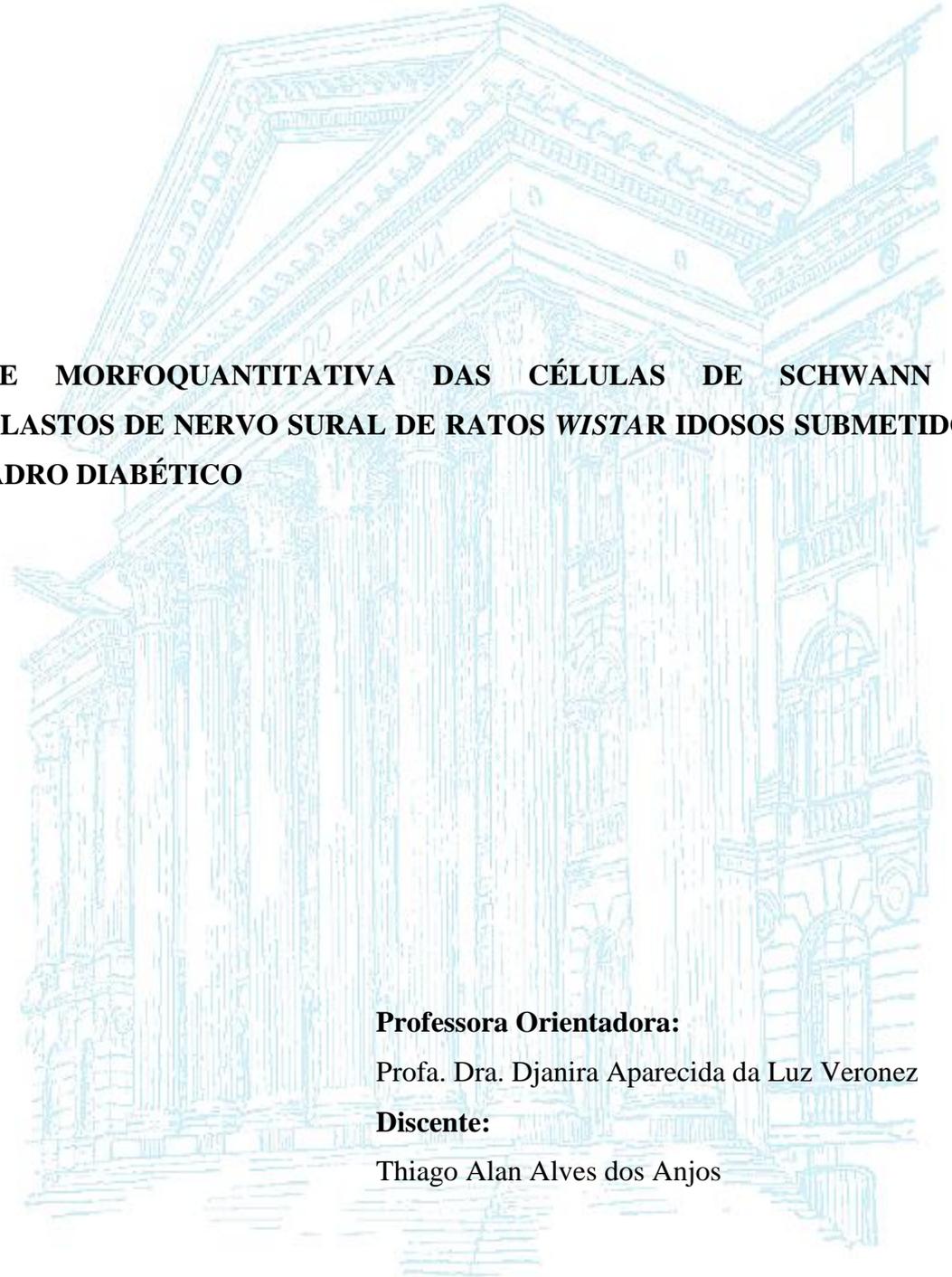


**Universidade Federal do Paraná - UFPR**  
**Setor de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Anatomia**



**ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DAS CÉLULAS DE SCHWANN E  
FIBROBLASTOS DE NERVO SURAL DE RATOS WISTAR IDOSOS SUBMETIDOS  
AO QUADRO DIABÉTICO**

**Professora Orientadora:**

Profa. Dra. Djanira Aparecida da Luz Veronez

**Discente:**

Thiago Alan Alves dos Anjos

Curitiba

2016

THIAGO ALAN ALVES DOS ANJOS

**ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DAS CÉLULAS DE SCHWANN E  
FIBROBLASTOS DE NERVO SURAL DE RATOS WISTAR IDOSOS SUBMETIDOS  
AO QUADRO DIABÉTICO**

Monografia apresentado à disciplina Trabalho  
de Conclusão de Curso II do Curso de  
Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Doutora Djanira  
Aparecida da Luz Veronez

Curitiba

2016

## RESUMO

O Diabetes é um problema epidemiológico de abrangência mundial em ascensão nos últimos anos, com provável interferência de mudanças sociais e culturais que refletem no estilo e qualidade de vida das pessoas. O aumento da prevalência do Diabetes em indivíduos idosos associado ao envelhecimento da população mundial faz com que esta seja a faixa etária mais acometida por neuropatia periférica diabética. Esses danos nervosos podem ser de natureza sensitiva, autonômica ou motora. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma análise morfoquantitativa das células de schwann e fibroblastos de nervo sural de ratos *Wistar* idosos submetidos ao quadro diabético. Utilizaram-se 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 ao modelo experimental de Diabetes Mellitus tipo II por meio da administração via intraperitoneal de Estreptozotocina e 30 animais senescentes normais sem tratamento. Decorrido o tempo de vida, os animais foram anestesiados com Xilasina 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 micrometros de espessura e em seguida, coloração em Hematoxilina-Eosina. Para análises quantitativas 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<sup>®</sup> para obtenção da quantificação dos núcleos de células de schwann e núcleos de fibroblastos. A média obtida nos indivíduos normoglicêmicos foi de 4,58 células de schwann por quadrante e 0,56 fibroblastos, para indivíduos hiperglicêmicos a média foi de 4,52 células de Schwann e de 0,54 fibroblastos. Os resultados obtidos permitiram concluir que não houve alteração significativa entre o grupo controle e o grupo induzido ao quadro diabético. Essa análise permite concluir que somente a hiperglicemia não é capaz de promover alteração na quantidade de células de Schwann e fibroblastos no nervo. Esses resultados corroboram com outros estudos dentro da literatura.

**Palavras-chave:** Diabetes. Envelhecimento. Neuropatia Periférica. Morfometria. Nervo Sural.

## **ABSTRACT**

Diabetes is an epidemiological problem that reaches entire world with visible increase in the frequency of the disease in recent years by social and cultural changes that reflect the lifestyle of people and quality of life. In addition, the aging of the world population is related to the increasing prevalence of diabetes in the elderly, thus comprising the main age group affected with diabetic peripheral neuropathy. In this sense, the objective of this research was to develop a morpho-quantitative analysis of schwann cells and sural nerve fibroblasts of elderly Wistar rats submitted to diabetic patients. For it will be used 60 male *Wistar* rats conceded by Vivarium Sector of Biological Sciences, Federal University of Paraná - UFPR, divided into two groups consisting of 30 senescent animals treated with type II diabetes by administering intraperitoneal of streptozotocin and 30 senescent animals normal untreated. Elapsed time of life, the animals will be anesthetized with xylazine and ketamine, perfused via transcardially with saline and 10% formalin for later removal of the sural nerve terminal branches. Slides are mounted with cross-sections of the sural nerve with seven microns thick and then staining with hematoxylin-eosin. For morphoquantitative analysis the slides will be photo documented in light microscope binocular axiophoto (Zeiss, D-7082), accompanied by a metric scale. Then the images are calibrated and analyzed by the program Image J to obtain the quantification of schwann cell nuclei and fibroblast nuclei. The mean values obtained in the normoglycemic individuals were 4.58 schwann cells per quadrant and 0.56 fibroblasts. For hyperglycemic individuals, the mean was 4.52 schwann cells and 0.54 fibroblasts. The obtained results allowed to conclude that there was no significant change between the control group and the group induced to the diabetic group. This analysis allows to conclude that only hyperglycemia is not able to promote alteration in the amount of schwann cells and fibroblasts in the nerve. These results corroborate with other studies within the literature.

