREENE, D.A.; SANTEUSANIO, F. - A multicenter study on the prevalence of diabetic neuropathy in Italy. **Diabetes Care**, **20**:836-842, 1997.
- FOREMAN, J.C. – Peptides and neurogenic inflammation. **Br. Med. Bull.**, **43**:386-400, 1987.
- FOWLER, C.J; ALI, Z.; KIRBY, R.S.; PRYOR, J.P. - The value of testing for unmyelinated fibre, sensory neuropathy in diabetic impotence. **Br. J. Urol.**, **61**:63-67, 1988.

-
- FUJIMOTO, W.Y.; LEONETTI, D.L.; KINYOUN, J.L.; SHUMAN, W.P.; STOLOV, W.C.; WAHL, P.W. - Prevalence of complications among second-generation japanese-american men with diabetes impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. **Diabetes**, **36**:730-739, 1987.
- GARIBALDI, S.G. – Condução nervosa do ramo dorsal do nervo ulnar : valores de referências. Campinas, 1996. (Tese Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas).
- GIANNINI, C. & DYCK, P.J. - Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneural microvessels in diabetes mellitus. **Ann. Neurol.**, **36**:408-415, 1994.
- GIANNINI, C. & DYCK, P.J. - Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. **Ann. Neurol.**, **37**:498-504, 1995.
- GIBBINS, I.L.; WATTCHOW, D.; COVENTRY, B. – Two immunohistochemically identified populations of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive axons in human skin. **Brain Res.**, **414**:143-148, 1987.
- GIULIANI, M.J.; STEWART, J.D.; LOW, P.A. – Distal small-fiber neuropathy. In: LOW, P.A., ed. - **Clinical autonomic disorders**. 2.ed. Philadelphia, Lippincott – Raven, 1997.p.699-714.
- GIULIANI, M.J.; TOBIN, K.; LOW, P. – Small-fiber neuropathy : evaluation recommendations. **Neurology**, **46**:A312, 1996.
- GREENE, D.A.; BROWN, M.J.; BRAUNSTEIN, S.N.; SCHWARTZ, S.S.; ASBURY, A. K.; WINEGRAD, A.I. – Comparison of clinical course and sequential

-
- electrophysiological tests in diabetics with symptomatic polyneuropathy and its implications for clinical trials. **Diabetes**, **30**:139-147, 1981.
- GREENE, D.A.; SIMA, A.A.F.; STEVENS, M.J.; FELDMAN, E.L.; LATTIMER, S.A.
- Complications : neuropathy, pathogenetic considerations. **Diabetes care**, **15**:1902-1925, 1992.
- GULBENKIAN, S.; WHARTON, J.; POLAK, J.M. – The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). **J. Auton. Syst.**, **18**:235-247, 1987.
- HACKER, G.W.; POLAK, J.M.; SPRINGALL, D.R.; BALLESTA, J.; CADIEUX, A.; GU, J.; TROJANOWSKI, J.Q.; DAHL, D.; MARANGOS, P.J. – Antibodies to neurofilament protein and other brain proteins reveal the innervation of peripheral organs. **Histochemistry**, **82**:581-593, 1985.
- HARATI, Y. - Diabetic peripheral neuropathies. **Ann. Intern. Med.**, **107**:546-559, 1987.
- HARATI, Y. - Frequently asked questions about diabetic peripheral neuropathies. **Neurol. Clin.**, **10**:783-807, 1992.
- HEIMANS, J.J.; BERTELSMANN, F.W.; VAN ROOY, C.G.M. – Large and small nerve fiber function in painful diabetic neuropathy. **J. Neurol. Sci.**, **74**:1-9, 1986.
- HILLIGES, M.; WANG, L.; JOHANSSON, O. – Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, **104**:134-137, 1995.

-
- HIRAI, A.; YASUDA, H.; JOKO, M.; MAEDA, T.; KIKKAWA, R. – Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves. **J. Neurol. Sci.**, **172**:55-62, 2000.
- HOLLAND, N.R.; CRAWFORD, T.O.; HAUER, P.; CORNBATH, D.R.; GRIFFIN, J.W.; MCARTHUR, J.C. – Small-fiber sensory neuropathies : clinical course and neuropathology of idiopathic cases. **Ann. Neurol.**, **44**:47-59, 1998.
- HOLLAND, N.R.; STOCKS, A.; HAUER, P.; CORNBATH, D.R.; GRIFFIN, J.W.; MCARTHUR, J.C. – Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. **Neurology**, **48**:708-711, 1997.
- IGGO, A. & ANDRES, K.H. – Morphology of cutaneous receptors. **Ann. Rev. Neurosci.**, **5**:1-31, 1982.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN - Pain terms : a list with definitions and notes on usage. **Pain**, **6**:249-252, 1979.
- JACKSON, P. & THOMPSON, R.J. – The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Neurol. Sci.**, **49**:429-438, 1981.
- JAMAL, G.A.; HANSEN, S.; WEIR, A.I.; BALLANTYNE, J.P. – The neurophysiologic investigation of small-fiber neuropathies. **Muscle Nerve**, **10**:537-545, 1987.
- JEYARAJAH, R.; SAMARAWICKRAMA, P.; JAMEEL, M.M. - Autonomic function tests in non-insulin dependent diabetic patients and apparently healthy volunteers. **J. Chron. Dis.**, **39**:479-484, 1986.

-
- KANDA, T.; TSUKAGOSHI, H.; ODA, M.; MIYAMOTO, K.; TANABE, H. – Morphological changes in unmyelinated nerve fibres in the sural nerve with age. **Brain**, **114**:585-599, 1991.
- KANDEL, E.R.; SCHWATZ, J.H.; JESSEL, T.M. – Os sistemas sensoriais. In : _____ - **Fundamentos da neurociência e do comportamento**. Rio de Janeiro, Prentice – Hall do Brasil, 1997. p.297-309.
- KARANTH, S.S.; SPRINGALL, D.R.; KUHN, D.M.; LEVENE, M.M.; POLAK, J.M. – An immunocytochemical study of cutaneous innervation and the distribution of neuropeptides and protein gene product 9.5 in man and commonly employed laboratory animals. **Am. J. Anat.**, **191**:369-383, 1991.
- KARANTH, S.S.; SPRINGALL, D.R.; LUCAS, S.; LEVY, D.; LEVENE, M.M.; POLAK, J.M. – Changes in nerves and neuropeptides in skin from 100 leprosy patients investigated by immunocytochemistry. **J. Pathol.**, **93**:289-296, 1989.
- KENNEDY, W.R. NOLANO, M.; WENDELSCHAFER-CRABB, G.; JOHNSON, T..L.; TAMURA, E. – A skin blister method to study epidermal nerves in peripheral nerve disease. **Muscle & Nerve**, **22**:3360-371, 1999.
- KENNEDY, W.R.& WENDELSCHAFER-CRABB, G. – The innervation of human epidermis. **J. Neurol. Sci.**, **115**:184-190, 1993.
- KENNEDY, W.R.; WENDELSCHAFER-CRABB, G.; BRELJE, T.C. – Innervation and vasculature of human sweat glands : an immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. **J. Neurosci.**, **14**:6825-6833, 1994.

