

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

IMPACTOS DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE O NERVO E MÚSCULO DA
PROLE

MARIA JÚLIA NEVES RIBEIRO

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

Coorientadora: Msc. Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas

UBERLÂNDIA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

IMPACTOS DA DIABETES GESTACIONAL SOBRE O NERVO E MÚSCULO DA
PROLE

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como como pré-requisito
para a obtenção do Título de Bacharel
em Biomedicina pela Universidade
Federal de Uberlândia.

UBERLÂNDIA, MG

2023

MARIA JÚLIA NEVES RIBEIRO

IMPACTOS DA DIABETES GESTACIONAL SOBRE O NERVO E MÚSCULO DA
PROLE

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como como pré-requisito
para a obtenção do Título de Bacharel
em Biomedicina pela Universidade
Federal de Uberlândia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

Msc. Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas

Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Prof. Dr. Claudemir Kuhn Faccioli

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos meus guias espirituais que me deram discernimento, fé e saúde para conseguir realizar essa pesquisa com coragem, dedicação e força, e passar por todas as dificuldades e obstáculos que apareceram pelo caminho.

Aos meus pais, Aparecida Neves, Jose Humberto e ao meu irmão João Pedro, pelo apoio, incentivo, paciência e por sempre acreditarem em minha capacidade, fornecendo o necessário para que eu pudesse concluir com excito todos os meus objetivos e sonhos.

Aos meus familiares, que sempre estiveram presentes me apoiando e fornecendo forças e orações por mim, e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava a realização desta pesquisa.

Ao meu noivo, Arthur Arantes por ter permanecido ao meu lado me acompanhando por todo o processo de formação e estudo, dando apoio, força, amor e sempre me mostrando que sou capaz, me encorajando a buscar a excelência e a superar meus medos e ansiedades, por ser meu porto seguro durante toda a graduação.

À minha orientadora, Renata Zanon por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu laboratório (LAMOC), pelo tempo dedicado a me ensinar e repassar todo o seu conhecimento e sabedoria.

À minha coorientado e amiga Fernanda Mascarenhas, que me orientou, ensinou, apoiou e me incluiu em seu projeto acreditando em minha capacidade.

Aos meus colegas de turma que presenciaram todo o meu esforço e dedicação, e juntos demos forças uns aos outros, apoiando e fornecendo concelhos.

À Universidade Federal de Uberlândia, e ao corpo docente, direção e administração do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), que oportunizaram e forneceram um ambiente saudável, ético, disponibilizando todos os recursos necessários para a realização desse projeto e para a minha formação acadêmica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	21
Figura 2	21
Figura 3	22
Figura 4	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro da divisão do grupo dos animais fêmeas grávidas.	18
Tabela 2 - Quadro da divisão do grupo da prole.	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DG: Diabetes *Mellitus* Gestacional

G1: Primeiro dia de gestação

G5: Quinto dia de gestação

G7: Sétimo dia de gestação

IDF: Federação Internacional de Diabetes

IGFs: Fator de crescimento semelhante à insulina

IMC: Índice de massa corporal

NPD: Neuropatia Periférica Diabética

PBS: Solução salina tamponada

REBIR: Rede de Biotérios

SNA: Sistema nervoso autônomo

SNC: Sistema nervoso central

STZ: Estreptozotocina

TOTG: Teste oral de tolerância à glicose

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

SUS: Sistema Único de Saúde

GLUT2: Transportador de glicose do tipo 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

NAD⁺: Nicotina adenina dinucleotídeo

ATP: Adenosina trifosfato

RESUMO

Diabetes Mellitus Gestacional (DG) é definida como qualquer intolerância à glicose durante a gestação, promovendo um ambiente hiperglicêmico que atinge o feto em desenvolvimento. O excesso de glicose pode comprometer as células neurais que reagem através de mudanças fisiológicas e estruturais. No Sistema Nervoso Periférico do diabético pode ocorrer prejuízos na condução do impulso nervoso e na musculatura inervada. Nesse sentido, esse trabalho estuda os comprometimentos no nervo isquiático e no músculo tibial anterior dos filhotes de ratas diabéticas. Para isso, ratas foram submetidas à lesão pancreática farmacológica no quinto dia de prenhez. Após o nascimento, os nervos isquiáticos e os músculos tibiais anteriores dos filhotes com 7 e 30 dias de vida foram coletados para análises morfológicas. Os resultados foram analisados com estatística adequada à distribuição dos dados, durante a gestação as mães induzidas ao DG apresentaram menor ganho de peso e evolução hiperglicêmica, enquanto o grupo controle se apresentou normoglicêmico. Os filhotes do grupo diabético apresentaram menor índice de massa corporal acompanhada de atrofia muscular. Não foram observados infiltrados inflamatórios ou sinais de degeneração precoce no nervo isquiático desses animais. Contudo afirmamos sobre a importância do acompanhamento médico e o tratamento adequado durante a gestação.

Palavras-chaves: diabetes gestacional, prole, sistema nervoso periférico, nervo isquiático e músculo tibial anterior

ABSTRACT

Gestational Diabetes Mellitus (GD) is defined as any glucose intolerance during pregnancy, promoting a hyperglycemic environment that affects the developing fetus. Excess glucose can compromise neural cells that react through physiological and structural changes. In the Peripheral Nervous System of diabetics, damage may occur in the conduction of nerve impulses and in the innervated muscles. In this sense, this project studies the impairments in the sciatic nerve and anterior tibialis muscle of diabetic rat puppies. For this, rats were subjected to pharmacological pancreatic injury on the fifth day of pregnancy. After birth, the sciatic nerve and anterior tibial muscles of 7- and 30-day-old pups were collected for morphological analysis. The results were analyzed with statistics appropriate to the distribution of data. During pregnancy, mothers induced to GD showed less weight gain and hyperglycemic evolution, while the control group was normoglycemic. The puppies in the diabetic group had a lower body mass index accompanied by muscle atrophy. No inflammatory infiltrates or signs of early degeneration were observed in the sciatic nerve of these animals. However, we affirm the importance of medical monitoring and adequate treatment during pregnancy.

Keywords: gestational diabetes, offspring, peripheral nervous system, sciatic nerve, anterior tibial muscle

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
3. JUSTIFICATIVA	15
4. OBJETIVOS	16
4.1. GERAL	16
4.2. ESPECÍFICOS	16
5. METODOLOGIA	17
5.1. ANIMAIS E ACASALAMENTO	17
5.2. INDUÇÃO AO DIABETES	17
5.3. VARIÁVEIS AVALIADAS	18
5.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISES DE TECIDOS	18
5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
6. RESULTADOS	20
6.1. EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL E GLICEMIA DAS MÃES	20
6.2. ÍNDICE DE MASSA CORPORAL E GLICEMIA DOS FILHOTES	21
6.3. AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS NERVOS DOS FILHOTES	22
6.4. PROCESSO DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DA FIBRA MUSCULAR	23
7. DISCUSSÃO	24

1. INTRODUÇÃO

O elevado teor de glicose durante a gestação pode prejudicar a saúde das mães e bebês, causando a Diabetes Mellitus Gestacional (DG). Para a confirmação diagnóstica da DG é necessário realizar o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Todas as mães a partir do quarto mês de gravidez realizam o exame em que é avaliado a dosagem de glicemia, caso o nível glicêmico em jejum seja ≥ 100 mg/dL é então realizado o TOTG. Os riscos mais comuns para o feto dentro do útero hiperglicêmico são anormalidades ou nascimento pré-maturo, sendo um dos principais fatores causadores de defeitos congênitos nos fetos, além disso, essas alterações não são encontradas apenas nos primeiros meses de vida, mas também podem estar presentes ao longo da vida adulta, levando a diversas patologias como a diabetes, doenças cardiovasculares, renais e neuropatias. Uma das principais queixas dos pacientes com Diabetes Mellitus são as dores nos membros periféricos e os principais fatores causadores dessas dores são as neuropatias, disfunções motoras e polineuropatias.