**Keywords:** Diabetes. Aging. Peripheral Neuropathy. Morphometry. Sural nerve.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	5
1.1 EVIDÊNCIAS DE INTERESSE .....	5
1.2 OBJETIVO GERAL .....	6
2. JUSTIFICATIVA.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	8
3.1 ETIMOLOGIA.....	8
3.2 DEFINIÇÃO DE DIABETES .....	8
3.3 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES NO BRASIL E NO MUNDO .....	9
3.4 QUESTÕES SOCIOECONÔMICAS DO DIABETES .....	9
3.5 FISIOPATOLOGIA DO DIABETES.....	10
3.6 NEUROPATIA PERIFÉRICA DIABÉTICA.....	12
3.7 ALTERAÇÕES DOS AXÔNIOS E DA BAINHA DE MIELINA NO QUADRO DIABÉTICO .....	13
3.8 COMPOSIÇÃO MORFOLÓGICA DO NERVO.....	14
3.8.1 ENDONEURO .....	14
3.8.2 PERINEURO.....	14
3.8.3 EPINEURO.....	15
3.9 CÉLULAS DE SCHWANN .....	15
3.10 FIBROBLASTOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1 Aspectos Éticos.....	17
4.2 Animais.....	17
4.3 Análise MORFOQUANTITATIVA das células de schwann e fibroblastos .....	18
4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
6. CONCLUSÕES.....	26
7. CRONOGRAMA.....	27
8. REFERÊNCIAS.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 EVIDÊNCIAS DE INTERESSE

Segundo Tanqueiro *et al.* (2013) mais de um quarto da população entre os 60-79 anos tem Diabetes, demonstrando haver correlação direta entre o aumento da prevalência do Diabetes com o envelhecimento.

As implicações econômicas e sociais relacionadas ao tratamento do quadro, tendo em vista que a patologia é crônica, refletem num problema de Saúde Pública. Pace *et al.*, (2002) relata que a maior parte dos custos diretos do Diabetes relaciona-se com as suas complicações, que muitas vezes podem ser reduzidas, retardadas ou, em certos casos, evitadas. Dependendo do país, as estimativas disponíveis indicam que o Diabetes pode gerar de 5 a 14% das despesas de atenção de saúde para tratamento de complicações desencadeadas pelo quadro diabético.

Dentre as complicações do Diabetes em idosos: retinopatia, infartos do miocárdio silenciosos, nefropatias, e neuropatia periférica nas mãos e, principalmente, nos pés.

Transtornos neuropáticos e isquêmicos causam ulcerações nos pés dos pacientes diabéticos. As úlceras no pé, fato que precede a amputação, são grande causa de morbimortalidade dos pacientes. A neuropatia diabética periférica é diagnosticada por histórico clínico do paciente e exame físico do pé, mas exames como eletromiografia ou biópsia também são importantes. Especialistas afirmam que é extremamente importante que pacientes diabéticos façam a inspeção rotineira de seus pés. Estudos anteriores ressaltam que é necessária uma avaliação minuciosa dos pés dos diabéticos por parte dos profissionais da saúde. Pace *et al.*, (2002) explicam que essa investigação básica é por meio da avaliação dermatológica, estrutural, circulatória e da sensibilidade tátil pressórica, além das condições higiênicas e características dos calçados, sendo estes últimos fundamentais para manter a saúde dos pés, e que essa análise contribui para diminuir o risco de morbidades nos pés dos diabéticos e conseqüentemente, suas complicações. As células de Schwann e os fibroblastos são de extrema importância para homeostase do nervo, pois estão relacionadas com reparo e cicatrização das fibras danificadas.

## **1.2 OBJETIVO GERAL**

O objetivo dessa pesquisa é observar se o quadro diabético em ratos *Wistar* idosos interfere no número de células de schwann e de fibroblastos, comparando o grupo de 30 ratos normoglicêmicos com o grupo de 30 ratos hiperglicêmicos submetidos ao modelo experimental de Diabetes Mellitus tipo II.

## 2. JUSTIFICATIVA

O diabetes é um problema de saúde pública mundial, especialmente em países em desenvolvimento. A prevalência do quadro vem aumentando no decorrer dos anos. Além disso, Sartorelli & Franco (2003) ressaltam que as afecções muitas vezes são subnotificadas, e essas são figuradas como causa do óbito.

O quadro diabético possui grande relevância na saúde, pois seu quadro acomete diversas disfunções, tais como, retinopatia, nefropatia, alterações cardiovasculares, e neuropatia. A neuropatia é uma complicação muito frequente no diabetes. Esse distúrbio pode afetar o Sistema Nervoso Autônomo, nervos das extremidades do corpo, nas regiões das mãos e pés, sendo a forma mais comum, denominada neuropatia periférica, embora nervos proximais, como o nervo femoral, também possam ser acometidos. Como Silveira & Silveira (1994) explicaram, a forma mais comum de neuropatia diabética é a polineuropatia periférica simétrica. Ela se caracteriza pela perda sensorial simétrica, afetando principalmente os membros inferiores em suas porções distais. A perda motora e o envolvimento dos membros superiores também ocorrem, mas são menos frequentes em relação aos membros inferiores. Os sintomas, que frequentemente se iniciam insidiosos, consistem de insensibilidade, sensação de queimação e dores em pontada.

A neuropatia diabética representa a complicação crônica mais prevalente, afetando 30 a 50 % dos pacientes com Diabetes, e 80% desses casos se manifestam como polineuropatia sensorio-motora distal simétrica. Em torno de 15% dos pacientes com neuropatia diabética desenvolvem úlceras, configurando a principal causa de amputação não traumática nos membros inferiores Costenaro *et al.*, (2015).

É indubitável a relevância do impacto do Diabetes dentro da sociedade atual e futura, segundo levantamentos epidemiológicos. Estudos de quantificação celulares são indispensáveis para o entendimento do quadro como um todo, apesar de suas funções bem elucidadas em indivíduos normoglicêmicos, as células de Schwann e fibroblastos dentro de uma condição hiperglicêmica podem sofrer alterações morfofuncionais, esse estudo tem como objetivo contribuir para melhor entendimento do efeito de glicemia elevada sobre nervos de pacientes diabéticos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ETIMOLOGIA

A origem do nome diabetes vem do grego “dia” significado “através de”, “baiten” quer dizer “ir” ou “passar” e “mellitus” ou “melito” está relacionado ao latim “mellis” significa mel. (DOS SANTOS et al., 2014)

#### 3.2 DEFINIÇÃO DE DIABETES

Diabetes Insipidus é uma doença caracterizada pela eliminação de grandes volumes de urina muito diluída. Esta doença é causada pela disfunção da parte posterior da glândula pineal, que passa a secretar quantidades inadequadas de arginina-vasopressina, também chamado de hormônio antidiurético (diabetes insípida neurogênica ou central), levando a incapacidade do rim em responder à arginina-vasopressina circulante (diabetes insípida nefrogênica) Velasquez & Medeiros (2014).

De acordo com SPD (2015) *apud* Martins *et al.*, (2015) o Diabetes Mellitus é a designação usada para descrever uma desordem metabólica com múltiplas etiologias caracterizada por uma hiperglicemia crônica resultante de distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, que são resultado de deficiências na secreção e/ou ação da insulina, ou de ambas. Ferreira *et al.*, (2014) associaram a definição da doença à qualidade de vida. Afirmam que Diabetes Mellitus compreende um grupo de distúrbios metabólicos de etiologia variada, resultante da secreção deficiente de insulina pelas células beta-pancreáticas, da resistência periférica a insulina ou de ambas. É uma doença muito associada ao sedentarismo e maus hábitos alimentares.

Guimarães (2015) define Diabetes Mellitus como um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e está associada a complicações, disfunções e insuficiência de múltiplos órgãos, especialmente, rins, coração, cérebro, vasos sanguíneos e olhos.

