



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

ESTUDO NEUROFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE SUJEITOS COM
DIFERENTES GRAUS DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (NORMAIS,
PRÉ-DIABÉTICOS E DIABÉTICOS)

ALUNO:
Pablo Brea Winckler

ORIENTADOR:
Prof. Dr. Pedro Schestatsky

Dissertação de Mestrado

2013



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

ESTUDO NEUROFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE SUJEITOS COM
DIFERENTES GRAUS DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (NORMAIS,
PRÉ-DIABÉTICOS E DIABÉTICOS)

ALUNO:
Pablo Brea Winckler

ORIENTADOR:
Profº. Dr. Pedro Schestatsky

Dissertação de Mestrado

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, Brasil

2013

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

Brea Winckler , Pablo

Estudo Neurofisiológico e Bioquímico de Sujeitos com Diferentes Graus de Tolerância à Glicose (Normais, Pré-Diabéticos e Diabéticos) / Pablo Brea Winckler

. -- 2013.

92 f.

Orientador: Pedro Schestatsky.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Neurologia. 2. Neurofisiologia. 3. Neuropatia. 4. S100B. 5. NSE. I. Schestatsky, Pedro, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“Uma formiguinha atravessa, em diagonal, a página ainda em branco.
Mas ele, aquela noite, não escreveu nada.
Para quê? Se por ali já havia passado o frêmito e o mistério da vida”*
Mário Quintana

DEDICATÓRIA

A minha família e minha namorada que sempre estiveram ao meu lado apoiando e compreendendo minhas ausências.

Aos meus colegas de trabalho e amigos os quais sem a ajuda esse trabalho não existiria.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Pedro Schestatsky** meu orientador e incentivador sempre disposto a auxiliar e dar força no rumo das pesquisas e da carreira acadêmica.

Ao **Prof. Luiz Nelson Fernandes** e a **Prof.^a Márcia Lorena Fagundes Chaves** pelos conselhos e auxílios e pela disponibilização da infraestrutura do serviço de neurologia do HCPA.

À bióloga pesquisadora **Isabel Cristina Bandeira** pelo imenso auxílio durante esses dois anos de mestrado.

A toda equipe de bioquímica da UFRGS em especial o **Prof. Dr. Luiz Valmor Cruz Portela**, **Prof. Dr. Jean Pierre Oses** e a aluna **Andressa Wigner Brochier** pela análise bioquímica e processamento das amostras sem os quais esse trabalho não seria possível.

À equipe de endocrinologia do HCPA em especial o **Prof. Dr. Fernando Gerchman**.

Às alunas de medicina e bolsistas de iniciação científica **Bruna Mezzari Milanez** e **Michele Finkler** pelos dias e noites de dedicação as coletas de dados.

A todos os funcionários do serviço de neurologia do HCPA em especial a **Ana Luiza Louzada** por auxiliar nos exames neurofisiológicos.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** pela oportunidade de qualificação e ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina** que coordenado pelo **Prof. Dr. Wolnei Caumo** fornecem uma estrutura de excelência permitindo o aprimoramento de tantos profissionais.

Lista de Abreviaturas

AVC	Acidente Vascular Cerebral
BBB / BHE	<i>Blood–Brain-Barrier</i> / Barreira hematoencefálica
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ECN	Estudo da Condução Nervosa
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENMG	Eletroneuromiografia
e-RSS	Resposta sudomotora simpática induzida por estímulo elétrico
GJA	Glicemia de jejum alterada
HbA1C	Hemoglobina glicada
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ND	Neuropatia Diabética
NNE	Non-Neuronal Enolase
NSE	<i>Neuron-specific</i> Enolase
PNPH	Programa nacional de padronização de hemoglobina glicada
QST	<i>Quantitative sensory testing</i> (teste sensorial quantitativo)
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products</i>
S100B	<i>S100 calcium binding protein B</i>
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SSR	Resposta simpática cutânea (<i>Sympathetic Skin Response</i>)
TDG	Tolerância diminuída à glicose
TTG	Teste de tolerância à glicose

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação dos tipos de diabetes.....	16
Tabela 2. Níveis de glicose e HbA1C no diagnóstico de diabetes e pré-diabetes.....	20
Tabela 3. Classificação da neuropatia diabética.....	22
Tabela 4. Dados comparativos entre as principais propriedades de NSE e NNE.....	37

Lista de figuras

Figura 1. Etiopatogenia da diabetes mellitus tipo II.....	18
Figura 2. Representação da decomposição do sinal de ENMG nas unidades motoras constituintes.....	28
Figura 3. Desenho esquemático do sistema somato-sensitivo, ilustrando suas divisões.....	31
Figura 4. Representação esquemática da estrutura secundária de uma proteína S100.....	33
Figura 5. Representação esquemática dos efeitos extracelulares de S100B em neurônios da microglia, astrócitos, mioblastos, VSMCs, cardiomiócitos e nervos periféricos...	35

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA	15
1. Diabetes Mellitus	15
1.2 Pré-Diabetes.....	19
1.3 Principais complicações decorrentes da diabetes mellitus	21
2. Diagnóstico Neurofisiológico.....	24
2.1. Eletroneuromiografia (ENMG)	25
2.1.4. Onda F	28
2.2. Teste Sensorial Quantitativo (QST)	30
3. Proteína S100B: histórico, estrutura e fisiologia	32
4. Enolase Neurônio-Específica (NSE).....	36
5. S100B e Neuron-Specific Enolase (NSE) e suas propriedades como marcadores biológicos.....	38
5.1. S100B e NSE na Diabetes Mellitus tipo II.....	40
6. OBJETIVOS	44
6.1. Objetivo geral.....	44
6.2. Objetivos específicos	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8. MANUSCRITO 1 – VERSÃO PRELIMINAR.....	72
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
10. ANEXOS	88
10.1. ANEXO 1	88
10.2. ANEXO 2	90
10.3. ANEXO 3	91

RESUMO

INTRODUÇÃO: A diabetes mellitus tipo 2 (DM) é uma doença metabólica caracterizada pela presença de hiperglicemia crônica. Estudos prévios demonstraram que pacientes com pré-diabetes (PDM) têm uma história natural de progressão para DM. A neuropatia diabética é a complicação mais comum da DM e avanços recentes na neurofisiologia clínica trouxeram um refinamento das técnicas de avaliação. Entre estas estão a resposta cutânea simpática (SSR) e o teste sensorial quantitativo (QST). Biomarcadores como Enolase Neurônio-Específica (NSE) e a Proteína S100-Beta (S100B) vem sendo descritos por muitos autores como associados a danos em células do sistema nervoso.

OBJETIVO: O objetivo deste estudo é avaliar parâmetros neurofisiológicos e compará-los com achados clínicos e bioquímicos (S100B e NSE) em pacientes com DM, PDM e controles saudáveis.

MÉTODOS: Pacientes dos ambulatórios de Neurologia e Endocrinologia foram randomizados em um estudo transversal. Os participantes foram submetidos a uma bateria de testes clínicos e neurofisiológicos que englobaram condução nervosa, Onda-F, SSR e QST. Níveis séricos de NSE e S100B foram quantificados através de ensaio ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

RESULTADOS: A avaliação clínica e os estudos de condução nervosa e Onda-F foram similares nos grupos estudados. Já os limiares QST calor (QSTc) e QST dor (QSTd) foram significativamente elevados nos pacientes PDM e DM com relação aos controles ($P < 0.05$ para todas as comparações). No entanto, estes parâmetros não foram capazes de distinguir pacientes DM vs. PDM ($P > 0.1$ para todas as comparações). O SSR foi capaz de diferenciar o grupo DM do controle ($P < 0,01$) embora não tenha mostrado diferença entre os grupos PDM e controle ($P = 0,6$). Não houve diferença entre os níveis de S100B ($P = 0.6$) e NSE ($P = 0.2$) entre os grupos DM, PDM e controles.

CONCLUSÃO: O QST e SSR são testes úteis para a avaliação de pacientes com diferentes graus de tolerância a glicose. Este estudo não encontrou diferenças entre os biomarcadores NSE e S100B em indivíduos com DM e PDM.

PALAVRAS-CHAVE: S100B, NSE, diabetes, pré-diabetes, QST, neurofisiologia, tolerância diminuída à glicose.

ABSTRACT

BACKGROUND: Type 2 diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by the presence of chronic hyperglycemia. Previous studies demonstrated that patients with prediabetes states (PDM) have a natural history of progression to DM. Neuropathy is the most common and disabling complication of diabetes and recent advances in neurophysiology have enabled a refinement of neurophysiological diagnostic techniques such as sympathetic skin response (SSR) and quantitative sensory testing (QST). Biomarkers like Neuron-specific Enolase (NSE) and S100-Beta Protein (S100B) has been described for many authors as associated with damage at nervous system cells and are related with severity of injury as well as clinical outcomes.

OBJECTIVE: The aim of this study is to evaluate neurophysiological findings and compare them with clinical and biochemical findings (S100B and NSE) in patients with DM, PDM and healthy controls.

METHODS: Patients at the outpatient Neurology and Endocrinology service were randomized in a cross-sectional study. Participants underwent a battery of clinical and neurophysiological tests that encompassed nerve conduction studies, F-wave, SSR and QST. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) were performed to quantify serum levels of NSE and S100B.

RESULTS: There were no difference regarding clinical evaluation, nerve conduction studies and F-wave were between groups. The QST thresholds of warm (QSTw) and QST pain (QSTp) were significantly elevated in patients with PDM and DM compared to controls ($P < 0.05$ for all comparisons). However, these parameters were not able to distinguish among DM and PDM ($P > 0.1$ for all comparisons). The SSR was able to differentiate DM from control group ($P < 0.01$) but did not show difference between PDM and control groups ($P = 0.6$). There was no difference on levels of S100B ($P = 0.6$) and NSE ($P = 0.2$) between the DM, PDM and control groups.

CONCLUSION: The QST and SSR are useful tests to evaluating patients with different degrees of glucose tolerance. This study found no differences between biomarkers NSE and S100B in subjects with DM and PDM.

KEYWORDS: S100B, NSE, diabetes, prediabetes, QST, neurophysiology, impaired glucose tolerance.

INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus é uma doença metabólica que resulta em considerável morbidade relacionada a lesões de órgãos-alvo. Os locais mais acometidos geralmente são os rins, retina, sistema nervoso periférico (SNP) e os vasos sanguíneos de pequenos e grandes calibres, tornando-se assim o foco da maioria dos estudos clínicos e experimentais. Nos últimos anos tornou-se evidente que a diabetes provoca complicações significativas relacionadas ao SNC, resultando em importantes deficiências funcionais. O SNC é afetado devido às consequências metabólicas e vasculares da diabetes (Mijnhout *et al.*, 2006; Selvarajah & Tesfaye, 2006).

Muitas são as complicações decorrentes da DM, dentre elas destaca-se a neuropatia diabética (ND), que foi definida como a presença de sintomas ou sinais de disfunção em nervos periféricos em casos de diabetes após a exclusão de outros fatores como neuropatias por trauma ou compressão sobre o nervo, deficiência de vitaminas (B1, B6, E entre outras), alcoolismo, infecções (Doença de Lyme, Epstein-Barr, hepatite C e HIV), doenças auto-imunes (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e síndrome de Guillain-Barret), doenças hereditárias (doença de Charcot-Marrie-Tooth e polineuropatia amilóide), tumores e exposição a agentes tóxicos (Kennedy *et al.*, 2005; Poncelet, 1998; Yasuda *et al.*, 2003; Boulton *et al.*, 2005). As neuropatias relacionadas à diabetes são heterogêneas, podendo afetar diferentes partes do sistema nervoso, o que leva a uma diversidade de manifestações clínicas, que podem ser focais ou difusas (Boulton *et al.*, 2005).

Marcadores bioquímicos específicos são utilizados com propósito diagnóstico em diferentes sistemas do organismo. Disfunção e danos no sistema nervoso central (SNC) podem ser detectados por esses marcadores. Proteínas relacionadas ao cérebro sintetizadas em células astrogliais ou neurônios foram propostas como marcadores de lesões celulares no SNC (Ingebrigtsen *et al.*, 2002; Raabe *et al.*, 1998; Fassbender *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 2003; Van Eldik *et al.*, 1994). Estágios conhecidos como pré-diabetes (PDM), que se referem aos indivíduos que apresentam valores de glicemia em jejum menores que o valor estabelecido para classificação de DM, porém superiores quando comparados aos valores normais de referência. Estudos recentes têm apontado para ocorrência de uma série de alterações neurofisiológicas, normalmente atribuídas apenas a DM, já nestes

estágios precoces chamados de PDM (Singleton *et al.*, 2001; Singleton *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2012).

A proteína S-100 é uma entre várias proteínas de ligação ao cálcio e existe uma forte evidência de que S100 regula sinais celulares cálcio dependente em diferenciação e desenvolvimento neuronal, e apoptose (Donato, 1999; Hu *et al.*, 1997; Schäfer & Heizmann, 1996; Zimmer *et al.*, 1995). Existem 19 proteínas S-100, das quais S-100A1 e S-100B (conhecidas como S-100 α e S-100 β , respectivamente) podem representar um homodímero ou heterodímero (Donato, 1999). S-100 β está envolvida na homeostase do cálcio e é predominantemente produzida pelas células da glia no cérebro e células de Schwann na bainha de mielina dos nervos (Mussack *et al.*, 2002).

A proteína Enolase neurônio-específica (NSE) é uma isoenzima dimérica da enzima glicolítica Enolase. Ela é encontrada no citoplasma dos neurônios e células de diferenciação neuroendócrina (Barone *et al.*, 1993). A mensuração da concentração de NSE em soro e líquido cefalorraquidiano (CSF) após isquemia cerebral e lesão cranioencefálica fornece um indicativo laboratorial confiável do grau de danos em células do cérebro e pode permitir uma detecção precoce dessas lesões (Bonner *et al.*, 2000; DeGiorgio *et al.*, 1996).

Um aumento dos níveis séricos de S-100B foi detectado em traumatismo cranioencefálico, lesão isquêmica cerebral, acidente vascular cerebral (AVC), hemorragia subaracnóidea, epilepsia e doença de Alzheimer (Ingebrigtsen *et al.*, 2002; Raabe *et al.*, 1998; Fassbender *et al.*, 1997; Butter *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 2003; Wiesmann *et al.*, 1997; Griffin *et al.*, 1995; Van Eldik *et al.*, 1994). Níveis séricos de NSE foram avaliados como marcadores de dano neuronal em pacientes que apresentaram uma série de condições incluindo dano cerebral por hipóxia ou traumatismo, *status epilepticus* e parada cardíaca (Cakir *et al.*, 2010; DeGiorgio *et al.*, 1995; Hardemark *et al.*, 1989; Rosén *et al.*, 2001; Vos *et al.*, 2010).

Recentes avanços na área da neurofisiologia permitiram um refinamento das técnicas de diagnóstico neurofisiológico, possibilitando aos investigadores clínicos diagnosticar neuropatias com maior precisão. Além de estudos convencionais de condução nervosa da eletroneuromiografia, novas técnicas como testes sensoriais quantitativos (QST) podem ser utilizados para melhorar o diagnóstico e caracterização de desordens nervosas periféricas (Cheah & Kiernan, 2010). Níveis séricos de marcadores como NSE e S100B estão relacionadas aos resultados clínicos, sendo que o valor prognóstico desses marcadores de dano cerebral é

comparável com os parâmetros clínicos tradicionais e pode ser utilizado como um adjuvante para diagnóstico precoce (Pham *et al.*, 2010; Rosén *et al.*, 2001).

REVISÃO DA LITERATURA

1. Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) não é uma doença única, mas sim um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que têm em comum a hiperglicemia que se deve a defeitos na ação ou secreção de insulina (Alberti & Zimmet, 1999). Trata-se de uma doença crônica que requer cuidados médicos contínuos e educação alimentar para prevenir e reduzir o risco de complicações em longo prazo. O cuidado com essa enfermidade é complexo e requer atenção não apenas com o controle glicêmico, mas uma série de intervenções que melhoram os seus resultados (American Diabetes Association, 2011b).

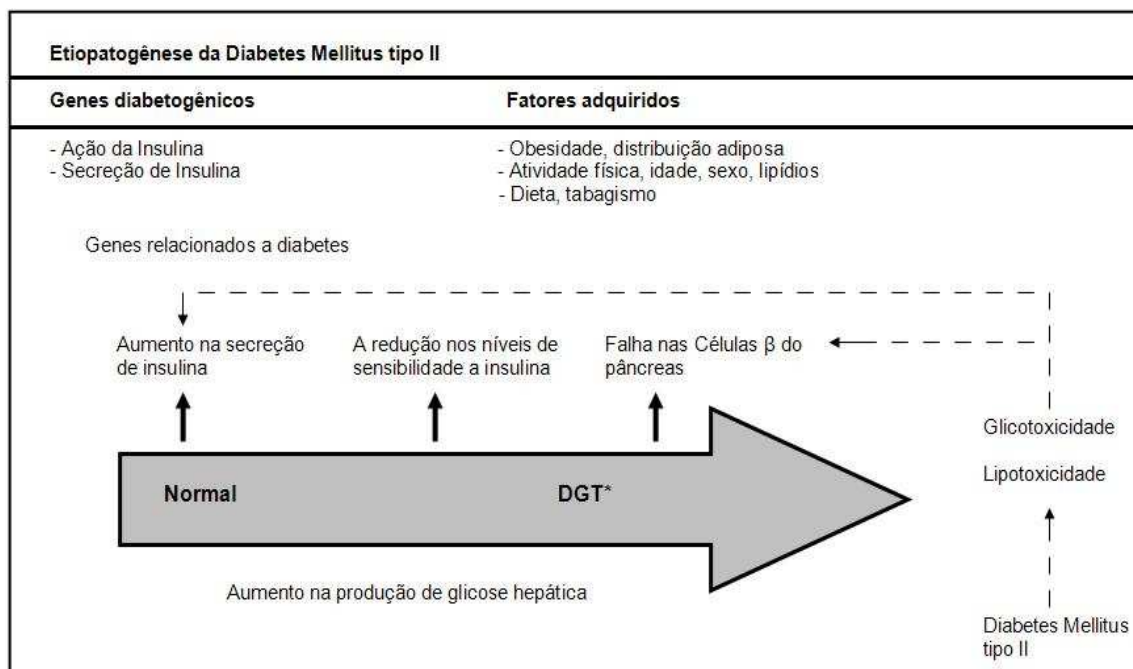
O DM é classificado em quatro tipos, DM tipo I (DMI), que resulta da destruição das células β , normalmente causando uma absoluta deficiência de insulina; DM tipo II (DMII), resultante de um defeito progressivo na secreção de insulina, caracterizando um quadro de resistência insulínica; DM gestacional (DMG), diagnosticada durante a gestação e outros tipos específicos de DM com causas diversas, como por exemplo, defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas e as induzidas quimicamente, como no tratamento de HIV/AIDS ou após transplante de órgãos. (Tabela 1) (American Diabetes Association, 2011b).