A Neuropatia Periférica Diabética (NPD) prejudica os axônios distais, levando a danos estruturais e de condutibilidade dos nervos dos membros superiores e inferiores, causando deformidades, úlceras e até mesmo amputação dos membros acometidos. Esses danos axonais ocorrem por conta da alta concentração de glicose presente na circulação sanguínea provocando a lesão dos nervos periféricos, e dificultando a propagação dos impulsos nervosos da forma adequada. Os sintomas mais comuns são o formigamento, dormência, dor, queimação e perda de sensibilidade. Desta forma, é possível observar que o dano decorrente do ambiente hiperglicêmico intrauterino nos nervos periféricos da prole pode ocasionar alterações musculares, como as síndromes de Bruns-Garland, e a neuropatia múltipla dolorosa aguda ou subaguda.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A Diabetes Mellitus Gestacional (DG) corresponde a um aumento no nível glicêmico desenvolvido na mãe durante o período gestacional, podendo persistir ou não após o parto. Ao decorrer da gestação o organismo materno está exposto a diversas alterações hormonais levando a uma provável intolerância à glicose associada à resistência insulínica e/ou diminuição da função das células beta pancreáticas (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2021; GODINHO, *et al.*, 2023), semelhante ao diabetes mellitus do tipo I, que é caracterizado por ser uma patologia autoimune que compromete principalmente o pâncreas levando a das células beta pancreáticas produtoras de insulina (NEVES, *et al.*, 2017, LEITÃO, *et al.*, 2023). Outros cofatores que estão envolvidos com este quadro são o sobrepeso, síndrome metabólica, idade materna maior acima dos 35 anos, história familiar de diabetes, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez, abortos passados, síndrome dos ovários policísticos, baixa estatura, polidrâmnio. Além desses, durante a gestação, naturalmente o organismo materno precisa produzir uma quantidade maior de glicose para suprir o feto com a quantidade adequada de glicose (FERNANDES; BEZERRA, 2020; LI, *et al.*, 2020; GODINHO, *et al.*, 2023).

O diagnóstico da DG é realizado no pré-natal pela dosagem de glicemia antes do quarto mês de gravidez, este rastreamento é considerado positivo quando o nível glicêmico em jejum for ≥ 100 mg/dL. Por outro lado, a confirmação diagnóstica é feita com o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), caso a glicemia seja ≥ 126 mg/dL, a gestante é diagnosticada com DG (RODRIGUES; CASANOVA; DE PAIVA, 2020; SOUSA; FERREIRA, 2021; MARTINS; HEINEN; DA COSTA, 2022.). Esse quadro é caracterizado como um problema de saúde pública, pois leva a uma perturbação metabólica durante o período gestacional. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), 16,8% das gestações são acometidas com o período gestacional hiperglicêmico (EGAN; DUNNE, 2020; BATISTA, *et al.*, 2021). No Brasil cerca de 18% das gestantes que fazem acompanhamento no Sistema Único de Saúde (SUS) apresentam hiperglicemia na gestação. Desta forma, observa-se um aumento durante os últimos anos de mulheres diagnosticadas com diabetes no período gravídico-puerperal (MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, 2020; SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, 2022). Essa perturbação metabólica pode causar graves complicações como o parto prematuro, aborto, hipoglicemia e hiperglicemia neonatal e materna, pré-eclâmpsia e distocia (CHOUDHURY; RAJESWARI, 2021). Em mulheres com diabetes pré-existente do tipo

1, a cesariana é recomendada em uma gestação mais precoce reduzindo para 37 a 38 semanas de gestação (MURRAY; REYNOLDS, 2020).

Caso o feto passe muito tempo em níveis elevados de glicose o mesmo pode vir a apresentar um quadro diabético no futuro (IDF, 2020). Além disso, a presença de malformações congênitas é mais frequentes em filhos de mães diabéticas, tais como, anomalias no Sistema Nervoso Autônomo (SNA), coração, esqueleto, trato gastrointestinal, sistema urinário, causando patologias como macrosomia fetal, desordens metabólicas, hiper bilirrubinemia, prematuridade, aumento de mortalidade neonatal e morte fetal intraútero (MURRAY; REYNOLDS, 2020). A hiperglicemia intrauterina desenvolve dependência glicêmica fetal levando a uma hipoglicemia após o parto resultando em lesão cerebral fetal (GIARLLARIELLI, *et al.*, 2023).

Quanto ao Sistema Nervoso Central (SNC), as malformações mais frequentes são falhas de fechamento do tubo neural, anencefalia, microcefalia, hidrocefalia, catarata congênita e hipoplasia do nervo óptico (PANTE, *et al.*, 2011). O efeito fisiológico causado pelo estado hiperglicêmico fetal influência diretamente na proporção de insulina secretada pelo pâncreas do neonato e na produção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs). Este tem como função promover o crescimento de órgãos e tecidos, garantindo a deposição de gordura adequada e armazenamento de glicogênio, prevenindo os desequilíbrios glicêmicos neonatais logo após o nascimento (MIRABELLI, *et al.*, 2021).

A DG, se não controlada, pode levar às complicações vasculares como retinopatia, nefropatia, doenças cardiovasculares, má cicatrização e consequentes exposições a infecções na mãe. Neuropatias e disfunções motoras como a Neuropatia Periférica Diabética (NPD) também pode ser um efeito à longo prazo no feto causada pela DG, afetando os axônios distais, levando a prejuízos estruturais e de condutibilidade dos nervos dos membros periféricos superiores e inferiores, causando deformidades, úlceras e amputações (DA COSTA; COELHO; DOS SANTOS, 2019; DE CASTRO, *et al.*, 2021).

Os sintomas da NPD incluem formigamento, dormência, dor, queimação e perda de sensibilidade, causados pela maior oferta de glicose sanguínea que provoca a lesão dos nervos periféricos, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos de modo correto (RAMJI, *et al.*, 2007; DA SILVA, *et al.*, 2021). O diagnóstico é feito através de testes de rastreio, utilizando Bioestesiômetro, Diapasão, e pelo Escore de comprometimento neuropático. Onde são avaliadas as fibras nervosas finas, que acometem a sensibilidade

térmica e dolorosa, e as fibras nervosas grossas responsáveis pelos reflexos tendíneos, sensibilidade vibratória e tátil (ROLIM, *et al.*, 2023). O tratamento é feito através de um acompanhamento médico rigoroso onde será avaliado a resposta do paciente, tendo como principais tratamentos a fisioterapia, atividades físicas, dietas, controle glicêmico e a utilização de fármacos para o alívio dos principais sintomas (ROLIM, *et al.*, 2023).

