

Caracterización morfológica cuantitativa del nervio tibial en ratas diabéticas

✉ Lisis G. Martínez¹, Orlando Castellanos¹, Lázaro Gómez²,
Maydelín Dorado², Juan C. Rosillo²

¹Departamento de Neurobiología

²Departamento de Neurofisiología Clínica

Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN)

Ave. 25 No. 15 805 e/ 158 y 160 Playa, CP 11 300, Ciudad de La Habana, Cuba

Fax: (537) 2736028; E-mail: lisis@neuro.ciren.cu

RESUMEN

El modelo de ratas tratadas con estreptozotocina se ha utilizado con mucha frecuencia en la etiología, la patología y el tratamiento de la neuropatía diabética. Sin embargo, existen discrepancias entre los autores en cuanto al daño que presentan el axón y la cubierta de mielina de los nervios periféricos cuando existe esta enfermedad. Se decidió cuantificar el daño morfológico que presenta el axón y la cubierta de mielina de la fibra nerviosa en el nervio tibial de ratas diabéticas a las 10 y 18 semanas después de inducida la diabetes mellitas, luego de la pubertad. En ratas Wistar, con 12 semanas de edad, se indujo un cuadro de diabetes mellitas, mediante una inyección de estreptozotocina y se evaluaron las variables: área, perímetro y forma del axón, así como el área de la vaina de mielina de las fibras nerviosas mielínicas, en cortes semifinos transversales. Se evidenció una disminución del área, del perímetro axonal y del área ocupada por la mielina en los animales diabéticos, en comparación con los animales control pareados en edad, así como una mayor irregularidad de las fibras nerviosas en los animales diabéticos. La alteración morfológica en el axón y en la vaina de mielina de la fibra nerviosa de los animales con diabetes, fue superior en la semana 18 con respecto a la semana 10. A las 10^{ma} y 18^{va} semanas de inducida la diabetes mellitus, se observó una mayor afectación del axón que la de la célula de Schwann. Se constató la presencia de neuropatía mixta axonal y mielínica en las ratas diabéticas, con una afectación principalmente axonal.

Palabras claves: axón, diabetes mellitus, estreptozotocina, mielina, morfometría, nervio tibial

Biotecnología Aplicada 2006;23:108-112

ABSTRACT

Quantitative morphological characterization of the tibial nerve in diabetic rats. Streptozotocin diabetic rat model has been widely used for the study of etiology, pathology and treatment of diabetic neuropathy. However, there are discrepancies among different authors with regard to axonal and myelin sheath damage that are present in the affected peripheral nerves. To quantify the morphological changes produced in the axon and in the myelin sheath of the nervous fibers at the tibial nerve of diabetic rats at 10 and 18 weeks of evolution of diabetes mellitus. Diabetes mellitus was induced by an injection of streptozotocin in 12-week-aged Wistar rats. A morphometric computerized analysis on myelinated nervous fibers was performed at 10 and 18 weeks of evolution of diabetes mellitus in diabetic animals and in age-paired controls. Morphological changes were quantified in the axonal area, axonal perimeter, form of axon, as well as in area of myelin, using transversal semithin sections. A reduction of the axonal caliber and the area occupied by myelin was observed in diabetic animals in comparison with age-paired controls. The greatest irregularity observed in the diabetic animals' nervous fibers showed the occurrence of greater damage in the axonal area than in the perimeter of axon. This result could indicate a greater effect of diabetes on the cyto-skeleton of fiber than on its axolema. A greater damage of the axon than of the schwann cell was evidenced at both studied times. At 10 weeks, a reduction of a 13.4% for the axonal area and of a 6.7% for myelin area were found, while at 18 weeks of inducing diabetes mellitus a diminishing of a 16.8% for the axonal area and of a 11.2% for myelin area were observed. The morphological changes of the nervous fibers were superior at 18 weeks of diabetes in comparison with the 10 weeks of evolution of the disease, thus, an increase in the severity of affectations with age was evidenced. Our results indicate the presence of axonal and myelinic mixed neuropathy in the diabetic rat, with mainly an axonal affectation.