-
- KENNEDY, W.R.; ZELICKSON, B.; JOHNSON, T.; WENDELSCHAFER-CRABB, G. - Classification of epidermal nerve fibers. **Neurology**, **46**(suppl):A287, 1996.
- KIHARA, M. & LOW, P.A. - Impaired vasoreactivity to nitric oxide in experimental diabetic neuropathy. **Exp. Neurol.**, **132**:180-185, 1995.
- KIMURA, J.; YAMADA, T.; STEVLAND, N.P. - Distal slowing of motor nerve conduction velocity in diabetic polyneuropathy. **J. Neurol. Sci.**, **42**:291-302, 1979.
- KIMURA, J. - Principles of nerve conduction studies. In: _____
Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle : principles and practice. Philadelphia, F.A.Davis, 1983. p.59-104.
- KRUGER, M.; BRUNKO, E.; DORCHY, H.; NÖEL, P. - Femoral versus peroneal neuropathy in diabetic children and adolescents : relationships to clinical status, metabolic control and retinopathy. **Diabetes Metab.**, **13**:110-115, 1987.
- LACOUR, J.P.; DUBOIS, D.; PISANI, A.; ORTONNE, J.P. - Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. **Br. J. Dermatol.**, **125**:535-542, 1991.
- LAMONTAGNE, A. & BUCHTHAL, F. - Electrophysiological studies in diabetic neuropathy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **33**:442-452, 1970.
- LE QUESNE, P.M. & FOWLER, C.J. - A study of threshold in diabetics with neuropathic foot lesions. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **49**:1191-1194, 1986.

-
- LE QUESNE, P.M.; FOWLER, C.J.; PARKHOUSE, N. – Peripheral neuropathy profile in various groups of diabetics. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **53**:558-563, 1990.
- LEVY, D.M.; ABRAHAM, R.R.; ABRAHAM, R.M. – Small and large fiber involvement in early diabetic neuropathy : a study with the medial plantar response and sensory thresholds. **Diabetes Care**, **10**:441-447, 1987.
- LEVY, D.M.; KARANTH, S.S.; SPRINGALL, D.R.; POLAK, J.M. – Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus : an immunocytochemical study. **Diabetologia**, **32**:427-433, 1989.
- LEVY, D.M.; TERENGHI, G.; GU, X.-H.; ABRAHAM, R.R.; SPRINGALL, D.R.; POLAK, J.M. – Immunohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin : relationship to tests of neurological function. **Diabetologia**, **35**:889-897, 1992.
- LIGHT, A.R. & PERL, E.R. – Peripheral sensory systems. In: DYCK, P.J.; THOMAS, P.K.; GRIFFIN, J.W.; LOW, P.A.; PODUSLO, J.F., ed.-**Peripheral Neuropathy**. 3.ed. Philadelphia, W.B.SAUNDERS, 1993. p.149-165.
- LINDBERGER, M.; SCHRÖDER, H.D.; SCHULTZBERG, M.; KRISTENSSON, K.; PERSSON, A.; ÖSTMAN, J.; LINK, H. – Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies : immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. **J. Neurol. Sci.**, **93**:289-296, 1989.
- LLEWELYN, J.G.; GILBEY, S.G.; THOMAS, P.K.; KING, R.H.M.; MUDDLE, J.R.; WATKINS, P.J. – Sural nerve morphometry in diabetic autonomic and painful sensory neuropathy : a clinicopathological study. **Brain**, **114**:867-892, 1991.

-
- LOW, P.A. – Autonomic neuropathy. **Semin. Neurol.**, 7:49-57, 1987a.
- LOW, P.A. - Recent advances in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Muscle Nerve**, 10:121-128, 1987b.
- LOW, P.A. – Laboratory evaluation of autonomic function. In : LOW, P.A., ed. – **Clinical Autonomic Disorders**. 2.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997. p.179-208.
- LOW, P.A. & NICKANDER, K.K. - Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. **Diabetes**, 40:873-877, 1991.
- LUNDBERG, L.M.; ALM, P.; WHARTON, J.; POLAK, J.M. – Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) : a new neuronal marker visualizing the whole uterine innervation and pregnancy-induced and developmental changes in the guinea pig. **Histochemistry**, 90:9-17, 1988.
- MACIOCE, P.; FILLIATREAU, G.; FIGLIOMENI, B.; HASSIG, R.; THIÉRY, J.; DI GIAMBERARDINO, L. – Slow axonal transport impairment of cytoskeletal proteins in streptozocin-induced diabetic neuropathy. **J. Neurochem.**, 53:1261-1267, 1989.
- MACKENZIE, R.A.; BURKE, D.; SKUSE, N.F.; LETHLEAN, A.K. – Fibre function and perception during cutaneous nerve block. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, 38:865-873, 1975.
- MACLAREN, N. & ATKINSON, M. - Is insulin-dependent diabetes mellitus environmentally induced ? **N. Engl. J. Med.**, 327:348-349, 1992.

-
- MCARTHUR, J.C.; STOCKS, E.A.; HAUER, P.; CORNBLATH, D.R.; GRIFFIN, J.W.- Epidermal nerve fiber density : normative reference range and diagnostic efficiency. **Arch. Neurol.**, **55**:1513-1520, 1998.
- MCCARTHY, B.G.; HSIEH, S.T.; STOCKS, A.; HAUER, P.; MACRO, C.; CORNBLATH,D.R.; GRIFFIN, J.W.; MCARTHUR, J.C. - Cutaneous innervation in sensory neuropathies : evaluation by skin biopsy. **Neurology**, **45**:1848-1855, 1995.
- MCLEOD,J.G. & TUCK, R.R. - Disorders of the autonomic nervous system: pathophysiology and clinical features. **Ann. Neurol.**, **21**:419-430, 1987.
- MILNE, J.A. – The normal skin. In: _____ - **An introduction to the diagnostic histopathology of the skin**. London, Edward Arnold, 1972. p.9-43.
- MIZISIN, A.P.; CALCUTT, N.A.; TOMLINSON, D.R.; GALLAGHER, A.; FERNYHOUGH, P. – Neurotrophin-3 reverses nerve conduction velocity deficits in streptozotocin-diabetic rats. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, **4**:211-221, 1999.
- MOLINA, F.A.; BURROWS, N.P.; JONES, R.R.; TERENCE, G.; POLAK, J.M. – Increased sensory neuropeptides in nodular prurigo : a quantitative immunohistochemical analysis. **Br. J. Dermat.**, **127**:344-351, 1992.
- MUNGER, B.L. & IDE, C. – The structure and function of cutaneous sensory receptors. **Arch. Histol. Cytol.**, **51**:1-34, 1988.

-
- MYERS, M.A.; RABIN, D.U.; ROWLEY, M.J. - Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase. **Diabetes**, **44**:1290-1295, 1995.
- NEWMAN, B.; SELBY, J.V.; SLEMENDA, C.; FABSITZ, R.; FRIEDMAN, G.D. - Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. **Diabetologia**, **30**:763-738, 1987.
- NILSSON, J.; VON EULER, A.M.; DALSGAARD, C.J. - Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. **Nature**, **315**:61-63, 1985.
- NOVOTNY, G.E.K. & GOMMERT-NOVOTNY, E. - Intraepidermal nerves in human digital skin. **Cell. Tissue Res.**, **254**:111-117, 1988.
- OCHOA, J. - Recognition of unmyelinated fiber disease : morphologic criteria. **Muscle Nerve**, **1**:375-387, 1978.
- OCHOA, J. & TOREBJÖRK, E. - Sensations evoked by intraneural microstimulation of C nociceptor fibres in human skin nerves. **J. Physiol.**, **415**:583-599, 1989.
- OH, S.J. - Anatomical guide for common nerve conduction studies. In: _____-**Clinical electromyography nerve conduction studies**. 2.ed. Baltimore, Williams & wilkins, 1993a. p.56-69.
- OH, S.J. - Normal values for common nerve conduction tests. In: _____-**Clinical electromyography nerve conduction studies**. 2.ed. Baltimore, Williams & wilkins, 1993b. p.84-104.