A NPD pode ser classificada como sensitiva, motora, autonômica, polineuropatia, mononeuropatia, simétrica, assimétrica, proximal ou distal. Sendo, a mais comum entre os diabéticos a neuropatia simétrica distal, decorrente da degeneração dos axônios e de suas bainhas de mielina, conhecida como Degeneração Walleriana, na região distal dos membros em ambos os lados do corpo (CONFORTI; GILLEY; COLEMAN, 2014; NASCIMENTO; PUPE; CAVALCANTI; 2016; COBOS-PALACIOS; SAMPALO; CARMONA, 2020).

Além da NPD, o paciente hiperglicêmico esta suscetível a desenvolver outras patologias de origem nervosa, como a neuropatia de aprisionamento, que acomete cerca de 25% dos pacientes afetando os nervos plantares, causando forte dores nos pés e tornozelos, comumente conhecida como Síndrome do Túnel do Tarso. Outra complicação comum, é a Amiotrofia diabética conhecida também como síndrome de Bruns-Garland, que compromete neurônios motores desenvolvendo atrofia muscular e dores intensas (DE MORA, *et al.*, 2019; DE MAGALHÃES, *et al.*, 2021). Devido a uma possível disfunção nervosa periférica, pode-se inferir uma conseqüente alteração muscular, de músculos inervados por nervos danificados pelo excesso de glicose no ambiente materno (D'SOUZA; AL-SAJEE; HAWKE, 2013).

Nesse contexto, tem sido relatado que a DG também afeta a musculatura, com a perda da capacidade física, força e crescimento, levando à redução do tamanho das miofibrilas e de massa muscular como um todo, com menores chances de regeneração, devido à disfunção metabólica e mudança no fenótipo glicolítico. A principal neuropatia que afeta a musculatura é a denominada múltipla dolorosa aguda ou subaguda, agindo nos nervos motores prejudicando os músculos proximais da perna causando amiotrofia diabética (DA SILVA, *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICATIVA

A DG é um dos grandes problemas de saúde pública em nível mundial. Entretanto, há uma escassez de trabalhos sobre alterações nervosas periféricas provocadas pelo diabetes gestacional na prole, sendo que a maioria dos trabalhos focam em comprometimentos em nível hipotalâmico, conhecida por ser a região do diencefalo que controla a fome e à saciedade e respondem à insulina. Desta maneira, o presente trabalho mostra a importância em trazer informações da ciência básica sobre o efeito da hiperglicemia no feto, especificamente sobre os tecidos musculares e nervosos periféricos, tecidos que raramente são focos de trabalho com DG. Consequentemente, conhecer melhor o efeito da hiperglicemia sobre o feto pode auxiliar, de forma translacional, em pesquisas clínicas que buscam estudar causas e/ou terapêuticas eficientes para doenças congênitas ou tardias com causas multifatoriais ou ainda desconhecidas e enfatizar a importância do tratamento e acompanhamento durante a gestação.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

- Avaliar a presença de sinais precoces de degeneração muscular e neurodegeneração periférica na prole de ratas diabéticas da linhagem Wistar.

4.2. ESPECÍFICOS

- Observar a evolução de peso corporal e glicemia das mães de ambos os grupos CT e DG.
- Avaliar o Índice de Massa Corporal (IMC) e glicemia dos filhotes de ambos os grupos CT e DG.
- Analisar a presença de alterações morfológicas nos nervos isquiáticos dos filhotes.
- Estudar o processo de regeneração das fibras musculares dos filhotes.

5. METODOLOGIA

5.1. ANIMAIS E ACASALAMENTO

Foram utilizados 12 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com oito semanas de vida, sendo considerada a idade de maturidade sexual, gerados na Rede de Biotérios (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (protocolo CEUA 056/18). Os animais foram mantidos em caixas de policarbonato opaco, em ambiente ventilado, com substrato de serragem autoclavada, em uma temperatura entre 18 a 22°C, umidade de 45 a 55% e ciclo de luz claro-escuro de 12/12 horas. Nutridos devidamente com ração comercial e água potável *ad libitum*, armazenados em bebedouros graduados com bico automático.

Para o acasalamento utilizamos quatro machos e oito fêmeas, que permaneceram separados em caixas por sexo. No final da tarde do primeiro dia de acasalamento, as fêmeas nulíparas foram colocadas nas caixas do macho na proporção de duas fêmeas/macho, e ficaram juntos durante a noite. Pela manhã as fêmeas foram separadas dos machos e em seguida realizado os lavados vaginais, onde com uma pipeta de Pasteur contendo solução salina (0,9%) foi introduzida superficialmente no canal vaginal. O material coletado foi depositado sobre lâminas de vidro devidamente identificadas, desta forma, foi possível realizar a leitura imediata em microscópio óptico de luz, em um aumento de 20x. A presença de espermatozoides nas lâminas indicou o primeiro dia de gestação (FERREIRA, *et al.*, 2011).

5.2. INDUÇÃO AO DIABETES

As ratas grávidas entraram em jejum no quarto dia de gestação (G4), permanecendo por 24 horas. A indução foi realizada no quinto dia gestacional (G5), que ocorreu por via injeção intraperitoneal, na região do quadrante inferior direito do abdômen dos animais, contendo tampão citrato (0,01M e pH 4,0) propriamente dito ou adicionado Estreptozotocina (STZ). Fármaco indutor de morte de células beta pancreáticas, causando diminuição da produção e secreção insulínica, gerando um quadro hiperglicêmico, levando ao desenvolvimento do Diabetes tipo I durante a gestação, típico de Diabetes Mellitus Gestacional. Após 48 horas da indução (G7), as fêmeas grávidas foram colocadas em jejum por oito horas, e posteriormente coletada uma gota de sangue da cauda para verificação da glicemia, realizada com o auxílio de um glicosímetro

Contour Plus® (KIRSTEN, *et al.*, 2010; MONTANHA, *et al.*, 2013). Assim, foram consideradas diabéticas as fêmeas grávidas que tiveram glicemia de jejum ≥ 200 mg/dL. Uma vez grávidas e diabéticas as fêmeas foram alocadas em caixas individuais divididas em:

Tabela 1 - Quadro da divisão do grupo dos animais fêmeas grávidas.

Grupo Controle (CT)	Quatro fêmeas grávidas (n = 4) que receberam injeção intraperitoneal de tampão citrato (0,01M e pH 4,0) no quinto dia da gestação (G5).
Grupo Diabetes Gestacional (DG)	Quatro fêmeas grávidas (n = 4) que receberam injeção intraperitoneal de STZ (50 mg/kg) (Santa Cruz®) diluída em tampão citrato (0,01M e pH 4,0) no quinto dia da gestação (G5).

5.3. VARIÁVEIS AVALIADAS

No período anterior ao acasalamento (pré-gestacional), e durante a gestação (G7 e G17), as fêmeas foram monitoradas quanto à glicemia utilizando glicosímetro Contour Plus®, bem como a massa corporal em gramas utilizando balança eletrônica KERN®. E posteriormente ao nascimento dos filhotes, estes também passaram pelas mesmas avaliações de peso e glicemia, além de medição de comprimento nasoanal, nas idades de 7 e 30 dias. O cálculo do índice de massa corporal foi realizado a partir dos dados de peso e comprimento desses animais.