Key words: Axon, Diabetes mellitus, Morphometry, Myelin, Streptozotocin, Tibial nerve

Introducción

La neuropatía diabética es una de las complicaciones más comunes de la diabetes mellitus (DM). El modelo de ratas tratadas con estreptozotocina (STZ) se ha utilizado con mucha frecuencia en la etiología, la patología y el tratamiento de la neuropatía diabética [1-4]. Se ha demostrado que las alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas a nivel neuronal en estos roedores [5-8], lo cual constituye uno de los más importantes marcadores de la neuropatía diabética. Sin

embargo, existen discrepancias entre los estudiosos de este tema, en cuanto al daño que presentan el axón y la cubierta de mielina de los nervios periféricos ante esta enfermedad. Según la mayoría de estos investigadores, cuando la DM es inducida luego de la pubertad, ocurre un mayor daño del tamaño axonal (diámetro, área), que del tamaño de la vaina de mielina (área y grosor en corte transversal) [9]. Por el contrario, otros investigadores demuestran que la reducción del tamaño de la fibra

1. Huang TJ, Sayers NM, Verkhatsky A, Fernyhough P. Neurotrophin-3 prevents mitochondrial dysfunction in sensory neurons of streptozotocin-diabetic rats. *Exp Neurol* 2005;194(1):279-83.

2. Li F, Drel VR, Szabo C, Stevens MJ, Obrosova IG. Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes* 2005;54(5):1514-22.

✉ Autor de correspondencia

nerviosa en los animales diabéticos en comparación con los animales control, sucede predominantemente por la reducción de la vaina de mielina [10, 11]. Otras investigaciones han revelado resultados diferentes a los ya citados [12, 13]. Medori y sus colaboradores (1988) informaron un incremento proximal y una disminución distal en relación con el grosor de la mielina [12]. Se ha descrito también determinada reducción en el diámetro del axón y un aumento absoluto en el grosor de la mielina, por lo que el tamaño de la fibra se ha preservado [13]. Estas discrepancias pudieran deberse a algunas diferencias entre los protocolos de investigación, como son: la edad de inducción de la DM, la duración de esta y los métodos para las evaluaciones morfométricas. La valoración de cualquier variante terapéutica en las ratas diabéticas requiere la estandarización de un modelo de la enfermedad por cada grupo de trabajo. El presente estudio se diseñó para cuantificar el daño morfológico que presentan el axón y la cubierta de mielina de la fibra nerviosa en el nervio tibial de ratas con DM inducida luego de la pubertad, a las 10 y 18 semanas de evolución de la enfermedad.

Materiales y métodos

Grupos experimentales e inducción de la diabetes mellitus

Se utilizaron ratas macho de la línea Wistar (CENPALAB, Cuba), mantenidas en un régimen de libre acceso al alimento y al agua. Se establecieron dos grupos experimentales de ratas diabéticas (10 y 18 semanas de duración de la DM), dos grupos de control sanos, pareados en edad y un grupo control del inicio del experimento. La inducción de la DM en los animales se realizó a las 12 semanas de edad, mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de STZ (Sigma) (65 mg/kg de peso corporal) [14]. Pasados 7 días de la inyección, se determinaron los niveles de glucosa en sangre en los animales control y los tratados (Reflotron, Boehringer Mannheim). Aquellos animales tratados con STZ, cuyos niveles de glucosa en sangre fueron superiores a 15 mmol/L, se consideraron diabéticos [15]. Mensualmente, se pesaron todos los animales (Sartorius, Alemania) y se chequeó el consumo de agua y de alimento durante todo el experimento, de manera cualitativa.

