

---

# Caracterização morfológica e morfométrica de nervos periféricos de camundongos da linhagem NOD (non-obese diabetic) da colônia brasileira (NOD/Uni)

---

**Rosana Mara Anzolin Marquezine**

0818135

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Rosana Mara Anzolin Marquezine e aprovada pela Comissão Julgadora.

31/10/98

ASS. NATURA



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas - Área de concentração em Morfologia

**Orientador**  
**Prof. Dr. Francesco Langone**

**Campinas**  
**1998**



INDAÇÃO	8C
CHAMADA:	Unicamp
Nº	848c
Ex.	
VALOR BC	34.929
DOC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
RECO	R\$ 11,00
DATA	04/09/98
OPD	

CM-00115553-7

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**Marquezine, Rosana Mara Anzolin**

M848c Caracterização morfológica e morfométrica de nervos periféricos de camundongos da linhagem NOD (non-obese diabetic) da colônia brasileira (NOD/Uni)/Rosana Mara Anzolin Marquezine . --Campinas, SP.[s.n.],1998.

72f.:ilus.

Orientador: Francesco Langone

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1.Diabetes. 2.Neuropatia periférica. 3.Camundongos. I.Langone, Francesco. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.Titulo.

---

**Caracterização morfológica e morfométrica  
de nervos periféricos de camundongos da  
linhagem NOD (non-obese diabetic) da  
colônia brasileira (NOD/Uni)**

---

**Rosana Mara Anzolin Marquezine**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas - UNICAMP, como  
parte dos pré-requisitos para a  
obtenção do título de mestre em  
Ciências Biológicas - Área de  
concentração em Morfologia

**Orientador**  
**Prof. Dr. Francesco Langone**

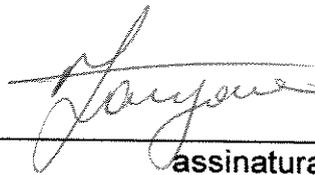
**Campinas**  
**1998**

Campinas, 14 de julho de 1998

**BANCA EXAMINADORA**

**TITULARES**

Prof. Dr. FRANCESCO LANGONE (orientador)

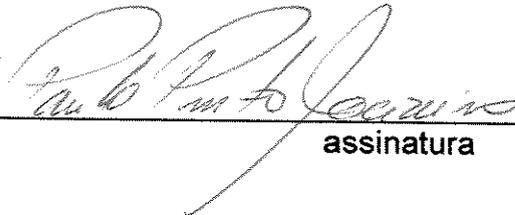


assinatura

Profa. Dra. IARA MARIA SILVA DE LUCA

assinatura

Prof. Dr. PAULO PINTO JOAZEIRO



assinatura

**SUPLENTE**

Prof. Dr. NORAIR SALVIANO DOS REIS



assinatura

**Ao meu marido Marcos,  
companheiro e amigo de todas as  
horas, que me faz encarar a vida com  
mais alegria e com muito amor.**

**Aos frutos dessa convivência  
tão maravilhosa, meus dois queridos  
filhos, minhas maiores riquezas,  
Lucas e Pedro, com todo o amor.**

**DEDICO**

**Aos meus pais queridos, Olivio e Nadir, pelos ensinamentos que têm me passado ao longo da minha vida, sempre com muita dignidade e caráter, meus maiores incentivadores desde o começo.**

**Aos meus irmãos, Rosi, Júnior e Liciane, pelo carinho constante e por sempre estarem torcendo por mim.**

**Aos meus sobrinhos tão amados João Gabriel e Adnan pelo carinho.**

**Ao meu cunhado João Antonio Sarria Cabreira pela força dada em todos os momentos em que precisei, pelo carinho e incentivo constante.**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Francesco Langone**, meu orientador e, acima de tudo, grande amigo, pela paciência e atenção constante durante toda a elaboração do meu trabalho, e por me mostrar o caminho para alcançar uma maior maturidade científica.

Ao **Prof. Dr. João Lopes Toledo Filho**, do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo (USP) em Bauru, pelo constante incentivo a minha carreira universitária.

Ao **Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada**, Coordenador da Sub-comissão do Curso de Pós-graduação em Morfologia, pela sua dedicação a este curso e pela atenção que sempre dispensou.

À colega **Glaucia Monteiro de Castro**, pela amizade e generosa colaboração.

À **Profa. Dra. Iara Maria Silva de Luca** pela análise deste trabalho, enriquecendo-o com suas observações.

Ao **Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis**, pela colaboração, pelas valiosas sugestões dadas a este trabalho e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro**, pela colaboração e criteriosa análise deste trabalho.

À **Sra. Silvia Helena Burghi Kalaf**, secretária do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp, pela atenção dispensada e pela sua amizade.

Ao **Sr. Marco Aurélio Ribeiro de Paula** e ao **Sr. Norivaldo Celestino**, técnicos do laboratório de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo grande auxílio durante o desenvolvimento prático deste trabalho.

À **Sra. Marlene Lima**, responsável pelo biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, pela colaboração e profissionalismo com que desempenha o seu trabalho.

Aos **colegas dos Departamentos de Anatomia e Histologia & Embriologia** do Instituto de Biologia da Unicamp, pelos anos de convívio.

À **Capes**, pelo incentivo financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Deus**, por tudo que tem me proporcionado durante a minha vida.

## **ABREVIATURAS**

NON-OBESE DIABETIC	NOD
DIABÉTICOS	DM
NÃO DIABÉTICOS	ND
DIÂMETRO DOS AXÔNIOS	DA
DIÂMETRO DAS FIBRAS	DF
ESPESSURA DA BAINHA DE MIELINA	EBM
RAZÃO "g"	RZG
DIABETES MELLITUS DEPENDENTE DE INSULINA	DMDI
DIABETES MELLITUS NÃO DEPENDENTE DE INSULINA	DMNDI
SISTEMA NERVOSO PERFÉRICO	SNP
FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO	NGF

# SUMÁRIO

## RESUMO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
	1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
	1.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS NERVOS PERIFÉRICOS	3
	1.2.1 AS FIBRAS NERVOSAS	3
	1.2.2 ENVOLTÓRIOS CONJUNTIVOS E VASCULARIZAÇÃO DOS NERVOS	
	1.3 NEUROPATIA DIABÉTICA	10
	1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DAS NEUROPATIAS DIABÉTICAS	13
2.	<b>OBJETIVO</b>	16
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	17
	3.1 ANIMAIS	19
	3.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS	19
	3.3 PROCEDIMENTOS	21
	3.3.1 OBTENÇÃO DOS NERVOS	21
	3.3.2 PROCESSAMENTO DOS NERVOS	21
	3.3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS NERVOS	22
	3.3.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS FIBRAS MIELÍNICAS	23
	3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4.	<b>RESULTADOS</b>	25
	4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS ANIMAIS EMPREGADOS	26
	4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS FIBRAS MIELÍNICAS	29
	4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS FIBRAS MIELÍNICAS	30
	4.3.1 NÚMERO DE FIBRAS MIELÍNICAS	30
	4.3.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS FIBRAS MIELÍNICAS DO NERVO SURAL	41
5.	<b>DISCUSSÃO</b>	51
6.	<b>CONCLUSÕES</b>	62
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	64

## ABSTRACT

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Considerações Gerais

O diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Uma característica típica do diabetes é a hiperglicemia, que reflete a incapacidade de utilização da glicose pelos tecidos, causada pela insuficiente secreção de insulina e/ou pela resistência dos tecidos periféricos responderem à ação desse hormônio (Olefsky, 1992).

Em função dos mecanismos patogênicos que o determinam e de suas características metabólicas, o diabetes tem sido classificado em tipo I, ou dependente de insulina (DMDI), e tipo II, ou não dependente de insulina (DMNDI). Em ambos os tipos, porém, as complicações vasculares, renais, nervosas e musculares, que se desenvolvem no decurso da doença são semelhantes, e costumam ser as principais causas de morbidade (Olefsky, 1992).

Dentre as complicações nervosas, as neuropatias periféricas são as mais comuns e afetam com frequência as fibras nervosas motoras e sensitivas que inervam os membros inferiores. Os sinais e sintomas característicos da neuropatia diabética estão relacionados principalmente com a redução da velocidade de condução nervosa e com déficits somestésicos e proprioceptivos. A neuropatia diabética pode vir acompanhada também por distúrbios na inervação de órgãos

pélvicos, levando à impotência sexual e a disfunções da bexiga urinária e dos esfíncteres reto-anais (Asbury & Johnson, 1978).

O emprego de modelos experimentais para o estudo das neuropatias diabéticas é de extrema importância para melhor se conhecer suas características anátomo-patológicas e, principalmente, para investigar suas possíveis causas e elaborar estratégias mais adequadas de tratamento e prevenção. Os camundongos da linhagem NOD representam um modelo experimental de DMDI, cujas características estruturais e fisiológicas de seu sistema nervoso periférico ainda não foram adequadamente analisadas, quer na vigência da doença, quer antes que a mesma se manifeste.

## **1.2 Aspectos morfológicos dos nervos periféricos**

### **1.2.1 As fibras nervosas**

Os nervos são formados essencialmente por fibras nervosas, que correspondem ao prolongamento dos axônios que se originam de neurônios localizados no neuroeixo ou no interior de gânglios sensitivos e viscerais. A partir de sua origem, no chamado cone de implantação do neurônio, os axônios caracterizam-se por conter neurofilamentos e microtúbulos, retículo endoplasmático liso,

mitocôndrias, vesículas. Ao longo do nervo os axônios se encontram sempre associados às células de Schwann, que podem ou não formar ao redor dos mesmos uma bainha lipoproteica, a bainha de mielina. Os axônios que apresentam esta bainha são denominados mielínicos e os demais, amielínicos. Ao atingir o órgão alvo, o axônio dá origem a uma estrutura arborescente, denominada terminação axonal ou telodendro (Carpenter, 1988).

Os axônios mielínicos possuem, em geral, diâmetro maior que 1,0 micrômetro e as células de Schwann encontram-se dispostas seqüencialmente ao longo do mesmo. Cada uma delas forma ao redor do axônio a bainha de mielina a partir do enrolamento de sua própria membrana plasmática. O número de voltas determina a espessura da bainha de mielina, sendo esta proporcional ao calibre do axônio.

Durante este processo, contudo, pequenas porções do citoplasma das células de Schwann ficam aprisionadas entre os folhetos de membrana plasmática. Isto pode ser evidenciado em secções longitudinais de fibras mielínicas nas quais se observam pontuais dilatações na bainha de mielina denominadas incisuras de Schmidt-Lantermann. Ao longo do axônio mielínico, as células de Schwann vizinhas estão separadas umas das outras por intervalos, denominados nodos de Ranvier, destituídos de mielina e parcialmente

cobertos por digitações laterais do seu citoplasma (Landon & Hall, 1976; Peters et al., 1976).

Os axônios amielínicos, por sua vez, apresentam uma relação diferente com as células de Schwann. Neste caso, projeções citoplasmáticas de uma célula de Schwann envolvem, total ou parcialmente entre 5 e 25 axônios, não havendo a formação da bainha de mielina. Como resultado, estes axônios encontram-se individualmente situados no interior de sulcos ou canais formados pelas expansões das células de Schwann (Peters et al., 1976). Ao longo destes feixes de axônios amielínicos, os prologamentos das células de Schwann vizinhas apresentam-se interdigitadas (Peters et al., 1976).

As células de Schwann são também responsáveis pela síntese e estruturação de uma membrana basal que reveste externamente tanto os conjuntos de fibras amielínicas quanto cada uma das fibras mielínicas. Esta membrana é contínua, não sendo interrompida nem mesmo nos nodos de Ranvier das fibras mielínicas. Ela é composta por colágeno (tipos IV e V), glicoproteínas e proteoglicanos. Quando observada ao microscópio eletrônico de transmissão, pode ser dividida em três camadas distintas: a primeira é a lâmina rara, que constitui-se numa região mais clara, possuindo de 20 a 40 nanômetros de

espessura. A segunda é a lâmina densa (ou basal), localizada numa posição intermediária (entre a lâmina lúcida e a lâmina reticular). Possui uma espessura de 20 a 100 nanômetros, é elétron-densa e contém uma complexa malha de filamentos. A terceira é a lâmina reticular (ou rara interna), que igualmente à lâmina rara, apresenta-se elétronlucida ao microscópio eletrônico de transmissão. Sua espessura é variável, localizando-se entre a lâmina densa e o endoneuro (Martin & Webster, 1973).

A membrana basal parece constituir também uma importante barreira seletiva na troca de substâncias entre as fibras nervosas e o seu meio externo (Oldfors & Johansson , 1979).

É importante mencionar que a relação morfofuncional entre os axônios e as células de Schwann estabelecem-se já durante o desenvolvimento embrionário (Le Douarin, 1982). Na formação do próprio sistema nervoso periférico, os axônios emitidos pelos neurônios jovens em direção à periferia são acompanhados pelas células de Schwann que migram a partir da crista neural. Durante este processo migratório, contudo, elas ainda apresentam um aspecto ovóide e não possuem lâmina basal. Somente após sua associação com um ou mais axônios, elas passam a apresentar seu característico aspecto fusiforme (Webster & Favilla, 1984). Embora ainda não se conheçam

exatamente quais os sinais que desencadeiam a formação da bainha de mielina, sabe-se que sua indução depende do contato entre o axônio e a célula de Schwann (Aguayo et al.1977; Bray et al., 1987; Lemke & Chao,1988; Gupta et al.,1993).

### 1.2.2 Envoltórios conjuntivos e vascularização dos nervos

No interior dos nervos as fibras mielínicas e os conjuntos de fibras amielínicas encontram-se intimamente envolvidas por um tecido conjuntivo frouxo, denominado endoneuro. O endoneuro contém fibrilas de colágeno tipo III, geralmente dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa, alguns fibroblastos e eventuais mastócitos e macrófagos residentes (Junqueira et al., 1979; Montes et al., 1984; Carpenter, 1988; Monaco et al., 1992).

A irrigação e drenagem sanguínea do endoneuro e das fibras nervosas é realizada por uma rede de capilares cujas células encontram-se unidas por "tight junctions". Esta característica estrutural confere à rede capilar endoneural o papel de barreira hemato-nervosa, responsável pelo controle seletivo da entrada e saída de substâncias no microambiente do nervo, contribuindo assim para a sua homeostase.

Conjuntos de fibras mielínicas e amielínicas constituem no nervo pequenos feixes ou fascículos, que são delimitados externamente pelo perineuro. Esta estrutura é uma membrana conjuntiva formada por células achatadas, semelhantes a fibroblastos e de perfil fusiforme, colágeno e vasos sanguíneos. Ao microscópio eletrônico pode-se observar que as células perineurais achatadas são revestidas por uma membrana basal e estão dispostas em camadas concêntricas (Peters et al., 1976). Entre as sucessivas camadas celulares encontra-se longas fibras de colágeno tipo I e tipo III (Peters et al., 1976; Montes et al., 1984). Além disso, as células perineurais das camadas mais profundas exibem citoplasma levemente granuloso, algumas mitocôndrias e grupos de vesículas de diferentes tamanhos (Carpenter, 1988).

O estudo das características morfofuncionais do perineuro, mostrou que esta bainha conjuntiva é extremamente importante na manutenção da homeostase do nervo. Em particular, as células perineurais estão unidas por "tight junctions" o que dificulta a passagem de substâncias de alto peso molecular através do perineuro (Peters et al., 1976). De fato, Oldfors & Johansson (1979), ao estudarem as propriedades ligadas à permeabilidade do perineuro, em nervos ciáticos de ratos, observaram que este atua como uma barreira

seletiva. Substâncias de alto peso molecular só conseguem difundir-se através do perineuro com muita lentidão por atividade pinocitótica, havendo consumo de energia.

Mais externamente, os diversos fascículos encontram-se reunidos por outro envoltório de tecido conjuntivo denominado epineuro. Ele é composto por células epineurais, vasos sanguíneos e fibras de colágeno tipo I. As células epineurais, assim como as perineurais, também apresentam um perfil fusiforme semelhantes aos fibroblastos, porém, não estão envolvidas por membrana basal. Estas células apresentam um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e são responsáveis pela produção das fibras de colágeno (Peters et al., 1976). Elas se organizam em camadas concêntricas, separadas pelas fibras colágenas, as quais se dispõem longitudinalmente ao nervo, promovendo um reforço estrutural. Os vasos sanguíneos que nutrem os nervos periféricos penetram o epineuro e emitem vários ramos. Aqueles de menor calibre prosseguem seu curso, penetrando no perineuro e, a seguir no endoneuro. (Peters et al., 1976; Junqueira et al., 1979; Montes et al., 1984; Carpenter, 1988).