### 3.3 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES NO BRASIL E NO MUNDO

Segundo Pereira *et al.*, (2014), o Diabetes Mellitus está entre as principais causas de morbimortalidade. Sua prevalência mundial tem aumentado rapidamente, especialmente entre os países em desenvolvimento. No Brasil, em 2010, a prevalência geral estimada, incluindo os tipos 1 e 2 entre adultos idosos, foi de 6,4% (aproximadamente 12 milhões). Destaca-se, no entanto, que o aumento da prevalência da doença é verificado em todo o mundo. Havia 371 milhões de diabéticos no mundo em 2012. Estima-se que, em 2030, cerca de 552 milhões de pessoas terão diabetes. Isto equivale a um diabético a cada 10 adultos, significando que, para se chegar a esse número, surgirão três novos casos a cada 10 segundos. O tipo 1 apesar de ser menos comum que o tipo 2 dentro da população, também vem aumentando a cada ano, sendo a prevalência mundial desse tipo de 0,1% a 0,3%, com cerca de 78.000 novos casos novos a cada ano.

### 3.4 QUESTÕES SOCIOECONÔMICAS DO DIABETES

Segundo Picon (2011) o Diabetes está entre as doenças mais estudadas da atualidade, devido à morbidade a que expõe os pacientes e ao significado contingente de gastos que demanda seu tratamento. Apesar dos grandes esforços científicos em todos os campos da área da saúde no sentido de mitigar a doença, ainda existem milhares de pessoas acometidas e outras que, sabidamente, virão a sofrer das importantes limitações decorrentes do avanço do Diabetes, quando da instalação de um quadro irreversível de degeneração nervosa: a neuropatia periférica diabética.

Atualmente o Diabetes Mellitus é um problema comum e grave para a saúde global. O quadro de Diabetes cresceu em conjunto com rápidas mudanças sociais e culturais, tais como o envelhecimento das populações, urbanização, mudanças na dieta, pouca atividade física e outros comportamentos que não são saudáveis, e está associado a várias complicações que diminuem a qualidade de vida e a sobrevivência de indivíduos afetados, segundo Shikata *et al.*, (2013).

Cortez *et al.*, (2015) dizem que no Brasil, o Ministério da Saúde criou vários programas que impactam a maioria da população para controlar doenças crônicas, como é o caso do Diabetes Mellitus, o Programa Nacional de Hipertensão e Diabetes Mellitus - Hiperdia foi criado em 2002, em uma tentativa de reorientar a assistência farmacêutica para o

fornecimento contínuo de medicamentos, bem como monitorar as condições clínicas dos pacientes de serviços de saúde.



Figura 1. Número de pessoas estimadas com diabetes no mundo e por regiões em 2015 e 2040 (20-79 anos). Fonte: Atlas IDF International Diabetes Federation 7ª edição (2015).

### 3.5 FISIOPATOLOGIA DO DIABETES

Na fisiopatologia do Diabetes Mellitus, o mesmo é classificado em vários subtipos, dos quais são os principais, tipo I e tipo II. O tipo I é autoimune, o pâncreas endócrino é atacado por anticorpos do próprio organismo, causando falência nas células beta, que são as células produtoras de insulina. De acordo com Ferreira *et al.*, (2011) no tipo II, o principal fenômeno fisiopatológico é a resistência à ação da insulina, diminuindo a captação de glicose em tecidos insulina dependentes. No início da doença, em resposta a esta resistência, ocorre hiperinsulinemia compensatória, continuando por meses ou anos. Com o avanço do Diabetes Mellitus II, por causa da disfunção e redução das células beta pancreáticas, a síntese e a secreção de insulina ficam comprometidas e, em alguns casos, a insulino terapia passa a ser essencial.

Dentre as principais consequências causadas pelos distúrbios metabólicos diabéticos estão as alterações visuais, neuropatias, nefropatias, alterações cardiovasculares, entéricas e glandulares. Espírito Santo *et al.*, (2013)

A nefropatia diabética afeta a capacidade de filtração dos rins. O rim é um órgão par, localiza-se na região retroperitoneal apoiado sobre o músculo psoas maior. Pemper *et al.*, (2015) dizem que, o sangue que será filtrado chega no rim por meio da artéria renal por uma fenda denominada hilo. O sangue a ser filtrado entra na cápsula de Bowman por meio da arteríola aferente, chegando no glomérulo, que terá a função de reter elementos como proteínas grandes e eritrócitos. Esses elementos, depois de retidos, saem da cápsula pela arteríola eferente retornando à circulação por meio da veia renal. O restante segue na cápsula onde acontece um processo de reabsorção ativa de glicose, carboidratos, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais sendo que em condições normais não entram no túbulo contorcido proximal. Haverá reabsorção passiva de água e sais minerais.

Quando há nefropatia diabética, os altos índices glicêmicos acabam gerando lesões nos glomérulos, comprometendo assim o processo de filtração sanguínea, gerando insuficiência renal. As destruições desses glomérulos podem ser identificadas precocemente por um exame chamado microalbuminúria, onde se identifica a proteína albumina na urina.

A retinopatia diabética é a complicação nos olhos causada pelo Diabetes Mellitus. A retina é uma camada de tecido nervoso no olho, sensível ao estímulo luminoso, capaz de captar a luz, transformá-la em estímulo nervoso que então é conduzido até o cérebro. Em pacientes diabéticos a glicemia elevada faz com que os vasos sanguíneos fiquem mais permeáveis, fazendo com que haja edema, ou seja, extravasamento de fluido e sangue. Inicialmente a visão fica embaçada, e progressivamente pode haver perda parcial e até mesmo total da visão. Segundo Boelter *et al.*, (2003) escreveram que a retinopatia diabética é uma complicação crônica do Diabetes Mellitus que ocorre em 99% dos pacientes com Diabetes tipo I e em 60% dos pacientes com Diabetes tipo 2, após 20 anos de evolução da doença, sendo a principal causa de cegueira em adultos. Níveis de glicose e pressão arterial elevados, junto com longo tempo de duração do Diabetes Mellitus, são os principais fatores de risco.

Segundo Espírito Santo *et al.*, (2013) há uma série de problemas crônicos relacionados ao Diabetes Mellitus. Com a glicemia desregulada, várias complicações micro e macrovasculares podem ocorrer, como a retinopatia diabética, alterações cardiovasculares, alterações circulatórias e neurológicas. Em relação à retinopatia diabética, esta pode ir desde uma turvação da visão até a presença de catarata, descolamento da retina, hemorragia vítrea e cegueira. Os problemas cardiovasculares, muitas vezes, estão associados à obesidade e

tabagismo, que pode precipitar o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva e as arritmias. As alterações microvasculares podem ocasionar lesões no membro inferior, acarretando o problema denominado “pé diabético”. Além disso, pode ocorrer a neuropatia diabética, com diminuição da sensação tátil e térmica, dentre outras complicações.

Em relação ao comprometimento dos nervos periféricos, segundo Porciúncula *et al.*, (2007) o comprometimento dos nervos motores dos membros inferiores no indivíduo diabético determina hipotrofia muscular, deformidades e pontos de pressão anormais; o comprometimento dos nervos sensitivos manifesta-se por distúrbios da sensibilidade nas extremidades podendo chegar à anestesia. Cerca da metade dos indivíduos com neuropatia diabética sensório-motora simétrica distal é assintomática, mas mantém risco de lesão insensível nos pés. A neuropatia diabética autonômica nas extremidades determina diminuição da função sudomotora, tornando o pé ressecado e vulnerável à ulceração. A complicação neuropática é preocupante, pois, particularmente nos membros inferiores, pode causar úlceras plantares que, sem tratamento adequado, culminam com amputações.

Por meio desse comprometimento sensitivo, os nervos mais longos são afetados primeiro e os sintomas aparecem inicialmente, e com mais severidade nos pés. A perda de sensibilidade é maior na porção periférica e mais distal, caracterizando a síndrome “bota-luva”, segundo Doi *et al.*, (1981).

### **3.6 NEUROPATIA PERIFÉRICA DIABÉTICA**

Segundo Sales *et al.*, (2012) a neuropatia diabética periférica é a complicação mais prevalente dessa doença, é progressiva e irreversível, atingindo até 80% dos diabéticos. Além disso, relatam que por meio de estudos anteriores, pode-se concluir que a neuropatia periférica leva a perda das informações sensoriais cutâneas nos pés, podendo ocasionar transtornos da estrutura osteoarticular dessa região, além de contribuir para modificar a marcha, o equilíbrio estático e dinâmico.

