

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA



**ESTUDO MORFOQUANTITATIVO DE FIBRAS TIPO C, A DELTA E A BETA
DO NERVO SURAL EM RATOS *WISTAR* IDOSOS NÃO DIABÉTICOS E
DIABÉTICOS**

Professora Orientadora:

Profa. Dra. Djanira Aparecida da Luz Veronez

Discente envolvido:

Flávia Dorieux Wastner Cunha

Curitiba

2016

FLÁVIA DORIEUX WASTNER CUNHA

**ESTUDO MORFOQUANTITATIVO DE FIBRAS TIPO C, A DELTA E A BETA
DO NERVO SURAL EM RATOS *WISTAR* IDOSOS NÃO DIABÉTICOS E
DIABÉTICOS**

Monografia apresentada à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito para a conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Doutora Djanira Aparecida da Luz Veronez

Curitiba

2016

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi diferenciar morfoquantitativamente os tipos de fibras nervosas tipo C, A Delta e A Beta do nervo sural de ratos *Wistar* normoglicêmicos e hiperglicêmicos. Para isso, foi realizado um estudo experimental com 60 ratos *Wistar* machos cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, distribuídos em dois grupos constituídos por 30 animais senescentes submetidos à diabetes tipo II por meio da administração via endovenosa de Streptozotocina e 30 animais senescentes normais sem tratamento. Decorrido o tempo de vida, de 24, 30 e 36 meses, os animais foram anestesiados com Xilazina e Cetamina, perfundidos via transcardíaca com solução salina e formalina a 10% para posterior remoção dos ramos terminais do nervo sural. Foram montadas lâminas com secções transversais do nervo sural com sete micrômetros de espessura e, em seguida, submetidos à coloração em Hematoxilina-Eosina. Para análise morfoquantitativa, as lâminas foram fotodocumentadas em fotomicroscópio binocular axiophoto (Zeiss, D-7082), acompanhadas por uma escala métrica. Em seguida, as imagens foram calibradas e analisadas por meio do programa Image J para obtenção do diâmetro do axônio, e da classificação e quantificação das fibras nervosas tipo C, A Delta e A Beta. Verificou-se a média de 5.5 ± 0.6 fibras tipo C em animais não diabéticos e média de 4.9 ± 0.2 para animais diabéticos. Para fibras A Delta, a média foi de 26.8 ± 0.9 para animais não diabéticos e média de 29.5 ± 0.8 para animais diabéticos. Já para as fibras A Beta, o número médio de fibras foi de 24.7 ± 0.8 para animais não diabéticos e 28.0 ± 0.7 para animais diabéticos. Com o número total somente de fibras tipo C significativamente menor no grupo de animais hiperglicêmicos ($p=0,0001$), fica evidente que para que um quadro de neuropatia diabética seja estabelecido, é preciso estar associada à hipertensão.

Palavras-chave: Anatomia. Diabetes. Dor. Terminação Nervosa Livre. Nervo Sural.

ABSTRACT

The aim of this study was to morphologically differentiate the types of nerve fibers type C, A Delta and A Beta from the sural nerve of normoglycemic and hyperglycemic Wistar rats. For this, an experimental study was carried out with 60 male Wistar rats assigned by vivarium of Biological Sciences Sector of the Federal University of Paraná - UFPR, distributed into two groups consisting of 30 senescent animals treated with type II diabetes by intravenous administration of Streptozotocin and 30 normal senescent animals without treatment. After 24, 30 and 36 months of age, the animals were anesthetized with Xylazine and Ketamine, transcardially perfused with 10% saline and formalin for later removal of the terminal branches of the sural nerve. The slides with transverse sections of the sural nerve were mounted seven micrometers thick and then stained with Hematoxylin-Eosin. For morpho-quantitative analysis, the slides were photodocumented in a binocular axiophoto photomicroscope (Zeiss, D-7082), accompanied by a metric scale. The images were then calibrated and analyzed using the Image J program to obtain the axon diameter and the classification and quantification of the type C, A Delta and A Beta nerve fibers. A mean of 5.5 ± 0.6 type C fibers was observed in non-diabetic animals and a mean of 4.9 ± 0.2 for diabetic animals. For Delta fibers, the mean was 26.8 ± 0.9 for non-diabetic animals and a mean of 29.5 ± 0.8 for diabetic animals. For Beta-A fibers, the mean number of fibers was 24.7 ± 0.8 for non-diabetic animals and 28.0 ± 0.7 for diabetic animals. With the total number of only type C fibers significantly lower in the group of hyperglycemic animals ($p = 0.0001$), it is evident that for a diabetic neuropathy to be established, the association with hypertension is needed.

Key-words: Anatomy. Diabetes. Pain. Free nerve ending. Sural nerve.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
1.1 EVIDÊNCIAS DE INTERESSE	5
1.2 OBJETIVOS.....	7
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	7
1.2.2 JUSTIFICATIVA.....	7
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 NERVO SURAL.....	7
2.2 RECEPTORES DE DOR	8
2.2.1 FIBRAS TIPO C	9
2.2.2 FIBRAS A DELTA.....	11
2.2.3 FIBRAS A BETA	11
2.3 CONCEITO DE DOR.....	12
2.4 INTERPRETAÇÕES DA DOR NO QUADRO DIABÉTICO.....	13
2.5 INTERPRETAÇÕES DA DOR NO QUADRO NÃO DIABÉTICO	14
2.6 COMPARAÇÕES DOS ASPECTOS DAS FIBRAS NERVOSAS DOS ANIMAIS NÃO DIABÉTICOS E DIABÉTICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	18
3.2 ANIMAIS.....	18
3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS NERVOS CORADOS POR HEMATOXILINA & EOSINA (HE)	19
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO	20
4 RESULTADOS.....	21
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÕES.....	25
7 CRONOGRAMA	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 EVIDÊNCIAS DE INTERESSE

A dor, desde a pré-história, vem sendo documentada e apresenta-se como uma das grandes preocupações da Humanidade. A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, podendo apresentar-se como um alerta em resposta a iminência de dano tecidual (IASP, 2016). Logo, é de suma importância para sobrevivência do organismo. A sensação desconfortável proporcionada pela dor é o principal fator que leva os pacientes a procurar ajuda profissional. Uma vez que a interpretação e a vivência da dor são individuais, a forma como o paciente interpreta a dor é única, bem como a forma que a dor interfere ou até mesmo impede, na realização de atividades diárias que o paciente costumava realizar antes de apresentar o quadro de dor. Por ter uma interpretação subjetiva, seu mecanismo ainda não foi totalmente elucidado. Logo, entender a dor é essencial para a aplicação e elaboração de terapias e medidas interventivas efetivas e humanizadas, de modo a proporcionar às pessoas idosas e diabéticas uma saúde de melhor qualidade (HALL et al., 2006).

O diabetes *mellitus* aflige 425 milhões de pessoas mundialmente, com previsão para que este número alcance quase 642 milhões no ano de 2040 (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2016). Esta doença pode provocar muitos sintomas agudos como hiperglicemia, cetoacidose, síndrome hiper-osmolar. Além disso, sintomas crônicos também são evidenciados como neuropatias, que são as principais causas de dor no quadro diabético. A dor neuropática é amplamente reconhecida como uma das síndromes mais difíceis de administrar e geralmente não são diagnosticadas corretamente. Contribui para a redução da sensibilidade vibratória e de temperatura, que no indivíduo diabético pode culminar em ulceração no pé, levando à necessidade de amputação (LLEWELYN et al., 2005).