### 1.3 Neuropatia Diabética

As causas das neuropatias são ainda incertas e diversas hipóteses têm sido aventadas (Dyck, 1987). A microangiopatia difusa, por exemplo, que afetaria a manutenção nutricional dos nervos periféricos, parece ser a causa mais provável das mononeuropatias diabéticas que afetam os nervos obturador, femoral ou ciático (Dyck et al., 1986). Por outro lado, os distúrbios no metabolismo da glicose propriamente, e não a insuficiência vascular, são considerados a causa mais provável das polineuropatias (Gabbay, 1973). De fato, nos tecidos onde não há necessidade de insulina para o transporte de glicose, como é o caso do tecido nervoso, a hiperglicemia leva ao aumento da concentração da glicose intracelular. A glicose é então transformada em sorbitol (poliol), pela aldose redutase e, eventualmente, este poliol é transformado em frutose por uma desidrogenase (Kador & Kinoshita, 1985).

O acúmulo de sorbitol e de frutose leva ao aumento da osmolaridade intracelular, que pode determinar lesão da célula. Além disso, o acúmulo de sorbitol parece estar associado à redução do conteúdo de mio-inositol que resulta na diminuição do metabolismo de fosfoinosítídeos e da atividade da proteína quinase C e da ATPase

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Greene, Lattimer & Sima, 1987; Sima et al., 1986; Greene & Lattimer, 1984). Este mecanismo tem sido proposto como responsável pelas alterações fisiológicas e ultra-estruturais irreversíveis das células de Schwann e das fibras nervosas. Realmente, nos últimos anos diversos autores tem relatado que através de tratamentos crônicos com inibidores da aldose redutase ou da administração de mioinositol é possível impedir o desenvolvimento da neuropatia em ratos diabéticos (Yagihashi et al., 1990; Greene, de Jesus & Winegrad, 1975; Greene & Lattimer, 1983).

A análise anátomo-patológica dos nervos periféricos na vigência do diabetes revela a ocorrência de desmielinização e degeneração axonal, cujas características morfológicas não diferem do observado em neuropatias periféricas de etiologia diversa (Asbury, 1987). Por outro lado, a deposição difusa de glicogênio em axônios mielínicos tem sido relatada como típica da neuropatia diabética em ratos cujo o diabetes foi induzido pela administração de streptozotocina (Yagihashi et al., 1990). Ao nível ultra-estrutural é possível observar com freqüência as chamadas formações em bulbo de cebola, que evidenciam a recorrência de episódios de desmielinização-remielinização, encontradas também nas neuropatias hipertróficas (Cotran, Kumar, Robbins, 1992).

A interação neuromuscular tem sido relativamente pouco abordada no estudo das neuropatias diabéticas. Em geral, o maior enfoque é dado ao fato de que as alterações patológicas das fibras nervosas acabam levando à denervação e atrofia da fibra muscular (Constantini et al., 1987; Klueber & Feczko, 1994). Contudo, no diabetes a fisiologia das fibras musculares também fica comprometida. O acúmulo de lipídios no citoplasma das fibras musculares, as alterações morfofuncionais das mitocôndrias e a mudança no perfil de distribuição dos tipos 2A e 2B, são evidências desse comprometimento (Feczko & Klueber, 1988; Cotter et al., 1989; Klueber et al., 1989). É sabido que entre as fibras muscular e nervosa existe uma dependência trófica importante. Diversos autores têm obtido evidências sobre a produção de fatores neurotróficos pelas fibras musculares esqueléticas, importantes na manutenção das fibras nervosas durante a fase adulta. Assim, tem sido postulado que o desenvolvimento da miopatia diabética poderia comprometer o fornecimento destes fatores e, conseqüentemente, contribuir de maneira significativa na expressão das neuropatias periféricas (Bathgate, 1993).

## **1.4 Modelos experimentais para o estudo das neuropatias diabéticas**

A investigação das causas e conseqüências do diabetes tem sido realizada experimentalmente empregando-se modelos animais onde a doença é introduzida pela administração de drogas (aloxana ou streptozotocina), ou modelos animais nos quais o diabetes se desenvolve espontaneamente, determinado por causas genéticas (Woltman & Wilder, 1929). Dentre estes últimos, a maioria dos modelos são constituídos por animais que desenvolvem DMNDI freqüentemente associados à obesidade. Por outro lado, apenas duas linhagens de roedores que desenvolvem DMDI, semelhante ao humano, estão disponíveis para estudos experimentais. Essas linhagens correspondem à dos ratos Wistar BB (Bio-Breeding) e à dos camundongos NOD (non-obese diabetic). Em ambas as linhagens, o aparecimento do diabetes é precedido de insulite e da subsequente eliminação das células beta da ilhotas de Langerhans mediada por mecanismos de autoimunidade (Fagerberg, 1959).

No que diz respeito ao estudo das neuropatias periféricas, diversos trabalhos têm mostrado que os animais de linhagem Wistar BB desenvolvem polineuropatia sensorial, distal e simétrica, bem como polineuropatia autonômica no decorrer do diabetes (Dyck, 1987).

Alguns autores têm reportado, também, a ocorrência de neuropatia motora proximal em ratos Wistar BB durante os estágios mais avançados da doença (Thomas & Sharma, 1987). Por outro lado, apenas dois estudos foram realizados sobre possíveis alterações patológicas no sistema nervoso periférico de camundongos da linhagem NOD (Kamijo, Yagihashi & Baba, 1990; Marques et al., 1997), desde sua descrição por Makino e colaboradores (1980).

Kamijo, Yagihashi & Baba (1990) mantiveram camundongos NOD sob condições de hiperglicemia, porém, com tratamento insulínico, de 1 a 16 semanas após o diagnóstico do diabetes. Estes autores observaram uma redução da velocidade de condução do impulso nervoso no nervo tibial proporcional ao tempo de diabetes. Contudo, os autores relataram não haver alteração morfológica nos nervos tibiais após 1 a 8 semanas de diabetes. Por outro lado, após 16 semanas de diabetes os animais apresentaram uma acentuada redução das dimensões de seus axônios, especialmente os do nervo sural. Por sua vez, recentemente, Marques e colaboradores (1997) verificaram uma baixa densidade de receptores de acetilcolina na junção neuromuscular em camundongos NOD diabéticos mantidos sem tratamento por um período de 2 a 3 semanas.

Os animais empregados no estudo realizado por Marques et al. (1997) pertenciam a colônia de camundongos da linhagem NOD recentemente implantada na Universidade Estadual de Campinas (Pavin & Zollner, 1994). Esta linhagem foi derivada da colônia de animais NOD do laboratório INSERM U-25, Paris, França, de alta frequência de DMID clínico espontâneo (55% em fêmeas e menor que 5% em machos). Resultados preliminares da frequência do DMID clínico espontâneo da colônia NOD brasileira revelaram similaridade com a colônia NOD de origem: 55% em fêmeas e menor que 5% em machos, ambos com 25 semanas de idade (Pavin et al., 1995). O estudo da ontogênese e morfologia da insulite, através de preparações histológicas de pâncreas realizadas até o momento, mostrou que esta também não difere daquela verificada na colônia NOD francesa (Pavin et al., 1995).

Estudos relativos ao sistema nervoso periférico de camundongos da linhagem NOD são escassos na literatura, conforme já referimos. Neste sentido, faz-se particularmente interessante a caracterização morfológica dos elementos do SNP desses animais antes e após a instalação do diabetes.

## **2. OBJETIVO**

**O presente trabalho tem como objetivo a caracterização morfológica e morfométrica de nervos periféricos de camundongos da linhagem NOD (non-obese diabetic) da colônia brasileira (NOD/Uni) visando seu emprego como modelo experimental para o estudo da neuropatia diabética.**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Animais

Foram empregados neste estudo 20 camundongos da linhagem NOD/Uni, 10 machos e 10 fêmeas, com idade entre 19 e 21 semanas, diagnosticados clinicamente como normais ou diabéticos. Foram usados, também, 5 camundongos machos normais da linhagem A/J, com 21 semanas de idade. Desta forma, como mostra a tabela abaixo, estabeleceram-se os seguintes grupos:

LINHAGEM	NOD		NOD		A/J
	DIABÉTICOS		NÃO DIABÉTICOS		NÃO DIABÉTICOS
ESTADO CLÍNICO	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS
SEXO	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS
Número do animal no grupo	SEM ANAS	SEM ANAS	SEM ANAS	SEM ANAS	SEM ANAS
1	21	19	19	19	21
2	21	19	21	19	21
3	19	19	21	21	21
4	19	19	21	21	21
5	19	19	21	21	21

### 3.2 Seleção dos Animais Diabéticos e Não Diabéticos

A evidência clínica do diabetes nos camundongos NOD/Uni pode ocorrer a partir da 5ª semana de vida. Por razões de padronização do protocolo experimental, foi estabelecido o uso apenas daqueles animais cuja doença evidenciou-se entre 17 e 19 semanas de vida. Os

animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp com idade entre 4 e 5 semanas e passaram a ser mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*. A partir da 10<sup>a</sup> semana de vida, foi monitorada, a cada dois dias, a ocorrência de glicosúria (Glukotest, Boehringer-Mannheim, Germany). Os animais, com idade entre 17 e 19 semanas de vida, que apresentaram glicosúria positiva, foram mantidos por mais duas semanas após o diagnóstico sem qualquer tipo de tratamento. Durante esse período foi avaliada a glicosúria a cada dois dias e a glicemia (Haemoglukotest/Reoflolux F, Boehring-Mannheim, Germany) ao fim da primeira e da segunda semanas. Ao fim deste período foram selecionados e sacrificados para estudo apenas aqueles animais cuja glicemia apresentava valores iguais ou acima de 300 mg/dl.

Camundongos NOD que não apresentaram glicosúria até a idade de 19 a 21 semanas e cuja glicemia exibia valores até 120 mg/dl foram considerados não diabéticos. O mesmo critério foi seguido para camundongos da linhagem A/J.

### 3.3 Procedimentos

#### 3.3.1 Obtenção dos nervos

Alcançada a idade estabelecida, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e, a seguir, o nervo ciático esquerdo foi exposto na região da coxa a partir do tendão do músculo obturador até a penetração dos seus ramos na região da fossa poplítea. Foram, então, identificados e isolados cirurgicamente os nervos tibial, fibular e sural. Para fixação *in situ*, todo o conjunto de nervos foi banhado com uma solução fixadora contendo 2% de glutaraldeído e 1% de paraformaldeído, dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4), durante 10 minutos a 4°C. A seguir, o conjunto de nervos foi removido, transecionando-se o nervo ciático junto ao tendão do m. obturador e os seus ramos na altura da fossa poplítea. Imediatamente após este procedimento, o conjunto de nervos foi mergulhado e mantido na respectiva solução fixadora durante 24 horas a 4°C.

#### 3.3.2 Processamento dos nervos

Após 24 horas na solução fixadora de aldeídos, os nervos tibial, fibular e sural foram então separados e os segmentos lavados com

solução tampão fosfato 0,1M (pH7,4) (3x) e a seguir submetidos à pós-fixação em OsO<sub>4</sub> (2%) durante duas horas. Após este procedimento foram lavados em água destilada (3x), deixados em solução de acetato de uranila (0,5%) durante 12 horas. A seguir, foram processados para embebição em resina Araldite. De cada segmento de nervo foram obtidos cortes transversais semi-finos (1,0 µm), abrangendo toda a área do mesmo. Após serem corados com azul de toluidina (1%) e montados, os mesmos foram empregados para a análise histológica, contagem do número total dos axônios mielínicos e para a avaliação morfométrica das fibras mielínicas no nervo sural.

### 3.3.3 Análise histológica dos nervos

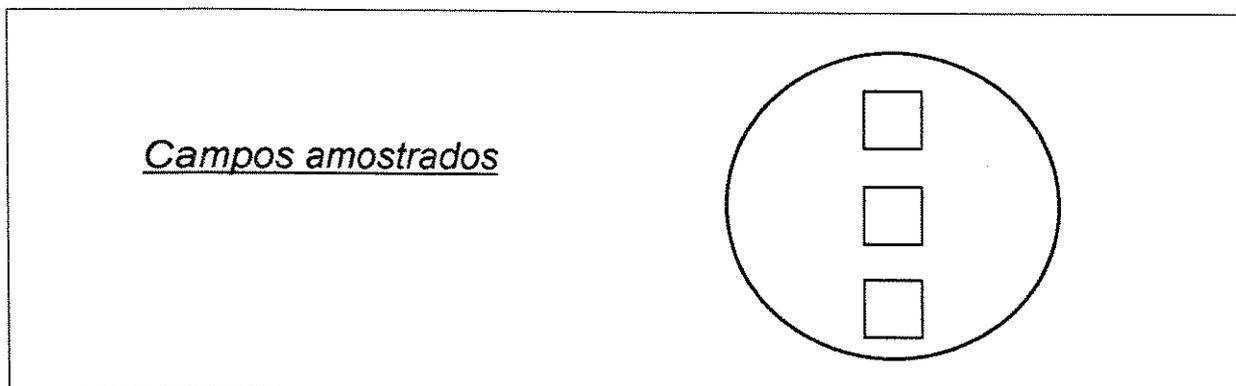
Secções transversais dos nervos tibial, fibular e sural foram observadas ao microscópio de luz. Foram considerados na análise histológica dos nervos a morfologia das fibras mielínicas, a natureza e distribuição dos elementos do endoneuro, as características morfológicas das bainhas conjuntivas perineural e epineural e as características estruturais dos vasos sanguíneos presentes nas mesmas.

### 3.3.4 Análise morfométrica das fibras mielínicas

Para a contagem do número de fibras mielínicas um corte transversal de cada nervo foi fotografado ao fotomicroscópio (Zeiss Axioskop), sob objetiva de imersão (100X) e optovar 2,5. Em cada corte foram fotografados campos adjacentes abrangendo-se a totalidade de sua área transversal. Os negativos foram então copiados com ampliação de 6,3 vezes obtendo-se um aumento final de 1.575 vezes. Associando-se os campos adjacentes a área total do nervo foi reconstruída e contados todos os axônios mielínicos empregando-se um contador digital construído para este fim.

Para a avaliação morfométrica das fibras mielínicas, em um corte de cada nervo sural foram amostrados 3 campos, segundo o esquema abaixo. Os negativos foram ampliados conforme descrito acima e em cada foto foi segmentado manualmente cada fibra mielínica, evidenciando-se o axônio e sua respectiva bainha de mielina. Cada imagem, contendo o contorno das fibras foi então digitalizada empregando-se um "scanner" de mesa (Microtek, ScanMaker IISP). A seguir estas imagens foram processadas morfometricamente computado-se o diâmetro dos axônios (DA), o diâmetro das fibras (DF), a espessura da bainha de mielina e razão g (DF/DA). Para este fim foi utilizado o programa SigmaScan Pro (SigmaScan Measurements,

Jandel Co., USA) instalado em um microcomputador Pentium II (233 Mhz).



### 3.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados quantitativos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) dos valores das médias registradas de cada parâmetro seguida do teste "t" de Student-Newman-Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Características clínicas dos animais empregados

Os animais com idade entre 17 e 19 semanas de vida foram avaliados clinicamente, a cada dois dias, durante duas semanas, antes do sacrifício. Em todos os animais foi avaliado o peso corporal, a glicemia e a ocorrência de glicosúria.

A tabela 1 mostra a última medida realizada ao fim da primeira e da segunda semanas, respectivamente. Pode se verificar que todos os animais que apresentaram glicosúria positiva (+) na primeira semana tiveram esse parâmetro aumentado (++ ou +++) na segunda semana. Este aumento foi maior nas fêmeas do que nos machos da linhagem NOD. Os valores de glicemia nestes animais também aumentou de maneira expressiva da primeira (Machos= $215,2 \pm 27$ ; Fêmeas= $233,0 \pm 42,1$ ) para a segunda semana (Machos= $318,6 \pm 15,5$ ; Fêmeas= $377,0 \pm 23,4$ ) após a detecção da glicemia positiva. Os animais NOD, machos e fêmeas, que não desenvolveram glicosúria, bem como os animais da linhagem A/J, mantiveram os valores de glicemia estáveis e dentro da faixa de normalidade (1ª semana: Machos= $92,6 \pm 10,8$ ; Fêmeas= $94,0 \pm 7,5$ ; A/J= $91,0 \pm 12,2$ ; 2ª semana: Machos= $94,8 \pm 9,2$  ; Fêmeas= $95,0 \pm 7,0$ ; A/J= $92 \pm 11,6$ )

## DOSAGEM DA GLICEMIA E GLICOSÚRIA NOS ANIMAIS APÓS A 1<sup>A</sup> E 2<sup>A</sup> SEMANAS ANTES DO SACRIFÍCIO

	NÚMERO DO ANIMAL NO GRUPO	GLICEMIA (mg/dl)		GLICOSÚRIA	
		1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana
NOD Macho não diabético	1	98	98	-	-
	2	100	102	-	-
	3	80	85	-	-
	4	103	104	-	-
	5	82	85	-	-
	Média±ep	92,6±4,8 (A,a)	94±4,1 (A,a)		
NOD Macho diabético	1	230	325	++	+++
	2	255	340	++	+++
	3	190	308	+	++
	4	205	320	++	+++
	5	196	300	+	++
	Média±ep	215,2±12,1 (B,a)	318,6±6,9(B,b)		
NOD Fêmea não diabética	1	104	105	-	-
	2	99	99	-	-
	3	92	92	-	-
	4	90	92	-	-
	5	85	87	-	-
	Média±ep	94±3,4 (A,a)	95±3,1 (A,a)		
NOD Fêmea diabética	1	306	410	++	+++
	2	198	370	+	+++
	3	216	345	++	+++
	4	220	380	++	+++
	5	225	380	++	+++
	Média±ep	233,0±18,8 (B,a)	377,0±10,5 (A,b)		
A/J Macho	1	83	84	-	-
	2	110	110	-	-
	3	92	95	-	-
	4	78	80	-	-
	5	91	91	-	-
	Média±ep	91,0±5,5(A,a)	92,0±5,2 (A,a)		

**TABELA 1** - A tabela mostra a média (±erro padrão) dos valores de glicemia e glicosúria avaliada nos animais machos e fêmeas, diabéticos e não diabéticos, da linhagem NOD e dos animais machos da linhagem A/J. As letras anotadas ao lado de cada media correspondem ao significado da comparação entre as médias observadas entre os animais diabéticos e não diabéticos (letras maiúsculas) e entre as médias observadas na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> semanas (letras minúsculas). As médias que apresentam letras iguais não são diferentes dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste "t" de Student-Newmans Keuls.