A neuropatia diabética predomina nos membros inferiores, apresentando-se bilateralmente. Da lesão nervosa periférica, derivam dois quadros: a neuropatia somática e a neuropatia autônoma. A primeira resulta da perda da função somática sensitiva e motora. Caracteriza-se por atrofia muscular (por perda da inervação dos pequenos músculos do pé), deformidade do pé (denominada dedos em garra), hipertensões plantares, profunda

insensibilidade dolorosa e proprioceptiva. A perda da sensibilidade termo-álgica e a sua consequente vulnerabilidade a traumas físicos e térmicos aumenta o risco ulcerativo em 7 vezes Reiber *et al.*, (2005) *apud* Marques (2010). A neuropatia autônoma reflete a abertura dos *shunts* arteriovenosos por perda da função simpática: o pé é quente, túrgido, com pele seca e associa-se a isquemia cutânea por desvio definitivo do fluxo para a profundidade da pele, agravando os efeitos da doença vascular periférica quando coexistentes Pataky *et al.*, (2007) *apud* Marques (2010).

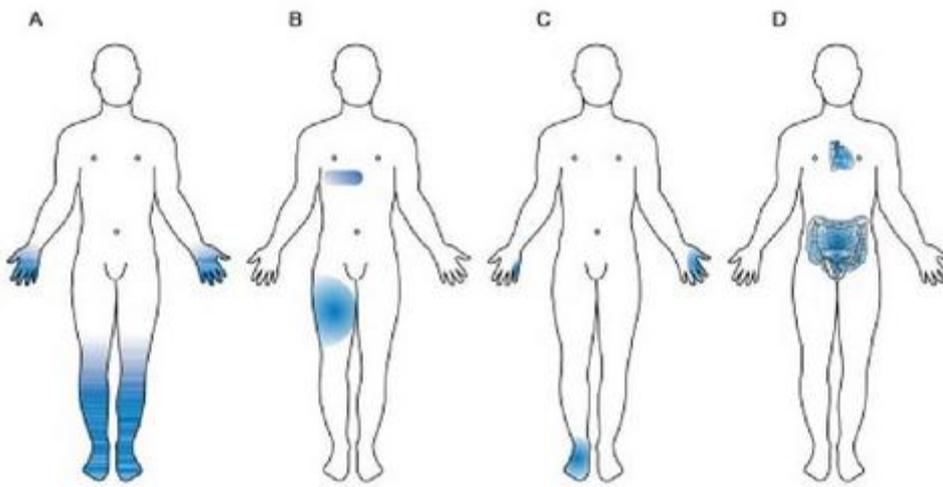


Figura 2. Manifestações clínicas da neuropatia diabética. (A) Polineuropatia sensório-motora. (B) Radiculopatia/plexopatia. (C) Mononeuropatia focal/mononeurite múltipla. (D) Neuropatia autonômica. Fonte: adaptada COSTENARO *et al.*, (2015)

### 3.7 ALTERAÇÕES DOS AXÔNIOS E DA BAINHA DE MIELINA NO QUADRO DIABÉTICO

Yagihashi & Sima (1985;1986) *apud* Filho (2008) demonstraram em seus estudos alterações nervosas provocadas por Diabetes. Dentre essas alterações constataram a redução do calibre axonal, sugerindo uma axonopatia, em nervos simpáticos de ratos diabéticos espontâneos biobreeding (BB). Medori & Cols (1988) *apud* Filho (2008) constataram uma diminuição do tamanho das fibras mielínicas e amielínicas no nervo vago em ratos. Análise Morfométrica de secções transversais de nervos isquiáticos de ratos diabéticos espontâneos BB, relataram que, nos segmentos proximais, houve um aumento da área dos axônios, enquanto que nos segmentos distais, essa área se mostrou diminuída. Estas diferenças estão relacionadas nas alterações do transporte axonal, concluíram Medori & Cols (1988).

Huang & Walsh (1973) *apud* Filho (2008) observaram em seu estudo que houve redução na densidade de fibras mielínicas do nervo esplâncnico maior e Migliaccio (2003) e Sato (2005) que houve redução de fibras mielínicas finas nos nervos vagos e simpático-renais de ratos *Wistar* diabéticos crônicos induzidos por estreptozotocina (STZ).

### **3.8 COMPOSIÇÃO MORFOLÓGICA DO NERVO**

Anatomicamente os nervos são estruturas do Sistema Nervoso Periférico constituídas pelo conjunto de axônios de neurônios envolvidos por três camadas de tecidos conjuntivos que conferem nutrição e integridade à fibra nervosa. Welch, (1996); Evans (2001) *apud* De Oliveira (2008).

#### **3.8.1 ENDONEURO**

O endoneuro é uma camada de tecido conjuntivo que reveste cada fibra nervosa, composta de fibroblastos, capilares e fibras colágenas, sendo a maioria dessas fibras disposta longitudinalmente. Apesar de apresentar elasticidade e resistência, a fibra nervosa é muito suscetível à compressão e ao estiramento. O endoneuro necessita da proteção do perineuro e do epineuro. Sunderland (1965); Welch, (1996) *apud* Sobral (2008).

#### **3.8.2 PERINEURO**

De acordo com Welch (1996); Lundy-Ekman, (2004) *apud* De Oliveira (2008), o perineuro é uma fina bainha de tecido fibroso, que envolve numerosas fibras nervosas formando fascículos e apresenta células pavimentosas fortemente unidas por zônulas de oclusão que são dispostas em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas. Entre as camadas de células são encontradas fibras colágenas tipo I e tipo III e fibras elásticas. O perineuro é importante na manutenção da homeostase do nervo, pois atua como barreira de difusão, auxiliando a preservação do microambiente intrafascicular especializado, além de ter papel de proteção mecânica, fornecendo ao nervo elasticidade e força tênsil.

### 3.8.3 EPINEURO

O epineuro é a camada mais externa, é constituído de uma densa bainha de tecido conjuntivo que envolve todo o nervo. Essa camada contém fibras colágenas e elásticas, mastócitos, macrófagos e fibroblastos. O tecido adiposo raramente é observado, mas pode se constituir em elemento importante para proteção do nervo contra forças deformadoras, segundo Sunderland (1965) *apud* Sobral *et al.*, (2008).

### 3.9 CÉLULAS DE SCHWANN

As células de Schwann, descritos desde 1839 por Theodor Schwann, constituem a glia do sistema nervoso periférico (SNP). em torno de todos axônios, em alguns casos envolvendo-os com o seu citoplasma e em outros casos por meio de bainha de mielina em torno do diâmetro maior. Estas células possuem múltiplas funções relacionadas proteção e suporte metabólico axonal, também contribuem no processo e mecanismos de condução do nervo e regeneração de axônios lesionados. LOMBANA (1993)

As células de Schwann (lemócito) formam uma bainha envolvendo cada axônio, que não é contínua sendo interrompida a cada 1 a 2 mm por nodos de Ranvier (regiões não mielinizadas). As células de Schwann se originam do ectoderma e, durante o crescimento, envolvem várias vezes o axônio para formar a bainha de mielina, sendo que cada uma apresenta-se revestida por membrana basal conforme relatado por Todd & Bowman, 1975; Kefalides *et al.*, (1979) *apud* Teodori (1996).

Segundo Carneiro (2004) a bainha de mielina é um envoltório lipoprotéico formado pela rotação do oligodentrócito em torno do axônio no Sistema Nervoso Central e é formada pela célula de Schwann no Sistema Nervoso Periférico. A célula de Schwann envolve apenas um axônio. A bainha funciona como um isolante elétrico do axônio em relação ao meio extracelular, devido a este isolamento o impulso nervoso é regenerado a cada nó de Ranvier, fazendo com que o impulso ocorra mais rapidamente, denominando esse impulso de saltatório.

### **3.10 FIBROBLASTOS**

São as células mais comuns no tecido conjuntivo propriamente dito. Os fibroblastos são alongados ou estrelados, com longos prolongamentos, núcleo eucromático e um ou dois nucléolos proeminentes. O retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi são bem desenvolvidos, pois sintetizam os componentes da matriz extracelular: as fibras colágenas, as fibras reticulares, as fibras elásticas e a substância fundamental. Produzem também fatores de crescimento que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Após uma lesão, estimulados pelo fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), produzido pelos macrófagos, os fibroblastos proliferam. Eles secretam a matriz extracelular, contribuindo para a cicatrização. Junqueira (2013)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa ocorreu de acordo com o princípio dos 3 Rs. Os 3 Rs são princípios éticos para a experimentação animal. Russel & Burch, *et al. apud Dany et al.* (2010) propõe a redução do número de animais utilizados em cada experimento, o refinamento das técnicas objetivando evitar a dor e o sofrimento desnecessários, e a substituição, do inglês replacement, por métodos alternativos deve ser imperativo. Ainda, o refinamento tecnológico na geração de modelos experimentais tem também levado à redução do número de animais/grupo experimental, por reduzir de maneira importante a variabilidade observada em cada experimento.