-
- PIRART, J. - Diabetes mellitus and its degenerative complications : a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. **Diabetes Care**, 1:168-188, 1978.
- POLONSKY, K.S.; STURIS, J.; BELL, G.I. - Non-insulin-dependent diabetes mellitus : a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. **N. Engl. J. Med.**, 334:777-784, 1996.
- PROPERZI, G.; FRANCAVILLA, S.; POCCIA, G.; ALOISI, P.; GU, X.; TERENCEHI, G.; POLAK, J.M. – Early increase precedes a depletion of VIP and PGP 9.5 in the skin of insulin-dependent : correlation between quantitative immunohistochemistry and clinical assessment of peripheral neuropathy. **J. Pathol.**, 169:269-277, 1993.
- REEVES, M.L.; SEIGLER, D.E.; AYYAR, D.R.; SKYLER, J.S. - Medial plantar sensory response : sensitive indicator of peripheral nerve dysfunction in patients with diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, 76:842-846, 1984.
- SAID, G.; GOULON-GOEAU, C.; LACROIX, C.; MOULONGUET, A. - Nerve biopsy findings in different patterns of proximal diabetic neuropathy. **Ann. Neurol.**, 35:559-569, 1994.
- SAID, G.; SLAMA, G.; SELVA, J. - Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy : a clinical and pathological study. **Brain**, 106:791-807, 1983.
- SCOTT, J.N.; CLARK, A.W.; ZOCHODNE, D.W. – Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes : failure of synthesis and export by sensory neurons. **Brain**, 122:2109-2117, 1999.

-
- SHAHANI, B.T.; HALPERIN, J.J.; BOULU, P.; COHEN, J. – Sympathetic skin response : a method of assessing unmyelinated axon dysfunction in peripheral neuropathies. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **47**:536-542, 1984.
- SIMONE, D.A.; NOLANO, M.; JOHNSON, T.; WENDELSCHAFER-CRABB, G.; KENNEDY, W.R. – Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. **J. Neurosci.**, **18**:8947-8959, 1998.
- SMITH, S.J.M.; ALI, Z.; FOWLER, C.J. – Cutaneous thermal thresholds in patients with painful burning feet. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, **54**:877-881, 1991.
- SOLIVEN, B.; MASELLI, R.; JASPAN, J.; GREEN, A.; GRAZIANO, H.; PETERSEN, M.; SPIRE, J.P. – Sympathetic skin response in diabetic neuropathy. **Muscle Nerve**, **10**:711-716, 1987.
- SOSENKO, J.M.; BOULTON, A.J.; KUBRUSLY, D.B.; WEINTRAUB, J.K.; SKYLER, J.S. - The vibratory perception threshold in young diabetic patients : associations with glycemia and puberty. **Diabetes Care**, **8**:605-607, 1985.
- SPRINGALL, D.R.; KARANTH, S.S.; KIRKHAM, N.; DARLEY, C.R.; POLAK, J.M. – Symptoms of notalgia paresthetica may be explained by increased dermal innervation. **J. Invest. Dermatol.**, **97**:555-561, 1991.
- STEWART, J.D. & LAL, S. – Autonomic and somatic neurologic dysfunction in impotent type II diabetic men. **Can. J. Neurol. Sci.**, **17**:222-223, 1990.
- STEWART, J.D.; LOW, P.A.; FEALEY, R.D. – Distal small neuropathy : results of tests of sweating and autonomic cardiovascular reflexes. **Muscle Nerve**, **15**:661-665, 1992.

-
- TANAKA, T.; DANNO, K.; IKAI, K.; IMAMURA, S. – Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, **90**:399-401, 1988.
- TERENGHI, G.; BUNKER, C.B.; LIU, Y.; SPRINGALL, D.R.; COWEN, T.; DOWD, P.M.; POLAK, J.M. – Image analysis quantification of peptide-immunoreactive nerves in the skin of patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. **J. Pathol.**, **164**:245-252, 1991.
- TESFAYE, S.; MALIK, R.; WARD, J.D. - Vascular factors in diabetic neuropathy. **Diabetologia**, **37**:847-854, 1994.
- THOMAS, P.K. – Diabetic neuropathy human and experimental. **Drugs**, **32**(suppl. 2):36-42, 1986.
- THOMAS, P.K. - Growth factors and diabetic neuropathy. **Diab. Med.**, **11**:732-739, 1994.
- THOMAS, P.K.; BERTHOLD, C.H.; OCHOA, J. – Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In: DYCK, P.J.; THOMAS, P.K.; GRIFFIN, J.W.; LOW, P.A.; PODUSLO, J.F., ed.- **Peripheral Neuropathy**. 3.ed. Philadelphia, W.B.SAUNDERS, 1993. p.28-91.
- THOMAS, P.K. & OCHOA, J. – Clinical features and differential diagnosis. In: DYCK, P.J.; THOMAS, P.K.; GRIFFIN, J.W.; LOW, P.A.; PODUSLO, J.F., ed. – **Peripheral Neuropathy**. 3.ed. Philadelphia, W.B.SAUNDERS, 1993. p.749-769.
- THOMAS, P.K. & TOMLINSON, D.R. - Diabetic and hypoglycemic neuropathy. In: DYCK, P.J.; THOMAS, P.K.; GRIFFIN, J.W.; LOW, P.A.; PODUSLO, J.F., ed. –

-
- Peripheral Neuropathy**. 3.ed. Philadelphia, W.B.SAUNDERS, 1993. p.1219-1250.
- THOMPSON, R.J.; DORAN, J.F.; JACKSON, P.; DHILLON, A.P.; RODE, J. – PGP 9.5 – a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. **Brain Res.**, **278**:224-228, 1983.
- TOREBJÖRK, H.E. & HALLIN, R.G. – Identification of afferent C units in intact human skin. **Brain Res.**, **67**:387-403, 1974.
- TURNER, R.C.; HOLMAN, R.R.; MATTHEWS, D.; HOCKADAY, T.D.R.; PETO, J. - Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes : estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. **Metabolism**, **28**:1086-1096, 1979.
- VALLBO, A.B.; HAGBARTH, K.E.; TOREBJÖRK, H.E.; WALLIN, B.G. – Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves. **Physiol. Ver.** **59**:919-957, 1979.
- VEVES, A.; YOUNG, M.J.; MANES, C.; BOULTON, A.J.M. - Differences in peripheral and autonomic nerve function measurements in painful and painless neuropathy. **Diabetes Care**, **17**:1200-1202, 1994.
- VINIK, A.I.; HOLLAND, M.T.; LE BEAU, J.M.; LIUZZI, F.J.; STANSBERRY, K.B.; COLEN, L.B. - Diabetic neuropathies. **Diabetes Care**, **15**:1926-1975, 1992.
- WALLENGREN, J.; BADENDICK, K.; SUNDLER, F.; HAKANSON, R.; ZANDER, E. – Innervation of the skin of the forearm in diabetic patients : relation to nerve function. **Acta Derm. Venereol.(Stockh)**, **75**:37-42, 1995.

-
- WANG, L.; HILLIGES, M.; JERNBERG, T.; WIEGLEB-EDSTRÖM, D.; JOHANSSON, O. – Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. **Cell. Tissue Res.**, **261**:25-33, 1990.
- WILKINSON, K.D.; LEE, K.; DESHPANDE, S.; DUERKSEN-HUGHES, P.; BOSS, J.M.; POHL, J. – The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. **Science**, **246**:670-673, 1989.
- WILSON, P.O.G.; BARBER, P.C.; HAMID, Q.A.; POWER, B.F.; DHILLON, A.P.; RODE, J.; DAY, I.N.M.; THOMPSON, R.J.; POLAK, J.M. – The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. **Br.J. Exp. Pathol.**, **69**:91-104, 1988.
- WINEGRAD, A.I.; SIMMONS, D.A.; MARTIN, D.B. – Has one diabetic complication been explained?. **N. Engl. J. Med.**, **308**:152-154, 1983.
- WINKELMANN, R.K. & BREATHNACH, A.S. – The merkel cell. **J. Invest. Dermatol.**, **60**:3-15, 1973.
- YOUNG, M.J.; BOULTON, A.J.M.; MACLEOD, A.F.; WILLIAMS, D.R.R.; SONKSEN, P.H. - A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. **Diabetologia**, **36**:150-154, 1993.
- YOUNG, R.J.; MACINTYRE, C.C.A.; MARTYN, C.N.; PRESCOTT, R.J.; EWING, D.J.; SMITH, A.F.; VIBERTI, G.; CLARKE, B.F. - Progression of subclinical polyneuropathy in young patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes : associations with glycaemic control and microangiopathy (microvascular complications). **Diabetologia**, **29**:156-161, 1986.