O tema “dor” em indivíduos diabéticos e não diabéticos tem recebido destaque nos aspectos fisiológicos e patológicos, porém há um escasso descritivo do substrato anatômico da dor, vias nervosas de condução de estímulos e os mecanismos neurológicos de modulação da dor para possibilitar sua compreensão,

possíveis causas e procedimentos para seu controle, reforçando assim a real necessidade do estudo minucioso das estruturas anatômicas que compõem o substrato anatômico da dor para a propagação do estímulo doloroso desde as terminações nervosas livres, trato espinotalâmico lateral, coroa radiada, área cortical somestésica presente no giro pós-central do córtex cerebral, bem como o envolvimento de outras vias nervosas subsidiárias até a substância cinzenta periaquedutal.

Com o envelhecimento da população espera-se que o número de pacientes com neuropatias aumente, enfatizando a importância de compreender o mecanismo da neuropatia no diabetes, bem como proporcionar o tratamento correto e uma melhora na qualidade de vida do paciente (HALL et al., 2006).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um estudo morfoquantitativo dos tipos de fibras nervosas, tipo C, A Delta e A Beta do nervo sural em ratos *Wistar* idosos não diabéticos e diabéticos.

1.2.2 JUSTIFICATIVA

O reconhecimento dos aspectos morfoquantitativos das fibras nervosas em ratos *Wistar* idosos não diabéticos e diabéticos contribuirá para o entendimento do mecanismo do diabetes mellitus tipo II isoladamente sobre fibras nervosas periféricas, uma vez que há um escasso descritivo sobre o assunto na literatura. Além disso, o estudo foi conduzido em ratos idosos uma vez que o aumento da expectativa de vida da população mundial e a prevalência do diabetes em adultos acima de 45 anos.

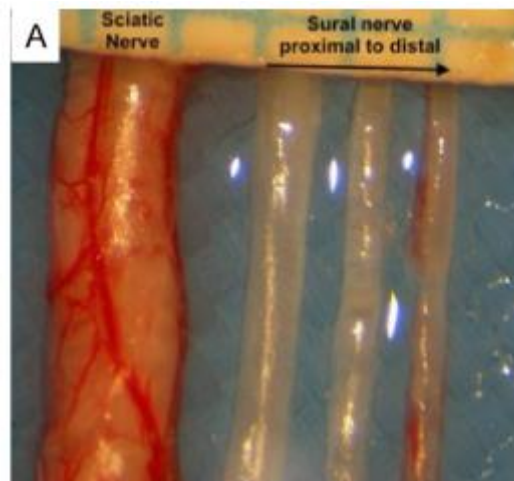
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NERVO SURAL

O nervo sural é muito estudado em modelo experimental de neuropatias por ser o nervo mais distal (SANADA et al., 2012). Os nervos de membros são os mais suscetíveis a traumas e danos quando comparados aos demais (FAZAN et al., 2010). O nervo sural inerva a porção lateral do tornozelo e do pé. Anatomicamente, está localizado lateralmente ao tendão de calcâneo e adjacente à veia safena parva (BELSACK et al., 2013). Os nervos tibial e o fibular comum, originados pelo nervo ciático, contribuem para a formação do nervo sural. Tipicamente, o nervo sural cutâneo medial ramifica-se do nervo tibial e une-se ao nervo sural cutâneo lateral originado pelo nervo fibular comum para formar o nervo sural (SEEMA, 2013). Contudo, variações na formação, percurso e morfometria, são descritas na literatura,

classificando as variações em 6 tipos diferentes. O nervo sural em ratos mede em torno de 34.8 mm da sua origem no nervo ciático até a parte posterior da articulação do tornozelo (ratos *Sprague-Dawley* machos com peso entre 223 e 430g) (FAZAN et al., 2010). A Figura 1 compara o nervo sural com o nervo ciático, ambos com 10 mm de comprimento (KILIC et al., 2011).

FIGURA 1 – COMPARAÇÃO DO NERVO SURAL COM O NERVO CIÁTICO EM RATOS



FONTE: KILIC et al., 2011.

2.2 RECEPTORES DE DOR

Os receptores de dor são terminações nervosas livres presentes na pele e em outros tecidos. Estas terminações estão distribuídas na camada superficial da pele e em baixas quantidades nos tecidos profundos, com exceção do periósteo, das paredes arteriais, das superfícies articulares, da foice e do tentório da abóbada craniana (GUYTON e HALL, 1997). A propagação do estímulo doloroso é iniciada por meio da ativação de receptores periféricos, também chamados de nociceptores, geralmente específicos para apenas um estímulo como mecânico, químico ou térmico (ALMEIDA et al., 2004). A informação é transferida da periferia por meio de sinais elétricos pelas longas fibras do neurônio sensitivo para a medula espinhal (STEEDS, 2016; WOOLF, 2000) e finalmente para o cérebro, onde a dor é vivenciada. Os longos axônios dos neurônios sensitivos primários fazem parte de nervos periféricos e são extensões dos corpos celulares localizados na raiz dos gânglios dorsais (WOOLF, 2000). Diferentemente dos outros receptores do corpo, os

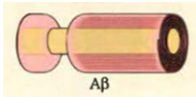
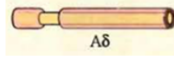
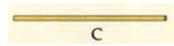
receptores para dor se adaptam muito pouco, para que o estímulo lesivo produza informações enquanto persistir (GUYTON e HALL, 1997).

Mediadores inflamatórios promovem a ativação e a sensibilização dos nociceptores. Bradicinina e prostaglanina sensibilizam nociceptores por estímulos de baixa intensidade. Histamina e serotonina causam dor quando aplicadas diretamente nas terminações nervosas. Íons hidrogênio e serotonina ligam-se à proteínas G ativando segundos mensageiros ou, em baixa frequência, agem diretamente nos canais iônicos na membrana celular (STEEDS, 2016).

As terminações nervosas livres correspondem à parte mais distal do neurônio aferente de primeira ordem e podem ser classificadas de acordo com estrutura, diâmetro e velocidade de condução, em fibras A Delta, A Beta ou tipo C. A área correspondente a esses receptores podem variar desde regiões puntiformes até mais de um sítio em territórios diferentes. Estes receptores possuem limiar mais alto do que outros tipos de receptores, com diminuição do limiar apenas em situações de sensibilização do receptor ou de atividade espontânea (ALMEIDA et al., 2004).

As fibras tipo C, A Delta e A Beta podem ser classificadas de acordo com o diâmetro do axônio e velocidade de condução (TABELA 1).

TABELA 1 – Classificação das fibras aferentes

Aferentes sensoriais somáticos que conectam receptores ao Sistema Nervoso Central				
Função sensorial	Tipo de receptor	Tipo de axônio aferente	Diâmetro do axônio	Velocidade de condução
Toque	Merkel, Meissner, Pacinian e células de Ruffini		6 a 12 μm	35 a 75 m/s
Dor, temperatura	Terminação nervosa livre		1 a 5 μm	5 a 30 m/s
Dor, temperatura, coceira	Terminação nervosa livre		0.2 a 1.5 μm	0.5 a 2 m/s

FONTE: Adaptado de PURVES et al., 2008

2.2.1 FIBRAS TIPO C

As fibras tipo C são fibras amielinizadas, com diâmetro variando de 0,2 a 1,5 μm e velocidade de 0,5 a 2 m/s. Estas fibras propagam informação de modo lento,

muitas vezes de maneira secundária às fibras aferentes A Delta. São mal localizadas e responsáveis pela sensação de dor lenta e crônica. Seu potencial prolongado ocorre devido à somatória de potenciais ao longo do tempo (TREEDE et al., 1992; GUYTON e HALL, 1997; ALMEIDA et al., 2004; STEEDS, 2016).