Estudio morfológico

A las 10 y 18 semanas, se anestesiaron los animales con hidrato de cloral (420 mg/kg, i.p.) y se sacrificaron. La fijación de las muestras se llevó a cabo mediante la perfusión aórtica: cada rata fue perfundida con 250 mL de solución salina, seguidos por 300 mL de solución fijadora (paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en tampón fosfato 0.1 mol/L pH 7.4). Las muestras se obtuvieron por disección del nervio tibial posterior derecho, y se mantuvieron en el mismo fijador durante 3 horas a 4 °C. Posteriormente, se lavaron los fragmentos de nervios en tampón fosfato, y luego se fijaron en OsO₄ al 2%, durante una 1 horas a 4 °C, deshidratados en etanol, pasados por óxido de propileno y embebidos en resina epóxica (Durcupán, ACM, Fluka, Suiza). Se obtuvieron cortes semifinos transversales de 1 mm de grosor, para lo cual se utilizó un ultrami-

crótomo (Ultratome IV, LKB, Suecia). Las secciones de tejido se teñieron con p-fenilendiamina al 1%.

Morfometría

El análisis microscópico cuantitativo se realizó en un microscopio OLYMPOS AH2 (objetivo 100x), acoplado a una cámara de video y con el empleo del sistema de análisis de imágenes DIGIPAT (EICISOFT, Cuba). Para la selección de los campos se siguió un muestreo al azar y sistemático de toda el área ocupada por las fibras. El primer campo se escogió al azar en el intervalo de 0 a 6 y, a partir de este, aquellos que aparecían con una separación de 6 campos [16-18]. Por cada nervio, se procesaron 400 fibras [19]. Se midieron los parámetros: área axonal (AX), perímetro axonal (PX), área de la mielina (AM), y se calculó el índice de circularidad (IC) ($IC = AX / PX$, calculada a partir de PX).

Procesamiento estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos, y los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media para cada una de las variables evaluadas. La comparación de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha = 0.05$), seguido por una prueba de rangos múltiples de Duncan.

Resultados

Observaciones clínicas

La aplicación de una inyección de STZ en la rata provocó un cuadro clínico de DM, caracterizado por polidipsia, poliuria, aumento significativo de los niveles de glucosa en sangre y reducción del peso corporal, al compararlo con el de los animales control (tabla 1). De las 22 ratas inyectadas con STZ, solo dos se excluyeron del estudio por presentar niveles de glucosa por debajo del límite inferior del criterio de inclusión (15 mmol/L), ambas al inicio del experimento. La mortalidad de los animales diabéticos durante las 18 semanas de experimentación fue del 40%.

Estudio morfológico

Tamaño axonal

Las medias de los valores del área y del perímetro del axón se incrementaron con la edad, en los animales sanos y en los diabéticos ($p < 0.01$). Sin

3. Wang Y, Schmelzer JD, Schmeichel A, Iida H, Low PA. Ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve in experimental diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 2004; 227(1):101-7.

4. Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Parvin CA, Zhang W, Sima AA. Experimental rat models of types 1 and 2 diabetes differ in sympathetic neuroaxonal dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(5):450-60.

5. Andriambeloso E, Baillet C, Vitte PA, Garotta G, Dreano M, Callizot N. Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology* 2006;26(1):32-42.

6. Rodrigues Filho OA, Fazan VP. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. *J Neurosci Methods* 2006;151(2):131-8.

7. Li F, Drel VR, Szabo C, Stevens MJ, Obrosova IG. Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes* 2005; 54(5):1514-22.

8. Saini AK, Arun KH, Kaul CL, Sharma SS. Acute hyperglycemia attenuates nerve conduction velocity and nerve blood flow in male Sprague-Dawley rats: reversal by adenosine. *Pharmacol Res* 2004;50(6): 593-9.

9. Thomas PK, Tomlinson DR. Diabetic and hypoglycemic neuropathy. En: Dick PJ, Thomas PK, eds. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders, 1993:1219-50.

10. Dockery P, Sharma AK. Ultrastructural abnormalities of myelinated fibers in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci* 1990;98:327-45.

11. Ochodnická E, Ochodnický M, Belej K, Fuseková, Bošelová L. Quantitative analysis of myelinated nerve fibers of peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Chem Neurophathol* 1995; 25:225-33.

12. Medori R, Autilio-Gambetti L, Jenich H, Gambetti P. Changes in axon size and slow axonal transport are related in experimental diabetic neuropathy. *Neurology* 1988;38:597-601.