-
- ZAMBONI, L. & DE MARTINO, C. – Buffered picric acid-formaldehyde : a new, rapid fixative for electron microscopy. **J. Cell Biol.**, **35**:307, 1967.
- ZIEGLER, D.; MAYER, P.; WIEFELS, K; GRIES, F.A. – Assessment 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.
- ZIMMET, P.Z. - Type 2 (non - insulin - dependent) diabetes : an epidemiological overview. **Diabetologia**, **22**:399-411, 1982.
- ZIMMET, P.Z. - Kelly West lecture 1991 : challenges in diabetes epidemiology : from West to the rest . **Diabetes Care**, **15**:232-252, 1992.
- ZIMMET, P.Z.; TUOMI, T.; MACKAY, R.; ROWLEY, M.J.; KNOWLES, W.; COHEN, M.; LANG, D.A. - Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA) : the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. **Diabet. Med.**, **11**:299-303, 1994.



ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo N _____ Paciente _____ data ____/____/____

Identificação do Paciente

Data de nascimento _____/_____/_____

Sexo - 1=Fem 2=Masculino

Raça -1=Branca 2=negra 3=oriental 4=outras

Altura (cm)=

Peso (Kg)=

Idade de início da diabetes =

Data de início dos sintomas neuropáticos, quando presentes=

Especificar os sintomas-

Tipo de diabetes -

Medicamento em uso

Hemoglobina Glicosilada

Exame Neurológico : Escala de Sintomas Neurológicos

1= Sintoma presente

0= Sintoma ausente

I-Sintomas de Fraqueza muscular

1. extraocular

2. facial

-
3. língua
 4. garganta
 5. cintura escapular e membros superiores
 6. mãos
 7. glúteos e coxas
 8. pernas

II – Sintomas Sensitivos

A. Sintomas Negativos

9. dificuldade de identificar objetos na boca
10. dificuldade de identificar objetos nas mãos
11. instabilidade ao andar

B. Sintomas Positivos

12. adormecimento em qualquer localização
13. parestesias (sensações espontâneas de dor difusa, profunda, em fisgada, queimação, formigamento, resfriamento, ardor) em qualquer localização

III – Sintomas Autonômicos

14. síncope postural
15. impotência em homens
16. perda de controle urinário
17. diarreia noturna

Soma total =

Exame Neurológico : Escala de Sinais Neurológicos

0=Normal Força muscular/Reflexo/Sensibilidade

1=fraqueza leve/Reflexo hipoativo/Sensibilidade diminuída/aumentada

2=fraqueza moderada/Reflexo ausente/Sensibilidade ausente

3=fraqueza severa

4=ausência de função

I. Nervos Cranianos

Fraqueza da musculatura ocular extrínseca-VI par

Fraqueza da musculatura ocular extrínseca- III par

Fraqueza facial

II. Fraqueza Muscular

Extensão punho

Flexão punho

Flexão dedos

Intrínsecos das mãos

Flexores dorsais

Plantar flexores

III. Reflexos

Reflexo Bicipital

Reflexo Tricipital

Reflexo Braquiorradial

Reflexo Patelar

Reflexo Aquileano

IV Sensibilidade

Segundo dedo e Hálux

Sensibilidade postural

Sensibilidade vibratória (diapasão 128 Hz)

Membros superiores e inferiores

Sensibilidade dolorosa (artefato de metal puntiforme 0.5 mm de diâmetro)

ANEXO 2

TESTES CLÍNICOS LABORATORIAIS

- 1- Hemograma completo
- 2- VHS
- 3- Tempo de protrombina- atividade de protrombina
- 4- Uréia- creatinina
- 5- sorologia para sífilis
- 6- Tiroxina livres- TSH ultrasensível
- 7- Dosagem de ácido fólico e vitamina B12
- 8- glicemia de jejum
- 9- Hemoglobina glicosilada
- 10-FAN- células LE- Fator Reumatóide
- 11-Colesterol total e LDH
- 12-Triglicérides
- 13-CPK
- 14-Eletroforese de proteínas séricas
- 15-Imunoeletroforese de proteínas séricas
- 16-Sorologia para hepatite A/B
- 17-Sorologia para o HIV

ANEXO 3

1. TESTE AUTONÔMICO

1.1. Reflexo cutâneo simpático

1.1.a Equipamento

O estudo da resposta simpática da pele foi realizado com o eletroneuromiógrafo Neuropack 2, MEB-7102K (Nihon Kohden, Japão), com os seguintes parâmetros fixados :

Filtros :1 HZ e 3 KHZ

Tempo de análise : 10 s

Sensibilidade: 200 μ V/divisão

Estimulação :

duração 0,2 ms

intensidade 10-20 mA

freqüência 0.1 Hz

1.1.b. Técnica eletrofisiológica :

Posição do paciente: decúbito dorsal

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado sobre a região plantar do pé direito.

Eletrodo de registro de referência (Modelo NM-312S): na região dorsal do pé direito.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): no tornozelo.

ANEXO 4

1. ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA

1.1. Equipamento

Foi utilizado o eletroneuromiógrafo, Neuropack 2 MEB-7102K (Nihon Kohden, Japão). No ECNM os parâmetros fixados foram os filtros de 20 Hz e 3 KHz, o tempo de análise de 30 ms, a sensibilidade de 2 mV/ divisão, e a duração e frequência do estímulo de 0,2 ms e 1 Hz respectivamente. No ECNS os filtros foram de 20 Hz e 3KHz, o tempo de análise de 20 ms, a sensibilidade de 10 μ V/divisão e a duração e frequência do estímulo de 0,2 ms e 1 Hz respectivamente. No estudo da OF os filtros foram de 50 Hz e 3KHz, o tempo de análise de 100 ms, a sensibilidade de 500 μ V/divisão e estímulo com frequência de 1 HZ e duração de 0.2 ms.

1.2. Técnicas de Condução Nervosa

Foram utilizadas no ECN técnicas padrões, definidas anteriormente por KIMURA (1983) e OH (1993a):

1.2.a. Estimulação

Foram utilizados elétrodos de superfície (NM-430S, Nihon Kohden, Japão), com o cátodo posicionado distalmente, exceto na obtenção do reflexo H e OF, quando a posição foi invertida.

1.2.b. Registro

As respostas evocadas foram registradas com eletrodos de superfície (NM-312S, NM-450S, Nihon Kohden, Japão). O eletrodo terra (NM-522S, Nihon Kohden, Japão) foi posicionado entre o eletrodo de estímulo e o de registro.

1.2.c. Promediação

Potenciais de ação sensitivos menores que 5 μ V em amplitude, foram promediados.