As fibras tipo C possuem receptores sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos de limiar baixo, e receptores específicos para substâncias halogênicas como íons potássio, acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandina, substância P e histamina. Muitas dessas fibras que possuem limiar alto são chamadas de polimodais, uma vez que respondem igualmente a estímulos térmicos e mecânicos. Outro tipo especial desta fibra possui alto limiar a estímulos térmicos e associa-se a fibras polimodais, sendo responsável pela resposta 'alongada' após dano tecidual. Há também as fibras mecanosensitivas, que conduzem o estímulo de maneira lenta, envolvidas em caso de queimaduras com liberação de histamina. No entanto, nova classe de receptores chamada de receptores silenciosos não respondem à estímulos nocivos, mas à inflamação. No músculo, tanto a fibra tipo C como a A Delta promovem a sensação de dor e são menos localizadas do que na pele. As fibras tipo C possuem as mesmas características polimodais do que as fibras A Delta na região muscular, porém numa proporção 50% maior de fibras que respondem à isquemia, hipóxia e pressão nociva (ALMEIDA et al., 2004).

A informação nociva ou inócua é propagada nos órgãos viscerais pelas fibras tipo C e A Delta. Devido aos estímulos elétricos de baixa intensidade serem propagados via vagal promovendo náuseas e enjôos, somente estímulos de alta intensidade são capazes de provocar dor. Acredita-se que a percepção de dor visceral seja dependente da intensidade e do somatório de estímulos, já que estes receptores estão dispersos (ALMEIDA et al., 2004). As fibras tipo C fazem sinapse na lâmina II do corno dorsal da medula espinhal (STEEDS, 2016) e liberam os neurotransmissores glutamato e substância P na medula espinhal. O glutamato possui ação muito rápida, já a substância P, por ser liberada lentamente, pode ter sua concentração aumentada por um período de segundos ou mesmo minutos. Por este motivo, acredita-se que a substância P seja o principal neurotransmissor envolvido com a dor lenta e crônica, já o glutamato está relacionado com a dor rápida (GUYTON e HALL, 1997).

2.2.2 FIBRAS A DELTA

As fibras A Delta são pouco mielinizadas, com diâmetro variando de 1 a 5 μm e velocidade de 5 a 30 m/s. Elas propagam informação específica de alta intensidade e pequena latência. São as fibras A Delta responsáveis pela sensação na dor aguda, rápida presentes na superfície corporal, dos músculos e articulações promovendo os movimentos de retirada. As fibras A Delta são classificadas em dois grupos: tipo I e tipo II (TREEDE et al., 1992; GUYTON e HALL, 1997; ALMEIDA et al., 2004; STEEDS, 2016).

As fibras A Delta tipo I são mecanorreceptores de alto limiar que respondem primeiramente a estímulos mecânicos de alta intensidade e fracamente a estímulos térmicos e químicos. As fibras tipo II possuem receptores mecanotérmicos para altas temperaturas, variando de 45 a 53°C, e alguns receptores para frio intenso (-15°C) (ALMEIDA et al., 2004).

No músculo, as fibras A Delta propagam estímulos mecânicos inócuos, químicos, térmicos, estímulos nocivos típicos de isquemia, hipóxia e pressão dolorosa, sendo classificadas como fibras polimodais. Cerca de um terço dessas fibras possui receptores especiais que sinalizam a quantidade de esforço realizada por um grupo muscular, induzindo a alterações de fluxo sanguíneo e no processo respiratório celular (ALMEIDA et al., 2004).

A fibra A Delta realiza sinapse no corno dorsal da medula espinhal nas lâminas I e V (STEEDS, 2016). Acredita-se que o neurotransmissor liberado pelas fibras nervosas da dor do tipo A Delta na medula espinhal seja o glutamato. O glutamato é um neurotransmissor excitatório que possui ação que dura apenas alguns milissegundos (GUYTON e HALL, 1997).

2.2.3 FIBRAS A BETA

As fibras A Beta são mielinizadas, com diâmetro que varia de 6 μm a 12 μm e velocidade rápida de 35 a 75 m/s. Estas fibras não propagam estímulo nocivo, respondem ao toque mecânico leve e à vibração. Em situações normais, porém, parecem ser essenciais ao circuito doloroso relacionado aos mecanismos de supressão segmental (TREEDE et al., 1992; ALMEIDA et al., 2004; STEEDS, 2016).

2.3 CONCEITO DE DOR

A dor foi definida em 1986 pela “Associação Internacional para o Estudo da Dor” como uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a danos teciduais reais ou potenciais. A habilidade de detectar um estímulo nocivo é essencial para o bem-estar e sobrevivência do organismo. A dor pode ser fortemente modificada por experiências prévias ou por aspectos culturais, emocionais e cognitivos. Portanto, a sensação da dor é subjetiva e sua significância é única para cada indivíduo. Um exemplo disso é a resposta placebo na qual tratamento sem medicamento pode promover grande analgesia. (BASBAUM et al., 2009; BRIDGESTOCK E RAE, 2013; IASP, 2016; STEEDS, 2016).

Os serviços de saúde deveriam levar em consideração os fatores psicológicos envolvidos na dor para efetuar um tratamento adequado ao paciente. Motivação e atitudes positivas podem ser muito importantes para o controle e recuperação da dor (COLVIN E POWER, 2005). A dor afeta também os cuidadores dos doentes provocando estresses físicos e emocionais. É uma das grandes preocupações da humanidade, já que é documentada desde a pré-história, gerando a necessidade de esclarecer possíveis causas e procedimentos para seu controle (SOCIEDADE BRASILEIRA PARA ESTUDO DA DOR, 2016).

Um estímulo nocivo capaz de provocar dano nem sempre é acompanhado de dor. É importante ressaltar que nocicepção e dor são conceitos distintos. Nocicepção é caracterizada por manifestações neurofisiológicas geradas por um estímulo nocivo, já a dor, envolve a percepção de um estímulo aversivo, no qual requer a capacidade de abstração e a interpretação de um impulso sensitivo. A dor vai além de sinais neuronais gerados por estímulos físicos (ALMEIDA et al., 2004; STEEDS, 2016).

Segundo IASP (2016) a dor e a intensidade de dano não estão obrigatoriamente relacionadas e ressalta, ainda, que a dor é um fator de alerta à iminência de dano tecidual e ocorre somente durante a dor aguda. Não é adequado associar dor somente com estímulo, a experiência da dor vai muito além de um sinal físico desencadeando sinais neurais (IASP, 2016). A dor é o resultado da interação

complexa entre sistemas sinalizadores, modulação de centros superiores e a percepção única do indivíduo (STEEDS, 2016).

2.4 INTERPRETAÇÕES DA DOR NO QUADRO DIABÉTICO

O diabetes só foi reconhecida em 1864 por Marchal de Calvi como um fator que possa alterar o funcionamento do sistema nervoso central e, a partir de então, as características clínicas como a neuropatia diabética foram salientadas (LLEWELYN et al., 2005). Esta é a complicação mais comum, liderando a maior taxa de morbidade e mortalidade no diabetes, o que gera um grande fardo econômico no cuidado da doença (HOLZER et al., 1998; VINIK et al., 2016). Dessa forma, acredita-se que a dor neuropática seja subdiagnosticada e que seja tratada de maneira inadequada (HALL et al., 2006). Baseada numa avaliação sintomática, apenas 10% dos pacientes diabéticos possuem neuropatias. Entretanto, numa análise mais detalhada, levando em consideração um protocolo sensorial quantitativo, teste autonômico e estudos de condução do nervo, ilustram um número muito maior representado por pouco menos da metade dos pacientes diabéticos (47,6%) (LLEWELYN et al., 2005). A neuropatia diabética é uma progressiva perda da sensibilidade distal, afetando inicialmente extremidades baixas (CELIK et al., 2016). Cerca de 50% dos pacientes diabéticos apresentam neuropatia diabética, que vem acompanhada de disfunções motores, autonômicas e sensitivas (LALLI et al., 2013).