13. Mattingly GE, Fischer VW. Peripheral nerve axonal dwindling with concomitant myelin sheath hypertrophy in experimentally induced diabetes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1985;68:149-54.

Tabla 1. Niveles de glucosa en sangre (Glu) y peso corporal

	Duración de la DM (semanas)	Peso (g)		Glu (mmol/L)		
		Valores iniciales	Valores finales	Valores iniciales	Valores finales	
Ratas sanas n = 15	0	289.7	\pm 0.8	7.79	\pm 1.42	-
	10	432.1	\pm 0.7	8.34	\pm 0.56	8.93 \pm 1.28
	18	440.5	\pm 0.9	7.32	\pm 1.12	9.80 \pm 0.62
Ratas diabéticas n = 12	10	220.7	\pm 0.9	20.97	\pm 2.13	26.70 \pm 0.75
	18	275.7	\pm 0.6	21.28	\pm 1.89	30.65 \pm 1.22

Los valores se presentan como la media \pm error estándar de la media
n: número de animales

embargo, en las ratas diabéticas estos valores fueron significativamente menores con respecto a los observados en los animales control sanos pareados en edad, a las 10 y 18 semanas de inducida la DM ($p < 0.01$). Ello no sucedió con el PX, que a las 10 semanas de evolución de la enfermedad no mostró diferencias significativas (Figura 1). Las diferencias encontradas en el AX de las ratas sanas y diabéticas fueron del 13.4% y del 16.8% a 10 y 18 semanas de duración de la DM, respectivamente.

Forma axonal

En el IC de los animales sanos y de los diabéticos no se observaron cambios significativos con relación a la edad ($p > 0.05$). Los valores de este parámetro en las ratas diabéticas fueron significativamente inferiores en relación con los de los animales control sanos pareados en edad y con respecto al grupo control del inicio del experimento (semana 0) ($p < 0.01$) (Figura 2).

Área de la mielina

El área de la mielina (AM) aumentó significativamente con la edad en los animales sanos y en los diabéticos ($p < 0.01$), excepto en las ratas diabéticas de las 22 y a las 30 semanas de edad, en que el aumento no fue marcadamente ($p = 0.12$). El AM fue significativamente menor en los grupos de animales diabéticos que en los animales control sanos pareados en edad ($p < 0.01$) (Figura 2). Las diferencias entre ratas sanas y ratas diabéticas fue del 6.7 y del 11.2% a las 10 y 18 semanas de duración de la DM, respectivamente.

Discusión

El proceso de crecimiento y desarrollo en las ratas se extiende durante gran parte de su vida, e incluye la maduración morfofuncional de los nervios periféricos [20, 21]. La instauración de un cuadro clínico de DM en estos animales, lleva a la aparición de alteraciones morfológicas que interfieren el proceso de crecimiento. El análisis morfométrico de las fibras nerviosas periféricas mielínicas, ha demostrado que existe una reducción de su calibre en los animales diabéticos, en relación con los animales control pareados en edad.

Sin embargo, existen divergencias de criterios en cuanto a las afectaciones relativas del calibre axonal y del tamaño de la vaina de mielina, al vincular la mayor afectación del axón y de la vaina de mielina con la etapa de más intenso desarrollo de estas estructuras, por lo que estas alteraciones se consideran un retardo en el crecimiento.

En este estudio se observó que el tamaño de la fibra nerviosa tuvo un aumento significativo según la edad de los animales sanos y los diabéticos, lo que responde al incremento del calibre axonal y al aumento del área ocupada por la mielina. Ello evidencia el proceso de crecimiento y desarrollo que ocurre en los nervios periféricos durante gran parte de la vida posnatal [22]. Estos resultados concuerdan con estudios en ratas sanas, en los que se aprecia un crecimiento del calibre axonal, desde las 3 semanas (momento en que se inició el estudio) hasta los 9 meses de edad [20]. Existen divergencias de criterios entre los distintos autores en cuanto al comportamiento del crecimiento de la cubierta de mielina en las ratas sanas. Fraher y colaboradores (1990) describieron un rápido incremento en el grosor de la vaina de mielina, la que alcanzó su máximo valor a los 3 meses de edad [20], lo cual no concuerda con los resultados de este estudio y los de otros autores, que indican una continuidad en el aumento del grosor y del área de la cubierta de mielina, pasados los 3 meses del nacimiento [11, 23]. Además, se evidenció que la DM experimental no detiene el proceso de crecimiento de los nervios periféricos, sino que lo retarda. Lo anterior se constató al observar que el incremento que se produce en el calibre de la fibra (AX y AM) en los animales diabéticos, es menor que el observado en los animales control pareados en edad. El AM de los animales diabéticos no aumentó significativamente entre las 10 y las 18 semanas de evolución de la DM, aunque sí se mantuvo una tendencia al aumento.