1.2.d. Amplificação

Foi ajustada para a obtenção de amplitudes mínimas de 1cm

1.2.e. Critérios de medidas

a. Latências

A unidade de medida foi o milissegundos (ms), para todas as latências. As latências distais sensitiva e motora foram medidas do artefato de estímulo ao início da deflexão negativa do potencial de ação sensitivo e muscular composto respectivamente. As latências proximais motoras, do artefato de estímulo ao início da deflexão negativa do PAMC. Para a OF foi registrada a mais curta latência obtida em 10 respostas.

b. Amplitudes

A amplitude do PANS foi medida em microvolts da linha de base ao pico da deflexão inicial negativa. A amplitude do PAMC foi medida em milivolts da linha de base ao pico da deflexão negativa do potencial.

c. Distâncias

As distâncias foram medidas em milímetro com uma fita métrica flexível sobre o provável curso do nervo. A distância do segmento distal foi medida do centro do cátodo estimulador distal ao centro do eletrodo de registro ativo. A distância do segmento proximal foi medida do centro do cátodo estimulador proximal ao centro do cátodo estimulador distal

d. Cálculo da velocidade de condução nervosa

A VCS foi obtida pela divisão da distância do segmento distal pela latência distal sensitiva, expressa em metros por segundo. A VCM foi obtida pela divisão da distância do segmento proximal pela diferença entre as latências motoras proximal e distal, no segmento estudado, também expressa em metros por segundo.

1.2.f. Controle da temperatura

A temperatura foi medida e monitorizada no dorso da mão e no terço distal da perna, através de um termômetro digital (Digi-Sense Thermistor da Cole-Parmer Instrument Company, USA) e mantida entre 32-34 °C durante a realização dos exames.

1.2.g. Posicionamento dos eletrodos

Nervo Radial Superficial (Método antidrômico)

Posição do paciente: mão estendida, com a palma para baixo.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado no aspecto dorsolateral da mão sobre o nervo radial superficial, quando ele cruza o tendão do músculo extensor longo do polegar.

Eletrodo de registro referência (Modelo NM-312S): 3 cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): posicionado sobre o aspecto radial do antebraço, com o cátodo a 14 cm do eletrodo de registro ativo.

Nervo Ulnar sensitivo (Método antidrômico)

Posição do paciente : mão estendida, com a palma para cima.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-450S): falange proximal do quinto dedo.

Eletrodo de registro referência (Modelo NM-450S): 3 cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): posicionado no punho, com o cátodo distal, sobre o nervo ulnar em torno de 14cm do eletrodo de registro ativo.

Nervo sural (Método antidrômico)

Posição do paciente: decúbito ventral, com o pé suspenso sobre a margem da mesa de exame.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): atrás do maléolo lateral.

Eletrodo de registro referência (Modelo NM-312S): 3 cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): posicionado no terço distal da perna em torno de 14 cm proximal ao eletrodo de registro ativo.

Nervo Ulnar Motor

Posição do paciente : braço estendido, palma para cima.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado sobre o músculo abdutor do V dedo.

Eletrodo de registro de referência (Modelo NM-312S): 4cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): distalmente posicionado no aspecto palmar do punho, justo radial ao tendão do músculo flexor ulnar do carpo, com o cátodo a 7 cm proximal ao eletrodo de registro ativo e proximalmente, cátodo posicionado 5-6 cm acima do sulco do cotovelo, entre os músculos tríceps e biceps braquial.

Nervo Fibular Motor

Posição do paciente : decúbito dorsal.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado sobre o músculo extensor curto dos dedos.

Eletrodo de registro de referência (Modelo NM-312S): 4cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): distalmente no tornozelo, 8 cm proximal ao eletrodo de registro ativo no ponto médio entre o maléolo lateral e medial e proximalmente no joelho, posterior à cabeça da fíbula.

Nervo Tibial Posterior Motor

Posição do paciente : decúbito ventral.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado sobre o músculo abdutor do hálux.

Eletrodo de registro de referência (Modelo NM-312S): 4cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): distal no tornozelo, 10 cm proximal ao eletrodo de registro ativo, ligeiramente posterior ao maléolo medial e proximalmente na fossa poplíteia.

Onda F do nervo ulnar

Posição do paciente : braço estendido, palma para cima.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado sobre o músculo abductor do V dedo.

Eletrodo de registro de referência (Modelo NM-312S): 4cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): posicionado no aspecto palmar do punho, justo radial ao tendão do músculo flexor ulnar do carpo, com o cátodo proximal a 7 cm ao eletrodo de registro ativo.

Onda F do nervo Fíbular

Posição do paciente: decúbito dorsal.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado sobre o músculo extensor curto dos dedos.

Eletrodo de registro de referência (Modelo NM-312S): 4cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): no tornozelo, 8 cm proximal ao eletrodo de registro ativo no ponto médio entre o maléolo lateral e medial, com o cátodo proximal.

Onda F do nervo Tibial Posterior

Posição do paciente: decúbito ventral.

Eletrodo de registro ativo (Modelo NM-312S): posicionado sobre o músculo abdutor do hálux.

Eletrodo de registro de referência (Modelo NM-312S): 4cm distal ao eletrodo ativo.

Eletrodo de estimulação (Modelo NM-430S): no tornozelo 10 cm proximal ao eletrodo de registro ativo, ligeiramente posterior ao maléolo medial, com o cátodo proximal.

1.3. Valores de referências

Nervo radial superficial GARIBALDI (1996)

Velocidade de condução nervosa sensitiva

Para o sexo feminino – VCS = 57,7 m/s com DP=3.37m/s

Para o sexo masculino – VCS = 63.7 m/s – 0.16 x idade (anos) com DP= 3.36

Amplitude

Para o sexo feminino – amplitude média =24.6uV com DP=5.8 uV e limites de consonância a 95% de 13 uV e 36.2 uV

Para o sexo masculino – amplitude média =19.5uV com DP= 10.7uV e limites de consonância a 95% de 10.7 uV e 28.3 uV

Latência distal sensitiva (LDS)

Para o sexo feminino – LDS média= 2.05 ms com DP=0.13 e limites de consonância a 95% de 1.79 ms e 2.31 ms

Para o sexo masculino – $LDS = 1.9 \text{ ms} + 0.006 \times \text{idade}(\text{anos})$

Nervo sural GARIBALDI (1996)

Velocidade de condução nervosa sensitiva

Para o sexo feminino – VCS = 51,6 m/s com DP=4.2m/s

Para o sexo masculino – VCS = 53.7 m/s – 0.10 x idade (anos) com
DP= 3.7

Amplitude

Para o sexo feminino – amplitude =25.2uV – 0.17 x idade (anos) com
DP=4.53 uV

Para o sexo masculino – amplitude =27.3uV – 0.22x idade(anos) com
DP= 5.4 uV

Latência distal sensitiva

*Para o sexo feminino e masculino – LDS média= 2.75 ms com
DP=0.34ms e s limites de consonância a 95% de 2.07ms e 3.43ms*

Nervo ulnar Sensitivo GARIBALDI (1996)

Velocidade de condução nervosa sensitiva

Para o sexo feminino – VCS = 54.4m/s, com os limites de consonância
a 95% de 48.6 m/s e 60.2 m/s

Para o sexo masculino – VCS = 61.1m/s – 0.17x idade(anos) com
DP=3.54m/s

Amplitude

Para o sexo feminino – amplitude =38.9uV – 0.23 x idade (anos) com
DP=5.5 uV

Para o sexo masculino – amplitude = $33.1\mu\text{V} - 0.24 \times \text{idade}(\text{anos})$ com DP= 5.3 μV

Latência distal sensitiva

Para o sexo feminino - LDS média = 2.63ms com DP=0.15ms e limites de consonância a 95% de 2.33ms e 2.93ms

Para o sexo masculino – LDS = $2.33\text{ms} + 0.009 \times \text{idade}(\text{anos})$ com DP=0.23ms