Alguns autores (MORASCO et al., 2015; DORFMAN et al., 2016) recomendam a aplicação de escores relacionados ao dano, como avaliação neurológica das pernas e os resultados de sete testes diferentes, ou a utilização de uma escala de classificação do estágio da severidade da neuropatia. A hiperglicemia é apontada como o principal fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia diabética, já que alguns experimentos revelaram que o controle da glicose pode retardar a progressão da neuropatia em pacientes com diabetes tipo I, embora o mesmo não tenha ocorrido em pacientes com diabetes tipo II. Além da hiperglicemia, outros fatores de risco são importantes para o desenvolvimento de neuropatias, como idade, tempo desde o início do diagnóstico, hipertensão, tabagismo. Na neuropatia sintomática, as áreas afetadas costumam ser: pés (96%), planta dos pés

(69%), dedos dos pés (67%), dorso do pé (54%), mãos (39%), planta das mãos (37%), calcanhar (32%) (LLEWELYN et al., 2005).

É possível inferir a fibra envolvida pelo tipo de dor sentida pelo paciente. Ao sentir uma dor de entorpecimento, formigamento, agulhadas, certamente as fibras densamente mielinizadas A Beta foram danificadas. Enquanto que queimação ou sensação de frio sugerem que as fibras pouco mielinizadas A Delta ou as fibras não mielinizadas do tipo C foram danificadas. Dentre as sensações descritas pelos pacientes estão: 1) torpor ou sensação de estar andando sobre um floco de algodão ou vestindo uma meia grossa; 2) dores que podem ser maçantes ou constantes; 3) dor de agulhada; 4) sensações de calor ou frio; 5) alodinia (estímulo que antes não era doloroso, torna-se doloroso), essa sensação torna-se pior ainda durante o período da noite, pois até o cobertor pode causar grande dor ao paciente; 6) câimbras nas panturrilhas ou nos músculos dos pés (LLEWELYN et al., 2005). Estas características da neuropatia podem prejudicar a realização das atividades diárias. Porém, para metade dos pacientes diabéticos, a neuropatia é assintomática (VINIK et al., 2016).

2.5 INTERPRETAÇÕES DA DOR NO QUADRO NÃO DIABÉTICO

A experiência dolorosa é o produto final de uma complexa rede de processamento de informação. Após a ocorrência do estímulo doloroso ocorre uma série de eventos químicos e elétricos. O primeiro estágio é a transdução na qual a energia do estímulo externo será convertida em atividade eletrofisiológica. No segundo estágio, transmissão, a informação é codificada e retransmitida via medula espinhal ao tálamo ou tronco encefálico. Finalmente, as conexões entre o tálamo e os centros corticais superiores controlam a percepção e integram a resposta afetiva à dor (MOFATT e RAE, 2010).

Indivíduos normoglicêmicos possuem percepção inalterada de estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Quando intensos estes estímulos geram uma dor aguda. Na persistência do dano, ambos os componentes dos sistemas nervosos centrais e periféricos transmitem a dor com grande plasticidade, intensificando os sinais dolorosos e promovendo hipersensibilidade (BASBAUM et al., 2009).

2.6 COMPARAÇÕES DOS ASPECTOS DAS FIBRAS NERVOSAS DOS ANIMAIS NÃO DIABÉTICOS E DIABÉTICOS

Em humanos, são reportadas nas neuropatias diabéticas: degeneração axonal, desmielinização primária resultante da disfunção da célula de Schwann, desmielinização segmental secundária relacionada ao controle da mielinização axonal e hipertrofia da lâmina basal (KUNDALIC, 2014). O modelo animal mais comum de neuropatia diabética é por meio da administração de Streptozotocina que é tóxica às células Beta pancreáticas (ALEY E LEVINE, 2001). Nervos de ratos diabéticos possuem menor área de mielina, o que reflete na redução do tamanho total da fibra e, ainda, ocorre uma mudança na velocidade de condução nervosa relacionada à alteração das fibras mielinizadas grandes (SANADA et al., 2015).

Sugere-se que a hiperglicemia atue como um fator que aumente o estresse metabólico das células de Schwann. Já foi demonstrado que ratos com diabetes induzida por Streptozotocina possuem alterações mitocondriais nas células de Schwann. Além da hiperglicemia, estresse metabólico causado pelo diabetes pode levar a um metabolismo anormal de ácidos graxos, hipóxia isquêmica e estresse oxidativo (STEVENS et al., 2000).

Como as células de Schwann são células mielinizantes, existe uma razão ou relação ideal (*g ratio*) esperada entre as células de Schwann, o tamanho do axônio e a espessura de mielina. Alteração nesta razão, como a diminuição do número de células de Schwann, certamente irá promover uma alteração na morfologia de mielina (GREGORY et al., 2012).

O espessamento da membrana basal das células de Schwann é uma das alterações do diabetes (FIGURA 2) (SANADA et al., 2015). Além disso, fibras amielinizadas são visíveis facilmente em animais hiperglicêmicos quando comparados aos normoglicêmicos. Em ratos diabéticos, a redução do tamanho da fibra nervosa mielinizada é bem característica. Esta redução ocorre devido à diminuição do tamanho do axônio causado por alterações metabólicas nos axônios, taxa de crescimento retardado, ou hiperosmolaridade. Mais recentemente, alterações da microvasculatura endoneural também são apontadas como fator de redução do tamanho do axônio (OLIVEIRA et al., 2003).

FIGURA 2 - Secção transversal de corte semifino de nervo sural



Secção transversal de corte semifino de nervo sural de rato Wistar normotenso induzido à diabetes crônica. É possível observar o espessamento da membrana basal das células de Schwann e vaso endoneural normal. V – vaso endoneural; M – fibra mielinizada grande. FONTE: SANADA et al., 2015

Sanada e colaboradores (2015) realizaram um estudo comparando morfometricamente o nervo sural de 4 grupos diferentes de ratos: WR (normoglicêmicos e normotensos = *Wistar rat control group*) WR+STZ (ratos normotensos com diabetes induzido por Streptozotocina), grupo espontaneamente hipertenso e grupo hipertenso com diabetes induzida. Foram discutidos dados obtidos pelos dois primeiro grupos. Alguns fatores não apresentaram diferença significativa entre os grupos normoglicêmicos e hiperglicêmicos, como: área e o diâmetro do fascículo, o número e a densidade de fibras mielinizadas, o número e a densidade das células de Schwann, a ocupação capilar (TABELA 2), área e diâmetro da área mielinizada, g *ratio* (TABELA 3). Já o diâmetro e a área da fibra mielinizada e a área da bainha de mielina, foram significativamente reduzidas no grupo hiperglicêmico quando comparadas ao grupo normoglicêmico (TABELA 3) (SANADA et al., 2015).

TABELA 2 - Dados morfométricos dos fascículos dos nervos surais de ratos normoglicêmicos (wr) e hiperglicêmicos (WR+STZ)

	WR	WR + STZ
Fascicular area (μm^2)	76963 \pm 4361	64739 \pm 3732
Fascicular diameter (μm)	202 \pm 24	169 \pm 17
Myelinated fiber number	1079 \pm 82	1039 \pm 50
Myelinated fiber density (number of fibers/ μm^2)	13994 \pm 601	16894 \pm 1113
Schwann cell nucleus number	60 \pm 5	66 \pm 4
Schwann cell nucleus density (number of nucleus/ μm^2)	789 \pm 60	1094 \pm 103
Capillary occupancy (%)	0.90 \pm 0.18	0.91 \pm 0.17

Os parâmetros diâmetro fascicular, número e densidade de fibras mielinizadas, número e densidade de núcleos de células de Schwann, e ocupância capilar, não apresentaram diferença significativa entre os grupos de animais normoglicêmicos e hiperglicêmicos. WR – *Wistar Rat*, ratos normoglicêmicos; WR+STZ – ratos *Wistar* submetidos ao tratamento com Streptozotocina, hiperglicêmicos. FONTE: SANADA et al., 2015.