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUABIO - UFPR) para análise técnico-científica.

Este projeto dá continuidade à outros projetos com equipes multidisciplinares distintas.

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

### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Os animais foram utilizados em dois grupos constituídos por:

**Grupo 1:** 30 animais senescentes (10 animais com idade de vinte e quatro meses, 10 animais com trinta meses e 10 animais com trinta e seis meses) com alimentação e água *ad libitum*, 12 horas de luz e 12 de escuro e com exaustão de ar. Os animais do grupo I foram submetidos à diabetes tipo II por meio da administração em dose única via intraperitoneal de Estreptozotocina (60mg/kg). Os níveis de glicose dos animais foram monitorados para constatar a hiperglicemia.

**Grupo Controle:** 30 animais senescentes normais (10 animais com idade de vinte e quatro meses, 10 animais com trinta meses e 10 animais com 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.

Após o tratamento e decorrido o tempo de vida, de acordo com os meses dos subgrupos, 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, coloração em Hematoxilina-Eosina.

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

Tabela 1: Correlação da idade do rato *Wistar* com a espécie humana. Fonte: Andreollo Santos, Araújo, Lopes (2012).

### **4.3 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DAS CÉLULAS DE SCHWANN E FIBROBLASTOS**

Para análise morfoquantitativa de células de schwann e fibroblastos do nervo sural foi feita a coloração em HE utilizando-se 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. Logo após, impregnadas com Eosina-Floxina por 45

segundos. Esse material foi imediatamente lavado com água destilada e em seguida foi desidratado e preparado.

Para análise quantitativa 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® numa ampliação da imagem de 100%, para obtenção da quantificação dos núcleos de células de schwann e núcleos de fibroblastos. A contagem foi feita na imagem fotográfica por meio da sobreposição de um quadrado de 4cm<sup>2</sup> em cinco áreas distintas do nervo, sendo 2 áreas na parte superior e 3 áreas na parte inferior de cada corte. Os dados foram registrados para posterior análise estatística.

Foram contados os núcleos de células de schwann e fibroblastos contidos dentro de cada um dos cinco quadrados sobrepostos ao fascículo nervoso, com cuidado para não haver sobreposição das áreas estudadas. Para essa contagem, os cinco campos por cada fascículo nervoso foram estudados ao acaso.

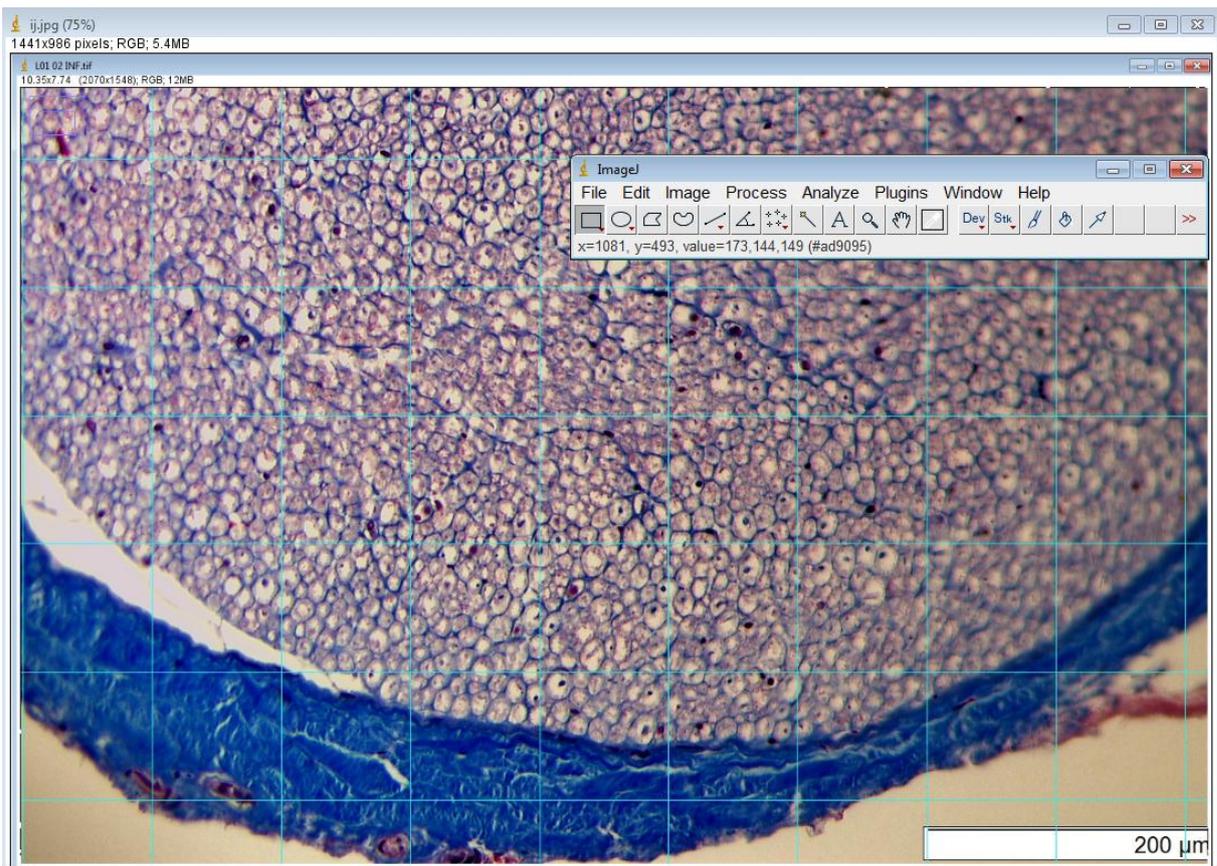


Figura 3: Fotomicroscopia do corte transversal de nervo sural de rato *Wistar* em análise feita por meio do programa Image J®, foram escolhidos 5 quadrantes em cada corte para a contagem dos núcleos celulares..

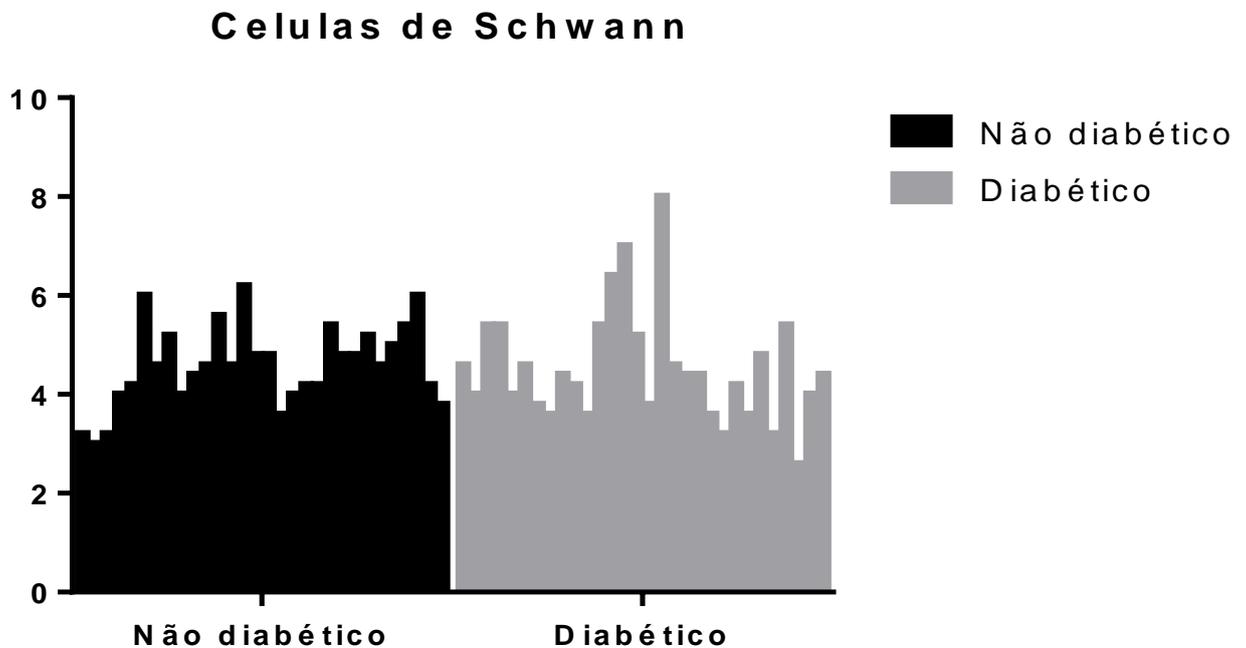
#### **4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO**

O teste estatístico utilizado para comparação entre os grupos foi o teste t não pareado. A análise e os gráficos foram gerados pelo software de estatística GraphPad Prism 6. O índice de significância considerado foi de valor menor ou igual a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste t Student não revelou diferenças significativas na quantidade de núcleos de células de schwann e fibroblastos entre indivíduos diabéticos e não diabéticos. Para valores significativos foi considerado  $P < 0.05$ . Para as células de schwann o valor de P foi de 0.8167. Para fibroblastos a valor de P foi 0.8106. Para a soma dos núcleos, ou seja, células de schwann mais fibroblastos, a variação entre os grupos também não foi significativa, resultado no valor de P igual a 0.7562.

Gráfico 1: Comparação entre a média das células de schwann nos quadrantes.



No eixo x estão representados todos os 60 animais, no eixo y o número de núcleo de células.

Existe controvérsia quanto às alterações morfoquantitativas na neuropatia diabética experimental, pois os achados dependem principalmente do modelo experimental, da idade dos animais utilizados nos modelos induzidos, do período de tempo investigado, do estado nutricional dos animais e outras FAZAN *et al.* (2010)

O resultado da análise dentro de suas limitações ocorreu como o esperado, com base em estudos presentes na literatura, as alterações na quantificação não são expressivas. O

diabetes Mellitus é um quadro clínico que está associado a diversas patologias, como hipertensão, além da glicemia elevada, danos isquêmicos acentuam a lesão nervosa provocada pelo diabetes.

Em um trabalho recente, Sanada *et al.*, (2015) fazem associação entre diabetes e hipertensão e constataram que em ratos hipertensos houve diminuição no número de células de schwann, além de alterações no calibre das fibras associadas à atrofia axonal. Desse modo uma associação entre diabetes e hipertensão pode apresentar alterações mais expressivas se comparados a aqueles que são apenas hiperglicêmicos induzidos por STZ. Em outro trabalho anterior, os autores Oliveira *et al.* (2014) sugeriram que a hiperglicemia é um fator que causa aumento do estresse nas células de schwann. Essas alterações foram demonstradas na mitocôndria das células em ratos hiperglicêmicos por meio de STZ.

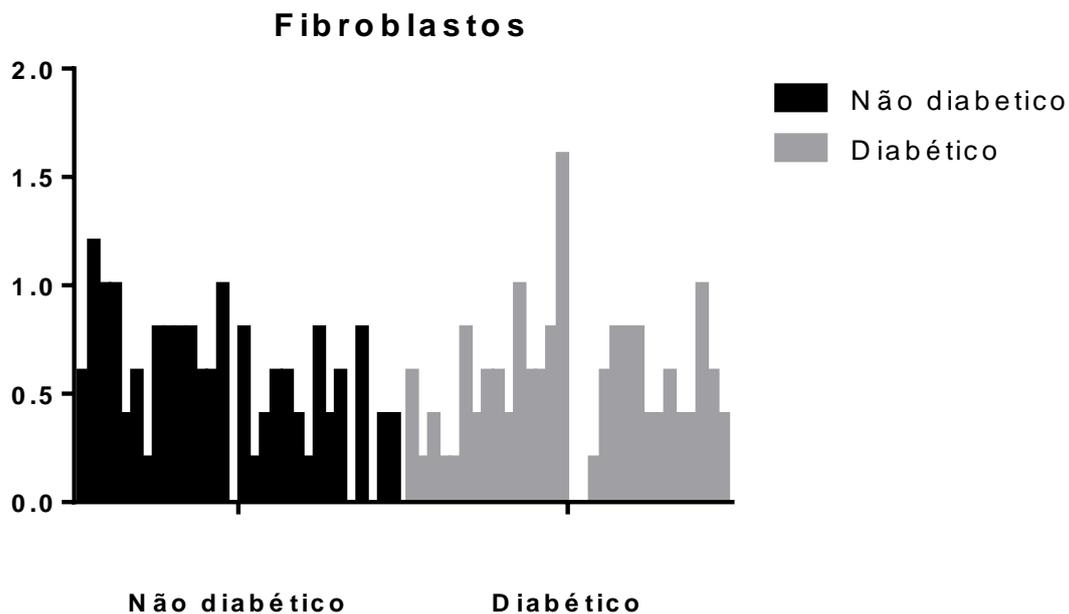
Entretanto, estudos que quantificam as células são escassos, sendo mais facilmente encontrado na literatura, estudos que analisam as alterações morfológicas e metabólicas das células. Com base na produção de mielina, Lombana e Giraldo (1993) relataram estudos em que as células de Schwann dentro do quadro diabético possuem acúmulo excessivo de corpos lipídicos no seu citoplasma. Esta acumulação provavelmente reflete uma alteração no metabolismo de lípidos e se produz uma desmielinização segmentar paranodal.

Estudos que relacionam a morfometria do axônio podem ser mais facilmente encontrados na literatura, há um vasto acervo de artigos que mensuraram a bainha de mielina, mas alguns autores relacionam que essas alterações no calibre das fibras estão intimamente ligadas com alterações na produção de mielina pelas células de schwann. Machado *et al* (2000), notificaram que houve um retardo no crescimento da fibra nervosa, traduzida por uma frequência aumentada de fibras nervosas de calibres menores, em relação às fibras maiores, também foi verificada nos animais diabéticos. Eles sugerem que a alteração nas fibras, provavelmente secundária se relaciona com a diminuição da síntese da mielina pelas células de Schwann, do que propriamente por um aumento do catabolismo ou destruição da mielina, parece anteceder os desarranjos intraaxonais observados no rato diabético. Estes mesmos autores também não encontraram diferenças significativas do ponto de vista ultraestrutural, não observaram diferenças significativas entre os dois grupos em relação ao aspecto dos vasos endoneurais, das células de Schwann e dos axônios. Concluíram, portanto, que não foram observadas alterações degenerativas das organelas intracitoplasmáticas, depósitos de

corpúsculos lipídicos, inclusões citoplasmáticas anômalas, proliferação endotelial ou espessamento da membrana basal dos capilares endoneurais, durante a avaliação.

Essas alterações no calibre têm apresentados resultados controversos, dependendo da região do nervo analisado. Chokroverty (1980), Medori (1985) *apud* Machado (2000) estudos têm relatado tanto aumento como diminuição do diâmetro axonal, em função do segmento nervoso analisado; parecendo haver um aumento do tamanho axonal nas porções mais distais dos nervos e, contrariamente, uma diminuição nas porções mais proximais, em função, respectivamente, da menor ou maior espessura da bainha de mielina<sup>5,14</sup>. Isto vem demonstrar que as alterações nervosas observadas em ratos diabéticos podem se expressar de diferentes formas em mesmo nervo, sendo o comprometimento mais acentuado na porção mais distal.

Gráfico 2: Comparação entre a média dos fibroblastos nos quadrantes.

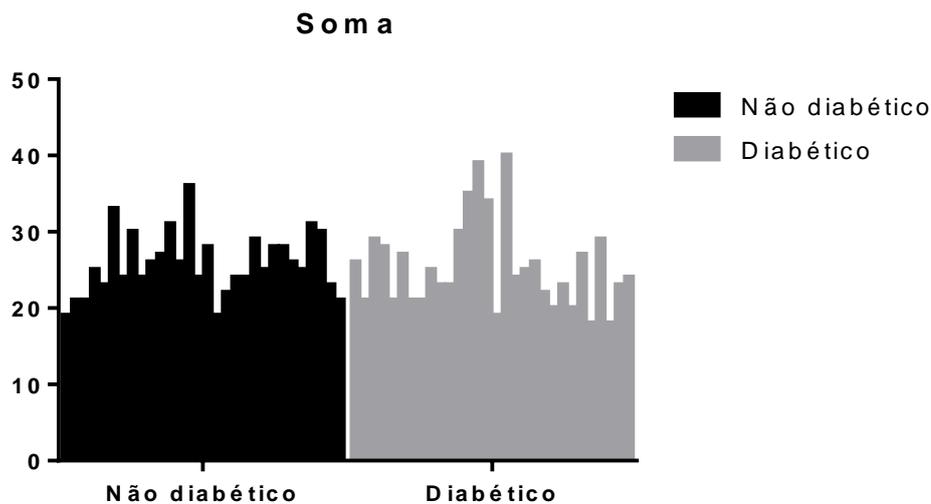


No eixo x estão representados todos os 60 animais, no eixo y o número de núcleo de células.

Os resultados referentes a quantificação de fibroblastos, mostrou que não houve alteração significativa entre o grupo controle e o grupo induzido ao quadro diabético. Os fibroblastos estão relacionados com o processo de cicatrização. Medeiros (2004) explica que

os fatores de crescimento são substâncias moduladoras do processo de cicatrização. O fator de crescimento de fibroblastos básico (FCF $\beta$ ) liberado pelas plaquetas, macrófagos e pelos próprios fibroblastos, estimulam a proliferação celular, a produção de colágeno e de outros elementos da matriz celular, favorecendo o processo da cicatrização, mesmo em situações adversas, como diabetes e uso de corticosteroides. De fato, como não houve diferença na quantidade de fibroblastos no presente estudo, sugere-se que os danos nos axônios não foram suficientes para provocar esse aumento. A quantificação de fibroblastos intraneural é algo que ainda precisa ser aprofundado, pois não foram encontrados estudos dentro da literatura que fazem a análise para a quantificação dessas células especificamente, no entanto estudos relacionando os fibroblastos e diabetes em seu comprometimento cutâneo, são mais elucidados. Como estudos que indicam que há aumento expressivo de fibroblastos na área cutânea em pacientes diabéticos. Sibbald (2008) *apud* De Ladeira (2011) Parte do metabolismo anormal da úlcera é verificado com aumento da atividade de macrófagos, fibroblastos e outros leucócitos nas margens de feridas crônicas de diabéticos, sugeriu-se que incompatibilidade entre aumento do metabolismo celular e entrega insuficiente de nutrientes pode contribuir substancialmente para a deficiência na cicatrização.

Gráfico 3: Comparação entre a soma das células de schwann e fibroblastos em cada indivíduo.



No eixo x estão representados todos os 60 animais, no eixo y o número de núcleo de células.

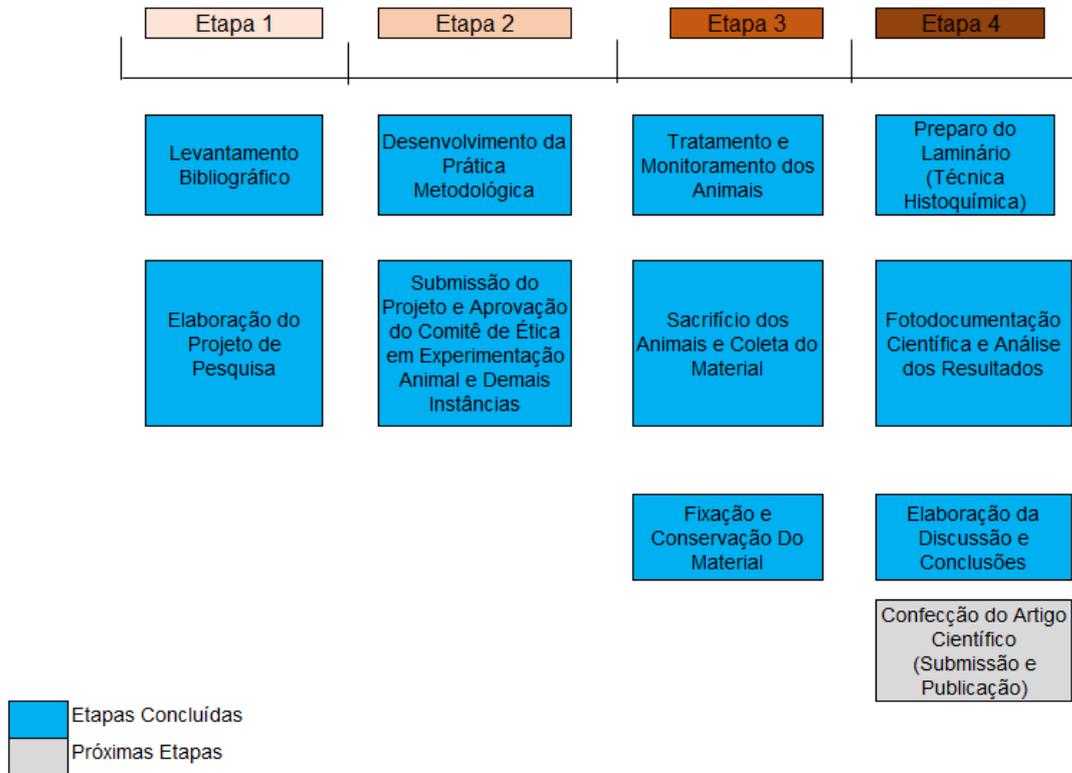
Um terceiro gráfico foi construído, nele foram somados os núcleos das células de schwann e de fibroblastos totais de cada indivíduo, e depois os resultados comparados entre o grupo diabético e o grupo controle. O valor de P foi igual a 0.7562, de modo que não houve significância. A média obtida nos indivíduos normoglicêmicos foi de 4,58 células de schwann por quadrante e 0,56 fibroblastos, para indivíduos hiperglicêmicos a média foi de 4,52 células de schwann e de 0,54 fibroblastos.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que não houve diferença significativa entre o número de células de schwann e fibroblastos dos grupos, normoglicêmicos e hiperglicêmicos. A média obtida nos indivíduos normoglicêmicos foi de 4,58 células de schwann por quadrante e 0,56 fibroblastos, para indivíduos hiperglicêmicos a média foi de 4,52 células de schwann e de 0,54 fibroblastos.

## 7. CRONOGRAMA

O esquema abaixo apresenta uma estimativa para a conclusão do estudo.



## 8. REFERÊNCIAS

FERREIRA, Isabele Albuquerque Alcoforado Ferreira et al. DIABETES MELLITUS NA POPULAÇÃO INDÍGENA: REVISÃO INTEGRATIVA. **REVISTA DE TRABALHOS ACADÊMICOS**, n. 2, 2014.

PEMPER, K. C. O. et al. NÉFROPATIA DIABÉTICA E INSUFICIÊNCIA RENAL. **Revista do Curso de Enfermagem**, v. 3, n. 3, 2015.

FERREIRA, Leandro Tadeu et al. Diabetes mellito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arq bras cienc saúde**, v. 36, n. 3, p. 182-8, 2011.

DA SILVA SALES, Kelson Luiz; DE SOUZA, Leonardo Alves; CARDOSO, Vinicius Saura. Equilíbrio estático de indivíduos com neuropatia periférica diabética. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 19, n. 2, p. 122-127, 2012.

DO ESPÍRITO SANTO, Michelle Brandão et al. Adesão dos portadores de diabetes mellitus ao tratamento farmacológico e não farmacológico na atenção primária à saúde. **Enfermagem Revista**, v. 15, n. 1, p. 88-101, 2012.

BOELTER, Maria Cristina et al. Fatores de risco para retinopatia diabética. **Arquivos brasileiros de oftalmologia. São Paulo. Vol. 66, n. 2 (mar./abr. 2003), 239-247**, 2003.

SHIKATA, Kentaro; NINOMIYA, Toshiharu; KIYOHARA, Yutaka. Diabetes mellitus and cancer risk: review of the epidemiological evidence. **Cancer science**, v. 104, n. 1, p. 9-14, 2013.

CORTEZ, Daniel Nogueira et al. Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus na atenção primária. **Acta paul. enferm**, v. 28, n. 3, p. 250-255, 2015.