La afectación del calibre axonal, dada por el menor valor del AX en los animales diabéticos con respecto a los animales control pareados en edad, se demostró a las 10 y 18 semanas de evolución de la DM y antes se estudió por varios autores [24-26]. En aquellos trabajos en que la DM se indujo en la pospubertad, se han encontrado valores del AX menores en los

14. Schmidt RE, Scharp DW. Axonal dystrophy in Experimental Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes* 1982; 31:761-70.

15. Clark HB, Schmidt RE. Identification of dystrophic sympathetic axons in experimental diabetic autonomic neuropathy. *Brain Res* 1984;293:390-5.

16. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-94.

17. Medori R, Autilio-Gambetti L, Jenich H, Gambetti P. Changes in axon size and slow axonal transport are related in experimental diabetic neuropathy. *Neurology* 1988;38:597-601.

18. Mayhew TM. Efficient and unbiased sampling of nerve fibers for estimating fiber number and size. *Methods in Neurosciences*. Conn P.M. New York. Academic Press, 1990: 172-87.

19. Dyck PJ, Gianini C, Lais A. Pathological alterations of the nerves. En: Dyck PJ, Thomas PK, eds. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders, 1993: 515-93.

20. Fraher JP, O'Leary D, Moran AM, Cole M, King RHM, Thomas PK. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. I. Normal animals. *Acta Neuropathol* 1990; 79:364-74.

21. Biessels G-J, Cristino NA, Rutten G-J, Hamers FPT, Erkelens DW, Gispen WH. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin diabetic rats. Course of development and effects of insulin treatment. *Brain* 1999;122:757-68.

22. Sharma AK, Bajada S, Thomas PK. Age changes in the tibial and plantar nerves of the rat. *J Anat* 1980;130:417-28.

23. Dockery P, Sharma AK. Ultrastructural abnormalities of myelinated fibers in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci* 1990;98:327-45.

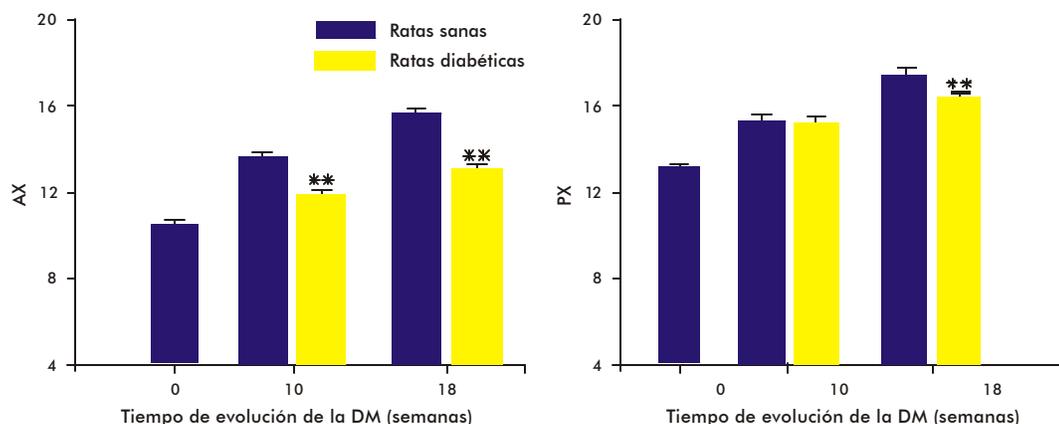


Figura 1. Media \pm error estándar de la media del área axonal (AX) y del perímetro axonal (PX) de las fibras del nervio tibial posterior, de los grupos de animales sanos y de los diabéticos. ** Diferencias con respecto a los animales control sanos pareados en edad ($p < 0.01$).