TABELA 3 - Dados morfométricos dos fascículos dos nervos surais de ratos normoglicêmicos (wr) e hiperglicêmicos (WR+STZ)

	WR	WR + STZ
Myelinated fiber area (μm^2)	33.46 \pm 0.74	29.00 \pm 0.89*
Myelinated fiber diameter (μm)	5.48 \pm 0.07	5.10 \pm 0.08*
Myelin sheath area (μm^2)	25.69 \pm 0.55	21.56 \pm 0.80*
Myelinated axon area (μm^2)	8.19 \pm 0.25	7.38 \pm 0.26
Myelinated axon diameter (μm)	2.67 \pm 0.05	2.65 \pm 0.05
g ratio	0.49 \pm 0.01	0.53 \pm 0.01

Os parâmetros área e diâmetro da fibra mielinizada, e área da bainha de mielina apresentaram uma redução significativa quando comparada aos demais fatores ($p < 0,001$). * indica diferença significativa entre os grupos. Foi considerado significativo valor de p menor ou igual a 0,05. WR – *Wistar Rat*, ratos normoglicêmicos; WR+STZ – ratos *Wistar* submetidos ao tratamento com Streptozotocina, hiperglicêmicos. FONTE: SANADA, et. al, 2015.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido para análise técnico-científica e ética, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUABIO - UFPR).

Foi respeitado o princípio dos 3 Rs: redução, reposição e refinamento lançado no livro “Princípios das Técnicas Experimentais Humanas” por Russel e Burch em 1959, e a Lei 11.794/2008 que regulamenta o uso de animais na experimentação científica. Além disso, foram aplicadas as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) que preconiza o respeito ao animal e determina o método de eutanásia mais adequado.

Não há conflitos de interesse quanto à escolha do tema, desenvolvimento do projeto e execução da pesquisa.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos criados e mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Quanto ao delineamento experimental, os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: 30 animais senescentes (10 animais com idade de vinte e quatro meses, 10 animais com trinta meses e 10 animais trinta e seis meses) submetidos à diabetes tipo II por meio da administração via intraperitoneal de Streptozotocina na dose de 60mg/kg.

Grupo Controle: 30 animais senescentes normais (10 animais com idade de vinte e quatro meses, 10 animais com trinta meses e 10 animais trinta e seis meses) com alimentação e água *ad libitum*, 12 horas de luz e 12 de escuro e com exaustão de ar, isto é, sem nenhum tipo de alteração induzida experimentalmente.

A idade dos animais foi escolhida de acordo com a relação da idade do rato e humanos (TABELA 4), para que o estudo equivalesse à investigação da população idosa humana.

Após o tratamento e decorrido o tempo de vida, os animais foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal de Xilazina (5mg/kg) e Cetamina (100mg/kg), perfundidos via transcardíaca com solução salina e formalina a 10% para posterior remoção dos ramos terminais do nervo sural. Foram montadas lâminas com secções transversais do nervo sural com sete micrômetros de espessura e em seguida, submetidos ao processo de coloração em Hematoxilina-Eosina.

TABELA 4 – Correlação da faixa etária de ratos *Wistar* com a espécie humana

IDADE DO RATO EM MESES	IDADE DO SER HUMANO EM ANOS
6 MESES	18 ANOS
12 MESES	30 ANOS
18 MESES	45 ANOS
24 MESES	60 ANOS
30 MESES	75 ANOS
36 MESES	90 ANOS
42 MESES	105 ANOS
45 MESES	113 ANOS
48 MESES	120 ANOS

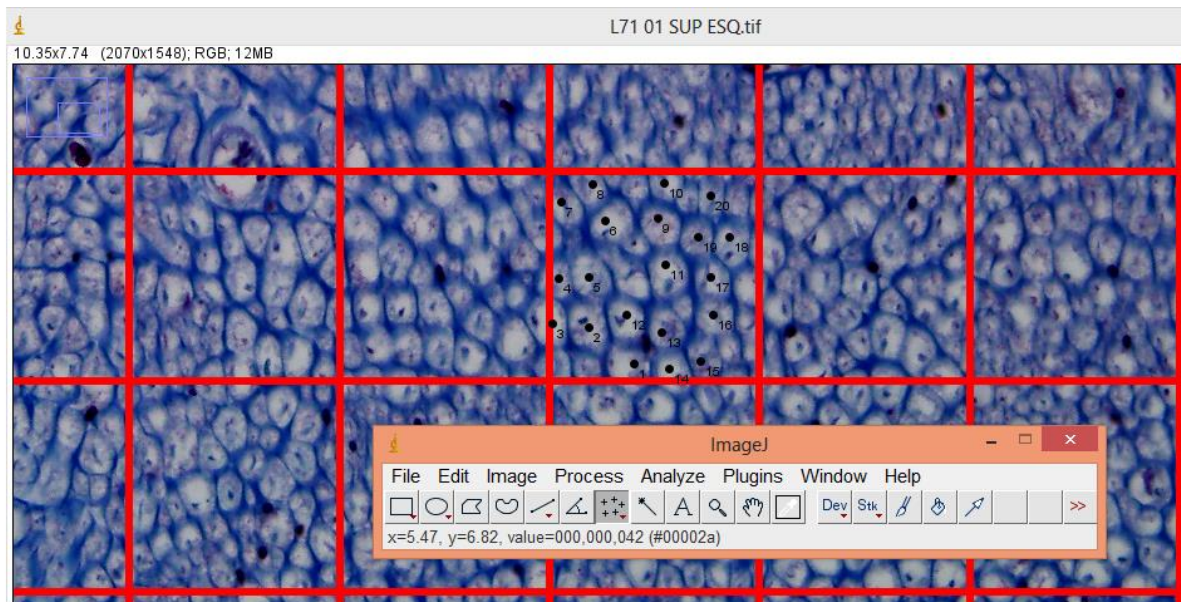
FONTE: SANTOS et. al, 2012.

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS NERVOS CORADOS POR HEMATOXILINA & EOSINA (HE)

Para coloração em HE foi utilizado o protocolo clássico com algumas adaptações. As lâminas foram colocadas, por um minuto, em solução Hematoxilina de Harris. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada duas vezes consecutivas. Posteriormente, foram impregnadas com Eosina-Floxina por 45 segundos. Esse material foi imediatamente lavado com água destilada para em seguida ser desidratado e montado.

Para análise morfoquantitativa, as lâminas foram fotodocumentadas pelo fotomicroscópio binocular axiophoto (Zeiss, D-7082), no aumento de 100x acompanhadas por uma escala métrica. Em seguida, as imagens foram calibradas e analisadas por meio do programa Image J para obtenção do diâmetro do axônio e quantificação das fibras. Foram analisadas cinco regiões do nervo de cada animal, sendo três regiões localizadas na parte inferior e duas regiões na parte superior da imagem obtida por microscopia de cada animal. Cada região foi delimitada por um quadrado de 4cm por 4cm fornecido pelo próprio programa, numa ampliação da imagem de 100%. As fibras foram classificadas de acordo com seu diâmetro e para quantificar foi utilizado o contador do Image J (FIGURA 3).

FIGURA 3 - Morfoquantificação pelo programa Image J



Análise de uma região inferior do nervo sural de fibras de animais normoglicêmicos. A área analisada foi delimitada por um quadrado de 4cm por 4cm e foi utilizada uma ferramenta do programa para quantificar os axônios. FONTE: O autor.