A tabela 2 mostra que todos animais da linhagem NOD que desenvolveram glicosúria positiva e glicemia acima de 120 mg/dl tiveram queda do peso corporal entre a primeira e a segunda semana antes do sacrifício. Não houve diferença significativa na queda de peso entre animais machos e fêmeas.

PESO (gramas) DOS ANIMAIS AO FINAL DA 1 <sup>A</sup> E 2 <sup>A</sup> SEMANAS ANTES DO SACRIFÍCIO							
Linhagem	No. do animal no grupo	1	2	3	4	5	Média±ep
NOD Macho não diabético	1 <sup>a</sup> semana	30	28	28	29	30	29,0 ±0,4 (A,a)
	2 <sup>a</sup> semana	32	28	28	30	31	29,1±0,8 (A,a)
NOD Macho diabético	1 <sup>a</sup> semana	30	28	28	30	30	29,2±0,5 (A,a)
	2 <sup>a</sup> semana	26	23	22	26	26	24,6±0,9 (B,b)
NOD Fêmea não diabética	1 <sup>a</sup> semana	30	29	28	28	28	28,6±0,4 (A,a)
	2 <sup>a</sup> semana	30	30	28	28	28	28,8±0,5 (A,a)
NOD Fêmea diabética	1 <sup>a</sup> semana	29	30	28	28	30	29,0±0,4 (A,a)
	2 <sup>a</sup> semana	24	23	24	22	23	23,2±0,4 (B,b)
A/J Macho	1 <sup>a</sup> semana	33	30	32	30	30	31,0±0,6 (A,a)
	2 <sup>a</sup> semana	33	30	33	30	30	31,2±0,7 (A,a)

**TABELA 2** - A tabela mostra os valores do peso corporal em gramas avaliado nos animais machos e fêmeas, diabéticos e não diabéticos, da linhagem NOD e dos animais machos da linhagem A/J. As letras anotadas ao lado de cada média correspondem ao significado da comparação entre as médias observadas entre os animais diabéticos e não diabéticos (letras maiúsculas) e entre as médias observadas na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> semanas (letras minúsculas). As médias que apresentam letras iguais não são diferentes dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste "t" de Student-Newmans Keuls. (ep=erro padrão)

## 4.2. Análise histológica das fibras mielínicas

Observados ao microscópio de luz, os cortes transversais dos nervos tibial, fibular e sural dos animais da linhagem NOD, diabéticos e não diabéticos, bem como dos animais da linhagem A/J, mostraram-se normais quanto à sua morfologia (figs 1-9). As fibras mielínicas se encontravam bem delineadas sem evidências de alterações patológicas decorrentes, por exemplo, de processos desmielinizantes. Nos axônios mielínicos de maior calibre foi possível observar a presença de elementos axoplasmáticos, tais como mitocôndrias (figs. 2B e 5B). Não foram encontradas alterações estruturais evidenciando alguma patologia axonal, tais como acúmulo de neurofilamentos ou vacuolização axoplasmática.

Distribuídos entre as fibras mielínicas foi possível evidenciar grupos de axônios amielínicos (figs. 4B, 6B, 7B, 8B e 9B), embora a clara definição do perfil dos mesmos só foi possível ser observado naqueles de maior calibre.

O espaço endoneural encontrava-se compactado, e em alguns casos observamos células, que identificamos como mastócitos (fig. 5B), distribuídas neste espaço. Não foram observados células com morfologia similar a macrófagos, quer

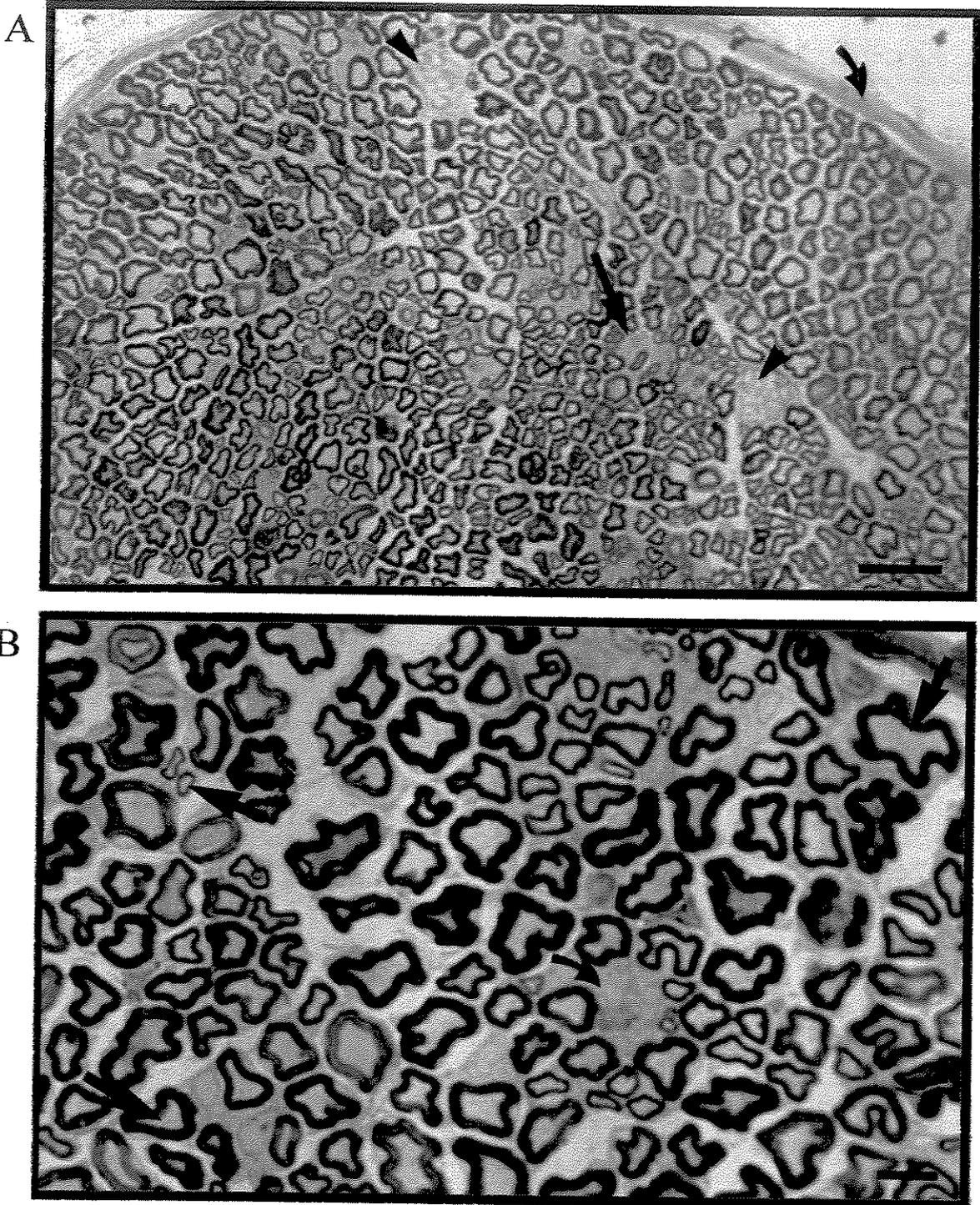
nos animais não diabéticos, quer nos animais diabéticos. O perineuro se apresentava com aspecto normal e bem delineados. Nenhuma alteração significativa, de natureza patológica, pode ser evidenciada com a técnica de coloração empregada (azul de toluidina). Um número variável de capilares foi observado, distribuídos principalmente no endoneuro (figs. 1A, 2A, 4A e 6B).

### **4.3. Análise morfométrica das fibras mielínicas**

#### **4.3.1 Número de fibras mielínicas**

A tabela 3 mostra a contagem do número total de fibras mielínicas computada nos cortes transversais dos nervos tibial, fibular e sural, dos animais machos e fêmeas da linhagem NOD e machos da linhagem A/J.

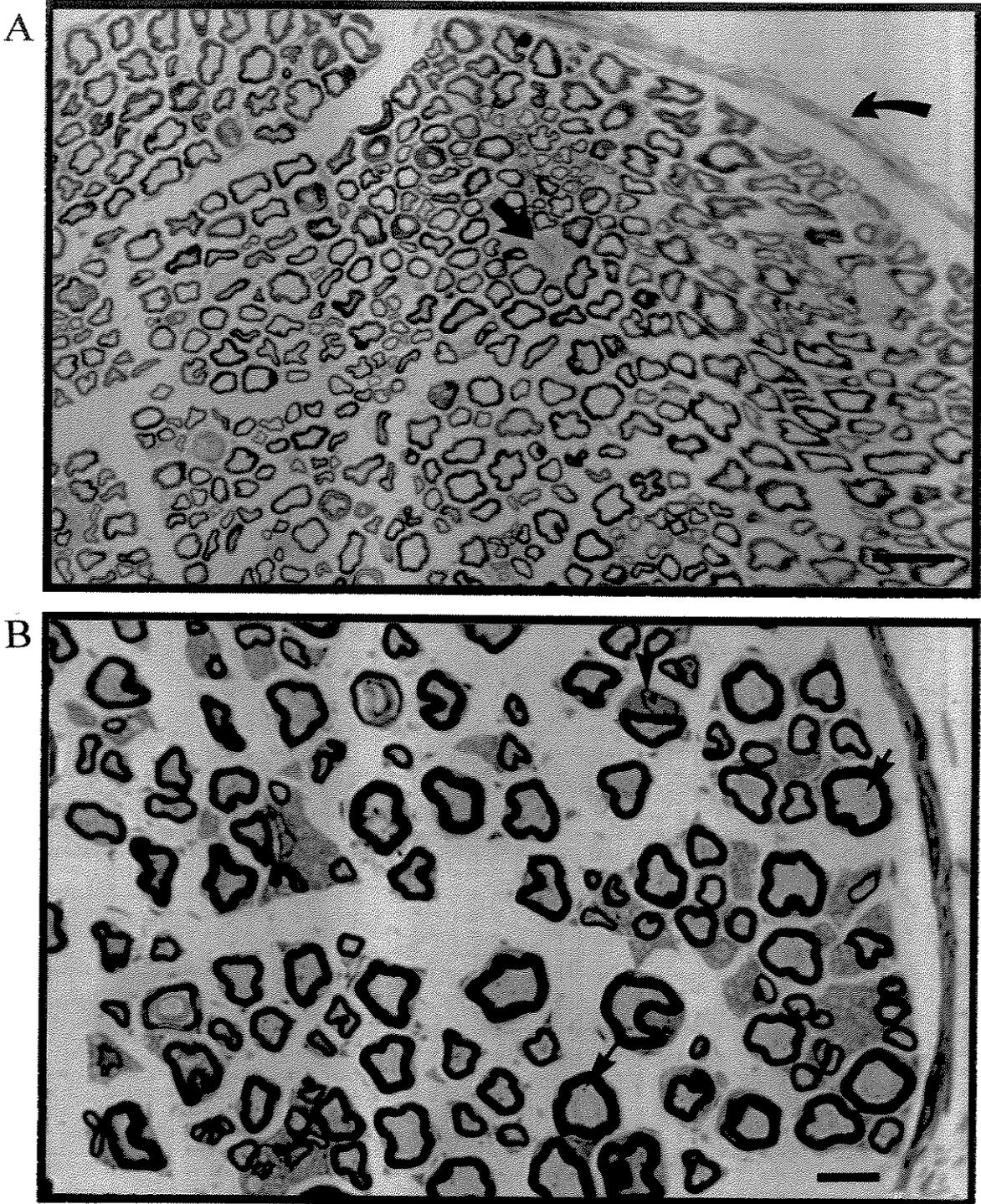
Os valores obtidos mostraram não haver diferenças significativas entre os animais machos e fêmeas da linhagem NOD, diabéticos e não diabéticos. O mesmo ocorreu quando comparado o número de fibras mielínicas obtido nestes animais com o obtido nos animais machos da linhagem A/J.



**Figura 1.**

A. Corte transversal de nervo tibial de camundongo NOD macho diabético. Observe a presença de axônios mielínicos organizados compactamente com reduzido espaço endoneural ao seu redor e a presença de vasos sanguíneos (cabeça de seta). O perineuro mostra-se bem delineado (seta curva). Observa-se a presença de vários grupamentos de axônios amielínicos (seta reta). Barra=30 $\mu$ m

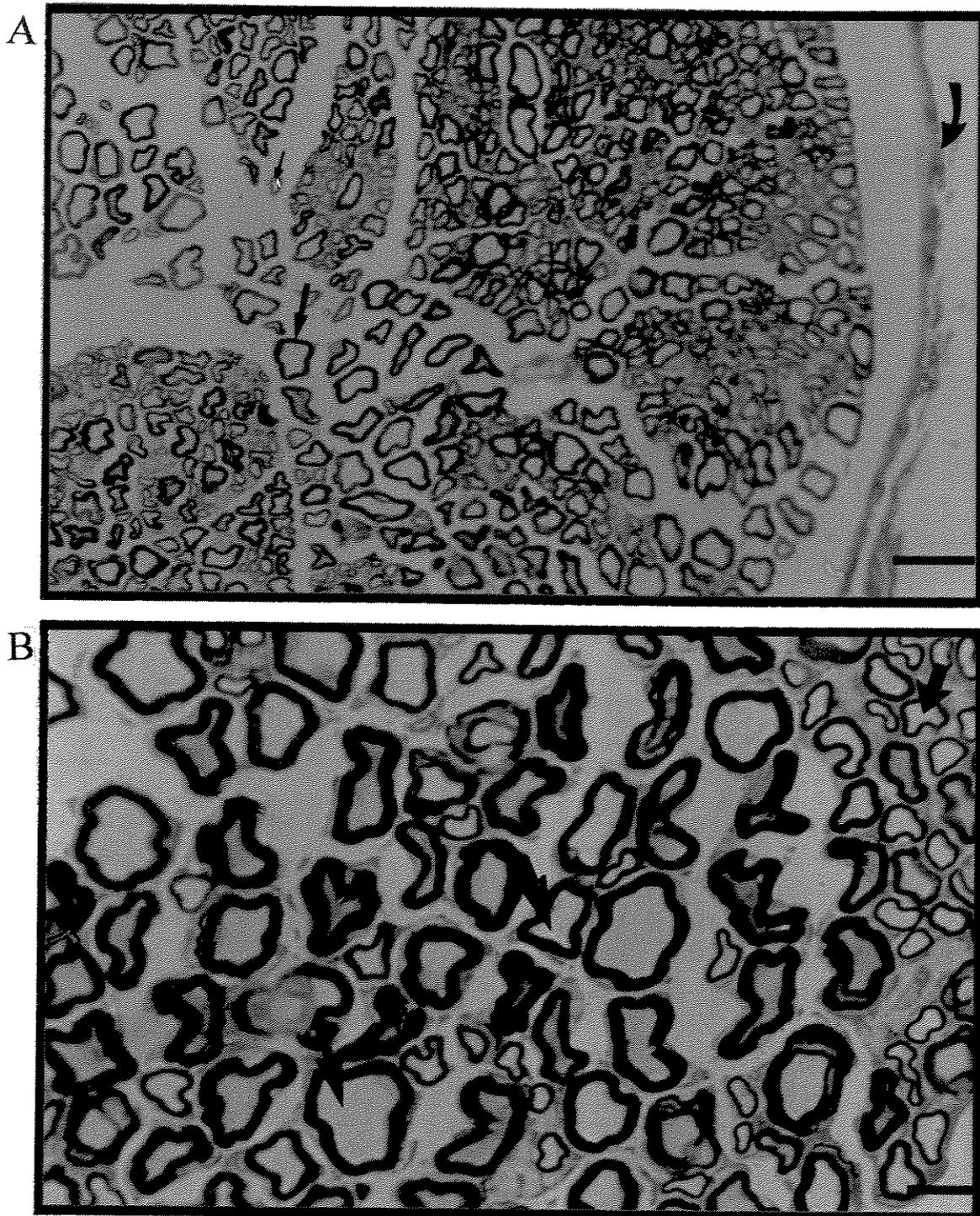
B. Detalhe de um nervo tibial de camundongo NOD macho diabético cortado transversalmente. Observe a presença de axônios mielínicos de diferentes calibres, com bainha de mielina bem definida (seta reta), e a presença de grupos de axônios amielínicos (seta curva) entre os mesmos. Barra=10 $\mu$ m. *Coloração:* azul de toluidina