Nervo Ulnar motor OH (1993b)

	amplitude(μV)	VCN (m/s)	Latência distal(ms)
Média+/-D.P	11.49 +/- 2.51	61.15+/-5.27	3.0+/-0.3
Limite da normalidade	5	50.61	3.6

Nervo Tibial Posterior OH (1993b)

	amplitude(μV)	VCN (m/s)	Latência distal(ms)
Média+/-D.P	19.06 +/- 7.23	49.83+/-4.60	4.8+/-0.8
Limite da normalidade	5	40.63	6.40

Nervo Fibular motor OH (1993b)

	amplitude(μV)	VCN (m/s)	Latência distal(ms)
Média+/-D.P	10.09 +/- 4.81	49.51+/-3.93	3.72+/-0.53
Limite da normalidade	4	41.65	4.78

Latências da Onda F OH (1993b)

Latência da OF do nervo ulnar(ms) = $0.202\text{ms} \times \text{altura}(\text{cm}) - 8.51$, com DP=3.82

Latência da OF do Nervo Fibular(ms) = $0.323 \times \text{altura}(\text{cm}) - 8.61$, com DP=4.70

Latência da OF do nervo tibial posterior = $0.436 \times \text{altura}(\text{cm}) - 27.01$, com DP=6.22

ANEXO 5

Identificação da população de estudo-pacientes diabéticos tipo 2

Nome	Id	Sexo	Alt (cm)	Peso (Kg)	Raça	Tempdur Diabete (anos)	Tempdur neuro (anos)	HgGLI (%) 1	HgGLI (%) 2	HgGLI (%) 3
D-001-H.S.	56	fem	158	53	Branca	15	2	6.5	6.5	6.2
D-002-M.T.S.	48	masc	166	65	Amarelal	7	Ausentes	4.6	5.2	4.5
D-003-B.A.F.	51	masc	174	96	Branca.	5	2	6.2	6.6	7.3
D-004-J. B.M.	50	masc	175	94	Branca.	17	5	8	10	9.7
D-005-A . M.	48	fem	168	72	Branca.	16	5	7.5	6.8	8.7
D-006-N.S.	60	fem	147	58	Branca.	3	Ausentes	7.5	10.5	8.3
D-007-M.A .	49	fem	165	95	Branca.	2	Ausentes	10,6	8,7	9,6
D-008-L.A B.	54	masc	165	70	Branca.	6	Ausentes	7,8	8,2	7,9
D-009-A S.N.	61	fem	162	75	Branca.	11	Ausentes	9,3	11,5	13,9
D-010-L.T.	50	fem	175	90	Branca.	4	Ausentes	5.2	5.0	4.9
D-011-D.R.P.	48	fem	155	75	Branca.	2	Ausentes	4.9	4.6	5.9
D-012-D.D	55	fem	168	74	Branca.	20	Ausentes	6.3	7.5	9.7
D-013-W.L.O	45	masc	170	58	Branca.	4	2	8.1	7.3	9.1
D-014-N. S.	58	fem	164	66	Branca.	10	Ausentes	10.9	8.9	10.5
D-015-H.R.F.	46	masc	176	96	Negro	19	Ausentes	7.7	8.5	8.5
D-016-A F.B.	64	masc	172	88	Negro	4	Ausentes	4.7	4.1	4.4
D-017-L O S	58	masc	172	94	Branca.	5	0.16	6.5	7.0	7.9
D-018-MJ	62	fem	160	94	Branca.	7	Ausentes	9.6	10.3	9.8
D-019-J V S	59	masc	165	70	Branca.	10	Ausentes	10	8,3	9,3
D-020-A P M	61	fem	165	72	Negro	12	Ausentes	9,6	8,3	9,6
D-021-J V	56	masc	186	94	Branca.	0.41	0.41	8.1	6.7	
D-022-N M A	65	fem	170	84	Branca.	15	1	8.8	7.9	7.3
D-023- A S	63	masc	163	72	Branca.	10	1	7.3	8.0	7.0
D-024-N T F	59	fem	160	62	Branca.	0.16	1	6.7	13.8	10.8
D-025-D M	44	masc	175	132	Branca.	3	3	5.4	5.4	4.0
D-026-ON	62	masc	180	93	Branca.	0.25	Ausentes	6.2	6.2	6.7
D-027-AMF	64	fem	148	85	Branca.	1	1	5.0	5.2	5.2
D-028-BRS	61	fem	160	67	Branca.	8	Ausente	5.5	5.6	5.8
D-029-NRS	57	fem	165	85	Branca.	10	3	7.1	7.0	7.8
D-030-APO	48	masc	172	140	Branca.	1	2	7.1	5.7	6.3

D-031-GMB	59	masc	167	69	Branca.	26	15	7,1	6,5	7,9
D-032-LSG	56	fem	160	66	Branca.	11	1	5,2	6,3	5,1
D-033-JAN	65	masc	163	69	Branca.	25	3	9.2	7.7	7.3
D-034-DOC	65	fem	150	46	Branca.	30	2	10.0	8.2	8.1
D-035-SS	57	fem	158	64	Negro	3	Ausente	4.9	4.6	5.1
D-036-OO	55	masc	180	96	Branca.	8	1	7.1	8.0	6.7
D-037-MMM	65	fem	160	93	Branca.	10	Ausentes	5.2	5.3	5.5
D-038-MGS	45	fem	160	62	Branca.	15	4	10.1	11.8	9.9
D-039-RBC	65	fem	158	75	Branca.	10	Ausentes	8,2	7,3	7,2
D-040-VHG	57	fem	150	57	Branca.	5	Ausentes	5,9	6,4	5,5
D-041-PS	60	fem	150	82	Branca.	13	10	9.7	11.6	10.6
D-042-BCP	64	fem	148	74	Branca.	10	Ausentes	7.6	5.0	5.3
D-043-BBG	59	masc	162	82	Branca.	15	3	8.9	8.2	9.7
D-044-AV	60	masc	168	81	Branca.	4	Ausentes	4,7	5,4	5,2
D-045-MLP	51	fem	150	74	Branca.	3	3	6,2	5	6
D-046-CLS	50	fem	150	69	Branca.	4	6	5.1	5.4	6.3
D-047-MTD	53	fem	167	113	Branca.	6	2	5,5	5,1	5,5
D-048-LGF	65	masc	165	70	Branca.	5	4	8.7	9.5	10.5
D-049-AC	65	fem	162	70	Branca.	2	2	6.9	13.5	12.9

fem=feminina; masc=masculino; Id = idade em anos; Tempdur neuro = tempo de duração dos sintomas neuropáticos; Tempdur diabetes = tempo de duração do diabetes; Alt = altura

ANEXO 6

Identificação da população de estudo - grupo controle

Nome	Idade (anos)	Sexo	Altura(cm)	Peso(Kg)	Raça
N-001-L.C.S.	45	Fem	143	42	Branca.
N-002-L.A.S.	45	Masc	175	95	Branca
N-003-M.L.S.	46	Fem	160	65,2	Branca
N-004-A .R.S.	59	Fem	164	66,5	Branca
N-005-O .B.S.B.	54	Masc	170	78	Branca
N-006-M.A .	59	Fem	155	62,5	Branca
N-007-D.A .M.	45	Fem	164	65,5	Branca
N-008- V.N.C.	54	Fem	160	61	Branca.
N-009-C.P.S.	58	Fem	160	61	Branca.
N-010-C.Z.S.S.	46	Fem	156	60	Branca.
N-011-M.C.	56	Fem	151	62	Negra
N-012-S.G.	45	Fem	165	59	Branca.
N-013-J.L.A	51	Fem	158	67	Branca.
N-014-EPS	65	Masc	165	75	Branca.
N-015-A H	63	Fem	156	68	Branca.
N-016-OB	62	Masc	164	70	Branca.
N-017-LPP	65	Fem	154	63	Branca.
N-018-MLPB	60	Fem	163	65	Branca..