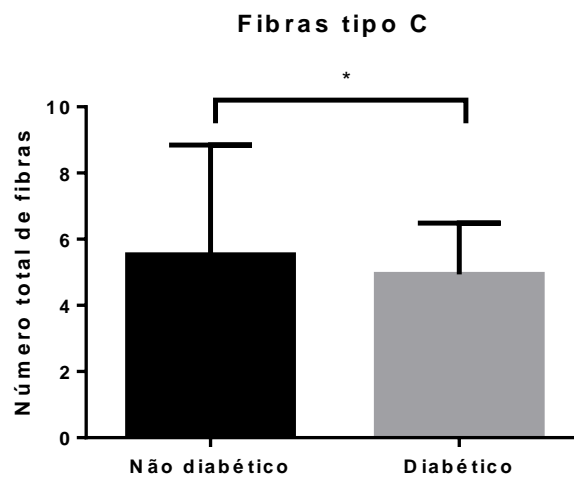
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO

Para análise estatística os resultados foram submetidos ao tratamento estatístico por teste t não pareado. A análise e os gráficos foram gerados pelo software de estatística GraphPad Prism 6. Foi considerado significativo o índice de significância menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

Ratos *Wistar* induzidos a diabetes mellitus tipo II por Streptozotocina apresentaram número total de fibras tipo C significativamente menor do que o grupo de animais normoglicêmicos ($p=0,0001$), como ilustrado no GRÁFICO 1.

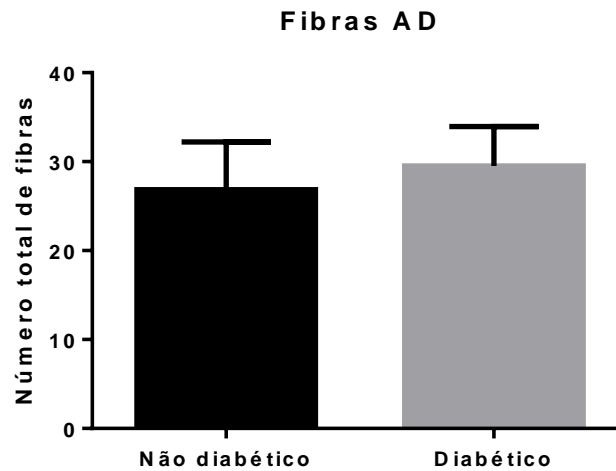
GRÁFICO 1 - Número total de fibras tipo C



As barras representam as médias \pm Erro Padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por meio de teste t não-pareado. $*p=0,0001$ (não diabético $n=30$, diabético $n=30$).

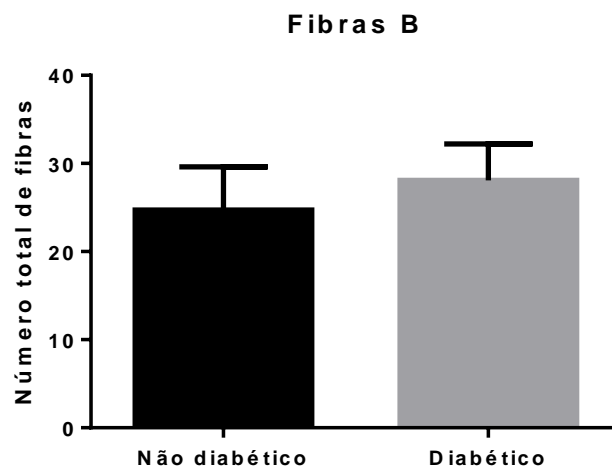
Entretanto, fibras A Delta e A Beta não retrataram diferença significativa no número total de fibras, ambas possuem diâmetro maior do que a fibra tipo C, estão representadas pelo GRÁFICO 2 e GRÁFICO 3 respectivamente.

GRÁFICO 2 - Número total de fibras A Delta



As barras representam as médias \pm Erro Padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por meio teste t não-pareado. $p=0,3245$ (não diabético $n=30$, diabético $n=30$).

GRÁFICO 3 - Número total de fibras A Beta



As barras representam as médias \pm Erro Padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por meio de teste t não-pareado. $p=0,3660$ (nao diabetico $n=30$, diabetico $n=30$).

Verificou-se a média de 5.5 fibras tipo C para animais não diabéticos e média de 4.9 para animais diabéticos. Para fibras A Delta, a média foi de 26.8 para animais não diabeticos e média de 29.5 para animais diabéticos. Já para as fibras A Beta, o número médio de fibras foi de 24.7 para animais não diabéticos e 28.0 para animais diabéticos (TABELA 5).

TABELA 5 – Média do número total de cada fibra por grupo experimental

	Fibras tipo C	Fibras A Delta	Fibras A Beta
Não diabético	5.533 ± 0.604	26.83 ± 0.9804	24.7 ± 0.8946
Diabético	4.933 ± 0.2834	29.50 ± 0.8147	28.07 ± 0.7550

Média do número total de fibras tipo C, A Delta e A Beta de animais não diabéticos (n=30) e animais diabéticos (n=30). Fibras tipo C $p=0,0001$, Fibras A Delta $p=0,3245$, Fibras A Beta $p=0,3660$. Foi considerado significativo $p\leq 0,05$ Média \pm E.P.M. (E.P.M. = erro padrão da média). FONTE: O autor.

5 DISCUSSÃO

É muito comum o estudo de neuropatias com a associação entre diabetes *mellitus* e hipertensão, devido à relação clínica entre as doenças. Fazan e outros pesquisadores da escola de medicina de Ribeirão Preto fazem esta abordagem e afirmam que a contribuição de cada fator isoladamente para o desenvolvimento de neuropatias ainda não está bem estabelecido e que necessita de maiores investigações. Este grupo de pesquisa demonstrou em um estudo que ratos induzidos a diabetes por Streptozotocina possuía uma redução do tamanho das fibras mielinizadas do nervo sural. Ressalta, ainda, que modelos animais para investigação do diabetes não reproduz todas as alterações morfológicas presentes em nervos humanos, mas oferece a possibilidade de estudo com fatores ambientais controlados e associação com outros fatores de risco da doença (SANADA et al., 2015).

O resultado obtido neste trabalho da redução significativa do número de fibras tipo C, pode ser relacionado a um estudo desenvolvido por Parry e Brown (1982) que investigou o tamanho da fibra com a vulnerabilidade à isquemia no nervo tibial proximal posterior com injeção de ácido araquidônico na artéria femoral ipsilateral. Esta pesquisa revelou que fibras de pequeno diâmetro ($<6\mu\text{m}$ de diâmetro) tiveram uma depleção significativa quando comparada a fibras maiores. Além disso, fibras não mielinizadas diminuíram em maior proporção do que as fibras mielinizadas. Estes resultados corroboram com estudo realizado por Newrick e colaboradores (1986) que relacionam a neuropatia diabética com o quadro de hipóxia no nervo. Além disso, em 1999 medidas espectrofotométricas da fluorescência do nervo foram

realizadas após a injeção intravenosa de fluoresceína de sódio como um indicador de fluxo sanguíneo. A menor saturação de oxigênio no nervo do grupo de pacientes diabéticos quando comparado ao grupo controle e fluxo sanguíneo comprometido, ilustraram mais uma vez o papel central da microcirculação na neuropatia diabética (IBRAHIM et al., 1999).

A influência das doenças vasculares na patogênese do dano neurológico do diabetes, já é reconhecida por mais de 100 anos (PRYCE, 1893). Está estabelecido que alterações vasculares, como redução da perfusão endoneural, são fortemente correlacionadas com a patologia do nervo. O diabetes promove alteração do balanço da vasoconstrição e vasodilatação, há deficiência dos principais vasodilatadores endoteliais como óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio, e ainda, a hiperglicemia e a dislipidemia levam ao estresse oxidativo, apontado como um dos principais fatores, pois levam ao aumento da formação do produto final da glicação e ativação da via poli-ol. Inclusive, já foi observado que tratamento com vasodilatadores de pacientes e animais melhorou a função do nervo (CAMERON et al., 2001). Neuropatias periféricas podem desenvolver em indivíduos não diabéticos com hipóxia crônica, como por exemplo, obstrução pulmonar crônica. Apresentando alterações neuropatológicas similares à neuropatia diabética. Isto sugere que somente a hipóxia, mesmo sem as alterações metabólicas decorrentes de um quadro diabético, é capaz de causar disfunção neuronal (MALIK et al., 1990).