Tabela 1. Classificação dos tipos de diabetes. (Adaptado de Conget, 2002)

1. Diabetes mellitus tipo I	
A. Autoimune	
B. Idiopática	
2. Diabetes mellitus tipo II	
1. Resistência a insulina predomina sobre os efeitos na secreção do hormônio	
2. Defeitos na secreção de insulina predominam sobre a presença da resistência à insulina	
3. Outros tipos específicos de diabetes mellitus	
A. <u>Defeitos genéticos na função das células β</u>	E. <u>Induzido por medicamentos ou agentes químicos</u>
1. Cromossomo 12, HNF-1 α (MODY 3)	1. <i>Vacor</i>
2. Cromossomo 7, glycosidase (MODY 2)	2. Pentamidina
3. Cromossomo 20, HNF-4 α (MODY 1)	3. Ácido nicotínico
4. DNA Mitocondrial	4. Glicocorticóides
5. Outros	5. Hormônio tireoidiano
B. <u>Defeitos genéticos na ação da insulina</u>	6. Diazóxido
1. Resistência à insulina Tipo A	7. Agonistas betadrenérgicos
2. Leprechaunismo	8. Tiazídicos
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall	9. <i>Dilantin</i>
4. Diabetes lipoatrófico	10. Interferon α
5. Outros	11. Outros
C. <u>Doenças do pâncreas exócrino</u>	F. <u>Infecções</u>
1. Pancreatite	1. Rubéola congênita
2. Pancreatectomia ou trauma	2. Citomegalovírus
3. Neoplasia	3. Outros
4. Fibrose cística	G. <u>Formas incomuns de DM auto-imune</u>
5. Hemocromatose	1. Síndrome Stiff-man
6. Pancreatopatia fibrocalculosa	2. Anticorpos anti-receptores de insulina
7. Outros	3. Outros
D. <u>Endocrinopatias</u>	H. <u>Outras síndromes genéticas por vezes associadas a DM</u>
1. Acromegalia	1. Síndrome de Down
2. Síndrome de Cushing	2. Síndrome de Klinefelter
3. Glucagonoma	3. Síndrome de Turner
4. Feocromocitoma	4. Síndrome de Wolfram
5. Hipertireoidismo	5. Ataxia de Friedreich
6. Somatostatina	6. Coréia de Huntington
7. Aldosteronoma	7. Síndrome de Lawrence-Moon-Biedel
8. Outros	8. Distrofia miotônica
	9. Porfíria
	10. Síndrome de Prader-Willi
	11. Outras
4. Diabetes mellitus gestacional	

A DMII geralmente não é diagnosticada até o aparecimento de complicações e acredita-se que muitas pessoas em âmbito mundial ainda seguem sem diagnóstico. Muitas vezes o indivíduo somente recebe o diagnóstico após complicações clínicas que, muitas vezes, são irreversíveis. A eficácia de uma identificação precoce de pré-diabetes e diabetes por meio de testes em massa em indivíduos assintomáticos ainda não foi planejada e segue sem previsão de ocorrer (American Diabetes Association, 2011). Esse tipo de diabetes anteriormente era conhecido como não insulino dependente ou diabetes mellitus adulta (diagnosticada em pessoas acima de 40 anos de idade). O caráter não insulino dependente da doença refere-se apenas ao tratamento necessário durante sua história natural, o que causou muita confusão no passado. Atualmente sabe-se que a DMII é cada vez mais diagnosticada em jovens, adolescentes e crianças (Conget, 2002).

Provavelmente existam muitas causas para esse tipo de diabetes. Embora não se conheçam etiologias específicas, a destruição autoimune das células β não ocorre e os pacientes não apresentam nenhuma outra causa conhecida da doença. A maioria dos pacientes com DMII são obesos e a própria obesidade provoca certo grau de resistência à insulina. Pacientes que não são considerados obesos pelos critérios tradicionais podem ter um aumento do percentual de gordura corporal distribuída na região abdominal. Levando em consideração que os pacientes com DMII podem ter níveis de insulina que parecem ser normais ou elevados, um nível alto de glicose no sangue desses indivíduos diabéticos deveria resultar em valores mais altos de insulina se a função das células β estivesse normal. Assim, a secreção de insulina nesses pacientes é insuficiente para compensar a resistência à insulina. Essa resistência pode melhorar com a redução de peso ou com tratamento farmacológico da hiperglicemia, mas raramente é possível voltar ao normal. O risco de desenvolver DMII aumenta devido a fatores como a idade, obesidade e o sedentarismo (Figura 1) (American Diabetes Association, 2004).



*DGT – *Decreased glucose tolerance* (Diminuição da tolerância à glicose)

Figura 1. Etiopatogênese da diabetes mellitus tipo II. (Adaptado de Conset, 2002).

Com relação à epidemiologia da DM, acredita-se que uma epidemia está em curso. A estimativa para o ano de 1985 apontava 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em dez anos e atingiu 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões no ano 2030. Cerca de dois terços dos indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (Wild *et al.*, 2004; Torquato *et al.*, 2003).

No Brasil, no final dos anos 80, a prevalência de DM na população adulta foi estimada em 7,6%; dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas, como 12,1% em um estudo realizado em de Ribeirão Preto. A estimativa para o ano de 2005 dizia que haveria em torno de 8 milhões de indivíduos com DM no Brasil (Marlebi & Franco, 1992; Torquato *et al.*, 2003). As estimativas mais atuais apontam para 11 milhões de casos no Brasil até 2030 (World Healthy Organization, 2010).

Estimativas mais recentes da Organização Mundial de Saúde apontam para a existência de pelo menos 346 milhões de pessoas em todo o mundo que apresentam algum tipo de diabetes e a previsão de afetados pela doença aponta

para mais de 600 milhões de casos até 2030, caso não haja intervenção no cenário global da doença (World Healthy Organization, 2012).

A incidência do DM II é difícil de ser determinada em grandes populações, pois envolve seguimento durante alguns anos, com medições periódicas de glicemia, mas sabe-se que ela é o tipo mais comum e prevalece em 90% a 95% dos casos de DM (American Diabetic Association, 2012).

Existem evidências de que as alterações no estilo de vida, com ênfase na alimentação e na redução da atividade física, estão associadas ao acentuado aumento na prevalência do DM2. Os programas de prevenção primária do DM2 têm se baseado em intervenções na dieta e na prática da atividade física, visando a combater o excesso de peso (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002).

Independentemente do tipo da doença, a maior preocupação dos profissionais da área da saúde é prevenir as complicações agudas da doença que podem ter conseqüências graves para os pacientes se não identificadas e tratadas desde cedo. Entre as diversas complicações relacionadas à DM, as principais são problemas vasculares (macro e microvasculares), retinopatia, nefropatia, neuropatias, entre outras (Pedrosa *et al.*, 2006; Gallagher *et al.*, 2011; World Healthy Organization, 2012).

1.2 Pré-Diabetes

Outro importante apontamento a ser feito diz respeito a um estágio conhecido como pré-diabetes (PDM), que se refere ao indivíduo que apresenta valores de glicemia em jejum menores que o valor estabelecido para classificação de DM, porém superiores quando comparados aos valores normais de referência. O diagnóstico de DM e PDM têm sido tradicionalmente realizados através da glicemia de jejum e do teste de tolerância a 75g de glicose (TTG), embora critérios diagnósticos recentes estabeleçam valores levando também em consideração a hemoglobina glicada (HbA1c). A diminuição da tolerância à glicose é uma alteração na regulação da mesma no estado pós-sobrecarga, duas horas após administradas 75g de glicose, diagnosticada pelo teste oral de tolerância à glicose. Este teste determina a glicemia de jejum e de 2 horas após a administração de glicose (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009). A tabela 2 mostra os critérios de classificação diagnóstica do Diabetes.

Tabela 2. Concentrações de Glicose e HbA1C no diagnóstico de Diabetes e Pré-Diabetes. (Adaptada de Pasqualotto *et al.*, 2012)

Categoria / Estado	Glicemia de Jejum		Duas Horas Após 75g Glucose		Hemoglobina Glicada HbA1C
	(mg/dL)	[mmol/L]	(mg/dL)	[mmol/L]	%
Normoglicêmico	≤ 99	≤ 5,5	≤ 139	≤ 7,7	≤ 5,6
Tolerância diminuída à glicose (Pré-diabetes)	≥ 100 ≤ 125	≥ 5,6 ≤ 6,9	≥ 140 ≤ 199	≥ 7,8 ≤ 11	≥ 5.7 ≤ 6.4
<i>Diabetes mellitus</i>	≥ 126	≥ 7,0	≥ 200	≥ 11,1	≥ 6,5

O estado de pré-diabetes (PDM) foi muito criticado pois alguns indivíduos não chegam a progredir para DM, o que para alguns demonstraria que não há doença estabelecida. Entretanto, deve-se levar em conta que o risco de desenvolver diabetes difere entre os indivíduos com PDM e aqueles apenas com outros fatores de risco para DM (Tabák *et al.*, 2012).

Os indivíduos que apresentam um risco maior de desenvolver DM são aqueles com glicemia de jejum alterada (GJA), tolerância diminuída à glicose (TDG), ou ainda, em fases pré-clínicas da doença com GJA e TDG combinadas. A essa categoria deu-se o nome de pré-diabetes (de Vegt *et al.*, 2001; American Diabetes Association, 2011a).

Apesar da importância da identificação do estado de PDM para determinar indivíduos em risco e dos esforços para determinar o teste diagnóstico mais apropriado, a prevalência de PDM varia consideravelmente conforme o método utilizado e também conforme a idade, sexo e etnia, sugerido que programas de prevenção para DM devem levar em consideração todos esses fatores. (James *et al.*, 2011).

Intervenções terapêuticas em pacientes com PDM podem ser importantes na prevenção primária das complicações crônicas macro vasculares do DM. A maior parte dos estudos epidemiológicos reforça a importância da GJA ou da TDG em relação ao maior risco de mortalidade ou de doença cardíaca isquêmica, bem como os riscos cardiovasculares em geral associados. Cada vez mais o PDM vem sendo associado a complicações que antes eram atribuídas apenas ao DM. Evidências

relacionam principalmente a TDG à retinopatia, à nefropatia e à neuropatia (Singleton *et al.*, 2001; Singleton *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2012).

Distúrbios fisiopatológicos subjacentes, como resistência à insulina e função das células β prejudicada, são responsáveis pelo desenvolvimento de DMII e também se manifestam em indivíduos com PDM (DeFronzo & Abdul-Ghani 2011). Os pré-diabéticos apresentam os mesmos fatores de risco que os diabéticos para problemas como níveis de açúcar no sangue alterados, hipertensão, dislipidemia, obesidade, inatividade física, resistência à insulina, disfunção endotelial, entre outros, que tornam esses indivíduos suscetíveis a complicações micro e macro vasculares diversas (Bajaj & DeFronzo, 2003; Barr *et al.*, 2007; Ford *et al.*, 2010, Tábak *et al.*, 2012).

Muitas evidências apontam para o fato de que o PDM não está apenas relacionado ao desenvolvimento de DMII e suas complicações, mas também aos danos que podem ser causados ao sistema nervoso periférico. Desta forma, identificar e tratar precocemente indivíduos PDM é crucial para prevenção de complicações. (Tabák *et al.*, 2012).

1.3 Principais complicações decorrentes da diabetes mellitus

As neuropatias estão entre as principais e mais frequentes complicações em longo prazo em pacientes com diabetes, afetando aproximadamente 50% desses indivíduos. Um diagnóstico rápido e preciso de neuropatia diabética (ND) é essencial para que se façam intervenções precoces para diminuir as taxas de incapacidade e mortalidade que estão associadas à doença. Há uma gama de ferramentas diagnósticas que auxiliam nessa detecção precoce (Dick *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1994; Cabezas-Cerrato, 1998; Boulton, 2007; Tesfaye *et al.*, 2010). As características clínicas da ND variam muito, indo desde alterações dermatológicas, podológicas, urológicas, cardiológicas, neurológicas entre outras. A tabela 3 contempla a classificação dos tipos de apresentação da neuropatia diabética.

Tabela 3. Principais sistemas de classificação para neuropatia diabética.
(Adaptado de Boulton *et al.*, 2004)

A: Classificação Clínica das NDs	
<u>Polineuropatia</u>	<u>Mononeuropatia</u>
Sensorial <ul style="list-style-type: none"> • Sensorial aguda • Sensorimotora crônica 	Periférica isolada Multiplex mononeurites Tronco
Autonômica <ul style="list-style-type: none"> • Cardiovascular • Gastrointestinal • Geniturinária • Outras 	
Motora Proximal (amiotrófica)	
Tronco	
B: Padrões de Neuropatia em Diabetes	
Polineuropatia diabética comprimento-dependente <ul style="list-style-type: none"> • Polineuropatia sensorial simétrica distal • Neuropatia de fibra grande • Polineuropatia simétrica dolorosa • Neuropatias autonômicas 	
Neuropatias focais e multifocais <ul style="list-style-type: none"> • Neuropatias cranianas • Neuropatias de membros • DN Proximal de membros inferiores • Neuropatias de tronco 	
Neuropatias não diabéticas mais comuns em diabetes <ul style="list-style-type: none"> • Paralisias por pressão • Polineuropatia inflamatória adquirida desmielinizante 	
C: Classificação das NDs	
Rapidamente reversível <ul style="list-style-type: none"> • Neuropatia hiperglicêmica 	
Polineuropatias simétricas generalizadas <ul style="list-style-type: none"> • Sensorimotora (crônica) • Sensorial aguda • Autonômica 	
Neuropatias focais e multifocais <ul style="list-style-type: none"> • Craniana • Radiculoneuropatia toracolombar • Membro focal • Motora proximal (amiotrófica) 	
Neuropatia inflamatória crônica desmielinizante sobreposta	

Neuropatias caracterizam-se por uma perda progressiva das fibras nervosas, o que pode afetar ambas as divisões principais do sistema nervoso periférico. Muitas evidências apontam que os métodos de mensuração de ND, como eletrofisiologia e testes quantitativos, são preditores não apenas dos resultados finais, como ulcerações no pé, mas também de mortalidade (Carrington *et al.*, 2002). A epidemiologia e história natural da ND não são completamente compreendidas, em partes devido a problemas na seleção dos pacientes e dos critérios que constituem o diagnóstico da neuropatia diabética. Estudos confirmaram a importância da hiperglicemia prologada na etiopatogênese da neuropatia e dor neuropática (DCCT Research Group, 1995; Vinik *et al.*, 2003; Carrington *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 1994).

O consenso internacional em diagnóstico ambulatorial e manejo de ND sugerem uma simples definição para ND referindo-se como a presença de sintomas ou sinais de disfunção dos nervos periféricos em indivíduos com diabetes, após a exclusão de outras causas. (Boulton *et al.*, 1998; Bhadada *et al.*, 2001). Foi acordado que a neuropatia não pode ser diagnosticada sem um exame clínico cuidadoso e que ausência de sintomas não pode ser interpretada como ausência de neuropatia, já que neuropatia assintomática é comum. A importância de excluir causas não diabéticas foi enfatizado em um estudo de Dyck *et al.* em que até 10% da neuropatia periférica em pacientes diabéticos se deveu a causas não-diabéticas (Dyck *et al.*, 1993). As estimativas de prevalência de ND, que é uma doença bastante heterogênea, variam de acordo com o critério diagnóstico (Butt *et al.*, 2006; Gooch & Podwall; 2004). Acredita-se que a ND é responsável pela ocorrência de 50 a 70% das amputações não traumáticas (Caputo *et al.*, 1994; Holzer *et al.*, 1998) e isso está relacionado à baixa qualidade de vida e ao ônus econômico (Ollendorf *et al.*, 1998; Ramsey *et al.*, 1999).

Retinopatia, nefropatia e doenças cardiovasculares também são complicações comuns em pacientes com DMII. A nefropatia diabética ocasiona um processo de filtração glomerular inadequado o que leva a excreção irregular de pequenas quantidades de moléculas de proteínas de baixa massa molecular pela urina. Essa complicação ocorre principalmente em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2. Com relação à retinopatia diabética, é a complicação ocular mais severa estando entre as principais causas de cegueira irreversível e manifesta-se de forma tardia. Ambas as complicações podem ser evitadas através de medidas adequadas, que incluem controle da glicemia e da pressão arterial, além da realização do

diagnóstico em uma fase inicial passível de intervenção (Bagga *et al.*, 1998; Ryder, 1998; Corrêa & Eagle, 2005).

O controle da glicemia é fundamental no tratamento de pacientes com diabetes e está intimamente relacionado à redução de complicações que estão vinculadas a essa enfermidade. Estudos conseguiram mostrar que quanto mais preciso for o controle glicêmico, menores serão as taxas de problemas microvasculares (retinopatia e nefropatia) e complicações neuropáticas (Ohkubo *et al.*, 1995; UK Prospective Diabetes Study, 1998a, b).

A despeito do conhecimento da ND e sua evolução natural quando não tratada, observa-se na prática clínica um grande número de casos subdiagnosticados e erros diagnósticos apesar da disponibilidade de ferramentas diagnósticas auxiliares. É de grande importância o diagnóstico precoce na tarefa de adotar as intervenções adequadas em pacientes de alto risco reduzindo o número de desfechos dramáticos como amputações e morte (Rith-Najarian *et al.*, 1998; Bevelaqua *et al.*, 2012).

2. Diagnóstico Neurofisiológico

Testes neurofisiológicos são de extrema utilidade na avaliação funcional dos nervos periféricos e freqüentemente são utilizados nos em ensaios clínicos para acompanhamento de pacientes com lesões de nervos periféricos (Chaudhry *et al.*, 1994; Bril *et al.*, 1998; Olney, 1998). Nesses casos, as mensurações são feitas em tempos diferentes, a fim de determinar a evolução neurofisiológica frente à intervenção estudada. A reprodutibilidade dos estudos eletrofisiológicos em avaliações seqüenciais pode ser afetada por fatores técnicos e fisiológicos, portanto, é importante que os parâmetros gravados sigam uma padronização de técnicas adequadas apresentando uma variação mínima dos testes num determinado momento (Honet *et al.*, 1968; Chaudhry *et al.*, 1991).

O diagnóstico eletrofisiológico clínico envolve gravação, exibição, mensuração e interpretação de potenciais de ação decorrentes do sistema nervoso central (potenciais evocados), nervos periféricos (condução nervosa) e músculos (eletromiografia). Existem vários princípios que são seguidos nos estudos de condução nervosa e inúmeras variáveis fisiológicas e técnicas podem influenciar os

resultados desses estudos, como idade, temperatura, erros de instrumentação, entre outros (Johnson & Pease, 1997; Misra & Kalita, 2006).

Testes neurofisiológicos desempenham um importante papel na caracterização de diversas enfermidades, como, por exemplo, as neuropatias (Wilson *et al.*, 2005) e seu uso representa uma extensão do exame clínico. Achados eletrofisiológicos podem confirmar achados clínicos e, em muitos casos, permitir a detecção de anormalidades subclínicas (Pastore *et al.*, 1999).

Estudos eletrofisiológicos são utilizados frequentemente prática clínica para localizar anatomicamente danos no sistema nervoso periférico. Esses testes ajudam a diferenciar entre radiculopatias cervicais, plexopatias braquiais e lesões focais ou generalizadas de nervos periféricos. Eles também ajudam no diagnóstico diferencial de outras doenças neurológicas e doenças subjacentes (Bevelaqua *et al.*, 2012).

2.1. Eletroneuromiografia (ENMG)

A neurofisiologia clínica fornece avaliação funcional do sistema nervoso, sendo o seu domínio semelhante ao do exame clínico e complementar aos exames de imagem como tomografia computadorizada e ressonância magnética. Existem duas principais vantagens nos exames neurofisiológicos com relação ao exame clínico: pode ser empregado em pacientes com alterações do estado mental por sedação ou coma e fornece dados quantitativos para comparação com estudos posteriores de acompanhamento. A principal técnica neurofisiológica disponível e amplamente difundida é a eletroneuromiografia (ENMG). A ENMG compreende duas etapas, uma delas, a eletroneurografia é responsável pela avaliação dos nervos periféricos, na qual se realizam estudos da condução nervosa (sensitiva e motora), estudos de resposta tardia (onda-F, reflexo-H e *blink test*) e técnicas especiais (estimulação repetitiva, *sympathetic skin response*). A outra etapa refere-se à eletromiografia propriamente dita com os estudos por meio de eletrodo agulha inseridos nos músculo avaliados (Guérit *et al.*, 2009; Bevelaqua *et al.*, 2012; Garcia-Larrea *et al.*, 2012).

O termo eletroneuromiografia foi usado pela primeira vez por Weddell e colaboradores em 1943, pioneiro no uso clínico de agulha como eletrodo para examinar o músculo. Infelizmente, ainda há confusão entre os médicos e profissionais de saúde com relação a esses termos. Na prática clínica, exames

eletrofisiológicos são por vezes confundidos com exames cardiológicos e a forma mais adequada é no momento de se solicitar um estudo neurofisiológico é justamente com a denominação eletroneuromiografia. A ENMG compreende um grupo de testes que geralmente são complementares uns aos outros e necessários para que se possa fazer um diagnóstico definitivo (Katirji, 2002).

2.1.2. Eletroneurografia

As propriedades eletrofisiológicas dos nervos periféricos podem ser avaliadas através de estímulos elétricos aplicados sobre algum ponto no trajeto dos nervos e análise das consequentes respostas neurofisiológicas eliciadas. O estudo da condução nervosa (ECN) permite a avaliação dos nervos periféricos com precisão suficiente capaz de gerar reprodutibilidade e padronização a fim de determinar os valores normais. Dessa forma é possível caracterizar achados anormais e correlacionar-los a características neurofisiológicas de diversas patologias (Buchthal & Rosenfalck, 1966).