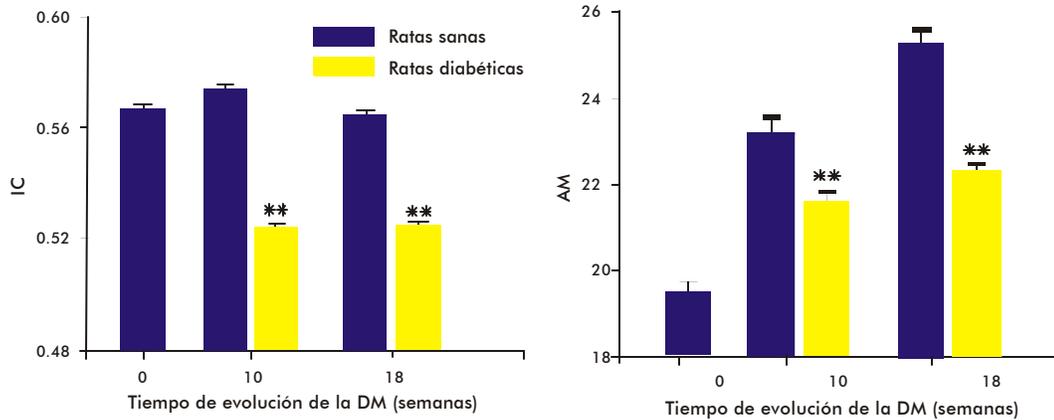


Figura 2. Media ± error estándar de la media del índice de circularidad (IC) y el área de la mielina (AM) de las fibras del nervio tibial posterior de los grupos de los animales sanos y de los animales diabéticos. ** Diferencias con respecto a los animales control sanos apareados en edad (p < 0.01).

animales diabéticos que en los animales control a las 12, 20 y 28 semanas de duración de la DM, en diferentes nervios [24-26]. De igual manera, se ha informado la ausencia de diferencias a las 2, 4, 6, 8 y 17 semanas de duración de la enfermedad en los nervios ciático, tibial, lateral plantar y peroneal común entre animales diabéticos y animales control apareados en edad [11, 23, 26]. Los autores atribuyeron la ausencia de diferencias en el AX entre animales sanos y diabéticos a las 17 semanas de evolución de la enfermedad, a que la DM se indujo tardíamente en el desarrollo (20-21 semanas de edad), en un período en que el crecimiento axonal no es un proceso muy activo [23]. Por tales razones, estos autores plantean que en esta etapa el AX es menos vulnerable al daño que ocasiona esta enfermedad, en comparación con el AX en las investigaciones en que la DM se provoca más tempranamente y donde sí se describen diferencias entre los animales sanos y los diabéticos desde las 12 semanas de duración de la DM. De acuerdo con los datos anteriores, existe un período de duración de la DM necesario para la aparición de la afectación del AX, pero este puede estar influenciado por la edad de inducción de la DM.

Al igual que el área, el PX constituye una medida del calibre del axón; sin embargo, el AX representa el axoplasma de la fibra, y el perímetro, su axolema. La mayoría de los estudiosos han reportado una disminución del PX en los animales diabéticos, en comparación con los animales control a partir de las 12 semanas de inducida la enfermedad [27], no ocurre así a las 4, 6 y 8 semanas de inducida [11, 27]. Los resultados de este estudio demostraron que existe afectación del axolema de la fibra a las 18 semanas de inducida la DM, no así a las 10 semanas de la enfermedad.