A função da fibra tipo C é o principal determinante da resposta neurovascular, podendo ser avaliada por meio da avaliação da sensação térmica e da função autonômica dos pacientes (CASELLI et al., 2006).

A técnica utilizada de contagem com auxílio de software já está estabelecida na literatura. Uma pesquisa apontou que a análise morfométrica demanda muito tempo, especialmente quando nervos grandes são estudados. Enquanto a utilização de uma ferramenta de software para contagem e análise morfométrica leva apenas alguns minutos (de 10 a 20 minutos), análise chamada de semi-automatizada com a intervenção do observador, a análise manual é realizada em torno de 40 minutos, podendo este número ser maior para nervos maiores. A microscopia de luz é amplamente utilizada para análise morfométrica de fibras mielinizadas quando comparada a microscopia eletrônica por ser uma técnica mais demorada e mais cara. Estudos revelaram que ambas as técnicas são confiáveis para estudos morfoquantitativos (DA SILVA et al., 2007).

Ewart et al. (1989) desenvolveu três protocolos diferentes para avaliar o diâmetro do axônio uma fibra nervosa: o diâmetro do axônio é considerado a menor medida sendo o maior diâmetro relacionado à fibra, no outro protocolo o diâmetro é a média dos dois diâmetros ortogonais e por fim, os diâmetros são calculados por um software geométrico por meio de uma circunferência digitalizada. Foi observado que o segundo protocolo (diâmetro é a média dos dois diâmetros ortogonais) é o que oferece menor variabilidade. No presente trabalho, o diâmetro do axônio foi calculado pelo software Image J para que fosse classificado em um dos três tipos de fibras, tipo C, A Delta e A Beta.

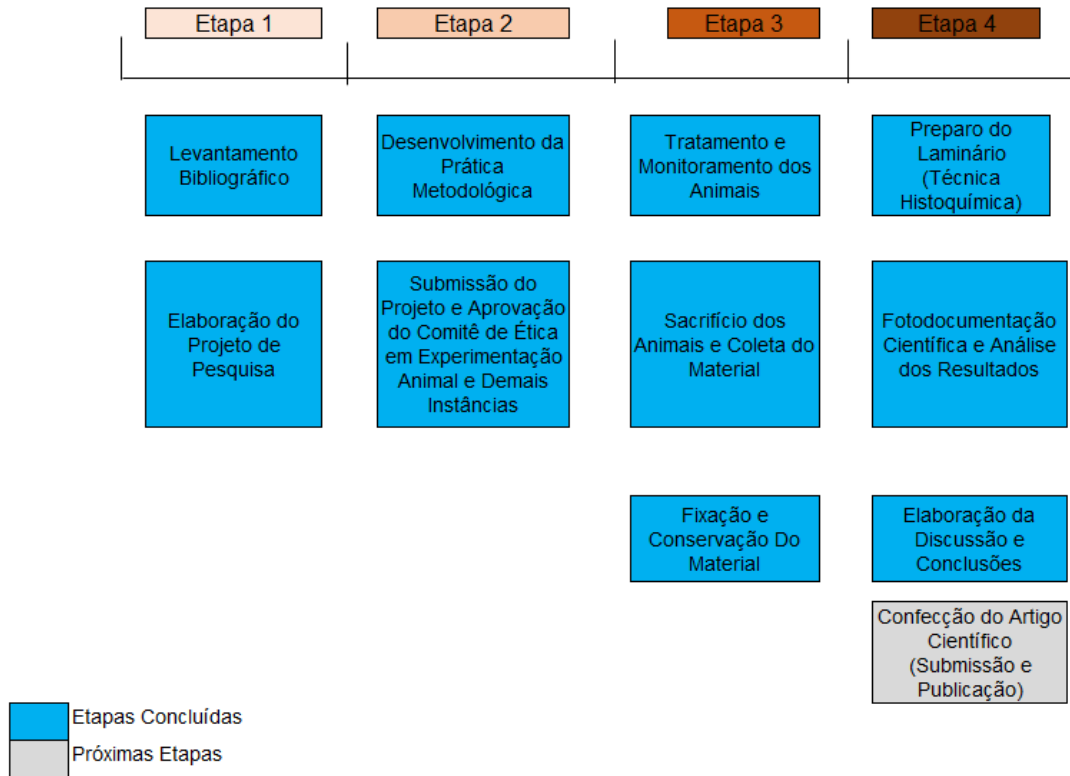
Este estudo não teve como objetivo estabelecer um quadro de neuropatia diabética, uma vez que Sanada e colaboradores (2015) já comprovaram que alterações no diâmetro do axônio e na bainha de mielina ocorrem em grupos induzidos à hiperglicemia e hipertensão concomitantemente, não ocorrendo diferença significativa quando estes fatores apresentam-se isolados. Como no presente estudo foi induzido o diabetes sem associação a nenhum outro fator, ocorreu apenas a diminuição na quantidade de fibras tipo C em animais diabéticos. De acordo com Caselli et al. (2006) este prejuízo da função do nervo tem como marcador precoce a perda da resposta neurovascular. O que pode estar relacionado à inabilidade das células do músculo liso de responder aos vasomoduladores liberados pelas fibras tipo C.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que a média do número de fibras C foi significativamente menor em animais diabéticos do que em animais não diabéticos ($p=0,0001$), não havendo diferença significativa entre os dois grupos experimentais nos tipos de fibra A Delta e A Beta. Estes dados sugerem que para que uma neuropatia periférica no diabetes mellitus tipo II seja estabelecida é preciso estar associada a um quadro hipertensivo.

7 CRONOGRAMA

O esquema abaixo apresenta as etapas da realização do estudo.



REFERÊNCIAS

ALEY, K.; LEVINE, J. Rapid onset pain induced by intravenous streptozotocin in the rat. **The journal of pain**, v. 2, n. 3 p.146-150, 2001.

ALMEIDA, T.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain research**, n. 100, p. 40-56, 2004.

ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL PARA ESTUDO DA DOR – IASP. Disponível em: < <http://www.iasp-pain.org/> > Acesso em: 17 maio 2016.

BASBAUM, A.; BAUTISTA, D.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 16 out. 2009.

BELSACK, D.; JAGER, T.; SCAFOGLIERI, A.; VANDERDOOD, K.; HEDENT, E. V.; VANHOENACKER, F.; MARCELIS, S.; MAESENEER, M. D. Ultrasound of the sural nerve: Normal anatomy on cadaveric dissection and case series. **European Journal of Radiology**, n. 82, p. 1953-1958, 2013.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para uso científico de animais. **Diário oficial da união**, Brasília, DF, 2008.

BRIDGESTOCK, C.; RAE, C. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anesthesia and intensive care medicine**, v. 14, p. 480-483, 2013.

CAMERON, N. E.; EATON, S. E. M.; COTTER, M. A.; TESFAYE S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Diabetologia**, n. 44, p. 1973-1988, 2001.

CASELLI, A.; SPALLONE, V.; MARFIA, G. A.; BATTISTA, C.; PACHATZ, C.; VEVES, A.; UCCIOLI, L. Validation of the sural nerve axon reflex for the assessment of small nerve fibre dysfunction. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, n. 77, p. 927-932, 2006.

CELIK, S; YENNIDUNYA, G; TEMEL, E; PURISA, S; UZUM, A; GUL, N; CINKIL, G; DINCCAG, N; SATMAN, I. Utility of DN4 questionnaire in assessment of neuropathic pain and its clinical correlations in Turkish patients with diabetes mellitus, **Primary care diabetes**, v. 10, p. 259-264, 2016.

COLVIN, L.; POWER, I. Neurobiology of chronic pain states. **Anaesthesia and intensive care medicine**, v. 6, n. 1, p. 10-13, 2005.

DA SILVA, A. P.; JORDAO, C. E. R.; FAZAN, V. P. S. Peripheral nerve morphometry: Comparison between manual and semi-automated methods in the analysis of a small nerve. **Journal of neuroscience methods**, n. 159, p. 153-157, 2007.

DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA. Disponível em: <<http://www.unifesp.br/reitoria/ceua/images/Diretrizes%20Eutanasia%20CONCEA.pdf>>
> Acesso em: 17 junho 2016.

DORFMAN, D.; GEORGE, M.C., ROBINSON-PAPP, J.; RAHMAN, T.; TAMLER, R.; SIMPSON, D.M. Patient reported outcome measures of pain intensity: do they tell us what we need to know? **Scandinavian journal of pain**, v.11, p.73-76, 2016.

EWART, D.P.; KUZON, W.M; FISH, J.S.; MCKEE, N.H. Nerve fibre morphometry: a comparison of techniques. **Journal of Neuroscience Methods**, n.29, p.143-150, 1989.

FAZAN, V. P. S.; DE VASCONCELOS, C. A. C.; VALENÇA, M. M.; NESSLER, R.; MOORE, K. C. Diabetic peripheral neuropathies: a morphometric overview. **International journal of morphology**, n. 28, v. 01, p. 51-64, 2010.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, IDF Diabetes Atlas, 7th edition, 2016 <<http://www.diabetesatlas.org/>> Acessado em 07 de julho de 2016.

GREGORY, J.A.; JOLIVALT, C.G.; GOOR, J.; MIZISIN, A.P.; CALCUTT, N.A. Hypertension induced peripheral neuropathy and the combined effects of

hypertension and diabetes on nerve structure and and functions in rats. **Acta Neuropathology**, v.56, n.124, p.61-73, 2012.

GUYTON, C.; HALL, J. **Fisiologia Humana**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HALL, G; CARROLL, D; PARRY, D; MCQUAY,D. Epidemiology and treatment of neuropathic pain: The UK primary care perspective. **Pain**, v.122, p.156-162, 2006.

HOLZER, S.; CAMEROTA, A.; MARTENS, L.; CUERDON, T.; CRYSTAL-PETERS, J.; ZGARI, M. Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. **Clinical therapeutics**, n. 1, v. 20, 1998.

IBRAHIM, S.; HARRIS, N.D.; RADATZ, M.; SELMI, F.; RAJBHANDARI, S.; BRADY, L.; JAKUBOWSKI, J.; WARD, J.D. A new minimally invasive technique to show nerve ischaemia in diabetic neuropathy. **Diabetologia**, n. 42, p. 737-742, 1999.

KILIC, A.; KONOPKA, G.; AKELINA, Y.; REGALBUTO, R.; TANG, P. Ipsilateral, cabled sural nerve for a sciatic nerve defect: An experimental model in rat. **Journal of neuroscience methods**, n. 197, p. 137-142, 2011.

KUNDALIC, B.; UGRENOVIC, S.; JAVANOVIC, I.; STEFANOVIC, N.; PETROVIC, V.; KUNDALIC, J. Morphometric analyses of connective tissue sheaths of sural nerve in diabetic and nondiabetic patients. **Biomedical research**, v. 4, p. 155-201, 2014.

LALLI, P.; CHAN, A.; GARVEN, A.; MIDHA, N.; CHAN, C.; BRADY, S.; BLOCK, E.; HU, B.; TOTH, C. Increased gait variability in diabetes mellitus patients with neuropathic pain. **Journal of diabetes and its complications**, v. 27, p. 248-254, 2013.

LLEWELYN, J; TOMLINSON, D; THOMAS, P. Neuropathy associated with systemic disease. In: de (Ed.). **Diseases of the peripheral nervous system**. p.1951-1991, 2005.

MALIK, R.; MASSON, E. A.; M SHARMA, A.K. Hypoxic neuropathy: relevance to human diabetic neuropathy. **Diabetologia**, n.33, p.311-318, 1990.

MOFATT, R.; RAE, C.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and intensive care medicine**, n.12, v.1, 2010.

MORASCO, B.J.; TURK, D.C.; NICOLAIDIS, C. Psychometric properties of the centrality of pain scale. **The journal of pain**, v. 16, n. 7, 2015.

NEWRICK, P.G.; WILSON, A.J.; JAKUBOWSKI, J.; BOULTON, A.J.M.; WARD, J.D. Sural nerve oxygen tension in diabetes. **British medical journal**, v.293, p.1053-1054, 1986.

OLIVEIRA, F. S.; NESSLER, R. A.; CASTANIA, J.A.; SALGADO, H. C.; FAZAN, V.P.S. Ultrastructural and morphometric alterations in the aortic depressor nerve of rats due to long term experimental diabetes: effects of insulin treatment. **Brain research**, n. 1491, p. 197-203, 2013.

PARRY, G. J.; BROWN M. J. Selective fiber vulnerability in acute ischemic neuropathy. **Annals of Neurology**, v. 11, n. 2, p. 147-154, 1982.

PRESIDENCIA DA REPUBLICA CASA CIVIL LEI N11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm> Acesso em: 25 maio 2016.

PRYCE, T. On diabetic neuritis with a clinical and pathological description of three cases of diabetic pseudo-tabes. **Brain**, n. 19, p. 416-424, 1893.

RAMAKRISHNAN, P. K.; HENRY, M.; VIKSE, J.; ROY, J.; SAGANIAK, K.; MIZIA, E.; TOMASZEWSKI, K. A. Anatomical variations of the formation and course of the sural nerve: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Anatomy**, n. 202, p. 36-44, 2015.

SAID, G. Diabetic neuropathy – a review. **Nature clinical practice**, v. 3, n. 6, 2007.

SANADA, L.; KALIL L.; TAVARES, M.R.; NEUBERN, M.C.M; SALGADO, H.C.; FAZAN, V.P.S. Sural nerve involvement in experimental hypertension: morphology and morphometry in male and female normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). **BMC Neuroscience**, v.13, n.24, p.1-12, 2012.

SANADA, L.; TAVARES, M.; SATO, K.; FERREIRA, R.; NEUBERN, M.; CASTANIA, J.; SALGADO, H.; FAZAN, V. Association of chronic diabetes and hypertension in sural nerve morphometry: an experimental study. **Diabetology and metabolic syndrome**, v.7, n.9, p.1-9, 2015.

SEEMA, S.R. Study of sural nerve complex in human cadavers. **ISRN Anatomy**, v.2013, p. 1-7, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA ESTUDO DA DOR. Disponível em:
< <http://www.sbed.org.br/home.php> > Acesso em: 2 jun. 2016.

STEEDS, C. The anatomy and physiology of pain. **Basic science**, v. 34, n. 2, p. 55-59, 2016.

STEVENS, M. J.; OBROSOVA, I.; CAO, X.; VAN HUYSEN, C.; GREENE, D. A. Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, n. 49, p. 6-15, 2000.

TREEDE, R. D.; BROMM, B. Painful dysaesthesias due to dissociated sensory loss: clinical and neurophysiological findings. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 100-116, 1992.

VINIK, A. I.; VINIK, E. J.; COLBERG, C. R.; MORRISON, S. Falls risk in older adults with type 2 diabetes. **Clinics in geriatric medicine**, v. 31, p. 89-99, 2016.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiology of disease**, v. 7, n. 5, p. 504-510, 2000.