5.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISES DE TECIDOS

Os filhotes após alcançarem as idades de 7 e 30 dias foram submetidos à eutanásia, sendo primeiramente anestesiados com uma overdose composta por uma mistura de cloridrato de Cetamina e cloridrato de Xilazina (1:1; 0,2 ml/ 100 g) via intraperitoneal (FIOCRUZ, 2008). Quanto aos filhotes, estes foram divididos em:

Tabela 2 - Quadro da divisão do grupo da prole.

	7 dias de vida (P7)	30 dias de vida (P30)
Filhotes do Grupo Controle (CT)	3	3
Filhotes do Grupo Diabetes Gestacional (DG)	3	3

Posterior a eutanásia, os animais foram submetidos a toracotomia e perfundidos transcardiamente com 5-20 ml de solução salina tamponada (PBS 0,1 M e pH 7,4) e, posteriormente fixados com 5-20 ml de solução fixadora de formalina 10% em PBS (0,1 M e pH 7,4). Foram extraídos o músculo tibial anterior e o nervo isquiático, e mantidos por 48 horas em soluções fixadoras específicas para cada tecido em temperatura de 4°C.

Os nervos permaneceram em fixador Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2) por 12 horas a 4°C. Passado esse período, foram lavados em PBS (0,1M, pH 7,4) e, em seguida, cada nervo foi cortado na metade, permanecendo um fragmento proximal e um distal. Os fragmentos foram submetidos à pós-fixação em solução tetróxido de ósmio 1% diluído em PBS (0,2M, pH 7,4) por 2 horas. Após a pós-fixação, lavou-se os fragmentos em água destilada, desidratados em séries crescentes de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS) em moldes de silicone em estufa a 60°C por 72 horas para polimerização da resina. Os blocos de resinas foram desbastados e as secções semifinas (0,5µm) obtidas e coradas com azul de toluidina 0,25%, para a observação e captura utilizando microscópio óptico de luz (Leica®) com câmera acoplada. A morfometria e as contagens de fibras mielínicas e degeneradas foi realizada pelo software ImageJ.

Os músculos permaneceram em fixador de formalina 10% por 48 horas a 4°C. Posteriormente, passaram por desidratação em series crescentes de etanol (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina na temperatura de 58 a 60°C, confeccionando assim os blocos de parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos em micrótomo (Leica®) com 5 µm de espessura, sendo obtidos cortes transversais seriados. As secções foram transferidas para as lâminas de vidro gelatinizadas e estocadas em temperatura ambiente até a realização das análises histológicas e nucleares.

As lâminas de músculos foram coradas com Hematoxilina e Eosina, uma coloração para estudos morfológicos gerais, revelando núcleos celulares arroxeados e citoplasma rosado. Primeiramente, as lâminas passaram por processos de desparafinização em xilol, hidratação em álcool etílico (100% a 70%), lavagem em água, coloração em solução de Hematoxilina de Harris, lavagem em água, e coloração em solução de Eosina-Floxina e lavadas novamente. Por fim, as lâminas foram desidratadas em concentrações gradativas de álcool etílico (70% a 100%) e lavagem em xilol. Para a montagem das lâminas, utilizou-se o meio de montagem (Entellan®) e uma lamínula devidamente limpa, e então mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz,

posteriormente fotografadas em microscópio óptico de luz (Leica®) com câmera acoplada.

Para os músculos, foram realizadas a morfometria de fibras musculares e a quantidade e localização dos núcleos nas mesmas (presença de núcleos centrais na fibra muscular indica processo de degeneração seguido por regeneração muscular), utilizando o software ImageJ.

5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores numéricos foram analisados por testes não-paramétricos Kruskal Wallis com pós teste de Dunn ou U de Mann Whitney. Para dados paramétricos usamos teste ANOVA 1 way com pós teste de Bonferroni. O programa usado foi o software GraphPadPrism 5.0 considerando que o nível de significância adotado para estes testes é de $p \leq 0,05$ e consideramos valor de p limítrofe entre 0,051 e 0,1. Os gráficos foram plotados apresentando mediana e percentil (dados não paramétricos) e média e erro padrão (dados paramétricos).

6. RESULTADOS

6.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL E GLICEMIA DAS MÃES

Durante a fase gestacional, nota-se que ambos os grupos CT e DG apresentaram evolução de ganho de peso, entretanto, o grupo DG obteve menores ganhos de peso. Em relação a avaliação glicêmica, apenas o grupo que foi induzido ao diabetes apresentou evolução hiperglicêmica, enquanto o grupo controle se apresentou normoglicêmico em todas as fases de avaliação ($p < 0,0001$) (**Figura 1**).

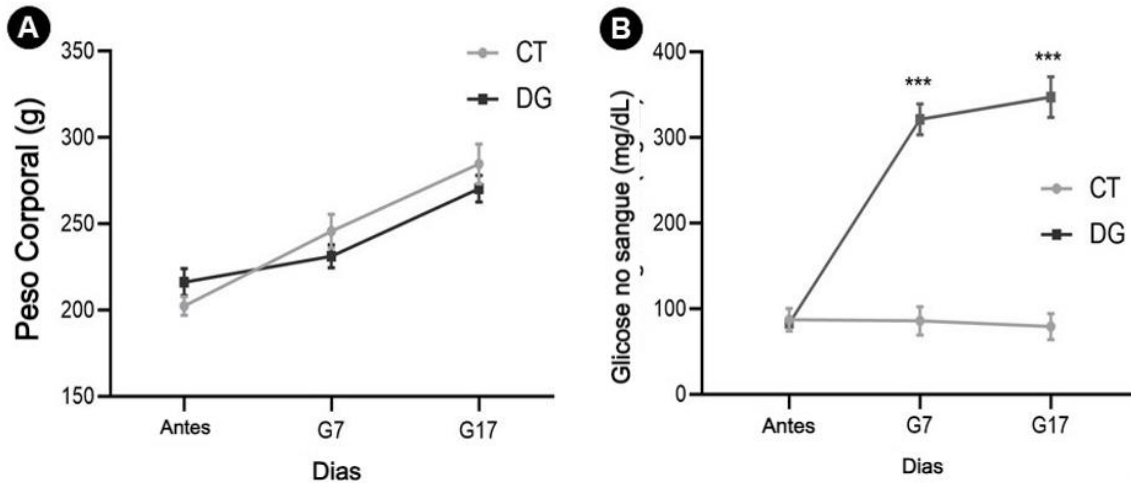


Figura 1 – Avaliação de evolução de peso corporal e glicemia das mães, dos grupos controle (CT) e diabetes gestacional (DG), nas fases pré-gestacional, sétimo (G7) e décimo sétimo (G17) dia gestacional **A**. Gráfico da evolução do peso corporal (g); **B**. Gráfico da evolução glicêmica (mg/dL), (***) $p < 0,0001$ (Teste t não pareado).

6.2.ÍNDICE DE MASSA CORPORAL E GLICEMIA DOS FILHOTES

Os resultados dos cálculos de índice de massa corporal mostraram que o grupo de filhotes expostos ao ambiente hiperglicêmico durante a gestação apresentou, em ambas as idades sete e trinta dias, menores IMC quando comparados ao grupo controle (***) $p < 0,001$ e **) $p = 0,0042$). A glicemia se apresentou mais baixa no grupo DG apenas na idade de trinta dias ($p = 0,0086$) (**Figura 2**).