En este experimento, la forma axonal (IC), tanto en los animales diabéticos como en los animales control, no mostró variaciones según la edad, lo que se corresponde con los resultados de otros autores [20]. Sin embargo, se ha informado también una tendencia a la disminución del IC durante el desarrollo [28]. La mayor irregularidad de la fibra nerviosa en los animales diabéticos con respecto a los animales control, sugiere una mayor afectación

del AX (axoplasma) que del PX (axolema). Esta irregularidad se ha tratado de explicar por varias hipótesis. Existen datos que apoyan la ocurrencia de un encogimiento axonal por deshidratación, debido a la hiperosmolaridad hística [24, 29], mientras que otros autores plantean que ocurre el déficit en el crecimiento, como causa de esta mayor irregularidad [27].

El calibre axonal está determinado fundamentalmente por los neurofilamentos [30]. Se ha informado que la formación inicial de la mielina en las fibras mielínicas está determinada por el calibre axonal, y este influye en el grosor de la cubierta de mielina y su volumen total. En esta investigación se observaron diferencias significativas en el AM entre los animales diabéticos y los animales control, tanto a las 10 como a las 18 semanas de inducida la DM, lo que concuerda con lo reportado por otros autores [11, 23, 27].

Varios autores plantean que cuando la DM es inducida en la pospubertad, se observa una mayor afectación del calibre axonal que de la función de las células de Schwann y el crecimiento de la capa de mielina [24, 25, 31]. Por el contrario, otros han observado una mayor alteración de la célula de Schwann que del calibre axonal en la DM inducida en la pospubertad [11, 23]. La mayor afectación de estas variables morfológicas, al parecer está asociada con la etapa más activa de crecimiento, por lo que la edad de inducción de la DM es un parámetro importante que se debe tener en cuenta al analizar los datos aportados por los diferentes estudios. En este estudio se observó daño axonal y mielínico, con una predominancia axonal a las 10 semanas de duración de la DM; una reducción del 13.4% para AX con respecto a los animales control apareados en edad y del 6.7% para el AM; mientras que a las 18 semanas, la afectación fue del 16.8% para el AX y del 11.2% para el AM. Al comparar la severidad de las afectaciones neuropáticas entre las 10 y 18 semanas de DM, se observó la mayor alteración del AX y del AM a las 18 semanas de evolución de la DM. En la mielina, esta afectación está dada, además, por la ausencia de diferencias significativas entre las ratas diabéticas a las 10 y 18 semanas de inducida la DM

24. Sugimura K, Windebank AJ, Natarajan V, Lambert EH, Schmid HO, Dyck PJ. Interstitial hyperosmolarity may cause axon cylinder shrinkage in streptozotocin diabetic nerve. *J Neuropathol Exp Neurol* 1980;39:710-21.

25. Weis J, Dimpfel W, Schröder M. Nerve conduction changes and fine structural alterations of extrafusal and intrafusal muscle and nerve fibers in streptozotocin diabetic in the rats. *Muscle and Nerve* 1995;18:175-84.

26. Chokroverty S, Seiden D, Navidad P, Cody R. Distal axonopathy in streptozotocin diabetes in rats. *Experientia* 1988;44:444-6.

27. Thomas PK, Fraher JP, O'Leary D, Moran AM, Cole M, King RHM. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. 2. Effect of streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathologica* 1990; 79:375-86.

28. Dockery P. Peripheral nerve structure in two models of diabetes: A morphometric approach. En: Manchanda SK, Selvarajurthy W, Kumar VM (eds.). *Advances in Physiological Sciences*. New Delhi, 1990: 220-9.

29. Dyck PJ, Lambert EH, Windebank AJ, et al. Acute Hyperosmolar Hyperglycemia Causes Axonal Shrinkage and Reduce Nerve Conduction Velocity. *Exp Neurol* 1981;71:507-14.

30. Hoffman PN, Griffin JW. The control of axonal caliber. En: Dyck PJ, Thomas PK (eds.). *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders, 1993:389-402.

31. Jacobsen J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibers. *Diabetologia* 1976;12: 547-53.

y la presencia de estas diferencias entre los animales control. En conjunto, los resultados de esta investigación indicaron que las ratas diabéticas

poseían una neuropatía mixta axonal-mielínica, con predominio de daño axonal y aumento de la severidad de la neuropatía con la duración de la DM.

Recibido en febrero de 2006. Aprobado en junio de 2006.