fem=feminina; masc=masculino

ANEXO 7

Nome	Escala Sintomas	Escala sinais	R.C.S.
D-001-H.S.	5	9	normal
D-004-J. B. M.	2	6	normal
D-005-A . M.	2	13	normal
D-013-W.L.O .	4	4	anormal
D-017-L O S	2	7	normal
D-021-J V	3	9	anormal
D-022-N M A	2	4	anormal
D-023- A S	2	7	anormal
D-027-AMF	4	6	anormal
D-030-APO	4	10	anormal
D-033-JAN	5	12	anormal
D-034-DOC	3	7	normal
D-036-OO	3	7	normal
D-038-MGS	2	3	normal
D-041-PS	3	13	anormal
D-043-BBG	4	14	anormal
D-048-LGF	2	9	anormal
D-049-AC	3	8	anormal
D-002-M.T.S.	0	0	normal
D-006-M.N.S.	0	2	normal
D-010-L.T.	0	1	Normal
D-011-D.R.P.	0	0	normal
D-019-J V S	0	4	normal
D-020-A P M	0	3	normal
D-026-ON	0	1	normal
D-028-BRS	0	0	normal
D-035-SS	0	2	normal
D-037-MMM	0	0	normal
D-039-RBC	0	3	normal
D-040-VHG	0	1	normal
D-042-BCP	0	2	normal
D-044-AV	0	0	normal
D-045-MLP	2	0	normal

D-007- M.A M.	0	16	normal
D-008-L.A B.	0	3	normal
D-009-A S.N.	0	8	normal
D-012-D.D	0	15	anormal
D-014-N. S.	0	10	normal
D-016-A F.B.	0	7	normal
D-018-MJ	0	6	normal
D-015-H.R.F.	0	2	normal
D-003- B.A .F.	4	5	normal
D-024-N T F	1	1	anormal
D-025-D M	1	3	normal
D-029-NRS	1	3	normal
D-046-CLS	2	0	anormal
D-047-MTD	2	2	normal
D-031-GMB	3	5	normal
D-032-LSG	2	2	normal

ANEXO 8

Estudo da condução nervosa motora em DM tipo 2

Paciente	Ld ulnar	Ld fib	Ld tibl	Amp Ulnar	Amp Fib	Amp Tib	VCM Ulnar	VCM Fib	VCM Tibal	OF Ulnar	OFFib	OFTib
D-007-MAM	3,66	5,52	7,62	3,83	0,43	0,05	41,7	30,5	35,9	31,8		
D-008-LAB	2,88	3,48	5,46	9	4,13	10,8	52,8	40,6	42,2	28	47,2	51,6
D-009-ASN	3	3,96	5,94	6	2,17	0,83	43,1	33,9	32,9	31,6	61	64,8
D-012-DD	3,48	6,6	9	7,17	1,07	0,23	37,5	32	29,6	38,2	58,4	60
D-014-NS	2,94	3,84	7,74	10,2	6,17	5,4	47,1	38,7	34,4	29,8	54,4	64,6
D-015-HRF	4,14	4,02	5,4	10,5	5,83	10,7	44,7	38,9	36,2	43,4	60	61
D-016-AFB	3,18	4,02	5,6	8,5	3,33	2,93	50,8	44,5	43,3	30	52,6	55,2
D-018MJ	2,52	2,76	6,72	8,67	7,17	6,1	49,5	40,3	36,7	27	47,6	56,6
D-002-MTS	1,74	2,94	4,5	7,67	11,3	7,17	60,4	53,8	52,5	25	43,8	44,6
D-006-MNS	2,82	3,3	4,8	10,3	6,5	10,2	50,7	44,1	42,9	26	41,6	47
D-010-LT	2,46	3,72	5,36	6,83	5,4	7,4	53,8	46,6	44,4	27,4	50,4	51,6
D-011-DRP	2,52	4,26	5,94	10,3	4,5	6	43,4	46,6	45,2	25,2	44,2	43
D-019-JVS	2,58	3,6	4,92	10	4,8	8,5	50,7	41,7	45,4	29,6	53,6	52,2
D-020-APM	3,48	4,14	6,06	9,5	8,67	8,5	45,8	50,3	46,8	32	46,8	50,2
D-026-ON	3,42	3,78	6,96	7,83	9,17	10,5	48,3	41,4	49,3	34,8	54,8	50,4
D-028-BRS	2,58	3,36	5,58	2,58	3,36	5,58	54,3	49,7	44,3	28,6	48,4	48
D-035-SS	1,8	3,18	5,58	8	4	7,67	54	48	41,1	27,8	45	49,4
D-037-MMM	2,46	2,82	4,5	10,2	7,5	4,83	59,1	49,2	46	26,4	43,2	46,4
D-039-RBC	2,82	3,42	6,3	11,2	3,67	7,17	47,8	44,9	40,4	27,6	46,2	51,2
D-040-VHG	2,28	3,78	6,24	12,8	10	11,5	44,9	44,7	42	26,8	42,2	49,6
D-042-BCP	2,28	3,54	5,76	10,3	5	6,83	57,4	49	44,8	25,2	43,4	47
D-044-AV	2,28	5,34	5,94	11,3	4,17	4,83	47,6	43,4	46,9	28,4	51,2	51,6
D-045MLP	2,52	3,84	5,76	8,83	6,33	8,5	57,6	48,2	43,7	24,9	48,1	40,3
D-001-HS	2,52	5,04	6,11	8,5	3,67	5	50,7	43	41	28	52	57
D-013-WLO	4,14	7,38	6,3	5,33	3,5	3,33	43,4	35,1	37,9	34,8	60,6	62,1
D-004-JBM	3,24	7,38	4,62	10,3	2,73	4,4	46,5	33,7	32,9	32,4	69,1	67,2
D-005-AM	2,4	3,54	5,04	6,33	2,5	5,17	50,9	46,1	43,1	25,6	51,3	52,1
D-017LOS	3,9	4,2	6,72	9,33	4,83	8,5	44,4	34,7	33,3	32	56,6	60,2
D-021JV	3,96	NO	NO	5,67	NO	NO	37,2	NO	NO	39,2	NO	NO
D-022-NMA	3,12	3,84	5,76	7,5	3,27	3,2	52,6	42,8	39,1	28,4	52,3	57,2
D-023-AS	3,48	5,52	7,74	8	4,4	4,93	43,3	34,7	33,8	32,8	63	72

D-027-AMF	2,28	3,78	5,58	8	8	4,27	49,1	52,1	44,3	27,7	45,2	52
D-030-APO	3,06	3,12	5,4	7,33	5,5	1,4	51,3	42,3	40,3	30,4	52,3	54,1
D-033-JAN	3,78	NO	NO	7,83	NO	NO	39,9	NO	NO	37	NO	NO
D-034-DOC	3,3	4,56	5,64	7,83	5	6,17	44,2	40,7	41,2	30,2	47,4	52,1
D-036-OO	2,46	3,36	6,11	9,67	4,33	5	51,4	41,7	40,9	30,2	57,2	55,2
D-038-MGS	3,48	4,2	5,7	3,48	4,2	5,7	42,1	37,3	32,8	30,8	55,8	59,2
D-041-PS	3,36	4,2	6,11	8,5	2,23	1,53	47,2	45,8	41,8	29,6	55,1	57,8
D-043-BBG	3,72	NO	NO	7	NO	NO	49,3	NO	NO	32,8	NO	NO
D-048-LGF	3,6	3,9	6,36	7,5	6,17	2,67	47,3	40	390	29,8	40,6	59,6
D-049-AC	2,04	4,32	4,98	7	2,5	1,67	7	2,5	1,67	27,4	53	57,6
D-003-BAF	2,42	4,08	6,05	12,5	13	13	52,4	43,4	40,7	29,8	51	55
D-024-NTF	2,88	3,9	4,92	11,5	4,93	12,5	53,1	44,2	41,1	28,6	49,2	49,8
D-025-DM	3,06	3,6	6,12	8,5	7,5	6,5	47,2	47,3	49,5	29,6	48,9	50,1
D-029-NRS	2,64	3,42	5,22	6,83	5,5	5,17	51,3	44,4	42,2	27,6	51,2	53,4
D-031-GMB	2,46	3,36	4,26	7,17	4,3	10	47,6	41,3	45,9	28,9	51,8	51,2
D-032LSG	2,64	4,02	7,4	9,67	8	8,33	49	43,7	43,2	28	45,4	49,2
D-046-CLS	2,04	3,36	4,68	8,67	9,33	10	58,3	53,6	48,4	22,4	40,4	43
D-047-MTD	2,1	3,84	5,85	10,6	5,33	6,1	51,4	48,9	46,7	28,2	47,5	48,9