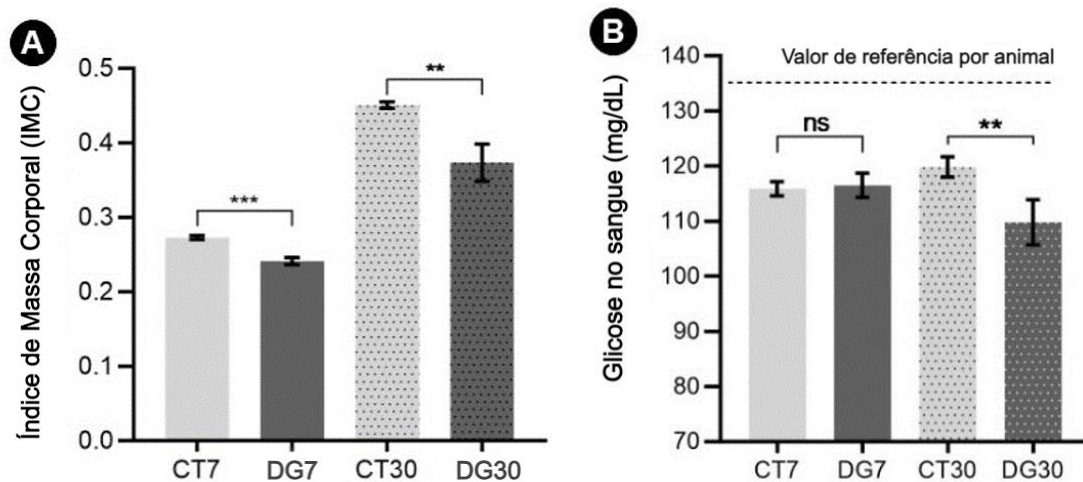


Figura 2 – **A**. Avaliação do índice de massa corporal (IMC), (***) $p < 0,0001$ e **) $p = 0,0042$) e **B**. Avaliação glicêmica (mg/dL) dos filhotes, dos grupos controle (CT) e

diabetes gestacional (DG), nas idades de sete (P7) e trinta (P30) dias (**p = 0,0086) (Teste t não pareado).

6.3. AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS NERVOS DOS FILHOTES

Na avaliação morfológica das secções transversais de nervos isquiáticos corados em azul de toluidina, não foram encontrados presença de infiltrados inflamatórios por avaliação qualitativa. E em relação as avaliações quantitativas de bainha de mielina, também não foram detectadas diferenças entre os grupos e idades (**Figura 3**).

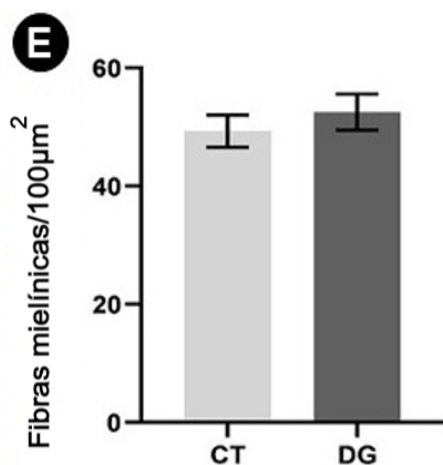
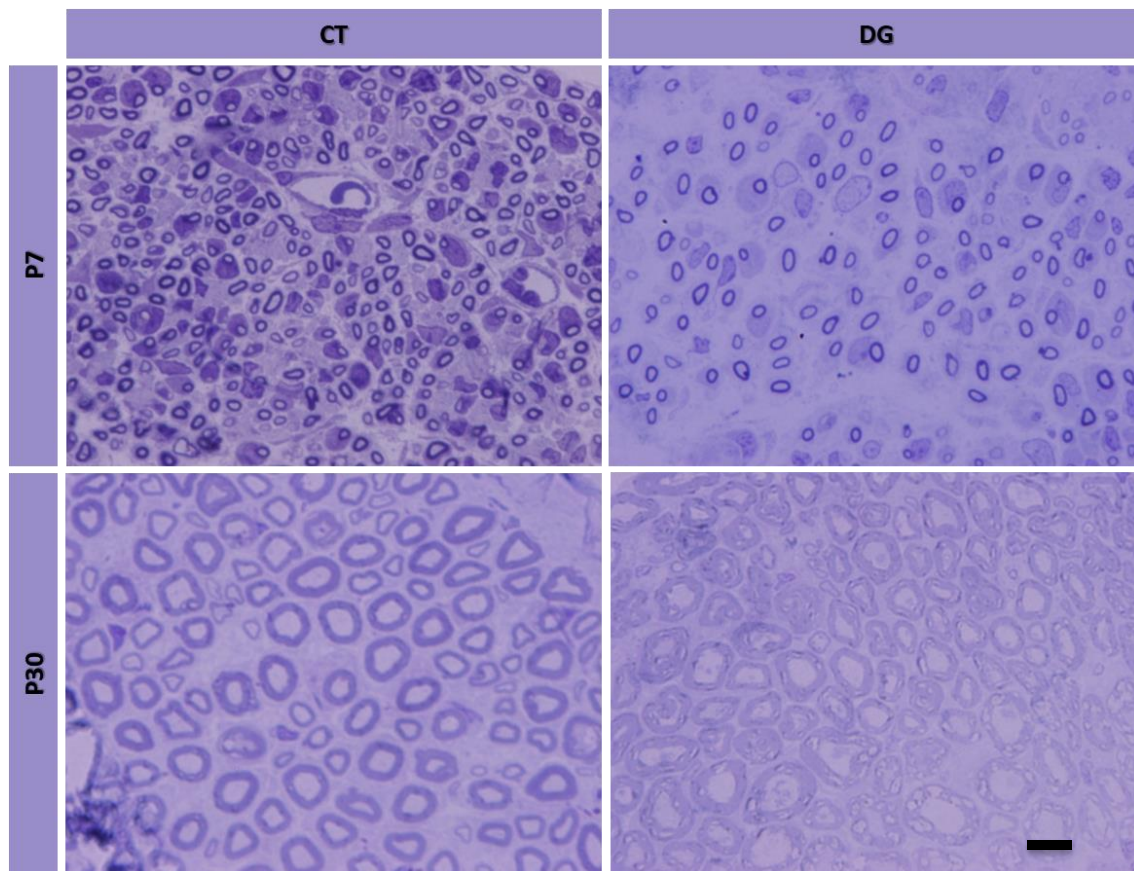


Figura 3 - A-D. Fotomicrografias no aumento de 1000x de cortes transversais de nervo isquiático dos filhotes. A. filhotes P7 grupo CT; B. filhotes P7 grupo DG; C. filhotes P30 grupo CT; D. filhotes P30 grupo DG; E. Gráfico da contagem de fibras mielínicas em ambas as idades nos grupos controle (CT) e diabetes gestacional (DG), (p = 0,4376) (Teste t não pareado). Escala: 5µm.

6.4.PROCESSO DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DA FIBRA MUSCULAR

Na avaliação morfológica das secções transversais de fibras musculares coradas em Hematoxilina e Eosina, foi mensurado as áreas das fibras musculares e a relação de núcleos centrais e periféricos. Observamos que no grupo DG em ambas as idades apresentavam fibras musculares com menores áreas de fibras (***) $p < 0,001$), sendo um indicativo de atrofia muscular nos filhotes de mães diabéticas quando comparado ao grupo de mães controle. E em relação a posicionamento de núcleos centrais e periféricos, foram observadas diferenças significativas entre os grupos em ambas as idades (P7, $p = 0,38$ e P30, $p = 0,10$) (Figura 4).