Os ECN são utilizados para diagnosticar neuropatias focais ou generalizadas, auxiliando na diferenciação de distúrbios primários do nervo e distúrbios musculares, embora os ECN avaliem a fundamentalmente a função do nervo não do músculo. É possível determinar anormalidades de condução dos nervos periféricos como degeneração axonal, desmielinização e bloqueio de condução, além de se estimar prognóstico e respostas a tratamentos. A maioria dos nervos periféricos são compostos de fibras nervosas mistas (motoras, sensitivas e autonômicas). No entanto, alguns nervos possuem fibras quase exclusivamente motoras (ramo interósseo anterior do nervo mediano, ramo interósseo posterior do nervo radial) ou fibras principalmente sensoriais (nervo sural, nervo fibular superficial, nervo radial superficial) (Krarup, 2004).

A classificação fisiológica mais utilizada das fibras nervosas leva em consideração seus diâmetros, mielina e propriedades condutivas:

- Fibras tipo A- α ou tipo A- α/β , são fibras mielinizadas grossas de 6 a 15 microns de diâmetro. Os maiores fibras aferentes musculares são por vezes chamadas de fibras 1^a.
- Fibras tipo A- δ são pequenas fibras mielinizadas, de 3 a 5 micra de diâmetro
- Fibras tipo C não mielinizadas, são fibras de 0,5 a 2 micra de diâmetro

Funcionalmente, fibras motoras mais eferentes são grossas e bem mielinizadas (tipo A- α). As fibras sensitivas (que conduzem sensação de toque, vibração e propriocepção) também são grossas e bem mielinizadas (Tipo A- α), enquanto as que conduzem sensação de dor são pouco mielinizadas (Tipo A- δ). Já as fibras que medeiam às sensações de calor e de dor são fibras tipo C amielínicas assim como as fibras autonômicas (Hursh, 1939).

Os estudos da condução nervosa realizados na eletroneuromiografia tradicional avaliam apenas as fibras tipo A- α . Esta compreensão é de extrema importância na avaliação de situações clínicas em que a força, sensibilidade vibratória e proprioceptiva estão preservadas, mas a sensação de dor e temperatura são anormais, como é o caso da neuropatia de fibras finas (Krarup, 2004).

2.1.3. Eletromiografia

A eletromiografia é uma técnica experimental de diagnóstico que envolve desenvolvimento, registro e análise de sinais mioelétricos. Esses sinais são formados por variações fisiológicas no estado das membranas de fibras musculares. Os fundamentos de eletromiografia referem-se a potenciais de ação de unidades motoras individuais e do domínio tempo-frequência relacionado. Com o passar dos anos diversos avanços tecnológicos trouxeram melhorias na qualidade de registro, aquisição de dados, representações gráficas, técnicas de modelagem e software para o tratamento do sinal todos incorporados aos preceitos básicos ainda vigentes (Clarys, 2000).

O sinal eletromiográfico é composto por potenciais de ação de grupos de fibras organizadas em unidades funcionais chamadas unidades motoras (Figura 2). Esse sinal pode ser detectado por micro sensores introduzidos em uma agulha que é colocada no tecido muscular. Quando apenas duas ou três unidades motoras nos arredores dos sensores são ativadas, normalmente é possível identificar visualmente os potenciais de ação individuais, pois a incidência de sobreposição entre esses potenciais é relativamente baixa. No entanto, quando o sinal de eletromiográfico contém a atividade de quatro ou mais unidades motoras, os potenciais de ação individuais tornam-se, em grande parte, indistinguíveis a olho nu, pois a incidência de sobreposição entre os dois ou mais potenciais de ação das unidades motoras tornam-se numerosos e semelhantes (De Luca *et al.*, 2006).

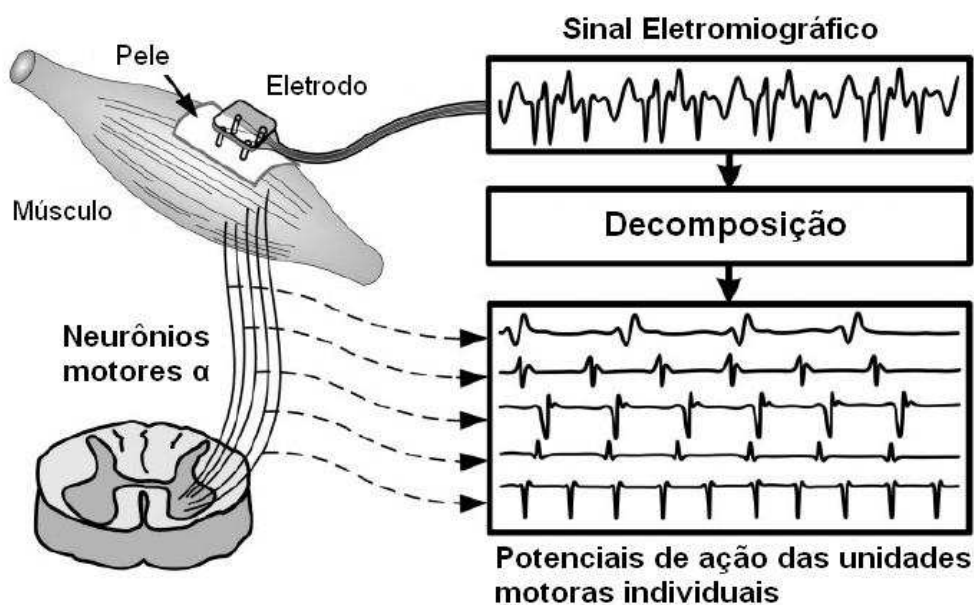


Figura 2. Representação da decomposição do sinal de ENMG nas unidades motoras constituintes. (Adaptado de De Luca *et al.*, 2006).

O potencial de ação da unidade motora é o somatório do espaço e do tempo dos potenciais de ação musculares individuais para todas as fibras de uma unidade de motora única. Portanto, o sinal de ENMG é a soma algébrica dos potenciais de ação de unidades motoras dentro da área de detecção do eletrodo a ser utilizado. Essa área do eletrodo quase sempre inclui mais de uma unidade motora porque as fibras musculares de diferentes unidades motoras são misturadas em toda a extensão do músculo. Qualquer porção do músculo pode conter fibras de 20 a 50 unidades motoras (De Luca *et al.*, 2006; Whittaker *et al.*, 2012).

2.1.4. Onda F

Em meados da década de 50, Magladery & Mcdougal nomearam a onda F desta forma devido ao fato de ter sido registrada pela primeira vez em músculos intrínsecos do pé (Preston & Shapiro, 1990). A onda F utiliza estimulação supramáxima de um nervo motor e o registro do potencial de ação motor composto (CMAP) de um músculo suprido por esse nervo. A onda F ocorre depois do potencial do motor direto ou da resposta M. Com a estimulação mais proximal a latência da resposta M aumenta, enquanto que a F diminui. Isto indica que o

impulso para provocar a onda F viaja dos eletrodos de registro até a medula espinal antes de retornar para os músculos distais ativados. Nervos mais motores e mistos podem ser estimulados, mas alguns são testados com mais frequência do que outros. Os principais nervos testados são o mediano, ulnar, fibular e tibial. O estímulo para induzir uma onda F pode ocorrer em qualquer ponto ao longo do nervo, mas a porção distal é a mais comumente utilizada (Mesrati & Vecchierini, 2004).

Após ser descrita (Magladery & Mcdougal, 1950), e estudada clinicamente (Kimura, 1974; Panayiotopoulos e Scarpalezos, 1977), a onda de F mostrou ter uma ampla aplicação na avaliação de lesões dos nervos periféricos. Ondas F registradas consecutivamente variam de latência e amplitude, necessitando de comparação de uma seqüência de respostas para selecionar uma medida ideal. A maior parte dos laboratórios utiliza persistência e latência mínima como únicas medidas práticas (Fierro *et al.*, 1987; Fraser & Olney, 1992; Weber, 1998).

Ainda continuam os debates sobre o número ideal de ondas F necessárias para atingir os objetivos de diagnóstico, a maioria dos laboratórios utiliza dez estímulos. Alguns pacientes podem não tolerar um grande número de estímulos necessários para obter resultados mais precisos (Kostera-Pruszczyk *et al.*, 2004).

A onda F é uma resposta tardia registrada a partir do músculo induzida por impulso elétrico transmitida aos neurônios alfa-motores da medula espinal. A latência da onda F é avaliada na eletroneuromiografia de rotina fornecendo informações quanto à condução no segmento proximal dos nervos. A amplitude da onda F raramente é analisada, apesar e alguns autores acharam que este dado poderia acrescentar informações valiosas sobre a excitabilidade dos neurônios motores em diferentes estados de doença (Kostera-Pruszczyk *et al.*, 2004).

Indivíduos diabéticos podem apresentar aumentos nas latências mínimas das ondas F. Ao avaliar o nervo em todo o seu comprimento, como é feito na onda F, as anormalidades podem ser encontradas em estágios iniciais. A Síndrome de Guillain-Barré, por exemplo, pode afetar qualquer segmento do nervo, mas é mais comum afetar o seguimento mais proximal primeiro. Se o paciente é testado cedo, os nervos podem permanecer normais. Conforme a doença progride, a latência da onda F pode aumentar ou pode ficar ausente, indicando desmielinização. As formas das ondas podem ser dispersas ou mostrar bloqueio de condução. Conforme o paciente começa a recuperar as ondas F que estavam ausentes e as latências que eram prolongadas podem retornar a normalidade (Kimura, 2001).

Os nervos conduzem mais rapidamente com uma temperatura corporal mais elevada, quanto mais frio o paciente, maior a latência pode ser. Cada clínica adota o valor de referência padrão que considera mais adequado, geralmente o paciente deve ficar em ambiente aquecido para que a temperatura do corpo esteja adequada na hora do exame (Kimura, 2001).

As ondas F não são sensíveis em detectar neuropatias compressivas. Se o estímulo for aplicado de forma distal à lesão, a latência da onda F pode ser prolongada ou ausente, estabelecendo a presença de uma lesão, mas o resultado não indica o local exato da lesão (Jablecki *et al.*, 2002).

2.2. Teste Sensorial Quantitativo (QST)

O teste sensorial quantitativo (QST) refere-se a procedimentos de diagnóstico em que intensidades de estímulos percebidos são referenciados para testar estímulos aplicados com intensidades definidas, ou seja, ocorre a determinação de limiares de percepção sensitiva junto a um estímulo de intensidade controlada (Shy *et al.*, 2003; Schestatsky *et al.*, 2011). Assim, o QST é um método não completamente objetivo, necessitando de uma rigorosa padronização. Protocolos para QST fornecem informações importantes sobre as características clínicas de pacientes com sintomas de dor. No entanto, é difícil comparar resultados avaliados por diferentes protocolos do teste entre os diferentes grupos de pesquisa. A necessidade de estabelecer valores padrão específicos controlados por idade e sexo para cada protocolo do teste e a variedade de testes sensoriais têm dificultado o uso rotineiro do QST (Magerl *et al.*, 2010)

Avaliar sintomas sensoriais é uma parte essencial no exame neurológico pois a análise sensorial ajuda a determinar o diagnóstico e avaliação da função das diferentes sub-modalidades do sistema somatossensorial (por exemplo, mecanocepção, propriocepção, termocepção, nocicepção, e visceroccepção). Essas submodalidades diferentes são transmitidas através de várias vias do sistema nervoso periférico e central (Figura 3). Devido à complexidade da estrutura do sistema somatossensorial, estudos mais abrangentes sobre área e qualidade das alterações somatossensoriais se fazem necessários. O mapeamento de sinais sensoriais combinados com a determinação adequada da distribuição neuroanatômica fornece pistas importantes para a localização de uma lesão ou

disfunção que pode ser responsável pelos sintomas de dor. É necessário examinar pelo menos uma submodalidade processada pelo lemnisco medial (tato, propriocepção), e, além disso, uma submodalidade processada pelo Trato espinotalâmico (temperatura e dor) (Cruccu *et al.*, 2008; Treede *et al.*, 2008).

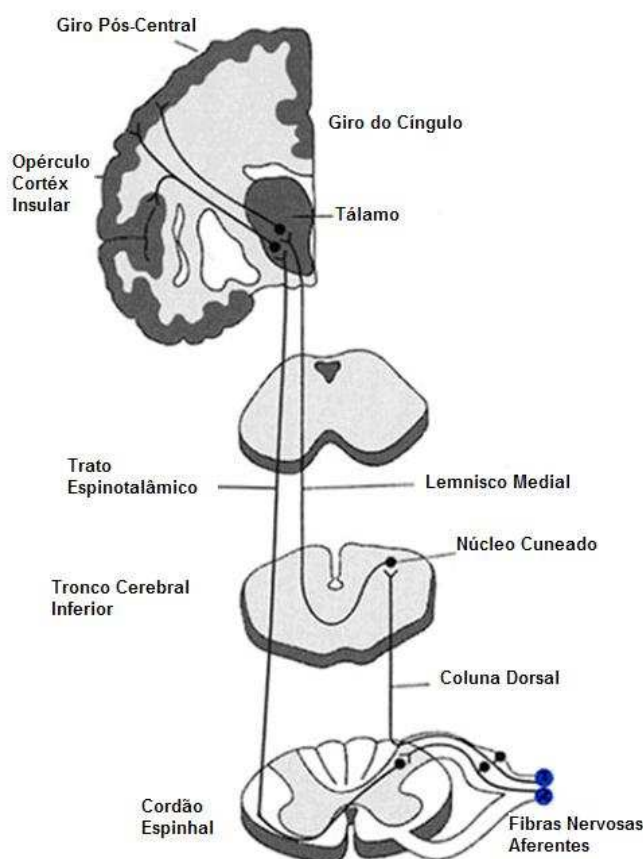


Figura 3. Desenho esquemático do sistema somatossensorial, ilustrando suas duas divisões. A informação somatossensorial é mediada pelo trato espinotalâmico (nocicepção, termoccepção, visceroccepção) e o lemnisco medial (mecanorecepção e propriocepção). A visceroccepção também é mediada pelo nervo vago. (Adaptado de Pfau *et al.*, 2012)

A necessidade clínica do uso dos testes sensitivos está aumentando de acordo com a alta incidência de dor neuropática e neuropatias de fibras finas associadas com diabetes, HIV e quimioterapias. Assim, são necessários protocolos completos, porém breves para QST, não somente em neurologia, mas também em endocrinologia, oncologia e clínica geral (Pfau *et al.*, 2012).

O QST é uma ferramenta científica aceita para investigar alterações somatossensoriais em pacientes com dor quando combinada com outros exames.

Deve-se realizar um exame clínico abrangente que fornece informações importantes sobre sistema somatossensorial, já que o QST não deve ser utilizado como forma única de diagnóstico de dor neuropática (Treede *et al.*, 2008).

O QST não pode substituir métodos eletrofisiológicos que investigam função somatossensorial, mas pode complementá-los pois acessa diferentes parâmetros. Uma abordagem promissora para superar essas limitações é combinar e correlacionar os achados do QST com exames funcionais (ENMG e imagem funcional), exames estruturais (biópsias de nervo e de pele, estudos de imagem), e monitorização de respostas terapêuticas através de múltiplas avaliações (Leffler *et al.*, 2008; Siao & Cros, 2003; Pfau *et al.*, 2012).

3. Proteína S100B: histórico, estrutura e fisiologia

S-100 é um conjunto de proteínas, altamente ácidas, que formam um dímero de ligação ao cálcio, com aproximadamente 20 kDa, que estão amplamente distribuídas em diferentes tecidos. As combinações diméricas das cadeias α e β formam 3 subtipos, que são S-100 $\alpha\alpha$, S-100 $\alpha\beta$ e S-100 $\beta\beta$. A proteína S-100 foi isolada primeiramente do cérebro, mas pode ser encontrada em uma variedade de células normais e neoplásicas (Moore, 1965; Fanò *et al.*, 1995). Além de ser uma proteína astrogliar, S-100 β também pode ser expressa em neurônios durante o período crítico de desenvolvimento neuronal, podendo estar relacionada à diferenciação dos neurônios (Bhattacharyya *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1996; Van Eldik *et al.*, 1991; Korfiás, 2006).

Os tipos de proteínas S-100AB e S-100BB foram descritas como S100B e mostram ser altamente específicas do sistema nervoso, sendo abundantes no citosol das células da glia do sistema nervoso central e periférico (astrócitos e células de Schwann) e também se expressam em melanócitos, adipócitos e condrócitos, mas em concentrações muito baixas (Heizmann *et al.*, 2002; Donato, 1986; Donato, 1991; Cocchia *et al.*, 1981).

Pelo menos quatro possíveis subtipos de S-100 são conhecidos por serem representados em tecidos humanos: S100A1 (músculo estriado, coração e rins) (Kato & Kimura, 1985), S-100A1B (células astrogliais), S-100B (células astrogliais e células de Schwann), e S-100BB (células astrogliais) (Donato, 1999; Zimmer *et al.*, 1995; Haimoto *et al.*, 1987). Sabe-se que as células astrogliais são tão sensíveis quanto os neurônios ao estresse causado por hipóxia, portanto podem

refletir indiretamente um dano neuronal (Böttiger *et al.*, 2001). A proteína S-100B é metabolizada pelo rim e relatam-se diferentes estimativas da sua meia-vida biológica, a qual se acredita ser de aproximadamente 30 minutos a 2 horas (Ghanem *et al.*, 2001; Jonsson *et al.*, 2000; Ytrebo *et al.*, 2001; Westaby *et al.*, 1996).

Evidências reunidas ao longo dos últimos 15 anos afirmam que os níveis de S100B em fluidos biológicos se correlacionam com a presença e a severidade de doenças neurológicas. Pelo menos 26 proteínas que pertencem à família de S-100 foram identificadas, as quais diferem principalmente pelo comprimento e sequência da *hinge-region* e a extensão da região C-terminal (Figura 4) (Lippi *et al.*, 2011; Donato, 2003).

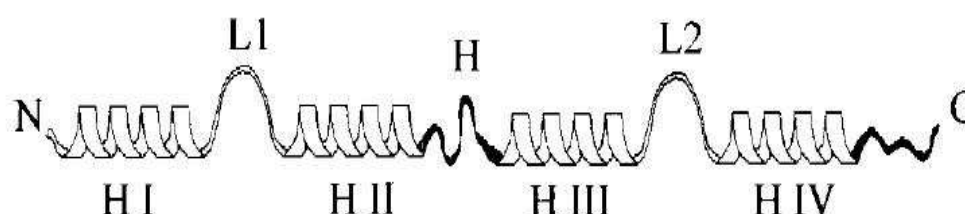


Figura 4. Representação esquemática da estrutura secundária de uma proteína S100. Cada região de ligação ao Ca^{2+} (L1 e L2, em N- e C-terminal, respectivamente) é flanqueada por α -hélices (hélices I e II, hélices III e IV por L1 e L2, respectivamente). Uma região de *link* (*hinge region*, H) conecta a hélice II a hélice III. A Hélice IV é seguida por uma extensão C-terminal. A região *hinge* e a extensão C-terminal (em cinza) mostram a menor quantidade de homologia da seqüência. (Adaptado de Donato, 2001).

As proteínas S100 estão localizadas no citoplasma e núcleo de uma grande variedade de células e estão envolvidas na regulação de alguns processos celulares, tais como progressão do ciclo celular e diferenciação. Especificamente, S100B regula a homeostase celular e a atividade enzimática e inibe a fosforilação da proteína kinase C da proteína 43 associada ao crescimento, que está envolvida no crescimento axonal e sinaptogênese durante o desenvolvimento e a remodelação sináptica (Kövesdi *et al.*, 2010)

Os genes S100 incluem, pelo menos, 13 membros, que estão localizados em cluster no cromossomo 1q21. O nome deste grupo de proteínas deriva da sua

solubilidade em sulfato de amônio, que é 100%, em um pH neutro (Filippidis *et al.*, 2010). A proteína S100B está envolvida no ajuste da morfologia celular, influenciando a integridade do esqueleto citoplasmático por inibir a união de microtúbulos e filamentos intermediários e também por influenciar a regulação da organização estrutural da membrana (Donato, 1983; Donato, 1984; Sorci *et al.*, 1998; Zolese *et al.*, 1988). S100B pode afetar também a atividade de descarga elétrica neuronal através da modulação das correntes de potássio (Kubista *et al.*, 1999). Essa proteína também está envolvida na resposta imune por exercer um efeito sobre a realização e regulação das funções celulares microgliais (Adami *et al.*, 2001). S100B também exerce funções extracelulares quando é liberado nos espaços extracelulares do cérebro (Shashoua *et al.*, 1984; Van Eldik & Zimmer, 1987).

Apesar de S100B ser especificamente glial e expressa primariamente por astrócitos e células de Schwann, ela pode ser encontrada em vários outros sistemas de células não pertencentes ao nervoso, como adipócitos, condrócitos, pele, e ainda em células de glioblastoma e melanoma (Zimmer *et al.*, 1995). Contudo, S100B não é expressa por todos os astrócitos, estudos mostram que a expressão ocorre em um subtipo de astrócitos maduros que estão próximos aos vasos sanguíneos (Wang & Bordey, 2008). S100B pode ser encontrada em baixos níveis no líquido e soro e, níveis normais desta proteína têm sido fortemente relacionados com a ausência de danos intracranianos (Figura 5) (Savola *et al.*, 2004).

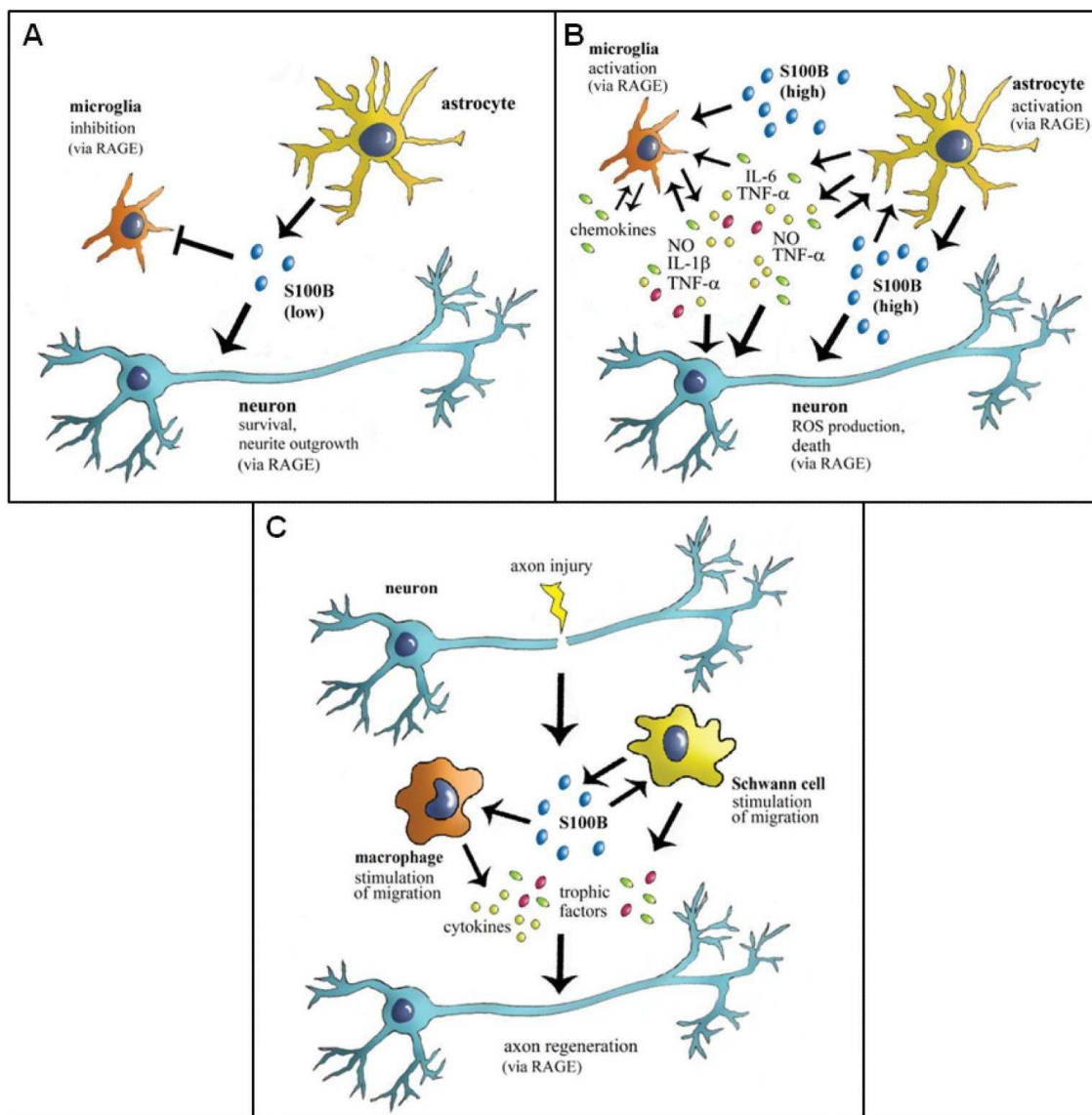


Figura 5. Representação esquemática dos efeitos extracelulares de S100B em neurônios da microglia, astrócitos, mioblastos, VSMCs, cardiomiócitos e nervos periféricos. (A) Em condições fisiológicas normais, S100 é secretada por astrócitos exercendo efeitos tróficos sobre os neurônios e modulando a atividade microglial envolvendo RAGE. (B) Quando presente no espaço extracelular do cérebro em altas concentrações, S100B ativa microglia e astrócitos, participando assim na resposta inflamatória e isto é tóxico para os neurônios por estimular excessivamente RAGE. (C) Em lesão aguda de nervo periférico, S100B produzido por células de Schwann ativas promove migração de macrófagos e células de Schwann e a liberação de fatores tróficos via RAGE participando assim da regeneração de nervos periféricos. (Adaptado de Donato, 2013).

4. Enolase Neurônio-Específica (NSE)

A Enolase neurônio-específica (2-fosfo-D-glicerato-hidrolase) é uma proteína solúvel do cérebro que foi descrita por Moore & McGregor em 1965 como sendo uma enzima glicolítica expressa por dímeros isoenzimáticos compostos por três distintas subunidades (α , β , γ). A subunidade α é amplamente distribuída em tecidos de mamíferos e células gliais do cérebro, enquanto que a subunidade β está localizada primariamente no músculo esquelético e no tecido do miocárdio (Moore & McGregor, 1965; Barone *et al.*, 1993; Zomzely-Neurath, 1983).

Três diferentes isoenzimas foram encontradas no cérebro humano: $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$, sendo as isoformas $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$ conhecidas como Enolase Neurônio-Específica (NSE), pois foram inicialmente encontradas no citoplasma de neurônios e células com diferenciação neuroendócrina. NSE é considerada um marcador neurobioquímico de dano cerebral tanto em humanos quanto em animais (Marangos *et al.*, 1987; Butterworth *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996). Assume-se que NSE, sendo uma enzima do citoplasma celular, é liberada durante o processo de destruição da célula (Hardemark *et al.*, 1989; Hatfield & McKernan, 1992; Horn *et al.*, 1995). A isoenzima $\alpha\alpha$ também é um dímero e foi designada como uma Enolase não neuronal (*Non-Neuronal Enolase* – NNE) (Moore & McGregor, 1965; Barone *et al.*, 1993; Zomzely-Neurath, 1983).

Existem diferenças distintas nas propriedades bioquímicas entre as isoformas $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$ do tecido cerebral, a mais importante dessas diferenças é, aparentemente, a completa falta de reatividade imunológica cruzada, o que foi utilizado para quantificação de NSE por vários imunoenaios. O ponto isoelétrico de NSE é 4.7 e é caracterizado por estabilidade em relação ao cloreto, uréia e temperatura. A tabela 4 mostra um comparativo entre as propriedades de NSE e NNE. Assume-se que NSE, sendo uma enzima do citoplasma celular, é liberada durante a destruição celular, sendo assim, a presença de NSE na circulação está relacionada com uma alta taxa de mortalidade de células em diferenciação neuroendócrina (Zomzely-Neurath, 1983).

Tabela 4. Comparativo entre as principais propriedades de NSE e NNE.
(Adaptado de Kaiser et al., 1989)

	<i>Non-Neuron Enolase (NNE)</i>	<i>Neuron-Specific Enolase (NSE)</i>
Localização	Células Gliais	Neurônios
Perfil de desenvolvimento	Aparentemente não relacionado com a maturação glial	Aparentemente associado a diferencial neural
Peso molecular	87.000	78.000
Subunidades componentes	$\alpha\alpha$	$\gamma\gamma$
Ponto isoelétrico (PH)	7.2	4.7
Reatividade (soro Anti-NNE)	+	-
Reatividade (soro Anti-NSE)	-	+
Estabilidade (Cloro)	Não	Sim
Estabilidade (Uréia)	Não	Sim
Estabilidade (Temperatura)	Não	Sim

A identificação específica de NSE no sangue tem sido extensivamente utilizada para detectar pequenas células tumorais de pulmão, neuroblastoma (Massaron *et al.*, 1998; Zeltzer *et al.*, 1986), tumores neuroendócrinos (Ishguro *et al.*, 1983), Doença de Creutzfeldt-Jacob (Zerri *et al.*, 1995), melanoma maligno (Lorenz & Dippold, 1989), seminoma (Fossa *et al.*, 1992), carcinoma de células de Merkel (Chang *et al.*, 1998), meduloblastoma (Zeltzer *et al.*, 1986), retinoblastoma (Ke Ping *et al.*, 1995) e síndrome de Guillain-Barré (Mokuno *et al.*, 1994).

Fisiologicamente, NSE, que é uma proteína altamente solúvel, está presente apenas em quantidades insignificantes no sangue periférico e, conseqüentemente, é facilmente liberado no sangue por dano em tecidos e apresenta uma meia-vida de aproximadamente 48 horas. Uma barreira hematoencefálica alterada e a

desintegração astrogliar causam a liberação substancial de NSE na circulação cerebral e sistêmica (Bharosay *et al.*, 2012).

5. S100B e Enolase Neurônio-Específica (NSE) e suas propriedades como marcadores biológicos

Nas últimas décadas, marcadores neurobioquímicos de dano cerebral ganharam uma atenção especial em neurotraumatologia experimental e clínica (Hardemark *et al.*, 1989; Raabe *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 2001). Enquanto que proteínas estruturais da astroglia (proteína glial fibrilar ácida) do tecido cerebral neuronal (proteína do neurofilamento) foram principalmente utilizadas em situações experimentais, Enolase Neurônio-Específica (NSE) e S-100B foram os marcadores que devido à disponibilidade comercial e o poder de detecção em amostras de soro, atraíram crescentemente grupos de pesquisa clínica (Woertgen *et al.*, 2000; Böttiger *et al.*, 2001).

Em diferentes estudos, uma relação significativa entre os níveis séricos de S-100B e dano encefálico severo (Herrmann *et al.*, 2001), parada circulatória (Böttiger *et al.*, 2001; Rosén *et al.*, 1998; Rosén *et al.*, 2001), acidente vascular cerebral (Bertsch *et al.*, 2001), insuficiência hepática aguda (Ytrebo *et al.*, 2000) e complicações leves do sistema nervoso central durante cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (Westaby *et al.*, 1996) vem sendo demonstrados. No caso de parada circulatória e danos cerebrais, NSE também foi proposta como um marcador adequado, mas foi considerado menos específico que as proteínas S-100 para a avaliação de lesão cerebral (Woertgen *et al.*, 2000; Fogel *et al.*, 1997).

Além do líquido cefalorraquidiano (que também pode ser utilizado para dosagem de avaliação de dano cerebral), NSE pode ser dosada também em soro em adultos que sofreram traumatismo crânio-encefálico (Karkela *et al.*, 1993; Skogseid *et al.*, 1992; Vázquez *et al.*, 1995; Yamazaki *et al.*, 1995). Muitos estudos avaliaram níveis séricos de NSE como marcador de dano neuronal em pacientes com uma ampla gama de condições neurológicas incluindo *status epilepticus* (DeGiorgio *et al.*, 1995), parada cardíaca (Rosén *et al.*, 2001), Doença de Creutzfeldt-Jakob (Jimi *et al.*, 1992) e câncer de pulmão metastático (Van de Pol *et al.*, 1994). S100B também foi previamente avaliada em parada cardíaca, AVC, hemorragia subaracnóidea e em pacientes com danos cerebrais por traumatismo ou hipóxia (Rosén *et al.*, 2001; Vos *et al.*, 2010; Oertel *et al.*, 2006; Wunderlich *et*

al., 2004). Tanto NSE quanto S100B são liberadas como um resultado de morte celular neuronal ou astrogliar após hipóxia ou dano cerebral por trauma. Esses marcadores refletem indiretamente dano neuronal isquêmico, talvez principalmente devido a um mecanismo que foi desencadeado por hipóxia (Rasmussen *et al.*, 2004; Mussack *et al.*, 2002; Korfiás *et al.*, 2006; Rosén *et al.*, 2001; Akelma *et al.*, 2012).

No cérebro, a expressão de S100 β está diretamente relacionada com o nível de serotonina (5-HT) e demonstrou ser induzida por estimulação dos receptores 5-HT1A (Haring *et al.*, 1993; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1989; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1990). Demonstrou-se que os agonistas dos receptores 5-HT1A protegem os neurônios contra danos causados por glutamato e estaurosporina (Ahlemeyer & Kriegstein, 1997; Ahlemeyer *et al.*, 1999; Prehn *et al.*, 1993; Semkova *et al.*, 1998; Suchanek *et al.*, 1998), então surge a questão que se um aumento da liberação de S-100 β devido à estimulação dos receptores 5-HT1A estaria envolvida em atividade anti-apoptótica dessas drogas. No entanto, ainda é discutido de forma controversa se S-100 β é um indutor de apoptose (Fanò *et al.*, 1993; Fulle *et al.*, 1997) ou é uma proteína neuroprotetora (Barger *et al.*, 1995).

O papel de S-100 β nas doenças neurodegenerativas ainda não está completamente esclarecido. Demonstrou-se que há um aumento de S-100 β no líquido cefalorraquidiano de pacientes com demência frontotemporal (Green *et al.*, 1997), no cérebro de pacientes com Síndrome de Down (Allore *et al.*, 1988; Griffin *et al.*, 1989), pacientes que sofreram AVC (Kim *et al.*, 1996), lesão cerebral traumática (Herrmann *et al.*, 1999) e doença de Alzheimer (Griffin *et al.*, 1989), onde parece estar relacionada com o número e densidade de placas neuríticas (Sheng *et al.*, 1994). S-100 β pode ter diferentes papéis durante o desenvolvimento neuronal, onde induz o crescimento de neurites e promove a sobrevivência neuronal e, com o passar dos anos, acelera a morte neuronal (Wang *et al.*, 1998).

De acordo com Kirino *et al.*, NSE parece ser um marcador de regeneração neuronal. Ela é liberada do cérebro para o fluido cefalorraquidiano como resultado de lesão cerebral aguda (Kirino *et al.*, 1983). Níveis de NSE parecem estar relacionados com danos no parênquima cerebral e mecanismos secundários de dano neuronal causado por edema e aumento da pressão intracraniana em casos de derrame cerebral. Há uma correlação positiva entre os níveis séricos de NSE e uma piora em quadros de problemas neurológicos (Bharosay *et al.*, 2012).

O significado clínico da mensuração dos níveis de S100B tem aumentado substancialmente em várias áreas da neurociência clínica, indo desde o monitoramento e acompanhamento terapêutico de doenças neurológicas a um amplo espectro de doenças traumáticas, isquêmicas e degenerativas. O valor de diagnóstico da S100B e o seu valor preditivo negativo na avaliação de diversas doenças neurológicas é notável e, o mais importante, não é comprometida pela sua produção através de fontes extracranianas (Pham *et al.*, 2010; Cervellin *et al.*, 2012).

5.1. S100B e NSE na Diabetes Mellitus tipo II

A diabetes mellitus está associada com alterações significativas no sistema nervoso central. Algumas dessas modificações são atribuídas a alterações na integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e a um aumento da incidência de doença cerebrovascular (Mooradian *et al.*, 1997; McCall, 2002). Embora as mudanças na BBB sejam facilmente demonstráveis em modelos animais de diabetes, em seres humanos essas alterações não têm sido consistentemente demonstradas. Isso se deve às limitações da tecnologia disponível para estudar a função da BHE em seres humanos (Horani & Mooradian, 2003; Hovsepyan *et al.*, 2004).

A neuropatia é uma das complicações crônicas mais comuns em pacientes com diabetes. Um diagnóstico rápido e preciso de neuropatia diabética é essencial para que se possa intervir precocemente para diminuir a taxa de incapacidade e de morte que estão associadas a ela. Há uma ampla gama de ferramentas de diagnóstico disponíveis, no entanto, biomarcadores específicos para danos neuronais ainda não são completamente conhecidos. Tratando-se deste tema, a Enolase neurônio-específica (NSE), que catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, pode atuar como um biomarcador emergente na neuropatia periférica em diabetes (Boulton, 2007; Li *et al.*, 2013). Sabe-se que essa proteína está localizada principalmente em tecidos neuronais e, após danos nesse tecido, a NSE é liberada no líquido cerebrospinal e sangue, tendo uma meia-vida de aproximadamente 48 horas (Marangos *et al.*, 1987).

Neurônios do sistema nervoso periférico residem nos gânglios em torno da coluna e próximos aos seus órgãos-alvo. Nervos periféricos estão junto aos vasos sanguíneos que irrigam os órgãos. Em torno de cada fibra dos nervos periféricos

está o *endoneurium*, que é, em certo grau, análogo a barreira hematoencefálica. A esse respeito, sabe-se que o fluido endoneurial é similar ao fluido cerebrospinal do sistema nervoso central e durante o desenvolvimento de danos em nervos periféricos, a quantidade desse fluido pode aumentar devido à irritação ou outros estímulos deletérios. Contudo, ao contrário do sistema nervoso central que tem proteção da barreira hematoencefálica, o sistema nervoso periférico é mais vulnerável e facilmente exposto a toxinas (Marieb & Hoehn, 2007).

Hiperglicemia e ambientes isquêmicos ou de hipóxia induzem estresse oxidativo no sistema nervoso. A oxidação inativa várias enzimas glicolíticas, incluindo Enolase, nos neurônios (Abdul-Khaliq *et al.*, 2003; Di Legge *et al.*, 2003; Herrmann *et al.*, 1999; Horani *et al.*, 2003). Para atender exigências energéticas razoavelmente altas, as enzimas glicolíticas são compensatoriamente reguladas para aumentar a sobrevivência dos neurônios (Kapural *et al.*, 2002). A exposição crônica ao quadro de hiperglicemia ou isquemia/hipóxia relacionada ao estresse oxidativo pode levar a um aumento do risco de desenvolver neuropatia periférica, que é caracterizada por neurodegeneração que muitas vezes é concomitante a neuroregeneração (Laemmli *et al.*, 1970; Marchi *et al.*, 2003). Durante esse processo, a taxa de síntese de Enolase nos neurônios afetados pode mudar e pode causar a liberação de NSE no fluido endoneurial e soro. Li *et al.*, postulam que esta circunstância pode ser indicativa de neuropatia diabética periférica (DPNP), mas estudos prévios sobre a associação de NSE com DPNP são bastante limitados (Li *et al.*, 2013; Sandhu *et al.*, 2008).

A disponibilidade de biomarcadores confiáveis com função de barreira no soro poderia melhorar muito a capacidade de estudar as alterações da BHE em humanos sob condições fisiológicas e patológicas. Níveis séricos da proteína S100B e/ou a presença de anticorpos anti-S100B são marcadores de aberturas na barreira hematoencefálica (Kapural *et al.*, 2002; Marchi *et al.*, 2003; Missler *et al.*, 1997).

Estudos que utilizaram manitol para romper a BHE mostraram que pequenos aumentos no nível sérico de S100B estão associados a sua ruptura, enquanto que um aumento mais significativo nesses níveis é um indicativo de dano cerebral. Essa última situação pode refletir também em um aumento dos níveis séricos de NSE (Marchi *et al.*, 2003). O aumento nos níveis da proteína S100B foi documentado em várias condições associadas ao rompimento da BHE, como traumatismo craniano, tumores cerebrais invasivos, entre outros (Herrmann *et al.*,

1999; Missler *et al.*, 1997). Contudo, a ruptura da BHE parece não refletir nos níveis séricos de S100B e levando em consideração fontes de tecido mais diversificadas, esses níveis de S100B na diabetes são modulados por uma multiplicidade de variáveis que acabam por ofuscar a sua utilidade como um marcador de integridade da BHE (Hovsepyan *et al.*, 2004)

Alterações em níveis séricos de S100B e NSE relacionadas a diabetes em humanos foi previamente estudada e demonstrou-se que os níveis séricos dessas proteínas em pacientes com diabetes com história de hipoglicemia severa não foram diferentes dos pacientes sem essa mesma condição. Neste estudo, não foi feita qualquer comparação com controles saudáveis, contudo, em dois dos três pacientes que morreram após hipoglicemia, as concentrações séricas de S100B e NSE estavam elevadas. Os autores concluíram que a mensuração das concentrações séricas dessas proteínas pode ter um papel prognóstico na avaliação clínica após hipoglicemia grave (Strachan *et al.*, 1999).

Os achados de Al-Rawi & Atiyah indicam que as concentrações de NSE no soro de pacientes diabéticos somente eram semelhantes às observadas em pacientes com acidente vascular cerebral, onde estava significativamente aumentada. Este fato indica que os pacientes diabéticos mostram algum tipo de danos neuronais e/ou dano na barreira hematoencefálica (Al-Rawi & Atiyah, 2009). Esta constatação está de acordo com o estudo de Hovsepyan *et al.*, que demonstrou um aumento significativo no nível de anticorpos contra NSE em pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 em comparação com controles saudáveis (Hovsepyan *et al.*, 2004).

Outra importante informação é que foi observada uma elevação significativa nos níveis de NSE em pacientes diabéticos com neuropatia e, esses níveis elevados estavam intimamente relacionados aos casos de neuropatia e essa relação foi independente de outras co-variáveis. Além disso, houve uma correlação positiva entre os níveis de Enolase aumentados com os estágios de neuropatia. Altos níveis de glicose têm sido relacionados com elevadas concentrações séricas de Enolase em pacientes que sofreram derrame (Selakovic *et al.*, 2005). Além de perturbações no SNC, a hiperglicemia induzida por perda de perócitos contribui para o rompimento da barreira hematoencefálica (Wunderlich *et al.*, 1999).

Li *et al.*, encontraram um leve aumento nos níveis séricos de Enolase em pacientes diabéticos sem distúrbios detectáveis do SNC e neuropatias periféricas. Assim como a barreira hematoencefálica, a permeabilidade do endoneurium que é

estruturalmente semelhante também pode ser maior em pacientes com diabetes. Níveis mais elevados de NSE mostraram-se altamente associados com neuropatia diabética periférica, sendo assim, níveis aumentados dessa proteína pode ser indicativo de neuropatia e do nível de danos nas fibras do nervo envolvidos, que são associadas com alterações na síntese e liberação da Enolase.

Durante o processo de produção de alterações patológicas, incluindo desmielinização e remielinização associados com neuropatia diabética periférica, NSE pode ser introduzida não só a partir de neurônios afetados, mas também a partir de células de Schwann afetadas que formam mielina, conforme foi sugerido por Clegg *et al.*, NSE foi detectada em oligodendrócitos bem como em neurônios (Clegg *et al.*, 2003). Este fato pode explicar por que os níveis de NSE foram maiores em neuropatia de fibras grandes do que em neuropatia de fibras pequenas no espectro das neuropatias. Outros estudos que incluam mais subcategorias de neuropatia diabética, juntamente com possíveis melhorias nas técnicas de detecção de NSE serão de suma importância para corroborar as hipóteses em questão (Li *et al.*, 2013).

Estudos que possam esclarecer a relação entre NSE e neuropatia observada por Li *et al.*, proporcionando uma abordagem adicional se fazem necessários para novas orientações em diagnóstico precoce e manejo do diabetes e suas complicações. Possivelmente, o estudo de Li *et al.*, indicando esse aumento dos níveis séricos de NSE em pacientes com diabetes e relacionando com a neuropatia diabética pode proporcionar indícios para corroborar um biomarcador potencial em neuropatia diabética. Se outros estudos forem capazes de confirmar esses resultados, ou seja, um aumento de NSE no soro como um indicador de neuropatia diabética ajudaria no diagnóstico precoce, tratamento e seguimento da população diabética (Li *et al.*, 2013).

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da investigação neurofisiológica (estudo de condução nervosa, onda-F, resposta cutânea simpática e teste de quantificação sensitiva) e dos níveis séricos da proteína S100B e da Enolase neurônio-específica nos sujeitos com diferentes graus de tolerância à glicose (normais, pré-diabéticos e diabéticos).

6.2. Objetivos específicos

Avaliar a correlação entre dados clínicos, neurofisiológicos e bioquímicos nesta população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul-Khaliq H, Schubert S, Stoltenburg-Didinger G, Huebler M, Troitzsch D, Wehsack A, Boettcher W, Schwaller B, Crausaz M, Celio M, Schroter ML, Blasig IE, Hetze R, Lange PE (2003) Release patterns of astrocytic and neuronal biochemical markers in serum during and after experimental settings of cardiac surgery. *Restor Neurol Neurosci* 21:141–150.

Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R (2001) S100B expression in and effects on microglia. *Glia* 33(2):131-142.

Ahlemeyer B, Glaser A, Schaper C, Semkova I, Krieglstein J (1999) The 5-HT_{1A} receptor agonist, Bay x 3702, inhibited apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 370:211–216.

Ahlemeyer B, Krieglstein J (1997) Stimulation of 5-HT_{1A} receptors inhibits apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons from chick embryo. *Brain Res* 777:179–186.

Akelma AZ, Celik A, Ozdemir O, Kavak Akelma F, Abaci A, Razi CH, Kislal FM, Akin O (2012) Neuron-specific enolase and S100B protein in children with carbon monoxide poisoning: children are not just small adults. *Am J Emerg Med* 31(3):524-528.

Alberti KGMM, Zimmet PZ, for World Healthy Organization Consulation (1999) Definition, diagnosis and classification of *diabetes mellitus* and its complications. Part I: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO consulation.

Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard DR, Cox A, Marks A, Dunn RJ (1988) Gene encoding the beta subunit of S-100 protein is on chromosome 21: implications for Down's syndrome. *Science* 239:1311–1313.

Al-Rawi NH, Atiyah KM (2009) Salivary neuron specific enolase: an indicator for neuronal damage in patients with ischemic stroke and stroke-prone patients. *Clin Chem Lab Med* 47(12):1519-1524.

American Diabetes Association (2004) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27(1):5-10.

American Diabetes Association (2011a) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 34(1):S62-69.

American Diabetes Association (2011b) Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 34(1):11-61.

American Diabetes Association (2012), Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 Suppl 1, S64-71.

Bagga P, Verma D, Walton C, Masson EA, Hepburn DA (1998) Survey of diabetic retinopathy screening services in England and Wales. *Diabetic Medicine* 15:780-782.

Bajaj M, DeFronzo RA (2003) Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *J Nucl Cardiol* 10:311-323.

Barger SW, Van Eldik LJ, Mattson M (1995) S-100b protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res* 677:167-170.

Barone FC, Clark RK, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, Storer BL, Ohlstein EH (1993) Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res* 623:77-82.

Barone FC, Clark RK, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, Storer BL, Ohlstein EH (1993) Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res* 623:77-82.

Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, Jolley D, Magliano DJ, Dunstan DW, Cameron AJ, Dwyer T, Taylor HR, Tonkin AM, Wong TY, McNeil J, Shaw JE (2007) Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation* 116:151-157.

Bertsch T, Casarin W, Kretschmar M, Zimmer W, Walter S, Sommer C, Muehlhauser F, Ragoschke A, Kuehl S, Schmidt R, Eden BP, Nassabi C, Nichterlein T, Fassbender K (2001) Protein S-100B: a serum marker for ischemic and infectious injury of cerebral tissue. *Clin Chem Lab Med* 39:319-323.

Bevelaqua AC, Hayter CL, Feinberg JH, Rodeo SA (2012) Posterior interosseous neuropathy: electrodiagnostic evaluation. *HSS J* 8(2):184-189.

Bhadada SK, Sahay RK, Jyotsna VP, Agrawal JK (2001) Diabetic Neuropathy: Current Concepts. *J Indian Academy of Clin Med* 2(4):305-318.

Bharosay A, Bharosay VV, Varma M, Saxena K, Sodani A, Saxena R (2012) Correlation of Brain Biomarker Neuron Specific Enolase (NSE) with Degree of Disability and Neurological Worsening in Cerebrovascular Stroke. *Indian J Clin Biochem* 27(2):186-190.

Bharosay A, Bharosay VV, Varma M, Saxena K, Sodani A, Saxena R (2012) Correlation of Brain Biomarker Neuron Specific Enolase (NSE) with Degree of Disability and Neurological Worsening in Cerebrovascular Stroke. *Indian J Clin Biochem* 27(2):186-190.

Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N (1992) S-100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J Neurobiol* 23:451–466.

Bonner JA, Sloan JA, Rowland KM Jr, Klee GG, Kugler JW, Mailliard JA, Wiesenfeld M, Krook JE, Maksymiuk AW, Shaw EG, Marks RS, Perez EA (2000) Significance of neuron specific enolase levels before and during therapy of small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6:597–601.

Böttiger BW, Möbes S, Glätzer R, Bauer H, Gries A, Bärtsch P, Motsch J, Martin E (2001) Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation* 103:2694–2698.

Boulton AJM, Gries FA, Jervell JA (1998) Guidelines for the diagnosis and outpatient management diabetic peripheral neuropathy. *Diabet Med* 15:508–514.

Boulton AJ (2007) Diabetic neuropathy: classification, measurement and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:141–145.

Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM (2004) Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care* 27(6):1458-1486.

Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D, American Diabetes Association (2005) Diabetic neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28:956–962.

Bril V, Ellison R, Ngo M, Bergstrom B, Raynard D, Gin H (1998) Electrophysiological monitoring in clinical trials. Roche Neuropathy Study Group. *Muscle Nerve* 21:1368–1373.

Buchthal F, Rosenfalck A (1966) Evoked action potentials and conduction velocity in human sensory nerves. *Brain Research International multidisciplinary journal devoted to fundamental research in the brain sciences* v.3 n.1, 122p.

Butt AN, Shalchi Z, Hamaoui K, Samadhan A, Powrie J, Smith S, Janikoun S, Swaminathan R (2006) Circulating nucleic acids and diabetic complications. *Ann N Y Acad Sci* 1075:258–270.

Butterworth RJ, Wassif WS, Sherwood RA, Gerges A, Poyser KH, Garthwaite J, Peters TJ, Bath PMW (1996) Serum neuron-specific enolase, carnosinase, and their ratio in acute stroke. *Stroke* 27:2064–2068.

Buttner T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W (1997) S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* 28:1961–1965.

Cabezas-Cerrato J (1998) The prevalence of diabetic neuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Diabetologia* 41:1263–1269.

Cakir Z, Aslan S, Umudum Z, Acemoglu H, Akoz A, Turkyilmaz S, Oztürk N (2010) S-100beta and neuron-specific enolase levels in carbon monoxide-related brain injury. *Am J Emerg Med* 28(1):61-67.

Caputo GM, Cavanagh PR, Ulbrecht JS, Gibbons GW, Karchmer AW (1994) Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N Engl J Med* 331:854–860.

Carrington AL, Abbott CA, Shaw JE, Vileikyte L, Van Schie CHM, Boulton AJM (2002) Can motor nerve conduction velocity predict foot problems in diabetic neuropathy over a 6-year outcome period? *Diabetes Care* 25:2010–2015.

Cervellin G, Benatti M, Carbucicchio A, Mattei L, Cerasti D, Aloe R, Lippi G (2012) Serum levels of protein S100B predict intracranial lesions in mild head injury. *Clin Biochem* 45(6):408-411.

Chang SF, Suh JW, Choi JH, Yoon GS, Huh J, Sung KJ, Moon KC, Kim WG, Koh JK (1998) Diagnostic pitfalls of Merkel cell carcinoma and dramatic response to chemotherapy. *Journal of Dermatology* 25:322–331.

Chaudhry V, Cornblath DR, Mellits ED, Avila O, Freimer ML, Glass JD, Reim J, Ronnett GV, Quaskey SA, Kuncel RW (1991) Inter- and intra-examiner reliability of nerve conduction measurements in normal subjects. *Ann Neurol* 30(6):841-843.

Chaudhry V, Corse AM, Freimer ML, Glass JD, Mellits ED, Kuncel RW, Quaskey SA, Cornblath DR (1994) Inter- and intraexaminer reliability of nerve conduction measurements in patients with diabetic neuropathy. *Neurology* 44(8):1459-1462.

Cheah BC, Kiernan MC (2010) Neurophysiological methodologies: diagnosis of peripheral nerve disease and assessment of pharmacological agents. *Curr Opin Investig Drugs* 11(1):72-79.

Chroni E, Taub N, Panayiotopoulos CP (1996) The importance of sample size for the estimation of F wave latency parameters in the peroneal nerve. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 101:375–378.

Clarys JP (2000) Electromyography in sports and occupational settings: an update of its limits and possibilities. *Ergonomics* 43(10):1750-1762.

Clegg N, Ferguson C, True LD, Arnold H, Moorman A, Quinn JE, Vessella RL, Nelson PS (2003) Molecular characterization of prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma. *Prostate* 55:55–64.

Cocchia D, Michetti F, Donato R (1981) Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294(5836):85–87.

Conget I (2002) Diagnosis, Classification and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Rev Esp Cardiol* 55(5):528-535.

Corrêa ZMS, Eagle JR (2005) Aspectos patológicos da retinopatia diabética. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 68:410-414.

Cruccu G, Aminoff MJ, Curio G, Guerit JM, Kakigi R, Mauguiere F, Rossini PM, Treede RD, Garcia-Larrea L (2008) Recommendations for the clinical use of somatosensory-evoked potentials. *Clin Neurophysiol* 119:1705–1719.

Cunningham RT, Watt M, Winder J, McKinstry S, Lawson JT, Johnston CF, Hawkins SA, Buchanan KD (1996) Serum neurone-specific enolase as an indicator of stroke volume. *Eur J Clin Invest* 26:298–303.

Dassan P, Keir G, Brown MM (2009) Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: a review of S100B. *Cerebrovasc Dis* 27:295–302.

DCCT Research Group (1995) The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy. *Ann Int Med* 122:561–568.

DeFronzo RA, Abdul-Ghani M (2011) Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol* 108(3):3-24B.

De Luca CJ, Adam A, Wotiz R, Gilmore LD, Nawab SH (2006) Decomposition of surface EMG signals. *J Neurophysiol* 96(3):1646-1657.

De Luca CJ, Basmajian JV (1985) *Muscles Alive: Their Functions Revealed by Electromyography*. 5th Ed. Williams & Wilkins, 561p.

DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, Ginsburg DL, Bracht KA, Smith T, Boutros R, Loskota WJ, Rabinowicz AL (1995) Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology* 45(6):1134-1137.

DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, Ginsburg DL, Bracht KA, Smith T, Boutros R, Loskota WJ, Rabinowicz AL (1995) Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology* 45(6):1134-1137.

DeGiorgio CM, Gott PS, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Correale JD (1996) Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia* 37:606–609.

Di Legge S, Di Piero V, Di Stani F, Perna R, Gattuso R, Reale MG, Benedetti VF, Lenzi GL (2003) Carotid endarterectomy and gliofibrillar S100b protein release. *Neurol Sci* 24:351–356.

de Vegt F, Dekker JM, Jager A, Hienkens E, Kostense PJ, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, Heine RJ (2001) Relation of impaired fasting and postload glucose with incident type 2 diabetes in Dutch population: The HOORN Study. *JAMA* 285(16):2109-2113.

Diabetes Prevention Program Research Group (2002) Reduction of the incidence of type 2 diabetes with life style intervention or metformin. *N Engl J Med* 346(6): 393-403.

DiBenedetto M, Gale SD, Adames D, Schabacher M (2003) F-wave acquisition using low-current stimulation. *Muscle Nerve* 28:82–86.

Donato R (1983) Effect of S-100 protein on assembly of brain microtubule proteins in vitro. *FEBS Lett* 162(2):310-313.

Donato R (1984) Mechanism of action of S-100 protein(s) on brain microtubule protein assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 124(3):850-856.

Donato R (1991) Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium* 12(10):713-726.

Donato R (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450:191-231.

Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637–668.

Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60:540–551.

Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL (2013) Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 13(1):24-57.

Donato R (1986) S100B proteins. *Cell Calcium* 7:123-145.

Dyck PJ, Katz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, Wilson DM, O'Brien PC, Melton LJ, Service FJ (1993) 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.

Fanò G, Biocca S, Fulle S, Marigliò MA, Belia S, Calissano P (1995) A protein family in search of a function. *Prog. Neurobiol* 46:71–82.

Fanò G, Marigliò MA, Angelella P, Nicoletti P, Antonica A, Fulle S, Calissano P (1993) The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death of PC12 cells. *Neuroscience* 53:919–925.

Fassbender K, Schmidt R, Schreiner A, Fatar M, Mühlhauser F, Daffertshofer M, Hennerici M (1997) Leakage of brain-originated proteins in peripheral blood: temporal profile and diagnostic value in early ischemic stroke. *J Neurol Sci* 148:101–105.

Fierro B, Modica A, D'Arpa A, Santangelo R, Raimondo D (1987) Analyzis of F wave in metabolic neuropathies: a comparative study in uremic and diabetic patients. *Acta Neurol Scand* 75:179–185.

Filippidis AS, Papadopoulos DC, Kapsalaki EZ, Fountas KN (2010) Role of the S100B serum biomarker in the treatment of children suffering from mild traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 29(5):E2.

Fisher MA (1998) The contemporary role of F-wave studies. F-wave studies: clinical utility. *Muscle Nerve* 21:1098–1101.

Fisher MA, Hoffen B, Hultman C (1994) Normative F wave value and the number of recorded F waves. *Muscle Nerve* 17:1185–1189.

Fogel W, Krieger D, Veith M, Adams HP, Hund E, Storch-Hagenlocher B, Buggle F, Mathias D, Hacke W (1997) Serum neuron-specific enolase as early predictor of outcome after cardiac arrest. *Crit Care Med* 25:1133-1138.

Ford ES, Zhao G, Li C (2010) Pre-diabetes and the risk for cardiovascular disease: a systematic review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 55:1310-1317.

Fossa SD, Klepp O, Paus E (1992) Neuron specific enolase : a serum marker in seminoma? *British Journal of Cancer* 65:297–299.

Fraser JL, Olney RK (1992) The relative diagnostic sensitivity of different F-wave parameters in various polyneuropathies. *Muscle Nerve* 5:912–918.

Fulle S, Marigiò MA, Belia S, Nicoletti I, Fanò G (1997) Nerve growth factor inhibits apoptosis induced by S-100 binding in neuronal PC12 cells. *Neuroscience* 76:159–166.

Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E (2011) The metabolic syndrome – from insuline resistance to obesity and diabetes. *Med Clin North Am* 95(5):855-873.

Garcia-Larrea L (2012) Objective pain diagnostics: clinical neurophysiology. *Neurophysiol Clin* 42(4):187-197.

Ghanem G, Loir B, Morandini S, Sales F, Lienard D, Eggermont A, Lejeune F (2001) On the release and half-time of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer* 94:586-590.

Gooch, C. & D. Podwall (2004) The diabetic neuropathies. *Neurologist* 10:311–322.

Gottesman RF, Wityk RJ (2006) Brain injury from cardiac bypass procedures. *Semin Neurol* 26:432–439.

Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN (1997) Increased S-100beta in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett* 235:5–8.

Griffin WS, Yeralan O, Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, Rovnaghi CR, Burnett BA, Feoktistova A, Van Eldik LJ (1995) Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem* 65:228–233.

Griffin WST, Stanley LC, Ling C, White LM, White CL, Araoz C (1989) Brain interleukin-1 and S-100b immunoreactivity elevated in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7611–7615.

Gruener G, Dyck PJ (1994) Quantitative sensory testing: methodology, applications, and future directions. *J Clin Neurophysiol* 11:568–583.

Guérit JM, Amantini A, Amodio P, Andersen KV, Butler S, de Weerd A, Facco E, Fischer C, Hantson P, Jääntti V, Lamblin MD, Litscher G, Péréon Y (2009) Consensus

on the use of neurophysiological tests in the intensive care unit (ICU): electroencephalogram (EEG), evoked potentials (EP), and electroneuromyography (ENMG). *Neurophysiol Clin* 39(2):71-83.

Haimoto H, Hosoda S, Kato K (1987) Differential distribution of immunoreactive S100-a and S100- β proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest* 57:489-498.

Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Olsson Y, Pahlman S, Persson L (1989) S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg* 71(5 Pt 1):727-731.

Haring JH, Hagan A, Olson J, Rodgers B (1993) Hippocampal serotonin levels influence the expression of S-100b detected by immunocytochemistry. *Brain Res* 631:119-123.

Hatfield RH, McKernan RM (1992) CSF neuron-specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat model. *Brain Res* 577:249-252.

Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:d1356-1368.

Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert AD, Fork ML, Synowitz H (2001) Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:95-100.

Herrmann M, Curio N, Jost S, Wunderlich MT, Synowitz H, Wallesch CW (1999) Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of the severity of traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci* 14:109-114.

Holzer SE, Camerota A, Martens L, Cuerdon T, Crystal-Peters J, Zagari M (1998) Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. *Clin Ther* 20:169-181.

Honet JC, Jepsen RH, Perrin EB (1968) Variability of nerve conduction velocity determinations in normal persons. *Arch Phys Med Rehabil* 650–654.

Horani M, Mooradian AD (2003) Diabetes and the blood–brain barrier. *Curr Pharm Des* 9:833–840.

Horn M, Seger F, Schlote W (1995) Neuron-specific enolase in gerbil brain and serum after transient cerebral ischemia. *Stroke* 26:290–297.

Hovsepyan MR, Haas MJ, Boyajyan AS, Guevorkyan AA, Mamikonyan AA, Myers SE, Mooradian AD (2004) Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neurosci Lett* 369(3):224–227.

Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ (1997) S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 69:2294–2301.

Hursh JB (1939) Conduction velocity and diameter of nerve fibers. *Am J Physiol* 127:131–139.

Ingebrigtsen T, Romner B (2002) Biochemical serum markers of traumatic brain injury. *J Trauma* 52:798–808.

Ishiguro Y, Kato K, Ito T, Nagaya M, Yamada N, Sugito T (1983) Nervous system-specific enolase in serum as a marker for neuroblastoma. *Pediatrics* 72:696–700.

James C, Bullard KM, Rolka DB, Geiss LS, Williams DE, Cowie CC, Albright A, Gregg EW (2011) Implications of Alternative Definitions of Prediabetes for Prevalence in U.S. Adults. *Diabetes Care* 34:387–391.

Jablecki CK, Andary MT, Floeter MK, Miller RG, Quartly CA, Vennix MJ, Wilson JR, American Association of Electrodiagnostic Medicine, American Academy of Neurology, American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation (2002) Practice parameter: Electrodiagnostic studies in carpal tunnel syndrome. Report of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, American Academy of

Neurology, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 58(11):1589-1592.

Jimi T, Wakayama Y, Shibuya S, Nakata H, Tomaru T, Takahashi Y, Kosaka K, Asano T, Kato K (1992) High levels of nervous system specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Chim Acta* 211:37–46.

Johnson EW, Pease WS (1997) Practical electromyography. 3rd ed, Williams & Wilkins, 398p.

Jonsson H, Jonsson P, Hoglund P, Alling C, Blomquist S (2000) Elimination of S100B and renal function after cardiac surgery. *Cardiothorac Vasc Anesth* 14:698-701.

Kaiser E, Kuzmits R, Pregant P, Burghuber O, Worofka W (1989) Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clinica Chimica Acta* 183:13-32.

Kapur M, Krizanac-Bengez LJ, Barnett G, Perl J, Masaryk T, Apollo D, Rasmussen P, Mayberg MR, Janigro D (2002) Serum S-100beta as a possible marker of blood–brain barrier disruption. *Brain Res* 940:102–104.

Karkela J, Bock E, Kaukinen S (1993) CSF and serum brain-specific creatine kinase isoenzyme (CK-BB), Neuron specific enolase (NSE) and neural cell adhesion molecule (NCAM) as prognostic markers for hypoxic brain injury after cardiac arrest in man. *J Neur Sci* 116:100–109.

Katirji B. The clinical electromyography examination. An overview. *Neurol Clin* 20(2):291-303.

Kato K, Kimura S (1985) S100a0 (aa) protein is mainly located in the heart and striated muscles. *Biochim Biophys Acta* 842:146-150.

Ke Ping X, Shang Lian L, Chuo N (1995) Immunohistochemical evidence of neuronal and glial differentiation in retinoblastoma. *British Journal of Ophthalmology* 79:771–776.

Kennedy JM, Zochodne DW (2005) Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 10:144–157.

Kim JS, Yoon SS, Kim YH, Ryu JS (1996) Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor- β , and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke* 27:1553–1557.

Kimura J (1974) F-wave velocity in the central segment of the median and ulnar nerves. A study in normal subjects and in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology (Minneapolis)* 24:539.

Kimura J (2001) *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle*. 3rd ed, Oxford University Press, 1024p.

Kirino T, Brightman MW, Oertel WH, Schmechel DE, Marangos PJ (1983) Neuron-specific enolase as an index of neuronal regeneration and reinnervation. *J Neurosci* 3(5):915-923.

Kleine TO, Benes L, Zöfel P (2003) Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients. *Brain Res Bull* 61:265–279.

Konstantinou EA, Venetsanou K, Mitsos AP, Mamoura KV, Theodosopoulou EE, Fotis T, Baltopoulos G (2008) Neuron specific enolase (NSE): a valuable prognostic factor of central nervous system dysfunction following cardiac surgery. *Brit J Anaesth Recov Nurs* 9:22–28.

Korfias S, Stranjalis G, Papadimitriou A, Psachoulia C, Daskalakis G, Antsaklis A, Sakas DE (2006) Serum S-100B protein as a biochemical marker of brain injury: a review of current concepts. *Curr Med Chem* 13:3719-3731.

Kostera-Pruszczyk A, Rowinska-Marcinska K, Owsiak S, Jeziński P, Emeryk-Szajewska B (2004) F-wave amplitude in peripheral nervous system lesions. *Neurol Neurochir Pol* 38(6):465-470.

Kövesdi E, Lückl J, Bukovics P, Farkas O, Pál J, Czeiter E, Szellár D, Dóczi T, Komoly S, Büki A (2010) Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. *Acta Neurochir (Wien)* 152:1–17.

Krarpup C (2004) Compound sensory action potential in normal and pathological human nerves. *Muscle Nerve* 29(4):465-483.

Kubista H, Donato R, Hermann A (1999) S100 calcium binding protein affects neuronal electrical discharge activity by modulation of potassium currents. *Neuroscience* 90(2):493-508.

Kumar S, Ashe HC, Parnell LN, Fernando DJ, Tsigos C, Young RJ, Ward JD, Boulton AJM (1994) The prevalence of foot ulceration and its correlates in type 2 diabetes: a population-based study. *Diabet Med* 11:480–484.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC, BRAIN Study Group (2009) Clinical Usefulness of a Biomarker-Based Diagnostic Test for Acute Stroke: The Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) Study. *Stroke* 40:77–85.

Leffler AS, Hansson P (2008) Painful traumatic peripheral partial nerve injury-sensory dysfunction profiles comparing outcomes of bedside examination and quantitative sensory testing. *Eur J Pain* 12:397–402.

Li J, Zhang H, Xie M, Yan L, Chen J, Wang H (2013) NSE, a Potential Biomarker, Is Closely Connected to Diabetic Peripheral Neuropathy. *Diabetes Care* 36(11):3405-3410.

Li Y, Wang J, Sheng JG, Liu L, Barger SW, Jones RA, Van Eldik L, Mrak RE, Griffin WST (1998) S-100b increases levels of amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J Neurochem* 71:1421–1428.

Li Z, Hu X, Tang N (2006) Significance of neuroelectrophysiological tests in the early diagnosis of sub-clinical neuropathy with diabetes mellitus. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26(4):429-431.

Lippi G, Aloe R, Numeroso F, Cervellin G (2011) The significance of protein S-100B testing in cardiac arrest patients. *Clin Biochem* 44:567–575.

Lorenz J, Dippold W (1989) Neuron-specific enolase: a marker for malignant melanoma. *Journal of National Cancer Institute* 81:1754–1755.

Magerl W, Krumova EK, Baron R, Tölle T, Treede RD, Maier C (2010) Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *Pain* 151:598–605.

Magladery JW, McDougal DB (1950) Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. I. Identification of certain reflexes in the electromyogram and the conduction velocity of peripheral nerve fibers. *Bull Johns Hopkins Hosp* 86:265–290.

Malerbi D, Franco LJ, the Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence (1992) Multicenter Study of the Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 years. *Diabetes Care* 15(11):1509-1516.

Marangos PJ, Schmechel DE (1987) Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* 10:269–295.

Marchi N, Rasmussen P, Kapural M, Fazio V, Kight K, Mayberg MR, Kanner A, Ayumar B, Albeni B, Cavaglia M, Janigro D (2003) Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction. *Restor Neurol Neuros* 21:109–121.

Marieb EN, Hoehn K (2007) *Human Anatomy & Physiology*. 7th ed, London, UK, Pearson, 1114p.

Massaron S, Seregini E, Luksch R, Casanova M, Botti C, Ferrari L, Martinetti A, Molteni SN, Bellani FF, Bombardieri E (1998) Neuron-specific enolase evaluation in patients with neuroblastoma. *Tumour Biology* 19:261–268.

Mayer SA, Linares G (2009) Can a simple blood test quantify brain injury? *Crit Care* 13:166–167.

McCall AL (2002) Diabetes mellitus and the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* 51:415–453.

Mesrati F, Vecchierini MF (2004) F-waves: neurophysiology and clinical value. *Neurophysiol Clin* 34(5):217-243.

Mijnhout GS, Scheltens P, Diamant M, Biessels GJ, Wessels AM, Simsek S, Snoek FJ, Heine RJ (2006) Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition. *Diabetologia* 49:1447–1448.

Misra UK, Kalita (2006) *Clinical Neurophysiology*. 2nd ed, Reed Elsevier India Pvt. Limited, New Delhi, 488p.

Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M (1997) S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 28:1956–1960.

Mokuno K, Kiyosawa K, Sugimura K, Yasuda T, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Takahashi A, Kato K (1994) Prognostic value of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase and S-100b protein in Guillain-Barré syndrome. *Acta Neurol Scand* 89(1):27-30.

Mooradian AD (1997) Central nervous system complications of diabetes mellitus, a perspective from the blood–brain barrier. *Brain Res Rev* 23:210–218.

Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 19:739–744.

Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, Wiedemann E, Gippner-Steppert C, Mutschler W, Jochum M (2002) Serum S-100B and interleukin-8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 30:2669-2674.

Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, Wiedemann E, Gippner-Steppert C, Mutschler W, Jochum M (2002) Serum S-100B and interleukin-8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 30:2669-2674.

Nobrega JAM, Manzano GM, Novo NF, Monteagudo PT (1999) Sample size and the study of F waves. *Muscle Nerve* 22:1275–1278.

O'Brien PC, Dyck PJ (1995) Procedures for setting normal values. *Neurology* 45:17–23.

Oertel M, Schumacher U, McArthur DL, Kästner S, Böker DK (2006) S-100B and NSE: markers of initial impact of subarachnoid haemorrhage and their relation to vasospasm and outcome. *J Clin Neurosci* 13(8):834-840.

Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M (1995) Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 28:103–117.

Ollendorf DA, Kotsanos JG, Wishner WJ, Friedman M, Cooper T, Bittoni M, Oster G (1998) Potential economic benefits of lower-extremity amputation prevention strategies in diabetes. *Diabetes Care* 21:1240–1245.

Olney RK (1998) Neurophysiological evaluation and clinical trials for neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 21:1365–1367.

Panayiotopoulos CP (1979) F chronodispersion. A new electrophysiologic method. *Muscle Nerve* 2:68–72.

Panayiotopoulos CP, Chroni E (1996) F-waves in clinical neurophysiology: a review, methodological issues and overall value in peripheral neuropathies. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 101:365–374.

Pasqualotto KR, Alberton D, Frigeri HR (2012) Diabetes mellitus and Complications. *J Biotec Biodivers* 3(4):134-145.

Pastore C, Izura V, Geijo-Barrientos E, Dominguez JR (1999) A comparison of electrophysiological tests for the early diagnosis of diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 22:1667–1673.

Pedrosa HC, Macedo GC, Ribeiro J (2006) Pé diabético. *Diabetes Mellitus Diagaphic* 557-568.

Pfau DB, Geber C, Birklein F, Treede RD (2012) Quantitative sensory testing of neuropathic pain patients: potential mechanistic and therapeutic implications. *Curr Pain Headache Rep* 16(3):199-206.

Pham N, Fazio V, Cucullo L, Teng Q, Biberthaler P, Bazarian JJ, Janigro D (2010) Extracranial sources of S100B do not affect serum levels. *PLoS One* 5(9).

Poncelet AN (1998) An algorithm for the evaluation of peripheral neuropathy. *Am Fam Physician* 57:755–764.

Prehn JHM, Welsch M, Backhaus C, Nuglisch J, Ausmeier F, Karkoutly C, Kriegelstein J (1993) Effects of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. *Brain Res* 630:110–120.

Preston D, Shapiro B (2005) Electromyography and Neuromuscular Disorders. 2nd ed, Butterworth-Heinemann, Elsevier, 704p.

Raabe A, Grolms C, Sorge O, Zimmermann M, Seifert V (1999) Serum S-100B protein in severe head injury. *Neurosurgery* 45:477-483.

Raabe A, Menon DK, Gupta S, Czosnyka M, Pickard JD (1998) Jugular venous and arterial concentrations of serum S-100B protein in patients with severe head injury: a pilot study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:930-932.

Ramsey SD, Newton K, Blough D, McCulloch DK, Sandhu N, Reiber GE, Wagner EH (1999) Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care* 22:382-387.

Rasmussen LS, Poulsen MG, Christiansen M, Jansen EC (2004) Biochemical markers for brain damage after carbon monoxide poisoning. *Acta Anaesthesiol Scand* 48:469-473.

Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK, Laskowitz DT, Valkirs GE, Buechler KF (2003) Early biomarkers of stroke. *Clin Chem* 49:1733-1739.

Rith-Najarian S, Branchaud C, Beaulieu O, Gohdes D, Simonson G, Mazze R (1998) Reducing lower extremity amputations due to diabetes: application of the staged diabetes management approach in a primary care setting. *J Fam Pract* 47:127-132.

Ryder RE (1998) Screening for diabetic retinopathy in the 21st century. *Diabetic Medicine* 15:721-722.

Rosén H, Rosengren L, Herlitz J, Blomstrand C (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29:473-477.

Rosén H, Sunnerhagen KS, Herlitz J, Blomstrand C, Rosengren L (2001) Serum levels of the brain-derived proteins S-100 and NSE predict long-term outcome after cardiac arrest. *Resuscitation* 49(2):183-191.

Sandhu HS, Butt AN, Powrie J, Swaminathan R (2008) Measurement of circulating neuron-specific enolase mRNA in diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 1137:258–263.

Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemelä O, Hillbom M (2004) Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma* 56:1229–1234.

Schäfer BW, Heizmann CW (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21:134-140.

Schestatsky P, Stefani LC, Sanches PR, Silva Júnior DP, Torres IL, Dall-Agnol L, Balbinot LF, Caumo W (2011) Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies. *Arq Neuropsiquiatr* 69(6):943-948.

Selakovic V, Raicevic R, Radenovic L (2005) The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci* 12:542–547.

Selvarajah D, Tesfaye S (2006) Central nervous system involvement in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 6(6):431-438.

Semkova I, Wolz P, Krieglstein J (1998) Neuroprotective effect of 5-HT_{1A} receptor agonist, Bay x 3702, demonstrated in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 359:251–260.

Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW (1984) Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem* 42(6):1536-1541.

Sheng JG, Mrak RE, Griffin WST (1994) S-100b protein expression in Alzheimer's disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J Neurosci Res* 39:398–404.

Shinozaki K, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Abe R, Tateishi Y, Hattori N, Shimada T, Hirasawa H (2009) S-100B and neuron-specific enolase as

predictors of neurological outcome in patients after cardiac arrest and return of spontaneous circulation: a systematic review. *Crit Care* 13:1–12.

Shy ME, Frohman EM, So YT, Arezzo JC, Cornblath DR, Giuliani MJ, Kincaid JC, Ochoa JL, Parry GJ, Weimer LH, Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology (2003) Quantitative sensory testing: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 60(6):898-904.

Siao P, Cros DP (2003) Quantitative sensory testing. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 14:261–286.

Singleton JR, Smith AG, Bromberg MB (2001) Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes Care* 24(8):1448-1453.

Singleton JR, Smith AG, Russel JW, Feldman EL (2003) Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 52:2867-2873.

Skogseid I, Nordby H, Urdal P, Paus E, Lilleaas F (1992) Increased serum creatine kinase BB and neuron specific enolase following head injury indicated brain damage. *Acta Neurochir (Wien)* 115:106–111.

Sociedade Brasileira de Diabetes (2009) Diretrizes. Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus. Rio de Janeiro, 332p.

Sociedade Brasileira de Diabetes (2007) Consenso Brasileiro de Tratamento e Acompanhamento do Diabete Mellitus. Rio de janeiro: Diagrafic.

Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R (1998) Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim Biophys Acta* 1448(2):277-289.

Souza CF, Gross JL, Gerchman F, Leitão CB (2012) Prediabetes: diagnosis, evaluation of chronic complications, and treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 56(5):275-284.

Strachan MW, Abraha HD, Sherwood RA, Lammie GA, Deary IJ, Ewing FM, Perros P, Frier BM (1999) Evaluation of serum markers of neuronal damage following severe hypoglycaemia in adults with insulin-treated diabetes mellitus. *Diabet Metab Res Rev* 15:5–12.

Suchanek B, Struppeck H, Fahrig T (1998) The 5-HT_{1A} receptor agonist, Bay x 3702, prevents staurosporine-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol* 355:95–101.

Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P; Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group (2010) Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 33(10):2285-2293.

Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimaki M (2012) Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet* 379:2279–2290.

Torquato MT, Montenegro Júnior RM, Viana LA, de Souza RA, Lanna CM, Lucas JC, Bidurin C, Foss MC (2003) Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med J* 121(6):224-230.

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J (2008) Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630–1635.

UK Prospective Diabetes Study (1998a) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352:837–853.

UK Prospective Diabetes Study (1998b) Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352:854–865

Van de Pol M, Twijnstra A, Velde G, Menheere P (1994) Neuron-specific enolase as a marker of brain metastasis in patients with small-cell lung carcinoma. *J Neurooncol* 19:149–154.

Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO (1991) Neurotrophic activity of S-100b in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal brain. *Brain Res* 542:280–285.

Van Eldik LJ, Griffin WS (1994) S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta* 1223:398–403.

Van Eldik LJ, Zimmer DB (1987) Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res* 436(2):367-370.

Van Munster BC, Korse CM, De Rooij SE, Bonfrer JM, Zwinderman AH, Korevaar JC (2009) Markers of cerebral damage during delirium in elderly patients with hip fracture. *BMC Neurol* 9:21.

Vázquez MD, Sánchez-Rodríguez F, Osuna E, Diaz J, Cox DE, Pérez-Cárceles MD, Martínez P, Luna A, Pounder DJ (1995) Creatine kinase BB and neuron specific enolase in cerebrospinal fluid in the diagnosis of brain insult. *Am J Forensic Med Pathol* 16:210–214.

Vinik AI, Maser RE, Mitchell B, Freeman R (2003) Diabetic autonomic neuropathy: a technical review. *Diabetes Care* 26:1553–1579.

Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, Edwards M, Rosmalen CF, Vissers JL (2010) GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology* 75(20):1786-1793.

Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342–367.

Weber F (1998) The diagnostic sensitivity of different F wave parameters. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:535–540.

Westaby S, Johnsson P, Parry AJ, Blomqvist S, Solem JO, Alling C, Pillai R, Taggart DP, Grebenik C, Ståhl E (1996) Serum S100 protein: a potential marker for cerebral events during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 61:88-92.

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC (1989) Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 497:80–86.

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC (1990) S-100 protein is released from astroglial cells by stimulation of 5-HT_{1A} receptors. *Brain Res* 528:155–158.

Whittaker RG (2012) The fundamentals of electromyography. *Pract Neurol* 12(3):187-194.

Wiesmann M, Missler U, Hagenstrom H, Gottmann D (1997) S-100 protein plasma levels after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 139:1155–1160.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27(5):1047-1053.

Wilson J, Chawla J, Fisher M (2005) Sensitivity and specificity of electrodiagnostic criteria for CIDP using ROC curves: comparison to patients with diabetic and MGUS associated neuropathies. *J Neurol Sci* 231:19–28.

Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A (2000) Time profile of neuron specific enolase serum levels after experimental brain injury in rat. *Acta Neurochir Suppl* 76:371-373.

World Health Organization. Diabetes Programme. Geneva, WHO 2010.

World Health Organization. Diabetes Programme. Geneva, WHO 2012.

World Health Organization. World Diabetes Day 2012. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acessado em 15 Out. 2013.

Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M (1999) Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190–1195.

Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M (2004) Release of neurobiochemical markers of brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 227(1):49-53.

Yamazaki Y, Yada K, Morii S, Kitahara T, Ohwada T (1995) Diagnostic significance of serum neuron-specific enolase and myelin basic protein assay in patients with acute head trauma. *Surg Neurol* 43:267–271.

Yang Q, Hamberger A, Wang S, Haglid KG (1996) Appearance of neuronal S-100b during development of the brain. *Dev Brain Res* 91:181–189.

Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R (2003) Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 69:229–285.

Young MJ, Boulton AJM, McLeod AF, Williams DRR, Sonksen PH (1993) A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the UK hospital clinic population. *Diabetologia* 36:150–156.

Ytrebo LM, Ingebrigtsen T, Nedredal I, Elvenes OP, Korvald C, Rommer B, Revhaug A (2000) Protein S-100b. A biochemical marker for increased intracranial pressure in pigs with acute hepatic failure. *Scand J Gastroenterol* 35:546-551.

Ytrebo LM, Nedredal GI, Korvald C, Holm Nielsen OJ, Ingebrigtsen T, Romner B, Aarbakke J, Revhaug A (2001) Renal elimination of protein S-100 beta in pigs with acute encephalopathy. *Scand J Clin Lab Invest* 61:217-225.

Zeltzer PM, Schneider SL, Marangos PJ, Zweig MH (1986) Differential expression of neural isozymes by human medulloblastomas and gliomas and neuroectodermal cell lines. *Journal of National Cancer Institute* 77:625–631.

Zerr I, Bodemer M, Racker S, Grosche S, Poser S, Kretschmar HA, Weber T (1995) Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt Jacob disease. *Lancet* 24:1609–1610.

Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.

Zolese G, Tangorra A, Curatola G, Giambanco I, Donato R (1988) Interaction of S-100b protein with cardiolipin vesicles as monitored by electron spin resonance, pyrene fluorescence and circular dichroism. *Cell Calcium* 9(3):149-157.

Zomzely-Neurath CE (1983) Enolase. In: Lajtha A (ed) *Handbook of Neurochemistry*, 2nd ed, New York: Plenum, p. 403–433.

8. MANUSCRITO 1 – VERSÃO PRELIMINAR

(Será submetido ao periódico *Clinical Neurophysiology Journal*)

NEUROPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY OF SUBJECTS WITH DIFFERENT DEGREES OF GLUCOSE TOLERANCE (NORMAL, PREDIABETIC AND DIABETIC)

Pablo Brea Winckler^{1,2}, Isabel Cristina Bandeira^{1,3}, Bruna Mezzari Milanez⁴, Michele Finkler⁴, Andressa Wigner Brochier⁵, Fernando Gerchman^{6,4}, Jean Pierre Oses⁵, Luiz Valmor Cruz Portela^{5,4}, Pedro Schestatsky^{1,2,4}

1- Post Graduation Programme in Medicine: Medical Sciences – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2- Neurology Department - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

3- Laboratory Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences - BRAIN

4- Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS

5- Post Graduation Program in Biochemistry - Department of Biochemistry - UFRGS

6- Endocrinology Department - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Corresponding author:

Pedro Schestatsky

Neurology and Neurophysiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: psches@hcpa.ufrgs.br

Phone number/FAX: 51-33598182

ABSTRACT

BACKGROUND: Type 2 diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by the presence of chronic hyperglycemia. Previous studies demonstrated that patients with prediabetes states (PDM) have a natural history of progression to DM. Neuropathy is the most common and disabling complication of diabetes and recent advances in neurophysiology have enabled a refinement of neurophysiological diagnostic techniques such as sympathetic skin response (SSR) and quantitative sensory testing (QST). Biomarkers like Neuron-specific Enolase (NSE) and S100-Beta Protein (S100B) has been described for many authors as associated with damage at nervous system cells and are related with severity of injury as well as clinical outcomes.

OBJECTIVE: The aim of this study is to evaluate neurophysiological findings and compare them with clinical and biochemical findings (S100B and NSE) in patients with DM, PDM and healthy controls.

METHODS: Patients at the outpatient Neurology and Endocrinology service were randomized in a cross-sectional study. Participants underwent a battery of clinical and neurophysiological tests that encompassed nerve conduction studies, F-wave, SSR and QST. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) were performed to quantify serum levels of NSE and S100B.

RESULTS: There were no difference regarding clinical evaluation, nerve conduction studies and F-wave were between groups. The QST thresholds of warm (QSTw) and QST pain (QSTp) were significantly elevated in patients with PDM and DM compared to controls ($P < 0.05$ for all comparisons). However, these parameters were not able to distinguish among DM and PDM ($P > 0.1$ for all comparisons). The SSR was able to differentiate DM from control group ($P < 0.01$) but did not show difference between PDM and control groups ($P = 0.6$). There was no difference on levels of S100B ($P = 0.6$) and NSE ($P = 0.2$) between the DM, PDM and control groups.

CONCLUSION: The QST and SSR are useful tests to evaluating patients with different degrees of glucose tolerance. This study found no differences between biomarkers NSE and S100B in subjects with DM and PDM.

KEYWORDS: S100B, NSE, diabetes, prediabetes, QST, neurophysiology, impaired glucose tolerance.

Introduction

Recent advances in Neurophysiology have enabled a refinement of neurophysiological diagnostic techniques, allowing clinical researchers to more accurately diagnose neuropathies. In addition to conventional studies performed in electromyography like nerve conduction studies (NCS) and F-wave, special techniques as sympathetic skin response (SSR) and quantitative sensory testing (QST) can be used to improve the diagnosis and characterization of peripheral nerve disorders [1].

Type II diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by the presence of chronic hyperglycemia accompanied by greater or lesser impairment in the metabolism. The origin and etiology of diabetes mellitus can vary greatly but always include defects of insulin secretion, insulin response or both at some point in the course of the disease [2]. DM often impairs the nervous system (NS), with clinical symptoms usually developing 15 to 20 years following the appearance of hyperglycemia. While the damage of the NS is rarely a direct cause of death, it is very frequently a major cause of morbidity [3].

Diabetic neuropathy (DN) is defined as presence signs and symptoms of peripheral nerve dysfunction in cases of diabetes after exclusion of other possible causes that could be related to this dysfunction [3]. The neuropathies associated with diabetes are heterogeneous, which leads to a variety of clinical manifestations that may be focal or diffuse [4].

Previous studies demonstrated that patients with prediabetes states (PDM) have a natural history of progression to DM type 2 (DMII). Traditionally, neuropathy in PDM and early DM is related to small myelinated and unmyelinated fibers responsible for sensation of light touch, pain and temperature [4,5]. However, there is convincing evidence of the involvement of the central nervous system (CNS) in the pathogenesis of early stages of diabetic neuropathy [3,4,6-8].

The S100-Beta Protein (S100B) is found abundantly in the cytosol of glial cells mainly at CNS but also at peripheral nervous system (astrocytes and Schwann cells respectively). When affected by injury process may cause serum levels increase. The Neuron-Specific Enolase (NSE) found in the cytoplasm of neurons is considered a marker of cerebral injury, it is assumed that this enzyme is released during a process of cell destruction [7,9,10].

Therefore, it is plausible to measure NSE and S100B in PDM and DM subjects. The aim of this study is evaluate neurophysiological findings and serum levels of the proteins S100B and NSE in patients with DM, PDM and health controls.

Subjects and Methods

Subject selection and Ethical aspects

Participants from the outpatient Neurology and Endocrinology service of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) were randomly enrolled after meet inclusion criteria of PDM or DM and be over 18 year old in a cross-sectional study. Hospital staff who agreed to participate in the study and did not meet criteria for DM or PDM represent the study controls. Individuals with previous Neurology or Endocrinology comorbidities apart from DM or PDM were excluded. All participants signed an informed consent. The HCPA research ethics board approved the study. Participants formed three groups: DM, PDM and controls.

Clinical evaluation

Initially we clinically assessed the Michigan Neuropathy Screening [11] and the Survey of Autonomic Symptoms [12]. Assessors were blind for patients group and did not engage with the following neurophysiological analysis.

Conventional Neurophysiological Tests (NCS/ F-wave / SSR)

We analyzed performed NCS from sural nerve and tibial nerve at right side as well as F-wave responses according to standard technics [13,14] using a *Medelec Synergy*® electroneuromyograph. Ten artifact free F-wave responses using stimuli with an intensity of 10% above the level for maximal M wave response were recorded to access the minimum F-wave latency of each subject [15]. The SSR was examined in the right foot using conventional methods [16,17]. The active surface electrode was placed on the sole of the foot and the reference electrode on the dorsum of the foot. Responses were recorded in a time window of 10 seconds, a gain of 0.2 mV, and a band pass frequency filter of 0.1 Hz to 0.5 KHz. Electrical stimuli of 30 mA intensity were delivered to the median nerve at wrist in order to generate SSR at foot [16,17].

Quantitative Sensory Testing (QST)

Warm and pain thresholds were assessed with the method of limits [18]. The thermode was placed on the nondominant forearm (Figure 1). After a warning signal, the temperature rose from an adaptation temperature of 30°C with a ramp rate of 1°C/s. The participant was asked to press as quickly as possible a button at the moment the stimulation became warm or painful. Three assessments were taken with an interstimulus interval of 40 seconds and thresholds were calculated by taking the average temperature of the three assessments (Figure 2). Thermoalgesic stimuli were applied at the skin of forearm ventral face with a contact thermode of 12.5 cm² at a ramp rate of 1C/s. We used the method of limits to determine warm and heat pain thresholds in all patients. Thresholds were defined as the mean value of three stimuli separated by inter-stimuli intervals of at least 60 s [19]. After the clinical and neurophysiological assessment, blood samples were collected.

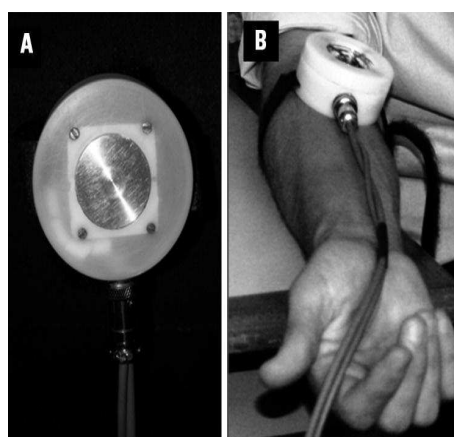


Figure 1.
Quantitative sensory testing devices(A).
Thermode position of the thermode in the arm(B).

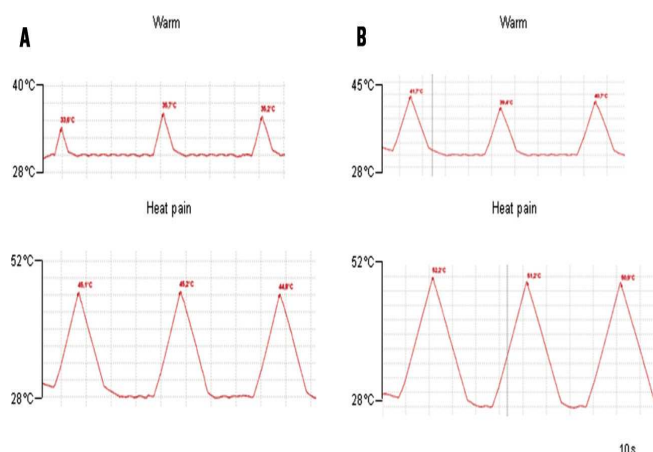


Figure 2.
Thermal thresholds in normal subjects(A) and patients with small fiber disease(B).
Note higher thresholds for warm and pain sensation in a illustrative patient.

S100B and NSE measurement

Blood samples (3 ml) for S100B and NSE levels measurement were collected by venipuncture with a vacuum system tube without anticoagulants by a trained professional. Serum was obtained by centrifugation at 5,000 × g for 5 min and, soon thereafter, it was frozen at -70°C until analysis. NSE and S100B serum levels were quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; DiaSorin SpA,

Saluggia, Italy and and Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, respectively) respectively, according to the manufacturer's instructions. The detection limit of the S100B immunoassay is 0.02 µg/L, the measuring range is comprised between 0.02 and 30 µg/L, the total imprecision (CV) is lower than 10%. Values above 0.5 ug/L are considered "pathological" and 0.15-0.5ug/L "borderline" according previous studies and the recommendations of the commercial representative [20, 21]. For NSE, the lower limits of detection of the ELISA are 1.00 ng/mL. Normal values for NSE in adult patients are less than 12.5 ng/mL. According to the laboratory that did the measurements, pathological values were greater than 30 ng/mL. Therefore, NSE data were stratified into normal (<12.5 ng/mL), intermediate (12.5 a 30.0 ng/mL) and high (>30 ng/mL) [21].

Statistical analysis

We used nonparametric test Kruskal–Wallis for analisis of biomarkers. Tukey test were used for demographic variables and QST, ANOVA one-way for NCS variables. Associations between categories of variables were measured by the χ^2 test. Multivariate regression analysis was undertaken with outcome variables as dependent variables. Statistical calculations were performed with SPSS v 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical significance was achieved if $P < 0.05$.

Results

The clinical and demographic characteristics of the patients (DM and PDM) and controls are depicted in Table 1. We observed that there was no statistically significant difference among those three study groups regarding age ($P = 0.1$), weight ($P = 0.1$), gender ($P = 0.4$), BMI ($P = 0.2$), Michigan Neuropathy Screening ($P = 0.4$) and the Survey of Autonomic Symptoms ($P = 0.2$).

Table 1. Demographic data among the groups

Variables	Diabetes (n=25)	Prediabetes (n=11)	Control (n=13)	P value ¹
Age (years)*	56 (53-59)	61 (54-69)	55 (50-60)	0.1
Sex, Male/ Female (%)	64 / 36	45.5 / 54.5	69.2 / 30.8	0.4
Weight*	82 (66.5-99)	73 (63-79)	80.9 (73.1-88.7)	0.1
Height*	165 (156-171)	165 (153-168)	170 (159-170)	0.7
BMI*	30.6 (28.2-33.0)	27.5 (24.3-30.6)	29.6 (27.3-31.8)	0.2
Michigan Screening*	1.2 (0-6)	1.0 (0-4)	0.81 (0-2.5)	0.4
Autonomic Survey*	1.62 (0-5)	1.19 (0-4)	1 (0-3)	0.2

¹ Insignificant values $P > 0.05$

* Mean values with lower and upper bound

There was statistically significant difference between groups regarding sympathetic skin response (SSR) amplitude at foot. No differences between nerve conduction and F-wave were observed among groups (Table 2).

Table 2. Nerve conduction values between the groups of study

	Variables	Diabetes (n=25)	Prediabetes (n=11)	Healthy control (n=13)	P value ¹
Sural	Latency (ms)	3.20 (0.79)	3.11±0.86	3.16±0.69	0.1
	Amplitude (mV)	11.23±1.96	12.08±2.61	12.50±2.16	0.4
	Velocity (m/s)	44.65±4.33	46.57±3.75	46.89±4.44	0.1
Tibial	Latency (ms)	3.93±0.73	4.31±0.65	3.99±0.75	0.7
	Amplitude (mV)	6.07±1.76	5.65±1.56	6.83±2.20	0.2
F-wave	Minimum Latency (ms)	51.3±3.5	48.8±5.0	49.0±2.9	0.4
SSR	Amplitude (mV)	1.2±0.6	1.3±0.3	1.4±0.5	<0.001

Concerning SSR measured in foot (See Table 3), the DM group was significantly different from control ($P < 0.01$) and PDM group ($P = 0.013$), but show no significant difference between groups PDM and control ($P = 0.65$).

Table 3. Post-hoc analysis of SSR abnormalities between groups

SSR	Groups comparison		P value
	DM	PDM	0.01*
	Controls	<0.001*	
PDM	DM	0.01*	
	Controls	0.65	

* Significant values $P < 0.05$

There was statistically significant difference of thermal thresholds among groups DM, PDM and controls regarding QST warm (QSTw) and QST pain (QSTp) (see Table 4).

With respect to the results of the QSTw, we found statistically difference between groups DM versus control ($P = 0.001$) and PDM versus control ($P = 0.01$). Between DM and PDM there was no significant difference ($P = 0.8$). Regarding QSTp, there were also significance related to the groups DM versus control ($P < 0.001$) and PDM versus control ($P = 0.02$), although there was no significant difference between the groups PDM and DM ($P = 0.89$) (Table 5).

Table 4. Thermal thresholds ($^{\circ}\text{C}$) among groups

Variables	Diabetes (n=25)	Prediabetes (n=11)	Healthy control (n=13)	P value ¹
QST warm ($^{\circ}\text{C}$) [†]	42 \pm 1.8	41 \pm 2.1	37 \pm 1.5	0.001
QST pain ($^{\circ}\text{C}$) [†]	51 \pm 2.3	49 \pm 1.9	45 \pm 2.3	0.02

¹ Significant values $P < 0.05$ [†] Data are the mean and standard deviation

Table 5. Profile data of the Quantitative Sensory Testing evaluation in the groups

	Groups comparison		P value*
	QST warm	DM	PDM
Controls			0.001*
PDM		DM	0.8
		Controls	0.01*
QST pain	DM	PDM	0.08
		Controls	<0.001*
	PDM	PDM	0.08
		Controls	0.02*

* Significant values $P < 0.05$

No statistically significant difference was observed regarding biomarkers S100B ($P = 0.6$) and NSE ($P = 0.2$) between DM, PDM and controls (see Table 6 and Figure 3).

Table 6. Biochemical markers measurements of the samples of subjects.

Variables	Diabetes (n=25)	Prediabetes (n=11)	Healthy control (n=13)	P value ¹
S100B (ng/uL) *	0.22 (0.09-0.47)	0.15 (0.10-0.43)	0.24 (0.11-0.51)	0.6
NSE (ng/mL) *	13.8 (8.6-23.1)	17.3 (4.8-34.9)	29.4 (13.4-43.5)	0.2

¹ Insignificant values $P > 0.05$

* Median values with lower and upper percentiles

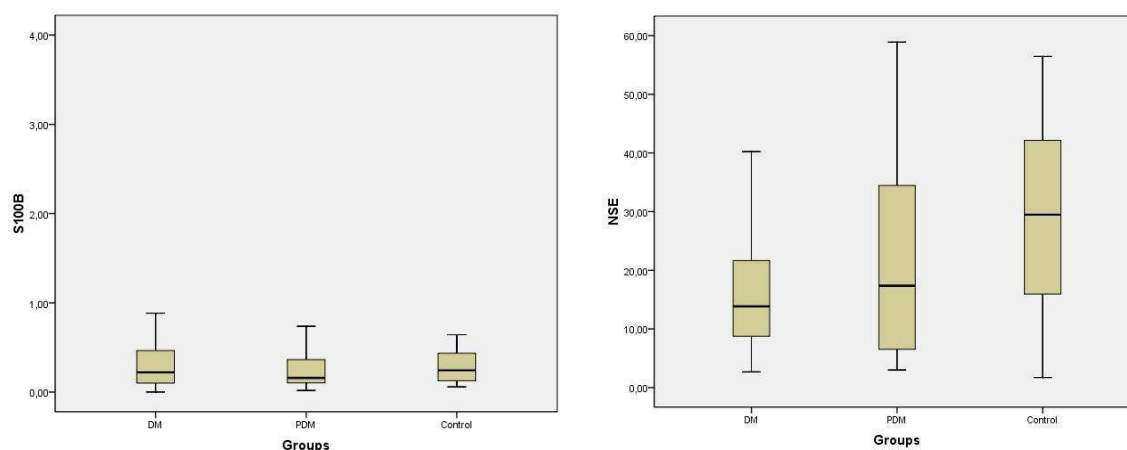


Figure 3.

Graphical representation of S100B (left) and enolase (right) between the study groups ($p > 0.05$ in all comparisons). Note the lack of difference between among groups

Discussion

Our study shows three main findings: (1) the QST demonstrated to be more accurate than conventional neurophysiological tests and biochemical markers for early detection of neuropathy, and thus may be a useful test in clinical practice for assessing neuropathy in PDM and DM at early stages; (2) the amplitude of SSR accessed at lower limb was able to differentiate the control group from the DM group, and may be complementarily to QST for evaluation of patients in later stages glucose tolerance; and (3) there was no statistically significant difference between serum levels of NSE and S100B in the DM, and PDM control, suggesting preservation of central circuits in PDM and DM.

QST/SSR versus NCS

In agreement with earlier studies, the present study was able to replicate findings concerning QST, since this psychophysical test was able to differentiate controls from DM and PDM groups [13,17,22,23]. This finding is of great relevance since because the traditional EMG is sometimes unable to do so at early stages of impaired glucose tolerance, like PDM and early DM, which was also confirmed in our study [24,25].

There was no statistical difference comparing controls with groups DM and PDM using NCS, highlighting the importance of using QST and SSR in routinely assessment of patients with metabolic disturbance and suspected neuropathy.

Although SSR only differentiate controls from DM, this tool is still valid to be applied in clinical practice because of its simplicity and availability in neurophysiologic lab worldwide.

Biomarkers

Although abnormal serum levels of NSE and S100B have been demonstrated in numerous studies involving pathologies that affect central and peripheral nervous system [8,26-30] the present study found no significant differences between these biomarkers at DM, PDM and control groups. This can be explained by the fact that minor dysfunction of small fibers and its Schwann cells at peripheral nerves may not be capable to enhance S100B and NSE levels. In the same way, the slow and gradual peripheral nerve damage mechanism involved at early states of impaired glucose tolerance, plus the relatively short half-life elimination of these biomarkers (48 hours for NSE and 2 hours for S100B), may play a role for the lack of biochemical abnormalities. It may also suggest that patients with different degree of glucose tolerance like PDM and DM did not have impairment at CNS since those biomarkers have been validated in previous studies on assessing injuries mainly at central level [20,29-32].

Another reason for not having found alterations of our biomarkers might be due to the characteristics of DM and PDM which differs significantly from the conditions assessed in previous studies i.e, acute and severe CNS clinical conditions, such as traumatic brain injury, hypoxic brain injury and stroke [29-34].

However, a recent study from Li and collaborators found a significant increase in NSE levels in patients with diabetes type I and type II with neuropathy. This author evaluated the serum levels in 568 subjects divided into 3 groups (control, diabetic patients without neuropathy and diabetic patients with neuropathy) and found a significant relationship between the rise of NSE serum levels in patients with DM without neuropathy and an increase even greatly in DM with neuropathy [27]. It is conceivable to think that the NSE alterations seen by those authors were due to the inclusion of DM type I with unequivocal neuropathy.

Limitations of the study

Our study had some limitations: Firstly, our sample size was small. It is possible that some of the findings did not show significance due to the small number of individuals in each group. Secondly, we did not use more objective tools to detect

small fiber neuropathy, such as laser [35] or contact heat evoked potentials [36] and spectral analysis of heart rate variability [37]. Those techniques have been shown accurate for assessment of early neuropathies. Clinical trials involving larger number of participants and more powerful neurophysiological tests are needed to increase the understanding about the role of biomarkers in prediabetes and diabetes.

Conclusions

Despite these limitations we conclude that QST and SSR are very useful tests for evaluation of neuropathy in PDM and DM. The traditional electromyography is not capable of early detect neuropathies in this population. This study found no differences between biomarkers NSE and S100B in DM, PDM and control. Further studies to increase the understanding regarding neurophysiological and biochemical tests for prediabetes and diabetes are needed in order to confirm our impressions.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by Institutional Research Funds linked to The Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA). The undergraduate researches received a FAPERGS governmental scholarship.

References

1. Cheah BC, Kiernan MC. Neurophysiological methodologies: diagnosis of peripheral nerve disease and assessment of pharmacological agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11(1):72-79.

2. Conget I. Diagnosis, Classification and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(5):528-535.
3. Bhadada SK, Sahay RK, Jyotsna VP, Agrawal JK. Diabetic Neuropathy: Current Concepts. *J Indian Academy of Clin Med* 2001;2(4):305-318.
3. Kucera P, Goldenberg Z, Varsik P, Buranova D, Traubner P. Spinal cord lesions in diabetes mellitus. Somatosensory and motor evoked potentials and spinal conduction time in diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett* 2005;26(2):143-147.
5. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D, American Diabetes Association. Diabetic neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28:956–962.
6. Giladi N, Turezkite T, Harel D. Myelopathy as a complication of diabetes mellitus. *Isr J Med Sci* 1991;27(6):316-319.
7. Sandhu HS, Butt AN, Powrie J, Swaminathan R. Measurement of circulating neuron-specific enolase mRNA in diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:258–263.
8. Mokuno K, Kiyosawa K, Sugimura K, Yasuda T, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Takahashi A, Kato K. Prognostic value of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase and S-100b protein in Guillain-Barré syndrome. *Acta Neurol Scand* 1994;89(1):27-30.
9. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 1995;37:417-429.
10. Pham N, Fazio V, Cucullo L, Teng Q, Biberthaler P, Bazarian JJ, Janigro D. Extracranial sources of S100B do not affect serum levels. *PLoS One* 2010;5(9).
11. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994;17(11):1281.

12. Zilliox L, Peltier AC, Wren PA, Anderson A, Smith AG, Singleton JR, Feldman EL, Alexander NB, Russell JW. Assessing autonomic dysfunction in early diabetic neuropathy: the Survey of Autonomic Symptoms. *Neurology* 2011;76(12):1099-1105.
13. Dumitru D, Amato AA, Zwarts M. *Electrodiagnostic Medicine*. 2nd Edition, Hanley & Belfus, 1524 p.
14. Marieb EN, Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology*. 7th ed, London, UK, Pearson, 2007.
15. Puksa L, Stålberg E, Falck B. Reference values of F wave parameters in healthy subjects. *Clin Neurophysiol* 2003;114(6):1079-1090.
16. Claus D, Schondorf R. Sympathetic skin response. *Electroencephogr Clin Neurophysiol* 1999;(Suppl. 52):277–282.
17. Schestatsky P, Ehlers J, Rieder CRM, Gomes I. Evaluation of sympathetic skin response in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2006;12(8):486-491.
18. Fruhstorfer H, Lindblom U, Schmidt WC. Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1976;39:1071–1075.
19. Schestatsky P, Stefani LC, Sanches PR, Silva Júnior DP, Torres IL, Dall-Agnol L, Balbinot LF, Caumo W. Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies. *Arq Neuropsiquiatr* 2011;69(6):943-948.
20. Ingebrigtsen T, Romner B, Kongstad P, Langbakk B. Increased serum concentrations of protein S-100 after minor head injury: a biochemical serum marker with prognostic value? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;59:103–104.
21. Tort AB, Portela LV, Rockenbach IC, Monte TL, Pereira ML, Souza DO, Rieder CR, Jardim LB. S100B and NSE serum concentrations in Machado Joseph disease. *Clin Chim Acta*. 2005 Jan;351(1-2):143-8.

22. Magerl W, Krumova EK, Baron R, Tölle T, Treede RD, Maier C. Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *Pain* 2010;151:598–605.
23. Gruener G, Dyck PJ. Quantitative sensory testing: methodology, applications, and future directions. *J Clin Neurophysiol* 1994;11:568–583.
24. Peltier A, Smith AG, Russell JW, Sheikh K, Bixby B, Howard J, Goldstein J, Song Y, Wang L, Feldman EL, Singleton JR. Reliability of quantitative sudomotor axon reflex testing and quantitative sensory testing in neuropathy of impaired glucose regulation. *Muscle Nerve* 2009;39(4):529-535.
25. Singleton JR, Smith AG, Bromberg MB. Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes Care* 2001;24(8):1448-1453.
26. Cervellin G, Benatti M, Carbucicchio A, Mattei L, Cerasti D, Aloe R, Lippi G. Serum levels of protein S100B predict intracranial lesions in mild head injury. *Clin Biochem* 2012;45(6):408-411.
27. Li J, Zhang H, Xie M, Yan L, Chen J, Wang H. NSE, a Potential Biomarker, Is Closely Connected to Diabetic Peripheral Neuropathy. *Diabetes Care* 2013;36(11):3405-3410.
28. Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert AD, Fork ML, Synowitz H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:95-100.
29. Bertsch T, Casarin W, Kretschmar M, Zimmer W, Walter S, Sommer C, Muehlhauser F, Ragoschke A, Kuehl S, Schmidt R, Eden BP, Nassabi C, Nichterlein T, Fassbender K. Protein S-100B: a serum marker for ischemic and infectious injury of cerebral tissue. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:319-323.

30. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, Edwards M, Rosmalen CF, Vissers JL. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology* 2010;75(20):1786-1793.
31. Selakovic V, Raicevic R, Radenovic L. The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci* 2005;12:542–547.
32. Böttiger BW, Möbes S, Glätzer R, Bauer H, Gries A, Bärtsch P, Motsch J, Martin E. Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation* 2001;103:2694–2698.
33. Akelma AZ, Celik A, Ozdemir O, Kavak Akelma F, Abaci A, Razi CH, Kislal FM, Akin O. Neuron-specific enolase and S100B protein in children with carbon monoxide poisoning: children are not just small adults. *Am J Emerg Med* 2012;31(3):524-528.
34. Cakir Z, Aslan S, Umudum Z, Acemoglu H, Akoz A, Turkyilmaz S, Oztürk N. S-100beta and neuron-specific enolase levels in carbon monoxide-related brain injury. *Am J Emerg Med* 2010;28(1):61-67.
35. Valeriani M, Pazzaglia C, Cruccu G, Truini A. Clinical usefulness of laser evoked potentials. *Neurophysiol Clin.* 2012 Oct;42(5):345-53
36. Baumgärtner U, Greffrath W, Treede RD. Contact heat and cold, mechanical, electrical and chemical stimuli to elicit small fiber-evoked potentials: merits and limitations for basic science and clinical use. *Neurophysiol Clin.* 2012 Oct;42(5):267-80.
37. Kuehl M, Stevens MJ. Cardiovascular autonomic neuropathies as complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Feb 28;8(7):405-16.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os achados deste estudo referentes ao QST e SSR mostraram que há uma eficiência por parte destes testes na detecção precoce de injúrias no sistema nervoso periférico. Também se pode constatar que os testes realizados nos estudos neurofisiológicos convencionais não foram capazes de mostrar essas alterações. O presente estudo não encontrou relação entre os biomarcadores S100B e NSE com possíveis danos nervosos em pacientes com diferentes graus de tolerância à glicose.

Técnicas mais acuradas de diagnóstico, que possam acessar informações neurofisiológicas de forma mais sensível, como o *Contact Heat Evoked Potential* (CHEP), emergem como ferramenta promissora podendo acrescentar novas informações em estudos futuros.

Novas pesquisas com tamanho amostral maior são necessárias para uma maior compreensão no que tange a avaliação neurofisiológica e o papel dos biomarcadores em pacientes com diferentes graus de tolerância a glicose.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA:

Nome: _____ Data: _____ Exame nº: _____ Nº do prontuário: _____
 Data de nascimento: / / Idade: _____ Sexo: () Masc. () Fem. Peso: _____ Altura: _____
 Escolaridade: () Não alfabetizado () 1º. Grau incompleto () 1º. Grau completo
 () 2º. Grau completo () Superior
 Profissão: _____ Endereço: _____
 Cidade: _____ UF: _____ Fone: _____

DADOS LABORATORIAIS DO PRONTUÁRIO:

O paciente preenche critérios diagnósticos para diabetes mellitus? () **SIM** () **NÃO**

1. Hemoglobina Glicosilada \geq 6.5% OU
--

2. Hemoglicoteste capilar após jejum de 8 horas (HGT) \geq 126mg/dL OU
3. Glicose sérica \geq 200mg/dL após duas horas do teste de tolerância à glicose (TTG) com a ingestão de 75g de glicose dissolvida em água OU
4. Paciente com sintomas de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica e com HGT \geq 200mg/dL

Interpretação dos resultados: *A presença de um ou mais dos critérios confirma o diagnóstico de DM*

TESTE DE MICHIGAN:

NORMAL	<i>Sim</i>	<i>Borderline</i>	<i>Não</i>
	0		1
ULCERAÇÃO	<i>Ausente</i>		<i>Presente</i>
	D	D	D
	E	E	E
REFLEXO	<i>Presente</i>	<i>(0,5)</i>	<i>Ausente</i>
	D	D	D
	E	E	E
SENSAÇÃO VIBRATÓRIA DO DORSO DO PRIMEIRO DEDO DO PÉ (HÁLUX)			
	<i>Presente</i>	<i>(0,5) Reduzida</i>	<i>Ausente</i>
	D	D	D
	E	E	E
MONOFILAMENTO DE 10 GRAMAS NA REGIÃO PLANTAR CORRESPONDEM A CABEÇA DO PRIMEIRO METATARSIANO (ABAIXO DO HÁLUX)			
	<i>Presente</i>	<i>(0,5) Reduzido</i>	<i>Ausente</i>
	D	D	D
	E	E	E
TOTAL:	/10 pontos		

Interpretação dos resultados: *Neuropatia Diabética se escore > 4*

ESCORE AUTONÔMICO:

1. Você desmaia ou fica tonto, com freqüência, ao levantar? SIM () NÃO ()
2. Você tem problemas freqüentes de ereção? SIM () NÃO ()
3. Você tem problemas freqüentes em controlar a urina? SIM () NÃO ()
4. Você tem diarreia com freqüência? SIM () NÃO ()
5. Você tem constipação/prisão de ventre com freqüência? SIM () NÃO ()
6. Você vomita após comer com freqüência? SIM () NÃO ()
7. Você sua quando come? SIM () NÃO ()
8. Você sua quando não está quente com freqüência? SIM () NÃO ()

10.2. ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: Casos

Estamos realizando um estudo sobre o diagnóstico precoce da neuropatia diabética e sua evolução ao longo do tempo. A neuropatia diabética é uma doença que destrói os nervos em pessoas diabéticas podendo provocar desconforto nos pés e nas mãos. Para isso necessitamos avaliar pacientes com diabetes como você. A participação no estudo envolverá:

- 1) Entrevista clínica: consistirá no preenchimento de questionários e exame físico.
- 2) Análise de sangue: consistirá na coleta de uma amostra de 10 ml de sangue para quantificar a proteína S100B. A proteína S100B é uma substância que pode estar aumentada no sangue quando há destruição dos nervos. A coleta pode causar desconforto pela agulha e eventualmente uma pequena mancha escura na área da punção.
- 3) Avaliação neurofisiológica: será realizada através da eletroneuromiografia e testes de limiares sensitivos. A eletroneuromiografia é realizada com a aplicação de pequenos estímulos elétricos sobre o trajeto dos nervos e complementada pelo estudo dos músculos com eletrodos de agulha. Os testes de limiares sensitivos consistem na avaliação das sensações térmicas por meio de placas colocadas sobre a pele e que aumentam progressivamente de temperatura até que está atinja uma sensação de dor. Ambas as técnicas acarretam apenas pequeno desconforto passageiro, sem ocorrência de lesões na pele ou dor importante.

Você não terá nenhum benefício em participar deste estudo. Porém, contribuirá para o aumento do conhecimento no tema que poderá ser importante no futuro.

Os riscos envolvidos são os relativos aos exames mencionados acima.

Todos os dados obtidos serão confidenciais, sendo que o nome do paciente não será divulgado na publicação dos resultados do estudo, assegurando total privacidade das informações obtidas. Informações adicionais serão prontamente respondidas pelo médico que fará o exame. Havendo alguma dúvida para preenchimento dos questionários, antes da decisão do ingresso, sinta-se à vontade para questionamentos. A não participação no estudo não causará nenhum impedimento a um eventual atendimento neste Hospital.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e justificativas para a realização deste estudo. Sei que estou livre para qualquer questionamento, minhas dúvidas foram respondidas de forma clara e recebi uma

cópia do termo de consentimento livre e esclarecido. Também estou ciente que estou livre para solicitar informações a qualquer momento, que as informações obtidas me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar este meu consentimento de participação a qualquer momento, mesmo após a assinatura do mesmo. Para isso o telefone do Pesquisador Responsável (Dr. Pedro Schestatsky, 51-33598564) estará disponível para esclarecimentos.

Nome do Paciente

Nome do Pesquisador

X _____

X _____

Data: ____ / ____ / ____

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

X _____

X _____

10.3. ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: Controles

Estamos realizando um estudo sobre o diagnóstico precoce da neuropatia diabética e sua evolução ao longo do tempo. A neuropatia diabética é uma doença que destrói os nervos em pessoas diabéticas podendo provocar desconforto nos pés e nas mãos. Para isso necessitamos avaliar, além de pacientes com diabetes, também pessoas que não possuem diabetes. Você está sendo convidado a participar desse grupo de pacientes que não possuem diabetes. A participação no estudo envolverá:

- 1) Entrevista clínica: consistirá no preenchimento de questionários e exame físico.
- 2) Análise de sangue: consistirá na coleta de uma amostra de 10 ml de sangue para quantificar a proteína S100B. A proteína S100B é uma substância que pode estar aumentada no sangue quando há destruição dos nervos. A coleta pode causar desconforto pela agulha e eventualmente uma pequena mancha escura na área da punção.
- 3) Avaliação neurofisiológica: será realizada através da eletroneuromiografia e testes de limiares sensitivos. A eletroneuromiografia é realizada com a aplicação de

pequenos estímulos elétricos sobre o trajeto dos nervos e complementada pelo estudo dos músculos com eletrodos de agulha. Os testes de limiares sensitivos consistem na avaliação das sensações térmicas por meio de placas colocadas sobre a pele e que aumentam progressivamente de temperatura até que está atinja uma sensação de dor. Ambas as técnicas acarretam apenas pequeno desconforto passageiro, sem ocorrência de lesões na pele ou dor importante.

Você não terá nenhum benefício em participar deste estudo. Porém, contribuirá para o aumento do conhecimento no tema que poderá ser importante no futuro.

Os riscos envolvidos são os relativos aos exames mencionados acima.

Todos os dados obtidos serão confidenciais, sendo que o nome do paciente não será divulgado na publicação dos resultados do estudo, assegurando total privacidade das informações obtidas. Informações adicionais serão prontamente respondidas pelo médico que fará o exame. Havendo alguma dúvida para preenchimento dos questionários, antes da decisão do ingresso, sinta-se à vontade para questionamentos. A não participação no estudo não causará nenhum impedimento a um eventual atendimento neste Hospital.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e justificativas para a realização deste estudo. Sei que estou livre para qualquer questionamento, minhas dúvidas foram respondidas de forma clara e recebi uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido. Também estou ciente que estou livre para solicitar informações a qualquer momento, que as informações obtidas me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar este meu consentimento de participação a qualquer momento, mesmo após a assinatura do mesmo. Para isso o telefone do Pesquisador Responsável (Dr. Pedro Schestatsky, 51-33598564) estará disponível para esclarecimentos.

Nome do Paciente

X _____

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do Paciente

X _____

Nome do Pesquisador

X _____

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do Pesquisador

X _____