MARTINS, Patrícia Alexandra Guerreiro. **Diabetes Mellitus: novas abordagens terapêuticas**. 2015. Tese de Doutorado.

PEREIRA, Patricia Feliciano; ALFENAS, Rita de Cassia G.; ARAÚJO, Raquel Maria A. Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence. **Jornal de pediatria**, v. 90, n. 1, p. 7-15, 2014.

SDP (2015) Classificação da Diabetes Mellitus. Disponível em <http://www.spd.pt/index.php/grupos-de-estudo-mainmenu-30/classificacao-da-diabetes-mellitus-mainmenu-175> consultado a: 30/06/2015

DOS SANTOS, Maria Sebastiana; FREITAS, Monique Neto; DE OLIVEIRA PINTO, Fernanda. O DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2 E SUA EVOLUÇÃO NO MUNICÍPIO DE QUISSAMÃ-RJ. **LINKSCIENCEPLACE-Revista Científica Interdisciplinar**, v. 1, n. 1, 2014.

GUIMARÃES, Alexandre Costa. Avaliação do efeito da uremia em diferentes métodos de determinação da A1c em pacientes com e sem Diabetes mellitus. 2015.

VELASQUEZ-JONES, Luis; MEDEIROS-DOMINGO, Mara. Diabetes insípida nefrogénica. **Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.**, México , v. 71, n. 6, p. 332-338, dic. 2014

MARQUES, Céline Rodrigues. Pé diabético: prevenção. 2010.

Pataky Z, Vischer U (2007) Diabetic foot disease in the elderly. *Diabetes Metab* 33(51): 56-65

Reiber GE, Raugi GJ (2005) Preventing foot ulcer and amputations in diabetes. *Lancet* 12; 366(9498):1676-7

PICON, Andreja Paley. **Estudo da progressão da diabetes e da neuropatia periférica: classificação da severidade e caracterização cinética da locomoção**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PORCIÚNCULA, Mariana VP et al. Análise de fatores associados à ulceração de extremidades em indivíduos diabéticos com neuropatia periférica. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 51, n. 7, p. 1134-1142, 2007.

DE QUATELI DOI, Sonia; LOTTENBERG, Simão Augusto; HALPERN, Alfredo. Alterações orgânicas no diabetes. **Revista de Medicina**, v. 63, n. 1/2, p. 2-10, 1981.

DOS SANTOS, Patrícia Caroline et al. RELATO DE CASO: DIABETES INSÍPIDUS NEUROGÊNICO. **REVISTA SAÚDE INTEGRADA**, v. 6, n. 11-12, p. 213-228, 2015.

SARTORELLI, Daniela Saes; FRANCO, Laércio Joel. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cad Saúde Pública**, v. 19, n. s1, 2003.

SILVEIRA, Euzélia Mamede; SILVEIRA, Paulo Roberto. Neuropatia periférica diabética. **J Bras Med**, v. 66, n. 6, p. 80-106, 1994.

DE OLIVEIRA, LARISSA SALGADO. **Regeneração nervosa e recuperação funcional após eletroestimulação muscular e exercício de natação na fase aguda da axoniotmese**. 2008. Tese de Doutorado. Dissertação de mestrado. Universidade Metodista de Piracicaba.

SOBRAL, LUCIANE LOBATO et al. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise morfométrica e funcional. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 4, p. 311-316, 2008.

Welch JA. Peripheral nerve injury. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1996; 11(4): 273-84.

SUNDERLAND, Sydney. The connective tissues of peripheral nerves. **Brain**, v. 88, n. 4, p. 841-854, 1965.

Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*. 2001; 263(4): 396-404.

Todd RB, Bowman W. In: *The physiological anatomy and physiology of man*. Philadelphia. Blanchard and Lea, 1957; 129: 523-660. Apud Teodori MJ. *Regeneração axonal através de autotransplante de retalho músculo esquelético obtido a partir de injeção de anestésico*. [Dissertação]. São Paulo: UNICAMP; 1996.

Kefalides NA, Alper R, Clark CC. Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int Rev Cytol* 1979; 61: 167-228. Apud Teodori MJ. Regeneração axonal através de autotransplante de retalho músculo esquelético obtido a partir de injeção de anestésico. [Dissertação]. São Paulo:UNICAMP; 1996.

CARNEIRO, MARCOS ANTONIO. **Atlas e texto de neuroanatomia**. Editora Manole Ltda, 2004.

TANQUEIRO, Maria Teresa de Oliveira Soares. A gestão do autocuidado nos idosos com diabetes: revisão sistemática da literatura. **Revista de Enfermagem Referência**, n. 9, p. 151-160, 2013.

PACE, Ana Emília et al. Fatores de risco para complicações em extremidades inferiores de pessoas com diabetes mellitus. 2002.

COSTENARO, Fabíola et al. Neuropatia diabética. **Rotinas em Endocrinologia**, 2015.

RODRIGUES FILHO, Omar Andrade et al. Anatomia ultraestrutural do nervo frênico de ratos: alterações decorrentes do diabete experimental crônico. 2008.

Atlas IDF International Diabetes Federation 7ª edição (2015). Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/>

YAGIHASHI, S., AND A. A. SIMA. 1986. Neuroaxonal and dendritic dystrophy in diabetic autonomic neuropathy: Classification and topographic distribution in the BB rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 45:545-565.

YAGIHASHI S, SIMA AA. Diabetic autonomic neuropathy in the BB rat. Ultrastructural and morphometric changes in sympathetic nerves. *Diabetes*, 1985, 34:558-564.

MEDORI R, JENICH H, AUTILIO-GAMBETTI L, GAMBETTI P. Experimental diabetic neuropathy: similar changes of slow axonal transport and axonal size in different animal models. *J. Neurosci.* 1988, 8: 1814-1821.

MIGLIACCIO, V, FAZAN, V . Morphometry of the cervical vagus nerve in chronic experimental diabetes. In: XXI Congresso da Associação Latino Americana de Ciências Fisiológicas ALACF, 2003, Ribeirão Preto- São Paulo, 2003.

SATO, K. L.; CARMO, J. M.; FAZAN, V. P. S. Estudo morfológico e morfométrico das alterações do nervo renal em ratos diabéticos crônicos. *Revista O Dendrito*. v. 11, n. 02, p. 31-31, 2005.

DAMY, Sueli Blanes et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

Russell WMS, Burch KL. The principles of humane experimental technique. UFAW, London: UFAW; 1992. [cited 2008 jan]. Available from: <http://altweb.jhsph.edu/>

CALDAS, Cristina. Aprovada, Lei Arouca exigirá investimentos para ser colocada em prática em instituições de pesquisa. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 61, n. 1, 2009 .

FAZAN, Valéria Paula Sassoli et al . Diabetic Peripheral Neuropathies: A Morphometric Overview. **Int. J. Morphol.**, Temuco , v. 28, n. 1, p. 51-64, marzo 2010 . Disponible en <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022010000100007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022010000100007&lng=es&nrm=iso)>. accedido  
en 05 dic. 2016. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000100007>.

OLIVEIRA, F. S. et al. Acute experimental diabetes and aortic depressor nerve ultrastructural morphometry: Effects of insulin treatment. **Anat Physiol**, v. 4, n. 153, p. 2161-0940.1000159, 2014.

SANADA, Luciana Sayuri et al. Association of chronic diabetes and hypertension in sural nerve morphometry: an experimental study. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 7, n. 1, p. 1, 2015..

LOMBANA, Adriana del Pilar López; GIRALDO, Hernán Hurtado. La célula de Schwann. **Biomédica**, v. 13, n. 4, p. 207-217, 1993.

DE LADEIRA, Pedro Ribeiro Soares et al. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares. **Revista de Medicina**, v. 90, n. 3, p. 122-127, 2011.

MACHADO, José Lúcio Martins et al. Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. **Acta cir. bras**, v. 15, n. 2, p. 86-93, 2000.

MEDEIROS, Aldo da Cunha et al . Efeitos do fator de crescimento de fibroblasto básico (FCFbeta) na cicatrização de anastomoses do esôfago. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro , v. 31, n. 1, p. 21-26, Feb. 2004 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-69912004000100005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912004000100005&lng=en&nrm=iso)>. access on 13 Dec. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912004000100005>.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido nervoso. **Junqueira J, Carneiro F. Histologia Básica: Texto & Atlas. 12th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 149-175, 2013.