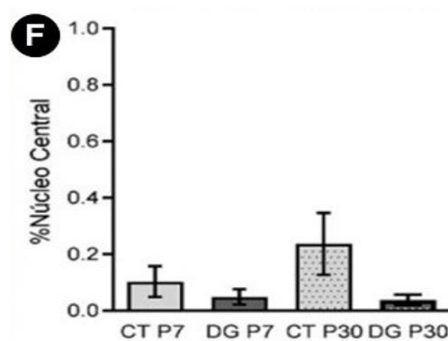
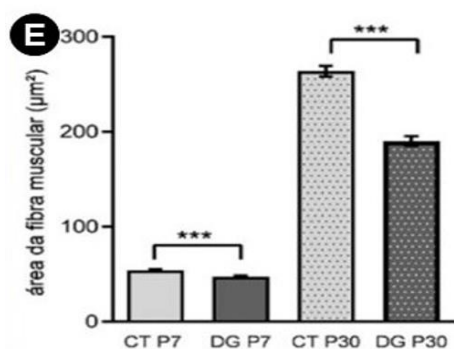
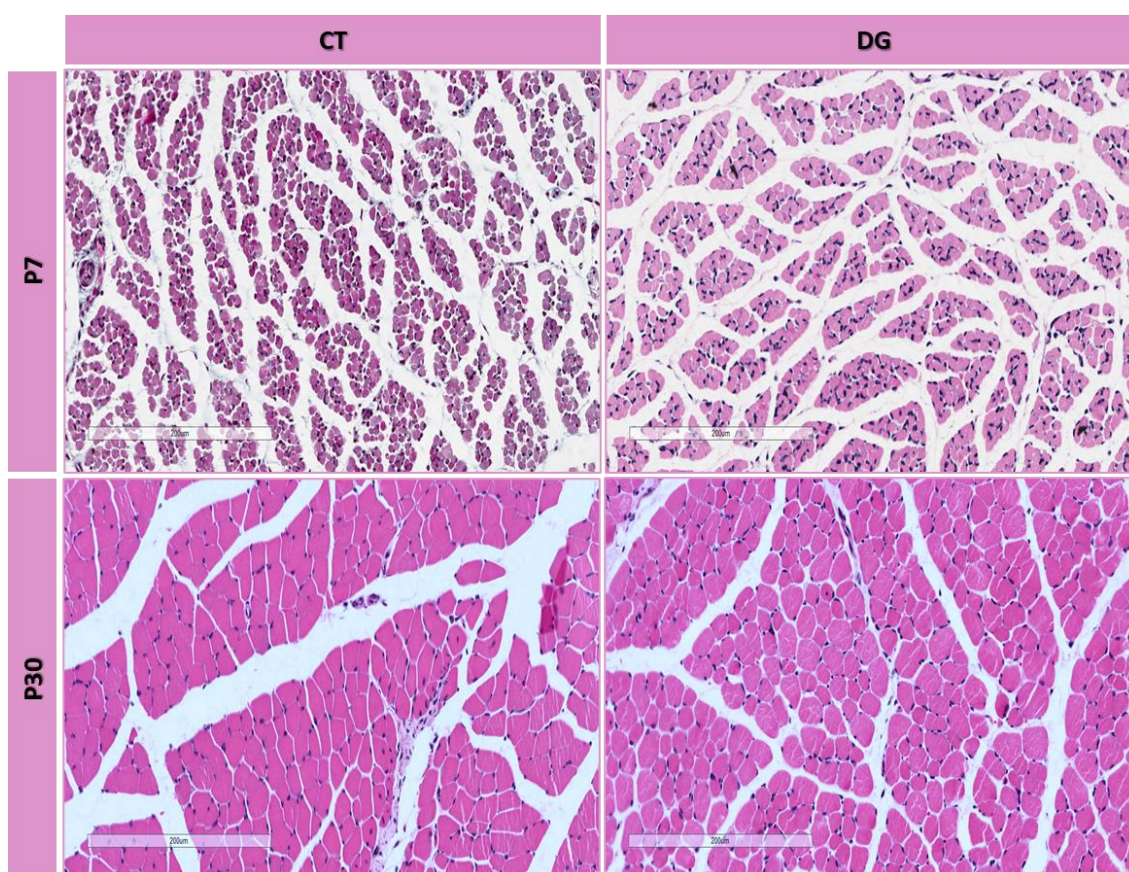


Figura 4 - A-D. Fotomicrografias no aumento de 20x de cortes transversais de fibras musculares dos filhotes. **A.** filhotes P7 grupo CT; **B.** filhotes P7 grupo DG; **C.** filhotes P30 grupo CT; **D.** filhotes P30 grupo DG. **E.** Gráfico de áreas das fibras musculares (μm^2) dos diferentes grupos e idades (** $p < 0,001$); **F.** Gráfico da relação de núcleos centrais e periféricos (%) dos diferentes grupos e idades, (P7, $p = 0,38$ e P30, $p = 0,10$) (Teste t não pareado). Escala: $5\mu\text{m}$

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou os efeitos de uma gestação hiperglicêmica causada pelo DG nos nervos periféricos e musculaturas da prole. Em relação aos efeitos da indução ao diabetes mellitus utilizando a droga estreptozotocina, os níveis glicêmicos das ratas começaram a mostrar alterações desde o primeiro dia, chegando a 300 mg/dL. Já o grupo controle que foi induzido com o veículo (tampão citrato) manteve-se normoglicêmico, resultados que corroboram com outros trabalhos (DE PAULA, 2008; HE *et al.*, 2020). Demonstrando a ação citotóxica da droga nas células beta, quando a mesma é capturada pelo transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2) o ácido desoxirribonucleico (DNA) é fragmentado em poli-ADP ribosilação, reduzindo a Nicotina Adenina Dinucleotídeo (NAD^+), diminuindo a produção de ATP mitocondrial, e essa escassez de energia leva a morte das células betas, inibindo a síntese e secreção da insulina (KIRSTEN; SESTERHEIM; SAITOVITCH, 2010; SILVA *et al.*, 2011; MAZUCANTI, 2013). Ambos os grupos apresentaram ganho de peso durante a gestação. Entretanto, as mães com DG devido ao alto nível glicêmico obtiveram menor ganho de peso. O estudo de RIBEIRO (2011) também demonstra como a hiperglicemia afeta o ganho de peso de camundongos no período gestacional.

O índice de massa corporal nos filhotes expostos ao ambiente hiperglicêmico foi menor e essa perda de massa muscular pode ser explicada pela excessiva proteólise, principal responsável na quebra de proteínas miofibrilares causada pelo alto nível de glicose, além da perda de água e triglicérides levando a redução do IMC (OLIVEIRA, 2007). Muitos estudos demonstram como a gestação hiperglicêmica afeta no índice de massa corporal dos filhotes, apresentando uma diminuição de massa magra e aumento de gordura (PEREIRA *et al.*, 2015; LEAL, 2023). Quanto maior o período da prole exposto ao ambiente hiperglicêmico maior será a predisposição da prole futuramente desenvolver doenças como hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (CORDEIRO, 2016; BATISTA, *et al.*, 2021).