**Figura 2.**

A. Corte transversal de nervo tibial de camundongo NOD fêmea não-diabética. Observe a presença do perineuro bem delineado (seta curva) e a presença de vaso sanguíneo (seta reta). Barra=30 $\mu$ m

B. Detalhe de um nervo tibial de camundongo NOD fêmea não-diabética cortado transversalmente. Observe a presença de axônios mielínicos de variados calibres e a presença de grupos de axônios amielínicos associados a células de Schwann (cabeça de seta). Note a presença de mitocôndrias no interior do axoplasma de axônios de maior calibre (seta reta). Barra=10 $\mu$ m. *Coloração:* azul de toluidina

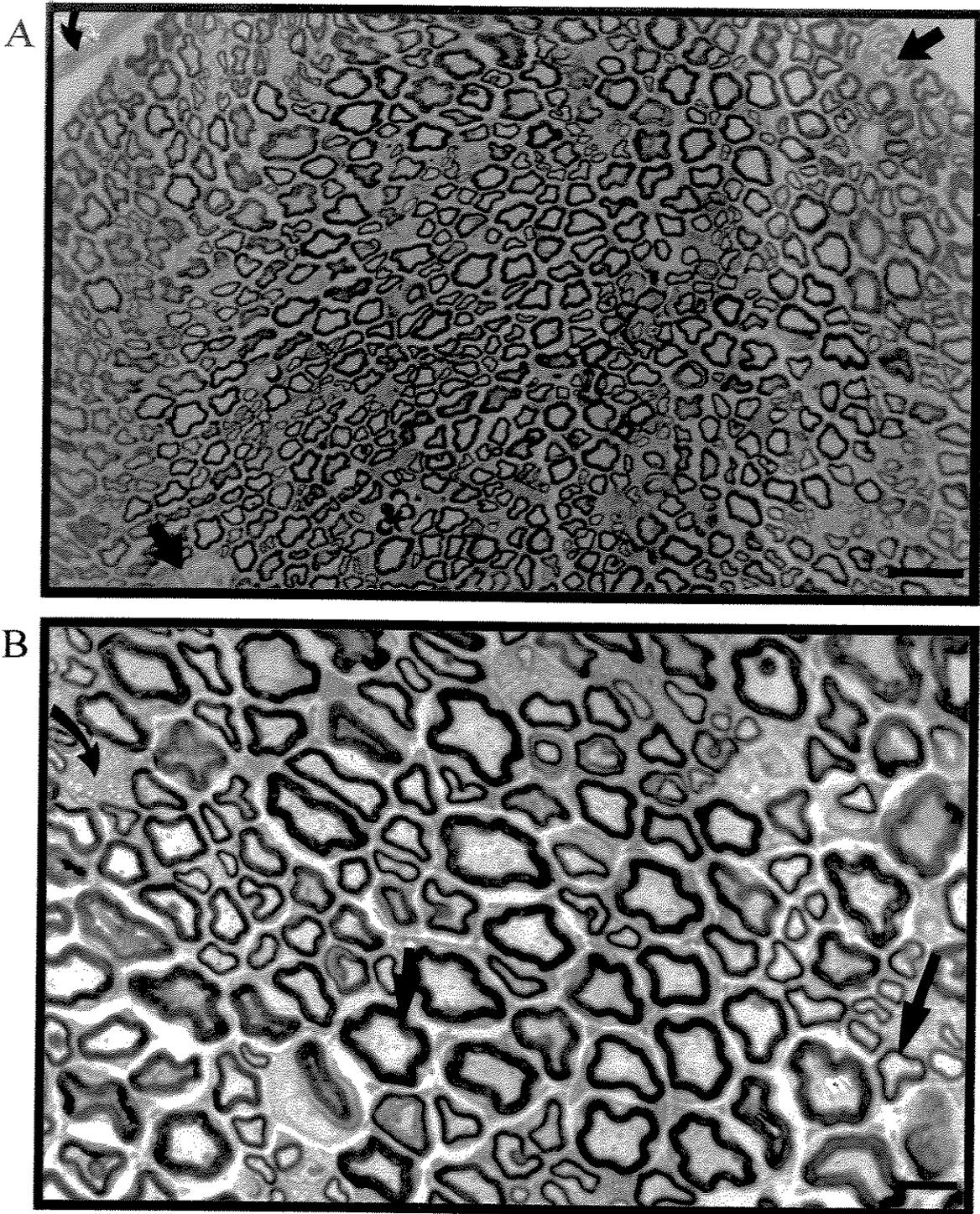


**Figura 3.**

**A.** Corte transversal de nervo tibial de camundongo A/J macho não-diabético. Observe a presença do perineuro (seta curva) e de axônios mielínicos de diferentes calibres (seta reta). Barra=30 $\mu$ m

**B.** Detalhe de um nervo tibial de camundongo A/J macho não-diabético cortado transversalmente. Observe a presença de axônios mielínicos de diversos calibres (setas retas). Barra=10 $\mu$ m.

*Coloração:* azul de toluidina

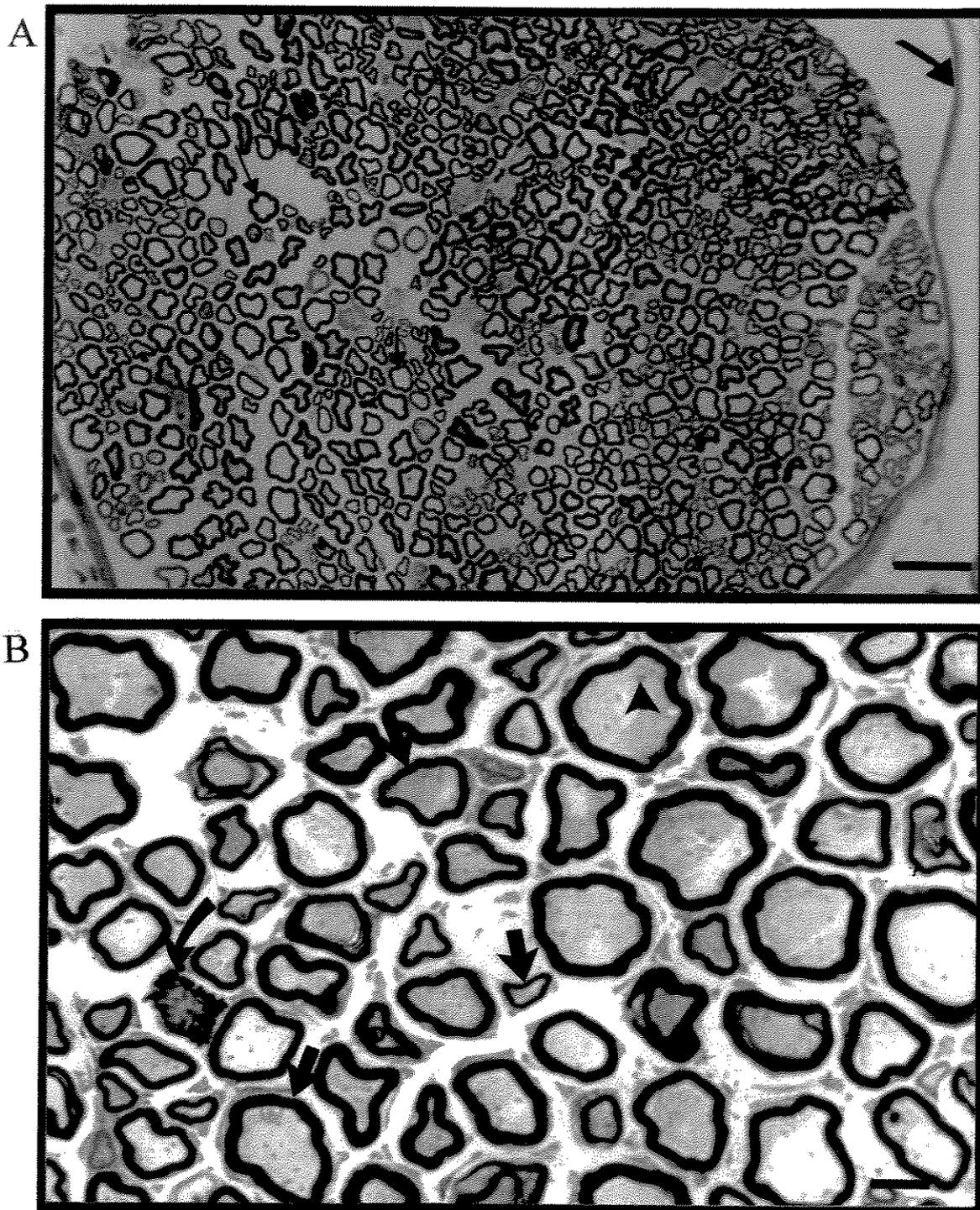


**Figura 4.**

A. Corte transversal de nervo fibular de camundongo NOD macho diabético. Observe o perineuro (seta curva) e a presença de vasos sanguíneos localizados mais periféricamente (seta reta). O endoneuro se apresenta bem compactado neste caso. Barra=30 $\mu$ m

B. Detalhe de um nervo fibular de camundongo NOD macho diabético cortado transversalmente. Nota-se espaço endoneural reduzido e axônios mielínicos de diferentes calibres (seta reta). Observe a presença de grupos de axônios amielínicos (seta curva). Barra=10 $\mu$ m.

Coloração: azul de toluidina

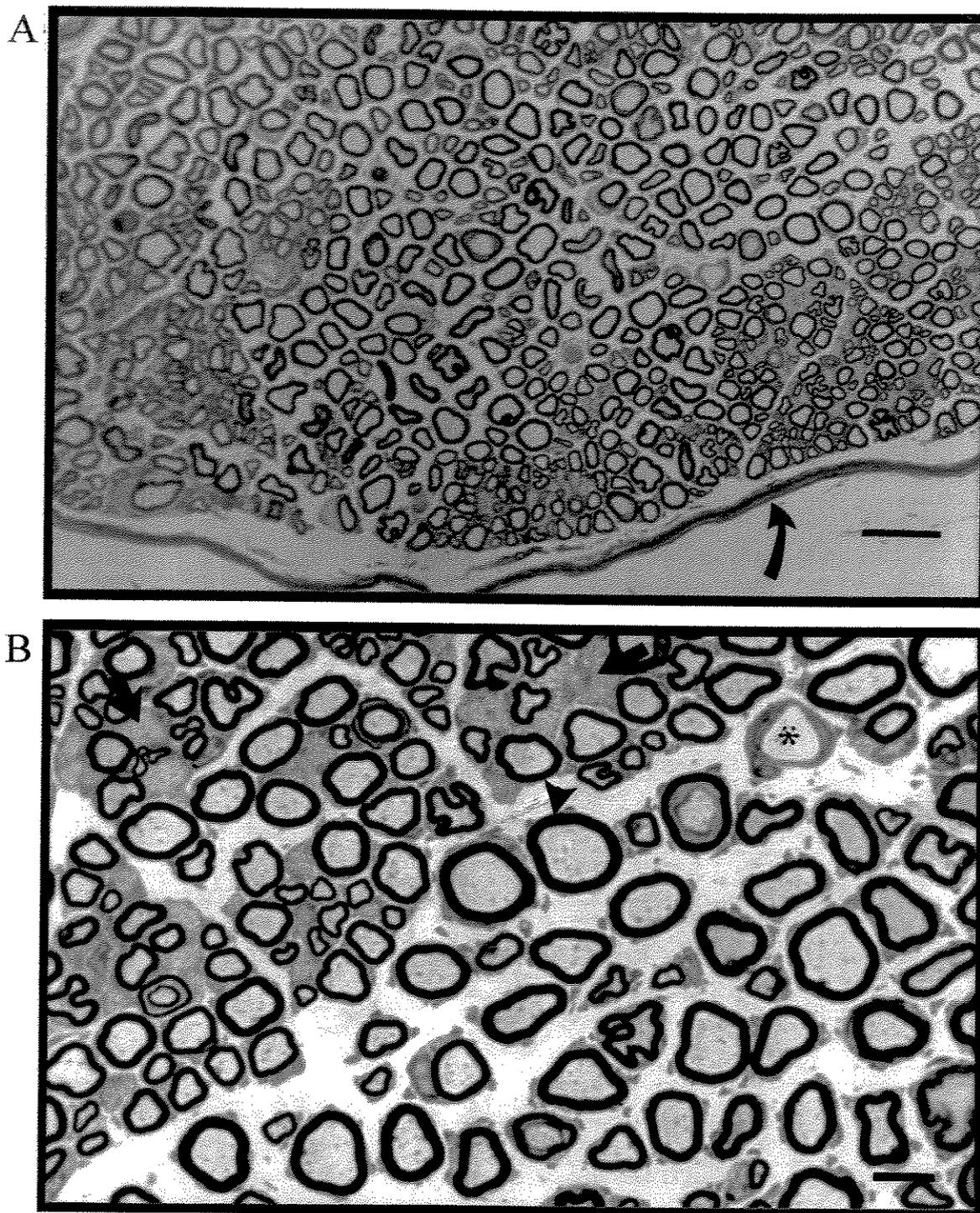


**Figura 5.**

A. Corte transversal de nervo fibular de camundongo NOD fêmea não-diabética. Observe o perineuro bem delineado (seta curva) e a presença de axônios de diferentes calibres (seta reta). Barra=30 $\mu$ m

B. Detalhe de um nervo fibular de camundongo NOD fêmea não-diabética cortado transversalmente. Observe a presença de axônios miélinicos de variados calibres (setas retas) podendo-se observar mitocôndrias no interior de axônios de maior calibre (cabeças de setas) e a presença de um mastócito (seta curva). Barra=10 $\mu$ m.

Coloração: azul de toluidina

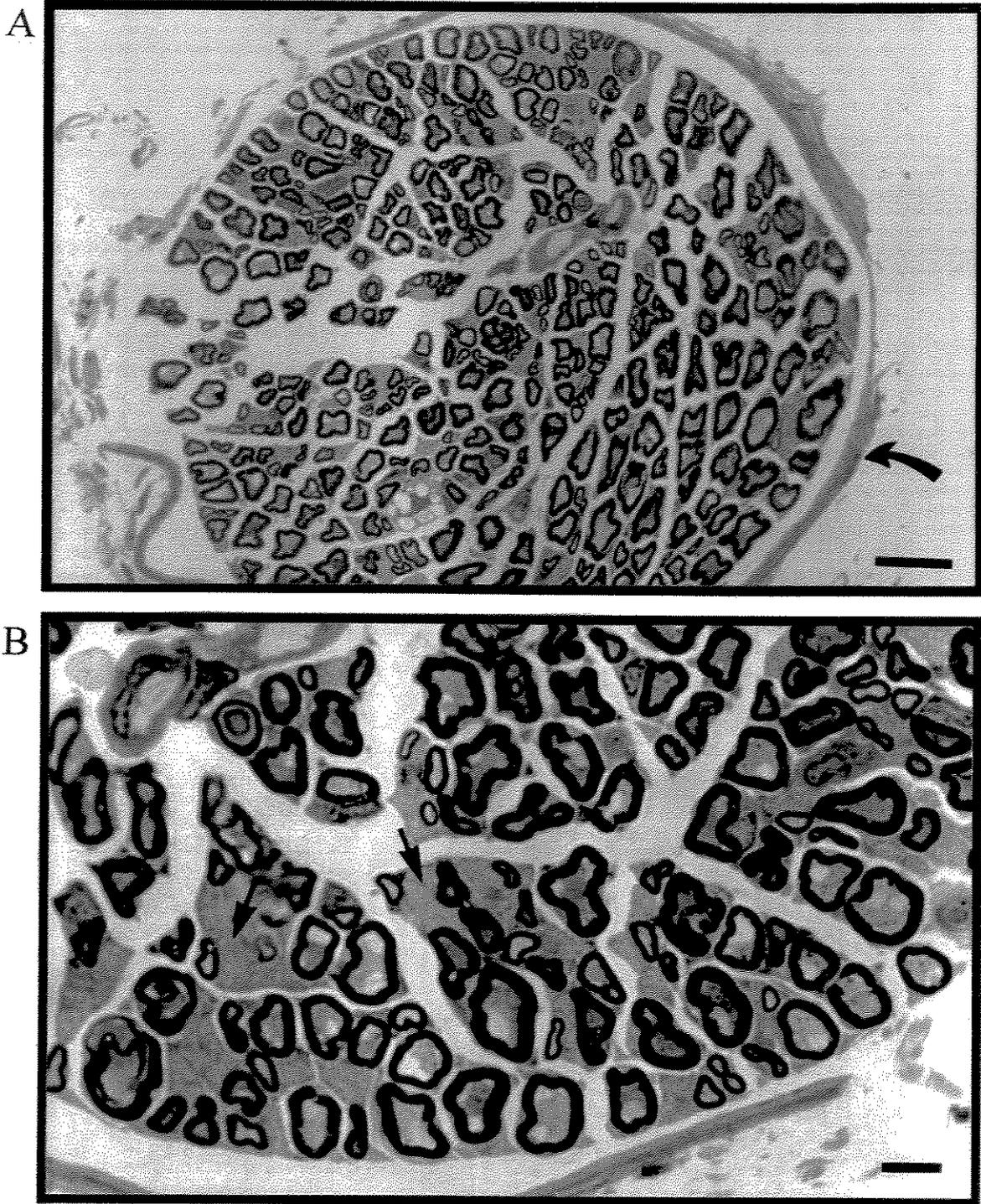


**Figura 6.**

A. Corte transversal de nervo fibular de camundongo A/J macho não-diabético. Note a presença do perineuro bem delineado (seta curva). Barra=30 $\mu$ m

B. Detalhe de um nervo fibular de camundongo A/J macho não-diabético cortado transversalmente. Observe a presença de axônios mielínicos (cabeça de seta) e a presença de axônios amielínicos entre eles (setas retas). Nota-se a presença de vaso sanguíneo (asterisco). Barra=10 $\mu$ m.