Ld = Latência distal; Amp = Amplitude; VCM = velocidade de condução nervosa motora; Tib = Tibial; Fib = Fibular; NO = Não obtido

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Estudo da condução nervosa sensitiva em DM tipo 2

Paciente	Ld Radial	Ld Ulnar	Ld Sural	Amp Radial	Amp Ulnar	Amp Sural	VCS Radial	VCS Ulnar	VCS Sural
D-002	2	2,16	2,04	24,3	29,3	31,4	65	67,1	59,8
D-006	2,2	2,84	2,88	26,1	32	14,3	52,3	51,1	47,9
D-010	2,2	2,2	2,12	34	41,3	19,7	63,6	64,7	51,9
D-011	2	2,6	2,24	27,3	34	15,3	60	55,8	46,8
D-019	2,08	2,84	2,12	25,7	22,7	22,7	56,6	62,5	48,4
D-020	2,08	2,84	2,12	18,7	27,3	22,7	55,3	49,3	47,2
D-026	2,12	2,36	2,2	21,7	17,3	19	61,3	50,8	50
D-028	2,04	2,56	2,28	23	30	24,3	63,7	52,7	50,4
D-035	1,84	2,08	2,04	28,3	23	27	65,2	67,3	53,9
D-037	1,8	2	2,56	21,3	27	13,7	66,7	67,5	54,7
D-039	2	2,48	2,32	15	16,3	9	15	16,3	9
D-040	2,2	2,56	2,88	2,2	2,56	2,88	52,3	48,8	43,4
D-042	1,92	1,88	2,44	25	51,3	14,7	62,5	58,5	45,1
D-044	1,64	2,64	2,8	26	14,3	19,7	64	56,8	41,1
D-045	1,96	2	2,6	15,3	29	12,7	61,2	67,5	48,1
D-007	NO	4,08	NO	NO	12,3	NO	NO	30,6	NO
D-008	2,24	2,72	3,16	19,3	24,7	8	58	57	42,7
D-009	2,72	3,12	NO	7,33	5,67	NO	47,8	48,1	NO
D-012	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
D-014	2,44	3,04	2,92	16	28	9,33	53,3	48,6	37,7
D-015	2,68	3,36	3,72	19,3	16	5,1	46,6	40,2	37,6
D-016	2	2,2	2,2	24,7	21,7	20,7	60	61,4	50
D-018	1,96	2,08	2,84	23,3	22,7	17	61,2	62,5	42,3
D-003	2,3	3,08	2,84	21,3	20,3	14	55,4	51,9	44
D-024	1,92	2	2,68	27,3	49,3	17,7	57,3	57,5	42,9
D-025	2,24	2,6	2,8	13,3	17	12	55,8	55,7	42,9
D-029	2,04	2,32	2,56	20,3	16	17	63,7	62,5	50,8
D-031	2,36	2,44	2,64	120	22,7	9	55,1	59,4	49,2
D-032	2,6	2,84	2,36	14,3	33,3	20,3	46,2	51,1	48,7
D-046	1,76	2,08	2,08	31,3	56	20,7	62,5	55,1	50,5
D-047	2,16	2,44	2,5	16	30,7	14,2	55,6	53,2	48
D-001	2,3	3,4	2,76	12,3	8,67	6,67	56	41,2	41,7

D-004	2,24	3,01	3,24	11	14,7	6,67	49,1	49,1	44,8
D-005	1,8	2,12	2,48	17	22	6,2	63,9	68,4	46,4
D-013	3	3,12	NO	8,8	13,3	NO	40	44,9	NO
D-017	2,36	3,24	NO	17	16,6	NO	50,8	46,3	NO
D-021	3,04	NO	NO	4,53	NO	NO	47,7	NO	NO _n
D-022	2,08	2,64	2,52	20,7	23,4	13	55,3	53	47,6
D-023	2,64	2,93	3,28	15,3	7,33	3,93	45,5	45,6	38,1
D-027	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO _n
D-030	2,32	NO	NO	2,32	NO	NO	60,3	NO	NO
D-033	2,84	3,36	NO	10,3	10,7	NO	42,2	43,2	NO
D-034	2,72	2,8	3,16	19	12,7	6,33	46	41,1	36,4
D-036	2,32	2,48	NO	14	13	NO	58,2	58,5	NO
D-038	2,68	2,76	NO	14,7	24,3	NO	44,8	48,9	NO
D-041	2,28	2,88	NO	9	5	NO	57	48,6	NO
D-043	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
D-048	2,28	3,2	NO	10,3	5,83	NO	57	48,4	NO
D-049	1,88	1,92	NO	17,3	22,7	NO	63,8	57,3	NO

Ld = Latência distal; Amp = Amplitude; VCS = velocidade de condução nervosa sensitiva; NO = Não obtido

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ANEXO 9

Densidade linear das fibras intra-epidérmicas PGP-IR em indivíduos normais

Nome	N lamina	FIE/mm
LCS	N-001	7,4
LAS	N-002	14
MLS	N-003	6,6
ARS	N-004	4,1
OBSB	N-005	8,09
MA	N-006	4,12
DAM	N-007	7,6
VNC	N-008	7,07
CPS	N-009	11,5
CZSS	N-010	8
MC	N-011	8
SG	N-012	5,8
JLA	N-013	5,7
EPS	N-014	4,6
AH	N-015	6,92
OB	N-016	6,25
LPP	N-017	5,35
MLPB	N-018	5,7

Densidade linear das fibras intra-epidérmicas PGP-IR em diabéticos tipo 2

Polineuropatia sintomática com VCN normal	
Nome	FIE/mm
D-024	1,62
D-032	1,44
D-003	1,11
D-025	1,25
D-031	0,99
D-029	1,73
D-046	1,53
D-047	2

Ausência de polineuropatia	
Paciente	FIE/mm
D-002	2,8
D-037	2,46
D-026	3
D-020	1,6
D-006	2
D-042	2,31
D-044	2,94
D-019	1,32
D-035	2,08
D-011	2,94
D-039	2,42
D-010	1,8
D-045	3
D-040	2,5
D-028	2,69

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Polineuropatia sintomática com VCN anormal	
	FIE/mm
D-004	0
D-021	0
D-023	0
D-027	0
D-030	0
D-033	1
D-034	0
D-005	0
D-041	0
D-043	0
D-048	0
D-036	2
D-038	2,55
D-013	1,73
D-017	0,8
D-022	0,4
D-049	0,52
D-001	0,75

Polineuropatia assintomática	
Nome	FIE/mm
D-008	1,92
D-018	1,7
D-007	1,6
D-012	0,75
D-015	1,85
D-009	1,53
D-014	0,75
D-016	2

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE