

Avaliação da Insulina como Estimulante da Regeneração Neural

Assessment of Insulin as Neural Stimulant

Gustavo Simiano Jung¹, Marcos Flávio Ghizoni², Bruna Jacobowski³,
Diego Gotardo⁴, João HC Villela⁵, Jucélia Jeremias Fortunato⁶

RESUMO

Evidências atuais sugerem que o sistema nervoso periférico apresente grande número de receptores com afinidade pela insulina. Tais descobertas indicam que esse hormônio possa promover grande impacto no processo de regeneração neural, visto à exacerbação do número desses receptores após injúria neural. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade do uso sistêmico da insulina no processo de regeneração neural em ratos Wistar submetidos à lesão neural periférica do tipo axonotmese. **Método.** Diferentes doses (0.05 UI e 0.01 UI) de insulina NPH ou volume equivalente de solução salina foram injetados por via subcutânea os quais foram acompanhados por 45 dias, avaliando-se o primeiro dia de flexão dos dedos e, no final do período proposto, foram avaliados quanto à sensibilidade e teste de *grasping*. **Resultados.** Os animais submetidos à aplicação de 0.05 UI de insulina NPH apresentaram recuperação precoce da função neural, bem como ganho adicional de 70 gramas no teste de *grasping*, comparados ao grupo controle. Não houve benefício do uso de insulina na recuperação sensitiva. **Conclusão.** Esses resultados sugerem que altas doses de insulina podem promover influência positiva na recuperação neuronal pós injúria neural.

Unitermos. Regeneração Neural, Sistema Nervoso Periférico, Insulina.

Citação. Jung GS, Ghizoni MF, Jacobowski B, Gotardo D, Villela JHC, Fortunato JJ. Avaliação da Insulina como Estimulante da Regeneração Neural.

ABSTRACT

Current evidence suggests that the peripheral nervous system has a large number of insulin receptors. This finding indicates that insulin can have a major impact on neural regeneration, since there is an increase in the number of these receptors after nerve injury. Thus, we aimed to evaluate the effectiveness of the systemic use of insulin for neural regeneration in Wistar rats with induced neural injury. **Method.** Different doses (0.05 UI and 0.01 UI) of NPH insulin or identical volumes of normal saline were injected at subcutaneous of rats with induced axonotmesis. The rats were followed by 45 days approaching the first day of finger flexion and in the end of this time they were accessed for sensibility and grasping test. **Results.** The rats submitted to insulin 0.05 UI showed a nearly recuperation of neural function and had upgrade of 70g in grasping test in comparison to control group. There were no evidences of benefit in sensibility recover with insulin use. **Conclusion.** These results suggest that high doses of insulin can provide positive influence at post-injury neuronal recover.

Keywords. Neural Regeneration, Peripheral Nervous System, Insulin.

Citation. Jung GS, Ghizoni MF, Jacobowski B, Gotardo D, Villela JHC, Fortunato JJ. Assessment of Insulin as Neural Stimulant.

Trabalho realizado na Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão-SC, Brasil.

1. Médico, Graduado na Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão-SC, Brasil.
2. Médico Neurocirurgião, Professor Titular da disciplina de Neurocirurgia da Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão-SC, Brasil.
3. Médica, Graduada na Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão-SC, Brasil.
4. Médico, Graduado na Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão-SC, Brasil.
5. Médico, Graduado na Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão-SC, Brasil.
6. Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço para correspondência:

Jucélia Jeremias Fortunato
Av. José Acácio Moreira, 787 – Caixa Postal 370
CEP 88.704-900 – Tubarão/SC – Brasil
Fone: 55 48 3621-3363
Email: jucelia.fortunato@unisol.br

Original

Recebido em: 07/02/11

Aceito em: 04/10/11

Conflito de interesses: não

INTRODUÇÃO

Lesões neurais periféricas, frequentemente resultam em perdas sensitivas e motoras na área corporal envolvida, gerando importantes disfunções físicas, psíquicas e socioeconômicas ao indivíduo acometido¹. Na era moderna, com o advento dos esportes radicais e o grande número de sobreviventes de acidentes automobilísticos, a incidência de pacientes que apresentam lesões neurais periféricas vem aumentando em centros médicos de todo o mundo. Acometem em 90% dos casos, adultos jovens com idade entre 15 e 25 anos, do gênero masculino que se encontram no início de suas atividades laborais¹⁻⁴.

Após cientificamente comprovada a capacidade de auto-regeneração das células neuronais, o grande desafio imposto na era atual, no que concerne à regeneração neural, é a busca por substâncias que possam otimizar o processo regenerativo, reduzindo dessa forma o ônus gerado aos pacientes acometidos por esse tipo de lesão neural⁵.

Diversos autores evidenciaram a expressão de grande quantidade de receptores para fatores de crescimento como a insulina e o IGF-1 no sistema nervoso central e periférico^{6,7}, creditando-se à ação desses fatores, achados como: aumento da velocidade de condução neural em nervos motores e sensitivos⁸, diminuição da latência neuronal média⁹, aumento do potencial de ação neural⁷, entre outros.

À insulina, atribui-se ainda a capacidade de regulação da regeneração axonal após injúria neuronal¹⁰. A participação da insulina nesse processo, pode dar-se por ação direta sobre receptores insulínicos ou, quando em doses supra-fisiológicas, por ação indireta co-ativando receptores de hormônios insulina-like, estando entre os mais estudados os receptores de IGF-1 e IGF-2^{7,8,10}.

Apesar de os dados encontrados na literatura serem otimistas quanto ao papel da insulina na regeneração neural, permanecem, ainda limitados, e a importância clínica dos fatores de crescimento usados como suporte neurotrófico, continua mal caracterizada, com dados ainda imaturos.

Sendo assim, este estudo buscou avaliar a importância prática do uso de insulina no processo de regeneração neural, utilizando-se para tal, modelos animais submetidos à lesão neural periférica.

MÉTODO

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) e aprovada sob o protocolo número 09.409.401. IV.

Animais Experimentais

Estudo experimental realizado com 24 ratos machos da linhagem Wistar, pesando inicialmente entre 220-240 gramas, mantidos em caixas numeradas, dois animais por caixa, obedecendo ao ciclo claro-escuro e com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ$ Celsius). Comida e água foram ofertadas *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais, quais sejam:

- A) Grupo I 0.01 UI (animais submetidos à aplicação de 0.01 UI de insulina NPH) (n=8);
- B) Grupo I 0.05 UI (animais submetidos à aplicação de 0.05 UI de insulina NPH) (n=8);
- C) Grupo Controle (animais submetidos à aplicação de solução salina) (n=8).

Inicialmente, sob anestesia geral, (injeção de solução de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina 2% na diluição 1:1 via intraperitoneal, 0.2 ml/100g – 0.5 ml por animal), os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico, para indução de lesão neural, permanecendo sob respiração espontânea durante todo o tempo cirúrgico.

Através de incisão longitudinal na face interna de ambas as patas superiores, os nervos medianos e ulnares foram expostos sob visão microscópica, sendo isolados com o auxílio de banda de polipropileno. Utilizando pinça bipolar tipo baioneta foi proferido, em uma extensão de dois centímetros, estiramento do nervo mediano da pata superior esquerda, suficiente para ocasionar o desaparecimento das bandas transversais de Fontoura. Em seguida, realizou-se a ressecção do nervo ulnar da pata superior esquerda e do nervo mediano e ulnar da pata superior direita, utilizando para tal procedimento uma tesoura micro cirúrgica, tipo Jacobson, impedindo a interferência de outros grupos neurais na avaliação motora e sensitiva do animal no acesso à regeneração neural.

No primeiro dia de pós-operatório, iniciou-se, por via subcutânea, a administração diária de insulina NPH ou solução salina para os animais de acordo com o grupo pertencente.

A partir do segundo dia de pós-operatório, os animais foram submetidos diariamente ao teste de *grasping*¹¹ com o intuito de evidenciar o primeiro dia de recuperação do movimento de flexão dos dedos, o qual foi utilizado, na forma de média, para avaliar a velocidade de regeneração neural nos grupos experimentais. Os valores obtidos ao teste de *grasping* no 45º dia foram utilizados para análise da recuperação de força pelos animais.

No 45º dia da aplicação, foram submetidos ao teste de sensibilidade, utilizando-se para isso um estimulador elétrico com transdutor bipolar, com o qual se proferiu descarga elétrica na pata superior esquerda do animal, avaliando-se a menor carga necessária para gerar sensibilidade, situação evidenciada pela retirada voluntária da pata pelo próprio animal.

Após a conclusão do estudo, foi realizada a eutanásia dos animais em conformidade com a resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS 16.0, utilizando os valores médios obtidos por cada grupo nos testes descritos. A relação entre as médias de cada grupo foi testada através da Análise de Variância de uma via (One-way ANOVA) e quando os valores encontrados foram estatisticamente significantes, aplicou-se o teste Post-Hoc de Tukey aumentando assim a especificidade do teste estatístico.

RESULTADOS

Dois dos vinte quatro animais, um do grupo I 0.05 UI e outro do grupo controle (salina), foram excluídos da pesquisa por não apresentarem recuperação da flexão dos dedos em nenhum momento durante o seguimento da pesquisa. Consequentemente, apenas vinte e dois animais tiveram seus dados incluídos na análise estatística.

Não houve óbitos de animais durante o seguimento da pesquisa. Nenhuma complicação referente à aplicação das soluções foi evidenciada.

Velocidade de Regeneração Neural

Quanto à análise dos dados referentes ao primeiro dia de flexão, o grupo tratado com insulina na dose de 0.05 UI subcutâneo (SC) apresentou um ganho em

média, de dois dias em comparação ao grupo controle. Comparando-se o grupo tratado com insulina na dose de 0.01 UI SC com o grupo controle, o valor de “p” foi considerado limítrofe para significância estatística, já no confronto entre os grupos tratados com as doses de 0.05 UI e 0.01 UI, não foi encontrada diferença estatisticamente significante ($p=0.257$) (Tabela 1).

Teste de Grasping

Em relação à análise das médias obtidas com a aplicação do teste de *grasping* no 45º dia, o grupo tratado com insulina 0.05 UI SC apresentou um ganho médio final de mais de setenta gramas, quando comparado ao grupo salina, sendo essa diferença relevante estatisticamente.

Quando comparamos o grupo tratado com insulina na dose de 0.01 UI SC e o grupo salina, o valor de “p” foi considerado limítrofe, observando-se o intervalo de confiança de 95%. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos tratados com insulina 0.05 UI SC e 0.01 UI SC (diferença média de 7.50 gramas - $p=0.0954$) (Tabela 2).

Sensibilidade

Quanto à comparação dos valores de sensibilidade, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os presentes resultados sugerem que: (I) o uso sistêmico da insulina permite recuperação precoce da função motora dos nervos submetidos à injúria; (II) a administração sistêmica de insulina, aumenta significativamente o ganho de força dos animais, quando comparamos ao grupo controle; (III) a recuperação sensitiva pós lesão neural, parece não ser influenciada pelo uso sistêmico de insulina; e (IV) o efeito da insulina sistêmica sobre a regeneração neural, apresenta um caráter diretamente proporcional às doses administradas desse hormônio.

Houve razões específicas para nossa escolha em relação ao tipo de injúria neural, grupo neural utilizado para indução da lesão e testes funcionais aplicados visto que, a axonotmese figura como a forma mais comum de lesão neural, apresentando, também, bom potencial

Tabela 1

Média em dias do 1º dia de flexão dos dedos

Grupo	Média 1º dia de flexão	Diferença média para o grupo salina	IC95%	P
Controle	17.86	-	-	-
I 0.01 UI	17.13	-0.732	(-2.48) - (1.02)	0.549
I 0.05 UI	16.00	-1.857	(-3.07) - (-0.05)	0.044

Grupo I – 0.01 UI (Insulina 0.01 UI); Grupo I – 0.05 UI (insulina 0.05 UI); Grupo Controle (grupo salina)

Tabela 2

Força média em gramas obtida no teste de grasping no 45º dia

Grupo	Grasping 45º dia	Diferença média para controle	IC95%	P
Controle	328.57	-	-	-
I 0.01 UI	392.50	63.929	(-1.49) - (129.35)	0.056
I 0.05 UI	400.00	71.429	(3.86) - (138.99)	0.037

Grupo I – 0.01 UI (Insulina 0.01 UI); Grupo I – 0.05 UI (insulina 0.05 UI); Grupo Controle (grupo salina)

Tabela 3

Sensibilidade média em micro volts no 45º dia

Grupo	Sensibilidade 45º dia	Diferença média para o Grupo Controle	IC95%	P
Controle	16.43	-	-	-
I 0.01 UI	16.25	-0.179	(-3.81) - (3.45)	0.991
I 0.05 UI	15.71	-0.714	(-4.46) - (3.03)	0.880

Grupo I – 0.01 UI (Insulina 0.01 UI); Grupo I – 0.05 UI (insulina 0.05 UI); Grupo Controle (grupo salina)

para regeneração, já que há preservação da arquitetura do *epineurium* e *perineurium*, estruturas responsáveis pelo suporte neuronal^{1,5}, aumentando dessa forma, a chance de resposta neural a exposição a fatores de crescimento.

Já as injúrias neurais periféricas em membros superiores apresentam-se como lesões em crescente incidência sobre as populações ao redor de todo o mundo. Essas lesões acometem em 90% dos casos, pessoas com idade entre 15 e 25 anos que se encontram no início de suas atividades laborais, acarretando grande ônus ao paciente e à sociedade^{1,2,4}.

Em relação aos meios de acesso à regeneração neural, foram utilizados o teste de *grasping* e a estimulação elétrica percutânea, por avaliarem aspectos funcionais da regeneração neural e, por isso, permitem avaliação objetiva desse processo¹¹.

O mecanismo imunohistológico pelo qual a insulina promove aumento no processo de regeneração neural, ainda carece de melhor caracterização, visto ser limitado número de estudos encontrados na literatura, acrescido às divergências nos resultados apresentados por essas pesquisas na tentativa de elucidação desse processo fisiológico. Porém, é comprovada a grande concentração de receptores insulínicos nas estruturas neurais periféricas^{12,13}.

A insulina exerce suas ações por vias independentes à mielinização neural⁸, no entanto, é fato o aumento da expressão de receptores insulínicos, seguindo a lesão neural, bem como o aumento da síntese de proteínas gangliônicas após estimulação insulínica^{7,10,14}.

Independentemente do mecanismo de ação da insulina no processo de regeneração neural, foram observados benefícios do uso com esse intuito. Dados como

aumento da velocidade de condução de fibras motoras⁸, aceleração do processo de re-inervação da placa motora terminal, maturação precoce da fibra de mielina regenerada, aumento da síntese de proteínas gangliônicas que, possivelmente, estejam relacionadas com o processo de anabolismo neural, são reportados na literatura^{7,10}.

Esses aspectos sugeridos por outros autores, corroboram os resultados apresentados por nós referentes à velocidade de recuperação neural e ganho de força final, nos animais expostos à ação da insulina.

O benefício do uso da insulina com intuito de aumento no processo de recuperação sensitiva sugerido na literatura^{13,7}, não pode ser confirmado funcionalmente por este estudo, visto que não houve diferença estatisticamente significativa entre o ganho de sensibilidade dos grupos submetidos à insulina quando comparados ao grupo controle.

Apesar de os animais submetidos ao uso de altas doses de insulina terem mostrado ganho significativo de força, bem como, aumento na velocidade de regeneração neural, não se encontrou diferença significativa com baixas doses do hormônio. Contudo, o que se observou foi a ocorrência de resultado limítrofe para significância, considerando um poder de 95%, quando comparado o ganho de força final e a velocidade de regeneração neural dos animais submetidos à insulina em baixas doses e o grupo controle. Sugere-se que esse dado possa estar relacionado ao tamanho da amostra utilizada no presente estudo. Outra hipótese levantada é a possibilidade da estimulação cruzada dos receptores IGF-I pela insulina quando em doses elevadas, assim obtendo melhores resultados com o uso de doses maiores do hormônio⁷. Dessa forma, novos estudos parecem ser necessários para elucidação desse questionamento.

CONCLUSÃO

O uso da insulina realizado com o objetivo de supra-maximizar o processo de regeneração neural mostra-se promissor, proporcionando uma recuperação precoce da função neural, bem como, ganho adicional de força nos animais submetidos à aplicação desse hormônio, porém novos estudos em modelos experimentais são necessários para a completa elucidação do benefício do seu

uso, bem como para extrapolação dos resultados para a população humana.

REFERÊNCIAS

- Moran SL, Steinmann SP, Shin AY. Adult Brachial Plexus Injuries: Mechanism, Patterns of Injury, and Physical Diagnosis. *Hand Clin* 2005;21:13-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hcl.2004.09.004>
- Tung THH, MacKinnon SE. Brachial plexus injuries. *Clin Plast Surg* 2003;30(2):269-87. [http://dx.doi.org/10.1016/S0094-1298\(02\)00094-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0094-1298(02)00094-9)
- Hassan S, Kay S. Brachial Plexus injury. *Surg* 2003;21(10):262-4.
- Rankine JJ. Adult traumatic brachial plexus injury. *Clin Radiol* 2004;59(9):767-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crad.2004.03.014>
- Peterson SL, Lehman TP. Injury to the peripheral nerves. In: Feliciano DV, Moore EE, Mattox KL (eds). *Trauma*. Stanford, McGraw-Hill 2008, p.872-905.
- James S, Patel NJ, Thomas PK, Burnstock G. Immunocytochemical localization of insulin receptors on rat superior cervical ganglion neurons in dissociated cell culture. *J Anat* 1993;182:95-100.
- Xu QG, Li XQ, Kotecha SA, Cheng C, Sun HS, Zochodne DW. Insulin As an in vivo growth factor. *Exp Neurol* 2004;188:43-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.008>
- Singhal A, Cheng C, Sun H, Zochodne DW. Near nerve local insulin prevents conduction slowing in the experimental diabetes. *Brain Res* 1997;763:209-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00412-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00412-5)
- Ozkul Y, Sabuncu T, Yazgan P, Nazligui Y. Local insulin injection improves median nerve regeneration in NIDDM patients with carpal tunnel syndrome. *Eur J Neurol* 2001;8:329-34. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00240.x>
- Edbladh M, Svenningsen AF, Ekström PAR, Edström A. Insulin and IGF-II but not IGF-1, stimulate the in vitro regeneration of adult frog sciatic sensory axons. *Brain Res* 1994;641:76-82. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91817-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(94)91817-1)
- Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods* 1995;58(1-2):151-5. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)00169-H](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(94)00169-H)
- Waldbilling RJ, LeRoith D. Insulin receptors in the peripheral nervous system: a structural and functional analysis. *Brain Res* 1987;409:215-20. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90704-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(87)90704-9)
- Sugimoto K, Murakawa Y, Zhang W, Xu G, Sima AAF. Insulin receptor in rat peripheral nerve: its localization and alternatively spliced isoforms. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16:354-63. [http://dx.doi.org/10.1002/1520-7560\(200009/10\)16:5<354::AID-DMRR149>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/1520-7560(200009/10)16:5<354::AID-DMRR149>3.0.CO;2-H)
- Svenningsen AF, Kanje M. Insulin and the Insulin-Like Growth Factors I and II are Mitogenic to Cultured Rat Sciatic Nerve Segments and Stimulate Thymidine Incorporation Through their respective Receptors. *Glia* 1996;18:68-72. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199609\)18:1<68::AID-GLIA7>3.0.CO;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199609)18:1<68::AID-GLIA7>3.0.CO;2-#)