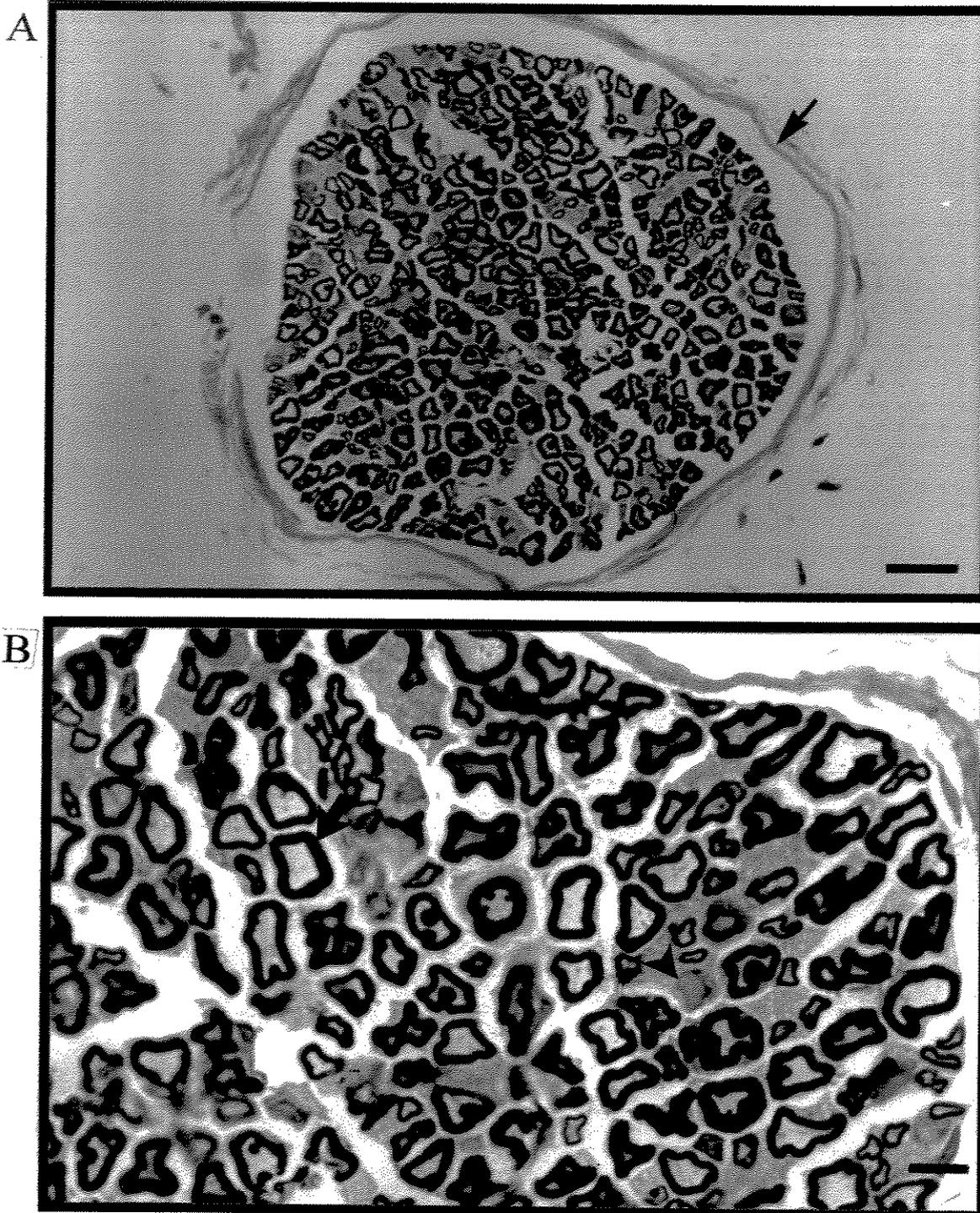
Coloração: azul de toluidina



**Figura 7.**

**A.** Corte transversal de nervo sural de camundongo NOD macho não-diabético. Presença do perineuro bem delineado (seta curva). Barra=30 $\mu$ m

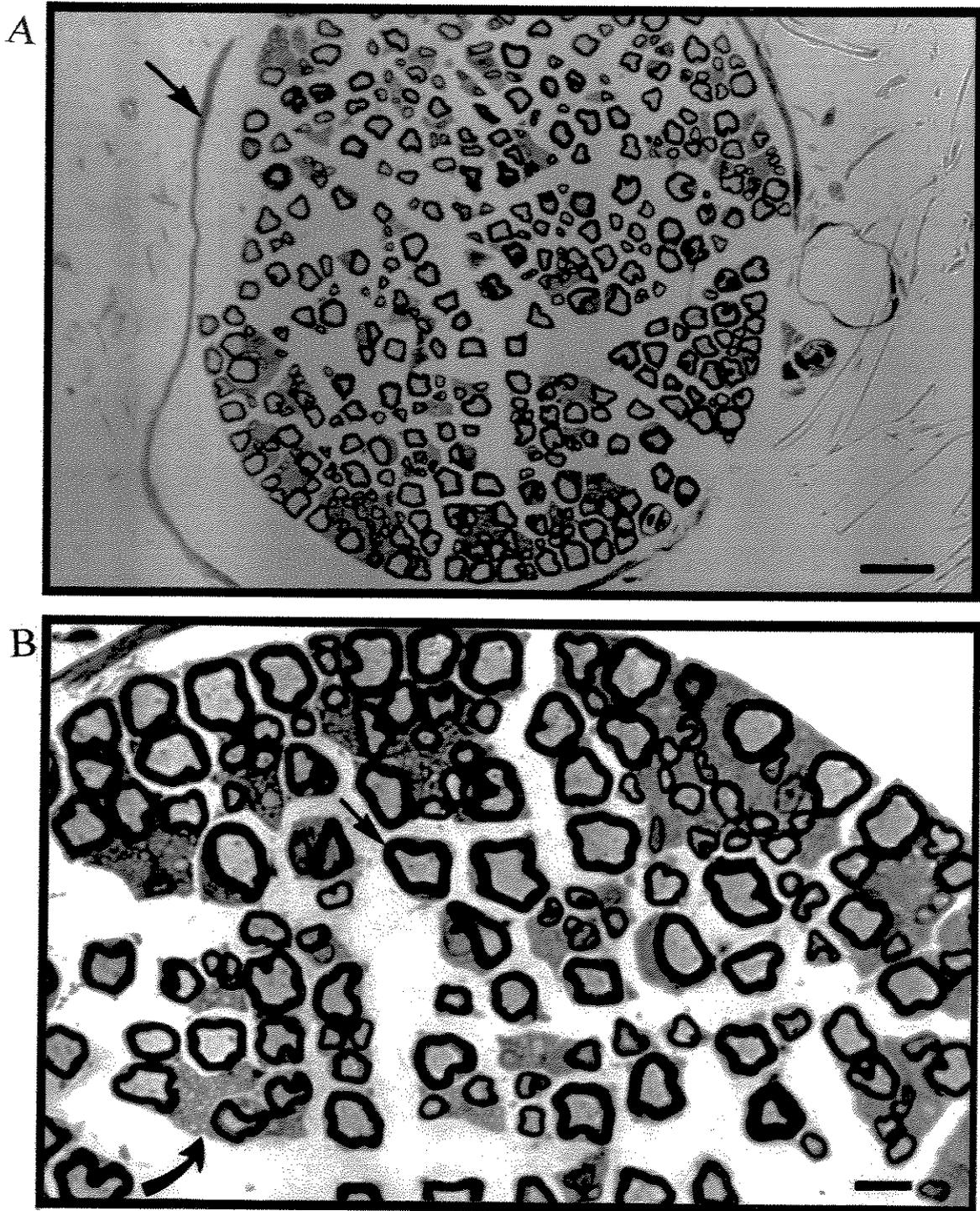
**B.** Detalhe de um nervo sural de camundongo NOD macho não-diabético cortado transversalmente. Note a presença de axônios mielínicos de calibres variados e o grande número de conjuntos de axônios amielínicos entre eles (setas retas). Barra=10 $\mu$ m  
Coloração: azul de toluidina



**Figura 8.**

**A.** Corte transversal de nervo sural de camundongo NOD fêmea diabética. Observe o perineuro bem delineado (seta reta). Barra=30 $\mu$ m

**B.** Detalhe de um nervo sural de camundongo NOD fêmea diabética cortado transversalmente. Observe axônios mielínicos com bainha de mielina bem definida (seta reta) e grande número de grupos de axônios amielínicos associados a células de Schwann (cabeça de seta). Barra=10 $\mu$ m.  
Coloração: azul de toluidina



**Figura 9.**

**A.** Corte transversal de nervo sural de camundongo A/J macho não-diabético. Observe o perineuro com morfologia similar aos observados nos animais da linhagem NOD (seta reta). Barra=30 $\mu$ m

**B.** Detalhe de um nervo sural de camundongo A/J macho não-diabético cortado transversalmente. Observe axônios mielínicos (seta reta) com bainha de mielina bem definida e grande número de grupos de axônios amielínicos (seta curva) ao seu redor. Barra=10 $\mu$ m

Coloração: azul de toluidina

## NÚMERO TOTAL DE FIBRAS MIELÍNICAS

LINHAGENS	NERVOS		
	Tibial	Fibular	Sural
NOD Macho Diabético (n=5)	1647±87 (a)	936±6(a)	439±10 (a)
NOD Macho Não Diabético (n=5)	1709±36 (a)	934±8 (a)	443±25 (a)
NOD Fêmea Diabética (n=5)	1769±56 (a)	1008±6 (a)	457±16 (a)
NOD Fêmea Não Diabética (n=5)	1594±39 (a)	990±27 (a)	461±10(a)
A/J Macho (n=5)	1630±34 (a)	983±16 (a)	474±27 (a)

**TABELA 3** - A tabela mostra as médias ( $\pm$  erro padrão) do número de fibras mielínicas contadas nos nervos tibial, fibular e sural dos animais machos e fêmeas, diabéticos e não diabéticos, da linhagem NOD e dos animais machos da linhagem A/J. A letra anotada ao lado de cada média corresponde ao significado da comparação entre as médias observadas nos animais diabéticos e não diabéticos e animais da linhagem A/J. As médias que apresentam letras iguais não são diferentes dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste "t" de Student-Newmans Keuls.

#### 4.3.2 Avaliação morfométrica das fibras mielínicas do nervo sural

A tabela 4 apresenta a média dos valores do diâmetro dos axônios (DA), diâmetro das fibras (DF), espessura da bainha de mielina (EBM) e razão "g" (DA/DF), computados no nervo sural dos animais machos e fêmeas da linhagem NOD, diabéticos e não diabéticos, assim como dos da linhagem A/J.

Os valores obtidos para o diâmetro dos axônios mielínicos mostram que houve uma redução significativa deste parâmetro nos animais diabéticos, machos e fêmeas, quando comparados, respectivamente, com os animais não diabéticos. O mesmo pôde ser observado quando analisado o diâmetro das fibras mielínicas. Por outro lado, não foi detectada diferença significativa na espessura da bainha de mielina entre os grupos de animais machos e fêmeas da linhagem NOD, diabéticos e não diabéticos. Também não há diferença significativa no valor da espessura da bainha de mielina entre os animais da linhagem NOD e os animais da linhagem A/J.

Com relação aos valores da razão "g", foi observada diferença significativa entre as fêmeas diabéticas e não diabéticas da linhagem NOD, sendo maior nestas últimas. Contudo, este parâmetro não apresentou diferença significativa entre os animais machos da linhagem NOD. Por outro lado o valor da razão "g" para as fibras

mielínicas dos animais da linhagem A/J foi semelhante ao das fêmeas não diabéticas da linhagem NOD e superior ao dos machos não diabéticos desta mesma linhagem.

### PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO NERVO SURAL

LINHAGENS	PARÂMETROS			
	DIÂMETRO AXÔNIO ( $\mu\text{m}$ )	DIÂMETRO FIBRA ( $\mu\text{m}$ )	ESPESSURA MIELINA ( $\mu\text{m}$ )	RAZÃO "g"
NOD Macho não diabético (n=3) 180 fibras	3,88±1,59 (a)	6,15±1,93 (a)	1,13 ± 0,25 (a)	0,61±0,08 (a)
NOD Macho diabético (n=3) 246 fibras	3,40±1,27 (b)	5,67±1,59 (b)	1,14±0,26 (a)	0,59±0,09 (a)
NOD Fêmea não diabética (n=3) 205 fibras	4,13±1,76 (c)	6,30±1,67 (c)	1,09±0,56 (a)	0,64±0,20 (b)
NOD Fêmea diabética (n=3) 371 fibras	3,56±1,51 (b)	5,86±1,50 (b)	1,15±0,47 (a)	0,60±0,16 (a)
A/J Macho (n=3) 184 fibras	4,25±1,80 (c)	6,53±2,14 (a)	1,15±0,27 (a)	0,63±0,10 (b)

**TABELA 4 - A tabela mostra a média ( $\pm$ desvio padrão) dos valores de diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras, espessura da bainha de mielina e razão "g" avaliada nos animais machos e fêmeas, diabéticos e não diabéticos, da linhagem NOD e dos animais machos da linhagem A/J. As letras anotadas ao lado de cada media correspondem ao significado da comparação entre as médias observadas entre os animais diabéticos e não diabéticos. As médias que apresentam letras iguais não são diferentes dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste "t" de Student-Newmans Keuls.**

Os gráficos da figura 10 mostram a distribuição de frequência dos diâmetros das fibras mielínicas nos animais diabéticos e não diabéticos da linhagem NOD e dos animais da linhagem A/J. Pode-se observar que nas fêmeas diabéticas a maior frequência de diâmetro das fibras correspondeu à classe daquelas possuem de 6 a 7  $\mu\text{m}$ , ao passo que nas fêmeas não diabéticas a maior frequência ocorreu entre 7 e 8  $\mu\text{m}$ . Além disso, nas fêmeas não diabéticas há um aumento do percentual de fibras mielínicas com diâmetro entre 8 e 9  $\mu\text{m}$  em relação às fêmeas não diabéticas, (12,5% e 4,5%, respectivamente).

Quanto aos animais machos da linhagem NOD pode-se observar que houve um aumento na frequência das fibras mielínicas de menor diâmetro (3 a 4  $\mu\text{m}$ ) nos animais diabéticos (18%) se comparada aos animais não diabéticos (10%). Pode-se observar também que houve uma redução da frequência de fibras de diâmetro entre 8 e 10  $\mu\text{m}$  nos animais diabéticos (6,5%), quando comparada aos animais não diabéticos (20,5%). Ainda, nos animais diabéticos a maior frequência correspondeu às fibras com diâmetro entre 5 e 6  $\mu\text{m}$  (22%), ao passo que nos animais não diabéticos ela foi igualmente alta para as fibras com diâmetro entre 5 e 6  $\mu\text{m}$  (22,5%) e entre 6 e 7  $\mu\text{m}$  (22,5%). Quanto aos animais da linhagem A/J, estes

apresentaram uma maior frequência de fibras com diâmetro maior que 10  $\mu\text{m}$  se comparados com animais macho e fêmeas não diabéticas da linhagem NOD.

Os gráficos da figura 11 mostram a distribuição de frequência dos diâmetros dos axônios mielínicos nos animais diabéticos e não diabéticos da linhagem NOD e dos animais da linhagem A/J. Observa-se que nas fêmeas diabéticas a maior frequência correspondeu aos axônios com diâmetro entre 3 e 4  $\mu\text{m}$ , ao passo que nas fêmeas não diabéticas a maior frequência correspondeu àqueles com diâmetro entre 4 e 5  $\mu\text{m}$ . Por sua vez, nos animais machos diabéticos houve uma redução na frequência dos axônios de maior calibre, ou seja daqueles com diâmetro entre 5 e 9  $\mu\text{m}$ , quando comparados aos machos não diabéticos. Neste caso, ainda, houve um aumento na frequência dos axônios com diâmetro entre 3 e 5  $\mu\text{m}$  nos animais diabéticos, se comparado aos animais não diabéticos.