Poucas são as pesquisas que mencionam sobre os mecanismos que ocorrem nas células e moléculas regulatórias do sistema imunológico que podem levar a prejuízos no

desenvolvimento neural e biológicos da prole. No estudo de PIAZZA (2018), foi visto que o nível das complicações vai depender principalmente da duração do diabetes e da qualidade do controle metabólico da doença.

Na avaliação dos nervos periféricos da prole, não foram observadas alterações qualitativas, com ausência de pontos de apoptose, focos inflamatórios e perda da bainha de mielina entre os grupos controle e filhotes de diabéticas em ambas as idades, 7 e 30 dias de vida. Entretanto, apesar da prole não apresentar nenhum comprometimento em nossos achados, quando essas análises são realizadas no próprio animal ou paciente com diabetes mellitus, estudos indicam a presença de neuroinflamação e comprometimento da neurogênese (MATOS, 2019; MAHMOUD et al., 2021; OMOLAOYE & DU PLESSIS, 2021).

Já em relação à musculatura desses animais, foi visto que o grupo de filhotes de mães diabéticas apresentaram uma menor área de fibras musculares, indicativo de perda de tecido muscular ou atrofia muscular. O alto nível de glicose no ambiente intrauterino pode acarretar o excesso de degradação e diminuição de síntese proteica (YIN et al., 2021). Entretanto, o mecanismo que acarreta essa degradação da musculatura nos diabéticos ainda não está bem definido. Pesquisas apontam para o excesso de glicose, a resistência à insulina nas fibras, para a disfunção de nervos periféricos, para o dano na síntese das células do músculo esquelético, e, para o estresse oxidativo, sendo, esse último, uma das principais causas das complicações diabéticas (SÁNCHEZ-DUARTE et al., 2021; YIN et al., 2021). Todos esses possíveis motivos estão vinculados ao balanço negativo entre a síntese e a degradação proteica.

Por sua vez, os estudos de KJELDSEN e colaboradores (1987), essa redução no tamanho das fibras musculares, pode ser devido a uma diminuição na concentração da bomba de Na^+/K^+ no tecido muscular. Outro ponto, é a vascularidade tecidual, pois sabe-se que uma vascularização hiperglicêmica contribui para uma má perfusão da musculatura esquelética em modelos de animais diabéticos (ROSA et al., 2021).

Em conjunto, de acordo com estudos mais profundos o DG pode impactar o nervo periférico apresentando sinais de inflamação ou degeneração, no entanto, nossos estudos não demonstraram tal resultado, por tanto, é necessário mais estudo para confirmação. Já em relação ao músculo alvo dessa inervação ele apresenta-se menor, com fibras musculares de menor diâmetro, e, esse resultado, quando confrontado com a literatura, mostra ser um problema diretamente envolvido com a hiperglicemia e não com a inervação deste músculo. Esse problema geralmente envolve a redução da síntese

proteica, mas que não foi avaliado no presente estudo. Por tanto, a diabetes mellitus gestacional afeta sim a musculatura periférica da prole, demonstrando a importância do acompanhamento médico e o tratamento adequado durante a gestação.

REFERÊNCIAS

1. BATISTA, M. H. J. et al. Diabetes Gestacional: Origem, Prevenção e Riscos. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.7, n.1, p. 1981-1995, 2021.
2. CHOUDHURY, A. A.; RAJESWARI, V. D. Diabetes mellitus gestacional - um distúrbio metabólico e reprodutivo. *Biomedicina & Farmacoterapia*, v. 143, p. 112183, 2021.
3. COBOS-PALACIOS, L.; SAMPALO, A. L.; CARMONA, M. L. Neuropatia diabética. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, v. 13, n. 16, p. 911-923, 2020.
4. CONFORTI, L; GILLEY, J; COLEMAN, M. P. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, n. 6, p. 394-409, 2014.
5. CORDEIRO, A. R. M. Estado nutricional e parâmetros bioquímicos de ratas alimentadas com dieta dislipidêmica durante a gestação e lactação e suas repercussões sobre o estado nutricional da prole. 2016.
6. DA COSTA, V. J. O. S.; COELHO, E. R.; DOS SANTOS C. V. Neuropatia induzida pelo tratamento: uma complicação iatrogênica da diabetes. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, v. 35, n. 5, p. 408-11, 2019.
7. DA SILVA B. I. P. et al. Alterações fisiológicas na captação de glicose pelo GLUT-4 no Diabetes Mellitus Gestacional. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. e857974783-e857974783, 2020.
8. DA SILVA, R. R. et al. Neuropatias diabéticas periféricas como complicações do diabetes mellitus: estudo de revisão. *Saúde Coletiva (Barueri)*, v. 11, n. 67, p. 6923-6936, 2021.
9. DE CASTRO, R. M. F. et al. Diabetes mellitus e suas complicações-uma revisão sistemática e informativa. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 1, p. 3349-3391, 2021.
10. DE MAGALHÃES, M. J. S. Neuroanatomia dos nervos periféricos, 2021.
11. DE MORA, R. I. L. et al. Complicaciones musculoesqueléticas de la diabetes mellitus. *Revista Cubana de Reumatología*, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2019.
12. DE OLIVEIRA, J. J. M. et al. Gestational diabetes mellitus and its complications – Review article. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 12, p. 116574-116589, 2021.

13. DE PAULA, C. P., N. Avaliação dos efeitos do diabetes gestacional induzido por estreptozotocina sobre a pressão arterial e reatividade vascular da prole adulta. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
14. D'SOUZA, D. M.; AL-SAJEE, D.; HAWKE, T. J. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Frontiers in physiology*, v. 4, p. 379, 2013.
15. EGAN, A. M.; DUNNE, F. P. Epidemiology of Gestational and Pregestational Diabetes Mellitus. In: *Gestational Diabetes*. Karger Publishers. V, 28, p. 1-10, 2020.
16. FERREIRA, C. L. R.; NICOLAU, R. A. Diabete experimental em ratos-revisão sistemática. Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, Encontro Latino Americano de Pós-Graduação: Anais de trabalhos completos XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, p. 1-5, 2011.
17. FERNANDES, C. N; BEZERRA, M. M. M. O Diabetes Mellitus Gestacional: Causa e Tratamento/The Managemental Diabetes Mellitus: Cause And Treatment. *ID on line Revista de psicologia*, v. 14, n. 49, p. 127-139, 2020.
18. GESTATIONAL diabetes: Gestational diabetes mellitus (GDM). 9th edn. International Diabetes Federation (IDF), 01 jul. 2020. Disponível em: <<https://idf.org/our-activities/care-prevention/gdm.html>>. Acesso em: 21 dez. 2021.
19. GIARLLARIELLI, M. P. et al. Diabetes gestacional e Diabetes Mellitus tipo 2 relacionado à complicações materno-fetais. *Revista Eletrônica Acervo Médico*, v. 23, n. 1, p. e12065-e12065, 2023.
20. GODINHO, B. V. et al. Diabetes Mellitus Gestacional: Fisiopatologia, fatores de risco e manejo terapêutico. *Brazilian Journal of Development*, v. 9, n. 4, p. 13859-13870, 2023.
21. HE, Y. et al. Research progress on the experimental animal model of gestational diabetes mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, p. 4235-4247, 2020.
22. IDF, International Diabetes Federation. *Diabetes Complications*. Bélgica, 2020. Disponível em: <<https://idf.org/aboutdiabetes/complications.html>>. Acesso em: 21/03/2021.