Nos animais da linhagem A/J os axônios de maior frequência foram aqueles com diâmetro entre 3 e 4  $\mu\text{m}$ , contudo 38% dos axônios se encontravam nas classes de diâmetro entre 4 e 6  $\mu\text{m}$ .

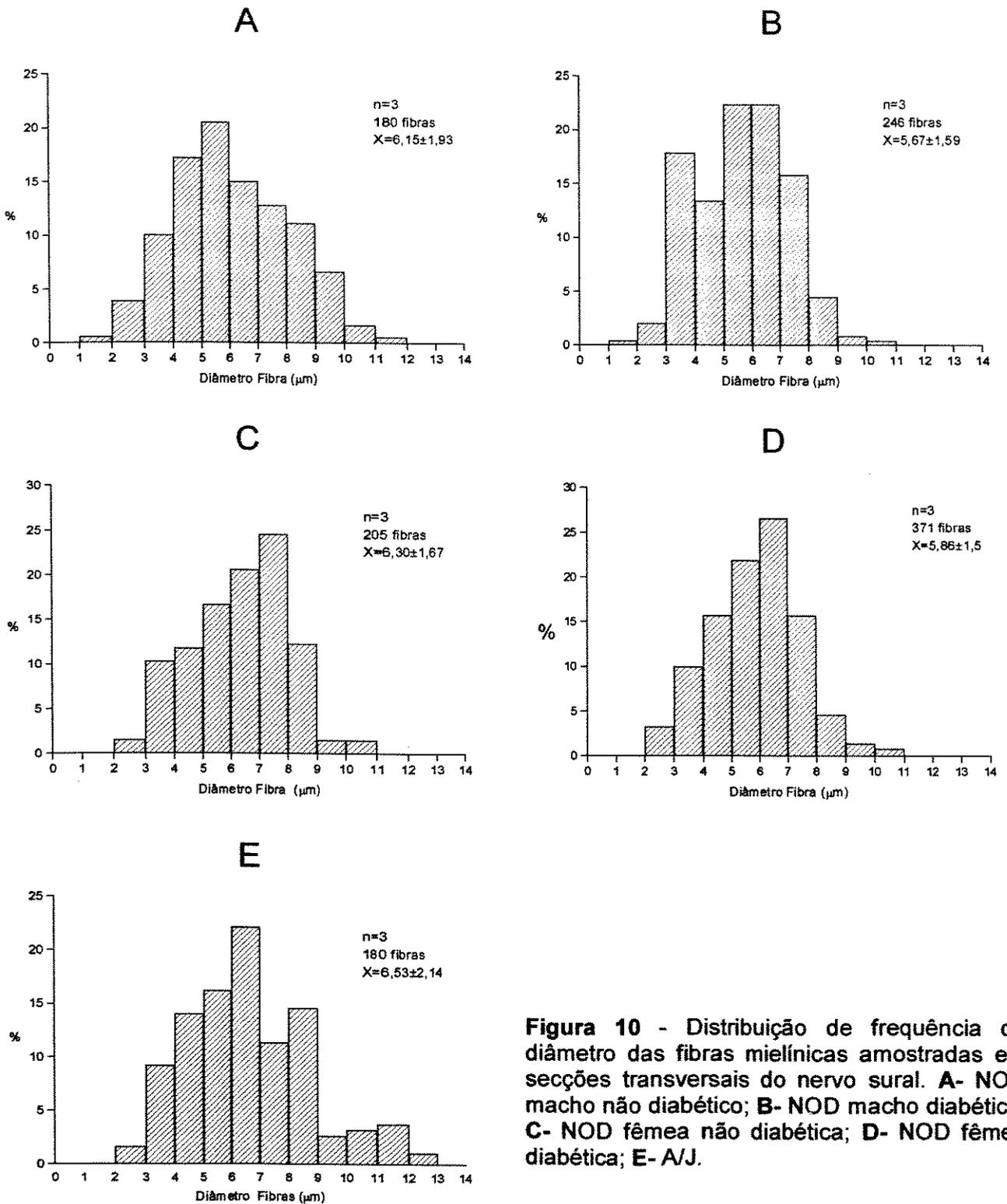
Os gráficos da figura 12 mostram a distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina nos animais diabéticos e não diabéticos da linhagem NOD e dos animais da linhagem A/J. Pode-se

observar a ocorrência de uma distribuição semelhante da espessura da bainha de mielina entre as fêmeas diabéticas e não diabética. Sendo que, a maior frequência ocorreu para as fibras com espessura da bainha de mielina entre 1,0 e 1,1  $\mu\text{m}$  para os animais diabéticos e entre 1,1 e 1,2 para os animais não diabéticos.

Nos animais machos da linhagem NOD, a distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina também foi semelhante entre os animais diabéticos e não diabéticos. Sendo que a maior parte das fibras apresentavam espessura da bainha de mielina entre 0,8 e 1,4  $\mu\text{m}$  para ambos os grupos. Contudo pode-se observar uma redução na frequência das fibras com espessura da bainha de mielina entre 0,8 e 1,1 $\mu\text{m}$  nos animais diabéticos (39,5%) em relação aos animais não diabéticos (41,5%).

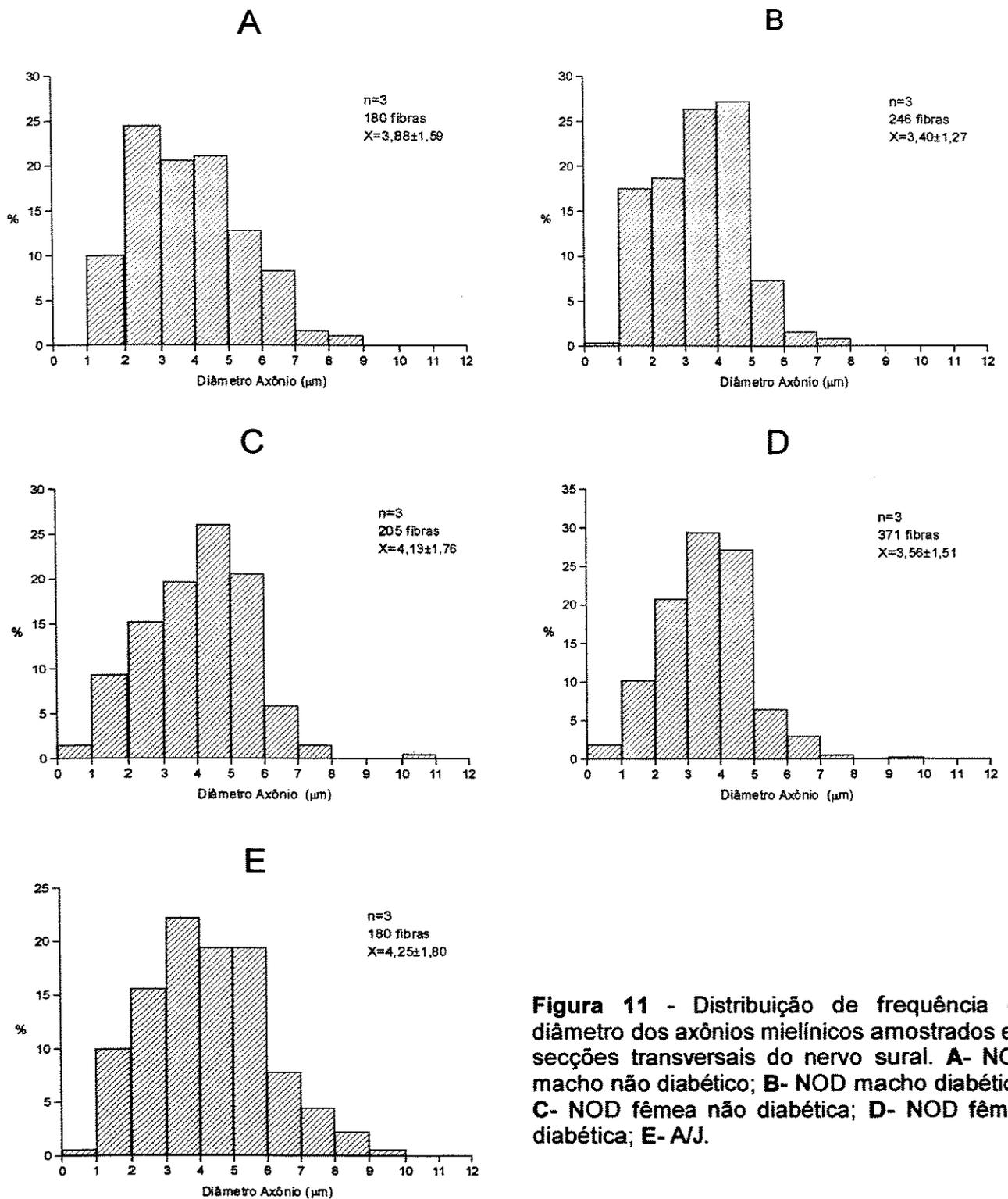
Os animais da linhagem A/J apresentaram uma distribuição de frequência de espessura da bainha de mielina semelhante à dos animais da linhagem NOD. Contudo, diferiram dos animais machos não diabéticos, desta última linhagem, no que se refere às fibras com espessura da bainha de mielina entre 0,8 e 1,0 (NOD não diabético= 28,5%; A/J=25,5%)

# DIÂMETRO DAS FIBRAS MIELÍNICAS



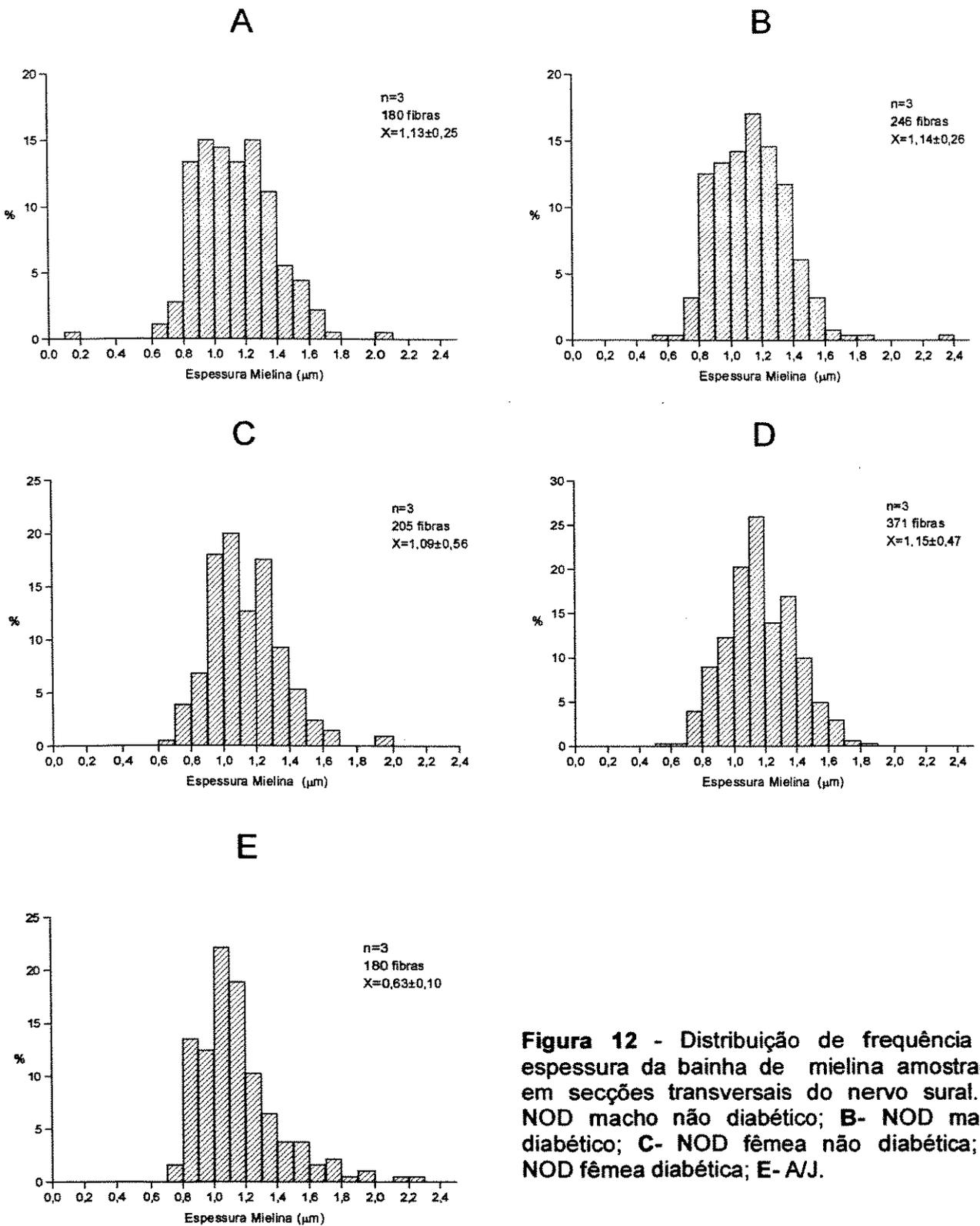
**Figura 10** - Distribuição de frequência do diâmetro das fibras mielínicas amostradas em secções transversais do nervo sural. **A**- NOD macho não diabético; **B**- NOD macho diabético; **C**- NOD fêmea não diabética; **D**- NOD fêmea diabética; **E**- A/J.

# DIÂMETRO DOS AXÔNIOS MIELÍNICOS



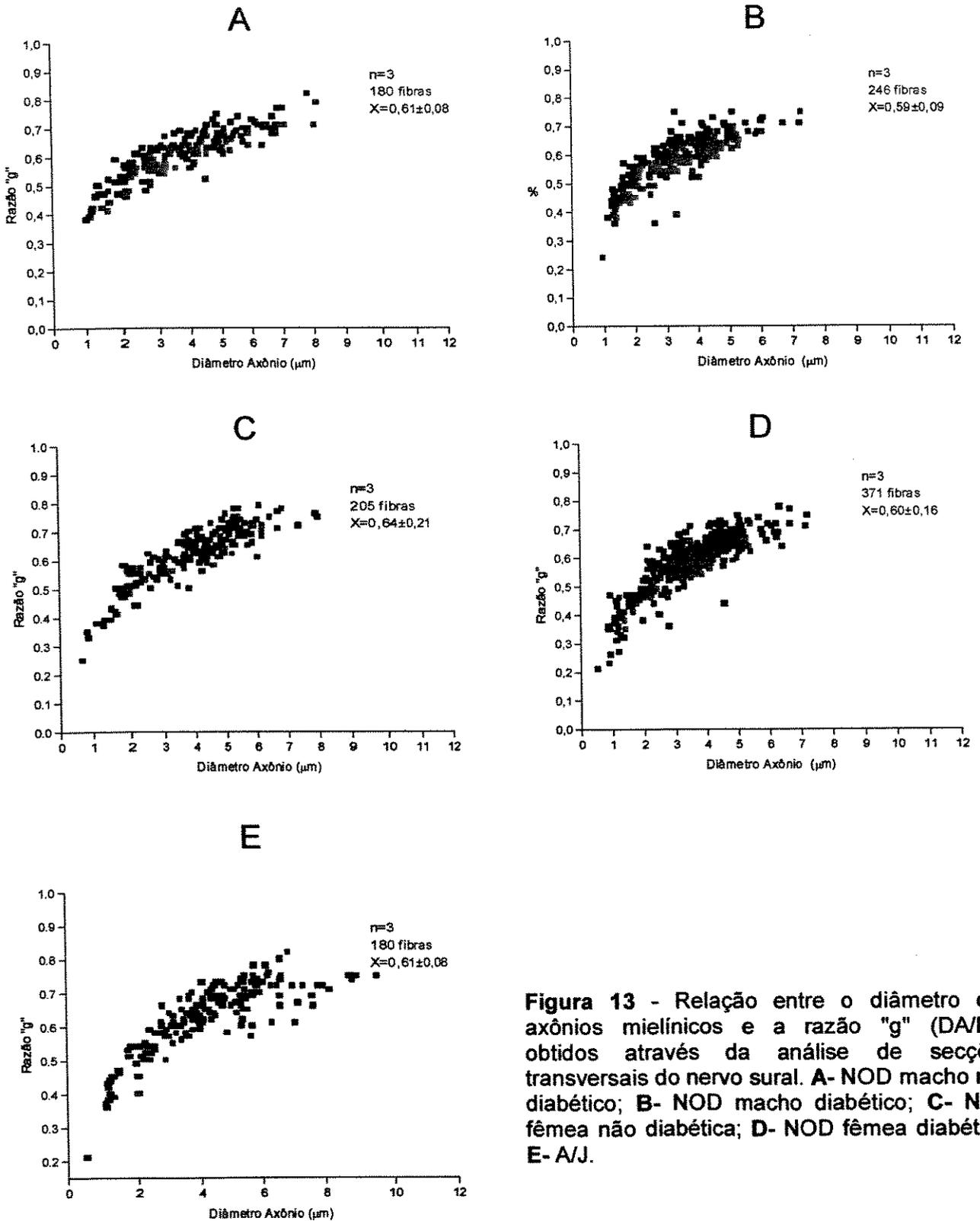
**Figura 11** - Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos amostrados em secções transversais do nervo sural. **A**- NOD macho não diabético; **B**- NOD macho diabético; **C**- NOD fêmea não diabética; **D**- NOD fêmea diabética; **E**- A/J.

# ESPESSURA DA BAINHA DE MIELINA



**Figura 12** - Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina amostradas em secções transversais do nervo sural. **A-** NOD macho não diabético; **B-** NOD macho diabético; **C-** NOD fêmea não diabética; **D-** NOD fêmea diabética; **E-** A/J.

# RAZÃO "g" (DA/DF)



**Figura 13** - Relação entre o diâmetro dos axônios mielínicos e a razão "g" (DA/DF) obtidos através da análise de secções transversais do nervo sural. **A-** NOD macho não diabético; **B-** NOD macho diabético; **C-** NOD fêmea não diabética; **D-** NOD fêmea diabética; **E-** A/J.

Os gráficos da figura 13 mostram os valores da razão "g" em função do diâmetro dos axônios, nos animais diabéticos e não diabéticos da linhagem NOD e nos animais da linhagem A/J. Pode-se observar que tanto nos animais da linhagem NOD, diabéticos e não diabéticos, como nos animais da linhagem A/J normomielinizados (razão "g" entre 0,6 e 0,75), extramielinizados (razão "g" acima de 0,75) e submielinizados (razão "g" abaixo de 0,6). Em todos os grupos estudados pode-se observar que há uma proporcionalidade inversa entre o aumento do diâmetro axonal e a espessura da bainha de mielina.

Pode-se observar também que nas fêmeas diabéticas está presente um maior contingente de fibras com valor de razão "g" abaixo de 0,6 se comparada com as fêmeas não diabéticas. Nestas últimas predominam os axônios normomielinizados. Fato semelhante pode ser observado quando se comparam os valores da razão "g" dos animais machos diabéticos e não diabéticos. Contudo, neste caso foram poucos os axônios com razão "g" abaixo de 0,4.

## **5. DISCUSSÃO**

O diabetes mellitus é uma doença metabólica que acomete uma expressiva porcentagem da população humana.

Caracteristicamente, é uma patologia crônica progressiva que atinge diferentes órgãos, diminuindo sensivelmente a qualidade de vida do indivíduo (Thomas & Tomlinson, 1993).

O estudo das sequelas causadas pelo desenvolvimento da doença torna-se bastante difícil no ser humano, sendo que muitos detalhes da evolução da mesma permanecem obscuros. Neste sentido, o estudo experimental das neuropatias diabéticas tem sido realizado em diferentes modelos animais, incluindo linhagens capazes de desenvolver espontaneamente o diabetes, tais como os ratos Wistar BB e os camundongos NOD (Sharma & Thomas, 1987; Sima, Brismar & Yagihashi, 1987; Kamijo, Yagihashi & Baba 1990; Marques et al., 1997). Contudo, no caso específico dos camundongos da linhagem NOD, há escassos dados na literatura no que diz respeito ao possível desenvolvimento de neuropatias subsequentes à instalação da doença nesses animais. Sendo assim, e associado o fato do estabelecimento de uma colônia de animais NOD no Centro de Bioterismo da Unicamp, acreditamos ser importante a análise morfológica e morfométrica de nervos periféricos desses animais, com o objetivo de melhor conhecer esta linhagem como modelo experimental.

Este trabalho baseou-se em observações realizadas à microscopia de luz convencional, empregando-se os nervos tibial, fibular e sural de animais não diabéticos e diabéticos. A título de comparação e controle foi realizada a mesma análise em camundongos da linhagem A/J. Esta análise baseou-se na observação da morfologia geral dos nervos, corados com azul de toluidina, e na obtenção de dados morfométricos do nervo sural, pela mensuração do diâmetro das fibras e dos axônios, espessura da bainha de mielina e cômputo da razão "g".

Os animais selecionados para este estudo foram aqueles cujo desenvolvimento da doença ocorreu entre a 17 e 19 semanas de vida e animais não diabéticos de mesma idade.

Interessantemente, observamos que os animais da colônia brasileira desenvolveram a doença mais rapidamente que os animais da colônia francesa de origem, havendo uma diferença de aproximadamente seis a sete semanas, confirmando assim dados previamente obtidos por outros autores (Makino, 1980; Kikutani & Makino, 1992; Pavin & Zollner, 1994). Tal fato pode ser explicado pelas diferenças ambientais e climáticas entre os dois países, não interferindo porém no desenvolvimento subsequente da doença, conforme apontado também por Pavin & Zollner (1994).

Entre os animais selecionados para este trabalho a avaliação do peso corporal mostrou uma clara redução nos animais diabéticos em relação aos não diabéticos, evidenciando assim o desenvolvimento da doença. Mais importante ainda, estes dados foram coerentes com os observados para os valores de glicose sangüínea. A glicemia aumentou significativamente entre o final da primeira e da segunda semanas nos animais diabéticos. Além disso, em todos os animais diabéticos o aumento da glicemia refletiu-se nos valores de glicosúria observados ao final da segunda semana. Por sua vez, os animais NOD não diabéticos, assim como os animais da linhagem A/J, não exibiram variações estatisticamente significativas da glicemia, entre o final da primeira e da segunda semana antes do sacrifício.

Assim, os parâmetros clínicos avaliados no decurso de tempo antes do sacrifício, em todos os animais empregados neste trabalho, forneceram evidências claras da ocorrência da doença nos grupos por nós considerados como diabéticos e concordam com dados da literatura (Kamijo, Yagihashi & Baba,1990; Pavin & Zollner,1994)

Com relação aos dados histológicos qualitativos, pode-se observar que as fibras mielínicas se encontravam bem delineadas, quer nos animais normais quer nos animais diabéticos. Não pudemos constatar evidências de alterações patológicas decorrentes, por exemplo, de processos desmielinizantes nos animais diabéticos. Nos

axônios mielínicos não encontramos alterações estruturais que evidenciassem alguma patologia axonal.

Também o número de fibras mielínicas não apresentou diferenças significativas entre os grupos de animais diabéticos e não diabéticos.

Numerosos estudos histopatológicos, realizados em pacientes humanos diabéticos têm demonstrado a ocorrência de lesões em nervos periféricos, tais como a marcada perda de fibras associadas com alterações microangiopáticas endoneurais (Sima & Greene, 1990, 1991; Giannini & Dyck, 1994; Malik, 1997). Por outro lado, ainda é um tema de estudo se nos modelos experimentais de diabetes as alterações estruturais são similares aos observados em humanos (Yagihashi, 1997).

De fato, diversos autores têm mostrado, por exemplo, que a detecção de tais alterações depende da metodologia empregada, tempo de vigência da doença e da região anatômica do nervo analisado (Sharma & Thomas, 1987; Yagihashi, 1997). Assim, alterações similares ao observado em humanos, são detectáveis nos modelos experimentais estudados após períodos longos de diabetes, tais como 12 meses (Zemp, Bestetti & Rossi, 1981; Mattingly & Fisher, 1985, Sima, Yagihashi & Greene, 1990). Além disso, tem sido descrito que as alterações morfológicas parecem se desenvolver no sentido

distal-proximal, sendo que diversos autores não foram capazes de detectar redução do número de fibras mielínicas nas porções proximais dos nervos tibial, fibular e sural em ratos tornados diabéticos pela streptozotocina (Jakobsen, 1976; Brown et al., 1980; Sharma & Thomas, 1987, Yagihashi et al., 1992).

Nossos resultados corroboram tais dados da literatura, especialmente aqueles reportados por Kamijo, Yagihashi & Baba (1990). Realmente, em nosso trabalho os animais estudados se encontravam diabéticos por um período não superior a três semanas (vide material e métodos). Portanto, durante um espaço de tempo onde possíveis alterações morfológicas nas fibras mielínicas, estruturas conjutivas e vasculares do nervo não puderam ser detectadas. Por outro lado, devemos considerar que neste estudo foi empregada exclusivamente a técnica de exame de cortes semi-finos à microscopia de luz. Certamente, a análise dos espécimes ao nível de microscopia eletrônica poderia confirmar nossos resultados ou evidenciar alterações ultraestruturais importantes. Além disso, outra abordagem que poderia trazer informações adicionais neste sentido seria o estudo de fibras isoladas, através da técnica das "teased fibers", que permitiria uma avaliação das regiões nodais e internodais das fibras mielínicas. Contudo, a eventual ausência de alterações morfológicas detectáveis não necessariamente significa ausência de

alterações funcionais . Neste sentido, os resultados de Kamiijo, Yagihashi & Baba (1990) mostraram haver uma redução da velocidade de condução do impulso nervoso no nervo tibial proporcional ao tempo de diabetes, estudado entre 1 a 16 semanas. Além disso, recentemente Marques et al. (1997) mostraram que em camundongos NOD há uma importante alteração da distribuição de receptores de acetilcolina na junção neuromuscular de animais diabéticos, não obstante a ausência de alterações estruturais no nervo correspondente, observado através de microscopia confocal.

Por sua vez, o curto espaço de tempo de vigência do diabetes associado ao fato da contagem do número de fibras mielínicas ter sido feita em níveis relativamente proximais dos nervos estudados, pode explicar a observação de não terem sido detectadas diferenças significativas entre os animais diabéticos e não diabéticos neste trabalho.

Por outro lado, dentro de nosso estudo podemos considerar particularmente importantes os dados obtidos na avaliação morfométrica das fibras mielínicas no nervo sural.

Primeiramente, destacamos que, não obstante o tempo relativamente curto de duração da doença, os animais diabéticos da linhagem NOD, machos e fêmeas, apresentaram uma significativa redução do diâmetro dos axônios mielínicos no nervo sural.

Dentre as alterações morfométricas descritas por diversos autores, a redução do calibre dos axônios mielínicos em animais diabéticos é uma das características mais comuns (Sharma & Thomas, 1987; Sasaki et al. 1990, Yagihashi, 1990 a,b). Este fenômeno tem sido atribuído a uma redução na síntese de neurofilamentos e microtúbulos, já que a quantidade destes parece regular as dimensões dos axônio (Medori et al., 1985, 1988a,b; Yagihashi et al., 1990 a,b; Yagihashi, 1993).

Na neuropatia diabética o componente sensitivo é geralmente o mais afetado (Thomas & Tomlinson, 1993). Sidenius e Jakobsen (1980, 1981) observaram uma redução do volume de neurônios sensitivos e do transporte axonal em animais diabéticos após quatro semanas da indução da doença. Medori et al. (1985, 1988a,b) mostraram haver uma redução no transporte axonal lento em nervos de animais diabéticos da linhagem BB e em animais cujo a doença foi induzida por streptozotocina.

Outro aspecto interessante do envolvimento do componente sensitivo na neuropatia diabética são os recentes achados mostrando a importância do Fator de Crescimento do Nervo (NGF) no contexto da doença, bem como de outros fatores neurotróficos (McMahon & Priestley, 1995; Tomlinson et al. 1995; Tomlinson, Fernyhough & Diemel, 1997). Sabe-se que o NGF tem particular efeito neurotrófico

sobre neurônios sensitivos e que o mesmo é sintetizado pelas células que recebem a inervação destas fibras (Fernyhough, Carrington & Tomlison, 1992). É plausível supor que, no caso do nervo sural dos animais diabéticos por nós analisados, já nas primeiras semanas da doença esteja ocorrendo uma redução do aporte deste fator neurotrófico ao corpo celular dos neurônios, devido à diminuição do transporte axonal e de sua disponibilidade no órgão alvo (Korsching & Thoenen, 1983; Hellweg & Hartung, 1990). Este fato poderia ser responsável pela alteração do metabolismo dos neurônios sensitivos, com redução da síntese de elementos do citoesqueleto e a consequente redução do diâmetro axonal.

Outra possível explicação para a redução do diâmetro axonal nos animais diabéticos poderia ser atribuída as alterações do metabolismo da glicose (Kador & Konoshita, 1985; Sima et al. 1986; Greene, Lattimer & Sima, 1987). Além dos distúrbios metabólicos decorrentes do acúmulo da mesma no interior dos axônios, este fato poderia determinar um desequilíbrio osmótico que provocaria redução do volume axonal (Greene & Lattimer, 1984; Sima et al. 1986; Greene, Lattimer & Sima, 1987).

Por outro lado, a análise morfométrica também mostrou que a espessura da bainha de mielina não sofreu alteração no decurso da doença. O envolvimento das células de Schwann no desenvolvimento

da neuropatia diabética tem sido amplamente estudado (Dick, Thomas, Asbury, Winegard & Porte, 1987; Ward & Goto, 1990). Alterações no metabolismo destas células poderiam levar ao desencadeamento do processo de desmielinização (Yagihashi, 1997). A ausência de desmielinização e de alterações na espessura da bainha de mielina permite-nos inferir que as eventuais alterações metabólicas que poderiam estar ocorrendo nas células de Schwann dos nervos surais analisados não chegaram a interferir nas características morfológicas da bainha de mielina.

Nossos resultados mostraram também que o diâmetro das fibras mielínicas também sofre uma redução, acompanhando o que foi observado para o axônios. Assim, considerando-se o fato da bainha de mielina não ter sofrido alterações, os valores computados para a razão "g" são consistentes, ou seja, o valor das médias da razão "g" tenderam a ser menores nos animais diabéticos, o que sugere a presença de um maior número de fibras extramielinizadas. Este fato pode ser comprovado se considerarmos que em geral houve um aumento do percentual de axônios mielínicos de menor diâmetro nos animais diabéticos e um concomitante aumento do contingente de axônios pequenos extramielinizados (fig.19).

Assim o conjunto dos nossos resultados mostraram que o estado diabético dos animais NOD, com a duração de pelo menos

duas a três semanas sem tratamento, é capaz de produzir alterações morfométricas em nervos sensitivos.

Comparativamente aos resultados apresentados por Kamijo, Yagihashi & Baba (1990), nossos dados se revestem de particular importância, já que estes autores observaram fenômeno semelhante, contudo, após longos tempos de diabetes e sob tratamento insulínico. Isto nos permite inferir que os camundongos NOD podem vir a ser um bom modelo de estudo dos efeitos da hiperglicemia diabética a curto prazo sobre o componente nervoso sensitivo.

## **6. CONCLUSÕES**

Nossos resultados permitem-nos concluir que:

1. Os camundongos da linhagem NOD/Uni desenvolvem um estado diabético semelhante à colônia francesa de origem.
2. Após um estado diabético de curta duração não ocorreram alterações morfológicas, observáveis ao nível de microscopia de luz, compatíveis com processos degenerativos axonais ou desmielinizantes, nos nervos tibial, fibular e sural dos camundongos NOD/Uni.
3. Após um estado diabético de curta duração os axônios mielínicos do nervo sural de camundongos NOD/Uni, machos e fêmeas, apresentaram uma redução do seu diâmetro, provavelmente em função de alterações metabólicas dos neurônios sensitivos.
4. A redução do diâmetro axonal foi acompanhado pela redução do diâmetro da fibra nervosa, porém sem alteração da espessura da bainha de mielina.
5. A linhagem de camundongos NOD/Uni pode ser empregada como modelo experimental para o estudo dos efeitos da hiperglicemia diabética a curto prazo sobre o componente nervoso sensitivo.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGUAYO, A.J., AHIWELL, M., TRECARTEN, J., PERKINS, S., BRAY, G.M.** Abnormal myelinization in transplanted Trembler mouse Schwann cells. **Nature (LONDON)**, 265:73-83, 1977.
- ASBURY, AK., and JHONSON. P.C.,** Diabetic Neuropathy. In: Asbury, K., and Jhonson, P.C., eds.: **Pathology of Peripheral Nerve**. Philadelphia, W.B Saunders Company, 1978.
- ASBURY, K.S.,** Focal and multifocal neuropathies of diabetes. In: **DYCK, P.J., THOMAS, P.K., ASBURY, AK, WINEGRAD, AL., PORTE, Jr. D., eds.: Diabetic Neuropathy**. Philadelphia and London: WB Saunders, 45-49, 1987.
- BATHGATE, R.H.,** A model of nerve regeneration in Diabetic Neuropathy. **Med. Hypotheses**, 41:63-77, 1993.
- BRAY, D.** Growth cones: Are they pull or are they pushed. **Trends Neurosci.**, 10:431-438, 1987.
- BROWN, M.J., SUMMER, AJ., GREENE, D.A, DIAMOND, S.M., & ASBURY, AK.:**Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus, **Ann. Neurol.**, 8:168-173, 1980.
- CARPENTER, M.B.** Human Neuroanatomy, **Rev. Interamericana**, 7<sup>a</sup> ed. 700p, 1988.
- CONSTANTINI, S., SCHILLER, Y., COHEN, A.M., RAHAMIMOFF, R.** Pathophysiology of the neuromuscular junction in diabetic rats. **Israel of J. Med Sciences**, 23:101-106 1987.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L.,** The endocrine pancreas: **Pathologic Basic of Disease**, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders Co., 992p, 1992.
- COTTER. M., CAMERON, N.E, LEAN, D.R. & ROBERTSON. S.** Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscle. **Quart. J. Exp. Physiol**, 74:65-74, 1989.
- DYCK, P.J. THOMAS, P.K. ASBURY, A.K., WINEGRAD, A.L. PORTE, Jr. D., eds.:**Diabetic Neuropathy. Philadelphia and London: WB Saunders, 1987.

- DYCK, P.J., KARNES, J., O BRIEN, P., OKAZAKI, H., LAIS, A, & ENGELSTAD, J.:** The spatial distribution of fiber loss in diabetic polyneuropathy suggests ischemia. **Ann. Neurol.**, **19**:440-445, 1986.
- DYCK, P.J.,** Pathology. In: Dyck P.J., Thomas P.K., Asbury AK., Winegrad Al., Porte Jr. D., eds: **Diabetic Neuropathy** Philadelphia and London WB Saunders, 223-235, 1987.
- FAGERBERG, S.E.,** Diabetic neuropathy, a clinical and histologic study on the significance of the vascular effections. **Acta. Med Scand.** **164(345)**:1, 1959.
- FECZKO, J.D. & KLUEBER, K.M.** The cytoarchitecture of muscle in a genetic model of murine diabetes. **Am. J. Anat.**, **182**:224-240, 1988.
- FERNYHOUGH, P., CARRIGTON, A.L., TOMLINSON, D.R.** Reduced nerve growth factor mRNA in skin od diabetic rats: effects of insulin. **Br. J. Pharmacol.**, 107-462, 1992.
- GABBAY, K.H.:** The sorbitol pathway and complication of diabetes. **N. Engl. J. Med.**, **288**:831-836, 1973.
- GIANNINI, C., DYCK, P.J.:** Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneurial microvessels in diabetes mellitus. **Ann Neurol**, **36**:408-415, 1994.
- GREENE, D.A, de JESUS , P.V, Jr, WINEGRAD AL,:** Effects of insulin and dietary myo-inositol impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. **J Clin Invest** **55**:1326-1336, 1975.
- GREENE, D.A, LATTIMER, S.A, SIMA:** Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium - ATPase in the pathogenesis of diabetes complications. **N. Engl. J. Med**, **16**:599-606, 1987.
- GREENE, D.A, LATTIMER, S.A:** Action of sorbitol in diabetic peripheral nerve relationship of polioli (sorbitol) pathway inhibition to a myoinositol-mediated defect insodium-potassium ATPase activy. **Diabetes**, **33**:712-16, 1984.

- GREENE, D.A, LATTIMER, S.A:** Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozotocin diabetes and its correction by dietary myo-inositol supplementation. *J Clin Invest* **72**:1058-1063, 1983.
- GUPTA, S.K. PRINGLE, J., PODULSO, J.F., MEZEI, C.** Induction of myelin during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. *J. Neurosci. Res.*, **34**:14-23, 1993.
- HELLEWIG, R. HARTUNG, H.D.** Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: A possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J. Neurosci Res*, **26**:258-267, 1990.
- JACKOBSEN, J.** Axonal dwindling in early experimental diabetes. I. A study of cross sectioned nerves. *Rev. Diabetologia*, **12**:539-546, 1976.
- JUNQUEIRA, L.C.U., MONTES, G.S.:KRISTZAN, R.M.** The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell tissue Res.*, **202**:453-60, 1979.
- KADOR, P.F., KINOSHITA, J.H.:** Role of aldose reductase in the development of diabetes-associated complications. *Ann J. MED.* **79** (Suppl. 5 A), 8-12, 1985.
- KAMIJO, M. YAGIHASHI, S., BABA, M.** Peripheral neuropathy in Nod mice. In: Ward, J. and GOTO, Y., eds: **Diabetic neuropathy**. New York, John Willey & Sons, 111-115, 1990.
- KIKUTAMI, H. and MAKINO, S.** The murine autoimmune diabetes model: Nod and related strains. *Adv. Immunol* , **51**:285-322, 1992.
- KLUEBER, K.M., & FECZKO, J.D.** Ultrastructural, histochemical, and morphometric analysis of skeletal muscle in a murine model of type I diabetes. *Anat. Rec.*, **239**:18-34, 1994.

- KLUEBER, K.M., J. D. FECZKO, G. SCHIMIDT, & WATKINS, J.B.,** III SKELETAL muscle in the diabetic mouse: Histochemical and morfometric analysis. **Anat. Rec.** **225**:41-45, 1989.
- KORSCHING, S., THOENEN, H.** Quantitative demonstration of retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. **Neurosci. lett**, **39**:1-4, 1983.
- LANDON, D.N. & HALL, S.** The myelinated nerve fiber. IN: **The peripheral nerve.** **LANDON, D.N., ed.** London. Chapman and Hall, p1-105, 1976.
- LE DOUARIN, N.M.** The neural crest. Cambridge, Cambridge University Press., 1982.
- LEMKE, G & CHAO, M.** Axons regulate cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. **Development**, **102**:499-504, 1988.
- MAKINO, S.K. KUNIMOTO, Y. MURAOKA. Y. MIZUSHIMA, K. KATAGIRI, Y. TOCHINO:** Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. **Exp. Anim.** **29**: 1-13, 1980.
- MALIK, R.A.** The Pathology of Human Diabetic Neuropathy. **Diabetes**, **46(2)**: S50-S53, 1997.
- MARQUES, M.J., H. SANTO NETO, E.J. PAVIN, C.A VILELLA and F. LANGONE.:** Acetylcholine receptor distribution and postsynaptic membrane topography at the neuromuscular junction of diabetic animals. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **23**:769.15, 1997.
- MARTIN, J.R & WEBSTER, H. de F.** Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure and axon relationships. **Dev. Biol.**, **32**: 417-31, 1973.
- MATTINGLY, G.E., FISHER, V.W.** Peripheral nerve axonal dwindling with concomitant myelin sheath hypertrophy in experimentally induced diabetes, **Acta Neuropathologia**, **68 (2)**:149-54, 1985.

- MCMALON, S.B. & PRIESTLEY, J.V.** Peripheral neuropathies and neurotrophic factors: animal models and clinical perspectives. *Curr Op. Neurobiol.*, 5:616-624, 1995.
- MEDORI, R., AUTILIO-GAMBETTI, L. JENICH, H., GAMBETTI, P.** Changes in axon size and slow axonal transport are related in experimental. *Neurology*, 38(4):597-601, 1988a.
- MEDORI, R., AUTILIO-GAMBETTI, L., MONACO, S., & GAMBETTI, P.:** Experimental diabetic neuropathy: Impairment of slow transport with changes in axon cross-sectional area. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:7716-7720, 1985.
- 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.* 8(5):1814-1821, 1988b.
- MONACO, S. GEHRMANN, J., RAIVICH, G., KREUTZBERG, G.W.,** MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. *J. Neurocytol.*, 21:623-634, 1992.
- MONTES, G.S., COTTA-PEREIRA, G., & JUNQUEIRA, L.C.U.** The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. *Adv. Cell Neurobiol.*, 5:177-218, 1984.
- OLDFORS, A. & JOHANSSON, B.R.** Barriers and transport properties of the perineurium. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 47:139-143, 1979.
- OLEFSKY, J.M.,** Diabetes Mellitus. In: Wyngaarden J.B., Smith L.H. Jr., Benneth J.C., eds: Cecil Text Book of Medicine, 19 th ed. Philadelphia, WB Saunders Co., 1291-1310, 1992.
- PAVIN, E.J. & ZOLLNER, R.L.,** Implantação da linhagem NOD-MICE (camundongos diabéticos não obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras autoimunes. *Arq. Bras. Endo. Metabol*, 38 (2): 105-108, 1994.

- PAVIN, E.J., VOLPINI, W., VILLELA, C., PEDROSO, M., & ZOLLNER, R.L.**, implantação e caracterização da colônia de camundongos NOD (non-obese diabetic) no Brasil. Resumos da X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE 14.35 (abstract), 1995.
- PETERS, A, PALAY, S.L: WEBSTER, H. de F.** The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. ed. Philadelphia, Saunders, 406-409, 1976.
- SASAKI, H. NAKA, K., YAMADA, M., SATOGAMI, E., SANKE, T., KONDO, M., NANJO, K., MIYAMURA, K. & MUKOYAMA, M.**, Morphometric changes in peripheral nerve in streptozotocin-diabetic rats. In: Ward, J. and GOTO, Y., eds. **Diabetic Neuropathy**, New York, John Willey & Sons, 99-103, 1990.
- SHARMA, AK., BAJADA, S., & THOMAS, P.K.**: Influence of streptozotocin-induced diabetes on myelinated nerve fibre maturation and on body growth in the rat. **Acta Neuro-pathol.**, 53:257, 1981.
- SIDENIUS, P., and JAKOBSEN, J.** Reduced perikaryal volume of lower motor and primary sensory neurons in early experimental diabetes. **Diabetes** , 29:182-189, 1980
- SIDENIUS, P., and JAKOBSEN, J.** Retrograde axonal transport a possible role in the development of neuropathy. **Diabetologia**, 20:110-117, 1981.
- SIMA, A A F., LATTIMER, S.A, YAGIHOSHI, S., GREENE, D.A.** Axoglial dysjunction: A novel structural lesion responsible for poorly-reversible nerve conduction slowing in the spontaneously diabetic Bio-Breeding rat. **J. Clin Invest**, 77: 474-84, 1986.
- SIMA, A.A.F, NATHANIEL, V., PRASHAR, A., BRIL, V., GREENE, D. A.** Endoneurial microvessels im human diabetic neuropathy. Endothelial cell dysjuncton and lack of treatment effect by aldose reductase inhibitor. **Diabetes** 40:1090-1099, 1991.
- SIMA, A.A.F., GREENE, A.D.** Structural changes in diabetic neuropathy. In: BROWN LEE., M., et al. Eds. **Diabetes mellitus and its complications.** ed. Philadelphia: Hanley Belfus, 103-107, 1990.

- SIMA, A.A.F., LATTIMER, S.A., YAGIHOSHI, S., GREENE, D.A.** Axoglial dysjunction: A novel structural lesion responsible for poorly-reversible nerve conduction slowing in the spontaneously diabetic Bio-Breeding rat. *J. Clin Invest*, **77**:474-84, 1986.
- SIMA, A.A.F., YAGIHASHI, S. and GREENE, D.A.** Morphological features of Human and animal diabetic nerve. In: **WARD, J. & GOTO, Y.**, eds. *Diabetic Neuropathy*, New York, John Willey & Sons, 17-28, 1990.
- SIMA, AAF, T. BRISMAR, YAGIHASHI S.**, Neuropathies encountered in the spontaneously diabetic BB Wistar rat., 253-258, 1981.
- THOMAS, P.K. & TOMLINSON, D.R.**, Diabetic and hypoglycemic neuropathy. In: **DYCK, P.J., THOMAS, P.K., GRIFFIN, J.W., LOW, P.A & PODUSLO, J.F.**, eds *Peripheral neuropathy*, Philadelphia and London : WB Saunders, 1219, 1993.
- THOMAS, P.K., & SHARMA, AK.**, Animals models: Pathologic and Pathofisiologic. In: **Dyck, P.J., Thomas, P.K., Asbury, AK., Winegrad, AL., Porte Jr. D.**, eds.: *Diabetic Neuropathy*, Philadelphia and London: WB Saunders, 237, 1987.
- TOMLINSON, D.R. FERNYHOUGH, P. & DIEMEL, L.T.** Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes*, **46(2)**:543-549, 1997.
- TOMLINSON, D.R., FERNYHOUGH, P., DIEMEL, L.T. and BREWSTER, W.J.** Neurotrophic factors in experimental diabetic neuropathy. In: **HOTTA, N. GREENE, D.A., WARD, J.D., SIMA, A.A.F., BOULTON, A.J.M**, eds. *Diabetic neuropathy: new concepts and insights*. Amsterdam, Elsevier, 23-25, 1995.
- WARD, J. & GOTO, Y.**, eds. *Diabetic Neuropathy*. New York, John & Sons, 1990.
- WEBSTER, H. & FAVILLA, J.T.** Development of peripheral nerve fibre. In: *Peripheral neuropathy*. **Dyck, P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H., Bunge, R.P.** Philadelphia, Saunders. 329-359, 1984

- WOLTMAN, H.M, & WILDER., R.M.,** Diabetes mellitus, pathological changes in the spinal peripheral nerves. **Arch. Intern. Med.,** 44-576, 1929.
- YAGIHASHI, S.** Axonal cytoskeleton and diabetic neuropathy. **Diab. Med.,** 2:107-109, 1993.
- YAGIHASHI, S. KAMIJO, M. IDO, Y., & MIRRLEES, D.J.** Effects of long-term aldose reductase inhibition on development of experimental diabetic neuropathy. Ultrastructural and morphometric studies of sural nerve in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes,** 39(6):690-696, 1990.
- YAGIHASHI, S. KAMIJO, M., BABA, M., YAGIHASHI, S., & NAGAI, N.** Effect of aminoguanidine on functional and structural abnormalities in peripheral nerve of STZ-induced diabetic rats. **Diabetes,** 41:47-52, 1992.
- YAGIHASHI, S.** Nerve structural defects in diabetic neuropathy: do animals exhibit similar changes. **Neuros: Res. Commun.,** 21(1): 25-32, 1997.
- YAGIHASHI, S., KAMIJO, M. & WATANABE, K.** Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats. **Ann J. Pathol,** 136(6):1365-1373, 1990.
- YAGIHASHI, S., KANEIJO, M, IDA, Y., & MIRRLEES, D.J.:** Effects of lon-term aldose reductase inhibition on development of experimental diabetic neuropathy: Ultrastructural and Morfometric Studies Nerve in Stretozotocin-Induced Diabetic Rats. **Diabetes,** 690-696, 1990.
- ZEMP, C., BESTETTI, G., & ROSSI, G. L.:** morphological and morphometric study of peripheral nerves from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Acta Neuropathol.,** 53:99-106, 1981.

## ABSTRAT

The development of diabetes neuropathy has not been deeply investigated in animals in which diabetes mellitus is genetically determined, specially in the lineage of NOD mice. This lineage develops diabetes type 1 as a consequence of the autoimmune destruction of the islets of Langerhans. This work had the purpose of characterize morfologically the tibial, fibular and sural nerves of the NOD mice from the brazilian colony (NOD/UNI) intending their possible use as experimental sample for the studies of diabetes neuropathy. For this work 20 NOD animals, aged between 19 and 21 weeks, were used, and they were divided into groups of 5 females and 5 males, that have brought out positive glycosuria during the two sequential weeks (DM) and 5 females and 5 males, also aged between 19 and 21 weeks whose glycosuria was negative until the moment of the sacrifice (ND). The glicosuria was monitored each two days from the tenth week of life and diabetic state evaluated by the measure of glycemia level ( $\geq 300\text{mg/dl}$ ) immediately before the sacrifice.

Another group of 5 male mice from the lineage A/J, aged between 19 and 21 weeks, were taken for comparison. Afther the animals had been anaesthetized, the tibial, fibular and sural nerves were isolated for fixation *in situ* with solution of glutaraldehyde 2% and paraformaldehyde 1% at a buffer solution of sodium phosphate (ph 7,4). Section of each nerve were pos-fixed in a solution of OsO<sub>4</sub> (1%) and processed for inclusion in araldite resin. Using thin transversal cuts, the morphological analysis was done as well as the counting of the number of myelinated axons of the tibial, fibular and sural nerves, and the morphological characterization of the latter. A computerized morphometric system was used and it has been obtained the following parameter myelinated fibers of the sural nerves of diabetic animals (DM) and non-diabetic animals (ND): the diameter of the myelinated axons (AD); fiber diameter (FD); thickness of the myelin sheath (TMS) and the rate "g" (AD/FD). The obtained results bring out that there are no detectable morphological differences among the tibial, fibular and sural nerves of diabetic and non-diabetic animals under optical microscopy.

In the same way, the total number of myelinated axons found in the analysed nerves was same in the groups studied. On the other hand, the morphometric analysis of the sural nerve made evident a reduction on the diameter of myelinated axons in the diabetic animals males and females if in comparison to those of the non-diabetic animals ( $p > 0,05$ ). The diameter of the fibers also pointed out a reduction in diabetic animals. Nevertheless the thickness of the myelin sheath had been staisically similar in diabetic and non-diabetic animals. The rate "g" pointed out a greater number of myelinated fibers bringing out a extramyelinization, specially in the female diabetic animals. Those results showed that the diabetic condition in NOD animals, lasting from 2 to 3 weeks, is able to cause morphometric alterations in the sensitive nerves.

Therefore, the mice of NOD lineage can become a good studying model of the effects of diabets hyperglycemia on sensitive nervous component in a short lapse of time.