23. KIRSTEN, V. R., SESTERHEIM, P., SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. *Ribeirão Preto*, v. 43, n. 1, p. 3-10, 2010.
24. LAROCA, D. F. R. Determinação da curva glicêmica e alterações histológicas (pancreas e fígado) de camundongos nod produzidos no ictb/fiocruz. Rio de janeiro, 2018.
25. LEAL, M. B. Avaliação do efeito do diabetes mellitus tipo 1 induzido por injeção de estreptozotocina intraperitoneal na memória, aprendizagem e parâmetros bioquímicos de ratos Wistar jovens, 2023.
26. LEITÃO F. A. S. et al. Diabetes Mellitus tipo 1: o impacto na qualidade de vida. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 3, p. e21512340680-e21512340680, 2023.
27. LI, Y. et al. Maternal age and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of over 120 million participants. *Diabetes research and clinical practice*, v. 162, p. 108044, 2020.
28. LUNDBORG, G. et al. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Experimental Neurology*, v. 36, n. 2, p. 361-375, 1982.
29. MAHMOUD, H. M.; ALI, A. F.; AL-TIMIMI, D. J. Relação entre status de zinco e dano oxidativo ao DNA em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. *Pesquisa Biológica de Oligoelementos*, v. 1276-1279, 2021.
30. MARTINS, F. R.; HEINEN, R. C.; DA COSTA, E. C. R. Importância do teste oral de tolerância à glicose para o diagnóstico da diabetes gestacional e prevenção de suas complicações para a mãe e para o feto. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, p. 38-45, 2022.
31. MATOS, R. A. Influência da melatonina sobre a neurogênese e neuroinflamação em ratos espontaneamente diabéticos do tipo 2 (Goto-Kakizaki). 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
32. MAYHEW, T. M.; SHARMA, A. K. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. I. Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. *Journal of Anatomy*, v. 139 (PT 1), p. 45-58, 1984.
33. MAZUCANTI, C. H. Y. Sinalização intracelular desencadeada por concentrações subtóxicas de estreptozotocina em células neuro-2A: modelo in vitro de neurodegeneração associada à doença de Alzheimer. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

34. MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO (Rio de Janeiro - RJ). Serviço de Obstetrícia/Endocrinologia. DIABETES MELLITUS NA GESTAÇÃO. Diabetes Gestacional, [s. l.], 21 fev. 2020.
35. MIRABELLI, M. et al. Gestational diabetes: Implications for fetal growth, intervention timing, and treatment options. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 60, p. 1-10, 2021.
36. MONTANHA, F.P; AZEVEDO, M.G.P. Administração medicamentosa: Vantagens e desvantagens das diferentes vias. *Semestral*, São Paulo, ano XI, v. 1679-7353, ed. 20, p. 1-6, 20 jan. 2013.
37. MURRAY, S. R.; REYNOLDS, R. M. Short-and long-term outcomes of gestational diabetes and its treatment on fetal development. *Prenatal diagnosis*, v. 40, n. 9, p. 1085-1091, 2020.
38. NASCIMENTO, O. J. M; PUPE, C. C. B; CAVALCANTI, UCHÔA, E. B. Neuropatia diabética. *Revista Dor*, v. 17, p. 46-51, 2016.
39. NEVES, C. et al. Diabetes Mellitus Tipo 1. *Revista Portuguesa de Diabetes*, v. 12, n. 4, p. 159-167, 2017.
40. NOVAS, R. B. Processamento, Extração de Características e Análise Morfométrica Automatizada de Fibras Mielínicas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015.
41. OLIVEIRA, A. L. R; LANGONE, F. GM-1 ganglioside treatment reduces motoneuron death after ventral root avulsion in adult rats. *Neuroscience Letters*, v. 293, p. 131-134, 2000.
42. OLIVEIRA, C. A. M., Modulação do metabolismo muscular de glicose e proteínas pelo exercício em ratos diabéticos, 2007.
43. OMOLAOYE, T. S.; DU PLESSIS, S. S. O efeito do diabetes induzido por estreptozotocina na função espermática: um olhar mais atento sobre AGEs, RAGEs, MAPKs e ativação da via apoptótica. *Pesquisa Toxicológica*, v. 37, p. 35-46, 2021.
44. PANTE, F. R. et al. Malformações congênitas do sistema nervoso central: prevalência e impacto perinatal. *Revista da AMRIGS*, v. 55, n. 4, p. 339-344, 2011.
45. PEREIRA, T. J. et al. Maternal obesity characterized by gestational diabetes increases the susceptibility of rat offspring to hepatic steatosis via a disrupted liver metabolome. *The Journal of physiology*, v. 593, n. 14, p. 3181-3197, 2015.

46. PIAZZA, F. V. Diabetes materno severo e diabetes mellitus tipo 1: uma perspectiva neuroinflamatória em modelos animais. 2018.
47. RAMJI, N. et al. Does diabetes mellitus target motor neurons? *Neurobiology of Disease*, v. 26, n. 2, p. 301-311, 2007.
48. RIBEIRO, R. F. Estabelecimento de um modelo de gestação complicada por diabetes tipo 1 em camundongos: avaliação do seu impacto sobre o ambiente uterino no início da gestação. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
49. RODRIGUES, G. M. C.; CASANOVA, R. F.; DE PAIVA, S. L. E. Métodos de Diagnóstico e controle do Diabetes Mellitus Gestacional: Uma Revisão de Literatura. *Revista de Iniciação Científica da Libertas*, v. 10, n. 1, p. 57, 2020.
50. ROLIM, L. C. et al. Diagnóstico e tratamento da neuropatia periférica diabética. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes (2023)*. DOI: 10.29327/557753.2022-14, ISBN: 978-85-5722-906-8.
51. ROSA, R. R. P. A., et al. Impacto do diabetes precoce sobre a função vascular da musculatura esquelética, 2021.
52. SÁNCHEZ-DUARTE, S., et al. O nicorandil diminui o estresse oxidativo nas fibras musculares de contração lenta e rápida de ratos diabéticos, melhorando o funcionamento do sistema glutatona. *Journal of Diabetes Investigation*, v. 7, pág. 1152-1161, 2021.
53. SANTOS, G. M. R. F., Diabetes gestacional induzido por estreptozotocina: contribuição do estresse oxidativo e da enzima NADPH oxidase no desenvolvimento de lesões cardiovasculares na prole. 2017.
54. SILVA, M. et al. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 55, p. 46-53, 2011.
55. SMITH, R. S.; KOLES, Z. J. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *American Journal of Physiology*, v. 219, n. 5, p. 1256-1258, 1970.
56. SOUSA, H. V. S.; FERREIRA, L. S. Diagnóstico mellitus gestacional: impacto do diagnóstico na qualidade de vida da mulher. *Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde*. v. 3, n. 3, p. 48-52, 2020.

57. Sistema Único de Saúde (SUS). Fundação Oswaldo Cruz. Diabetes Mellitus na Gestação: classificação e diagnóstico. Atenção às mulheres, portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br, 15 set. 2022.
58. YIN, Y., et al. A epidemiologia, mecanismos fisiopatológicos e manejo em pacientes com COVID-19 com diabetes tipo 2: uma revisão sistemática. Diabetes na atenção primária, v. 15, n. 6, pág. 899-909, 2021.
59. WAXMAN, S. G. Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. Muscle Nerve, v. 3, n. 2, p. 141-150, 1980.