

1 **HISTOMORFOMETRIA DO MIOCÁRDIO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS**
2 **COM AZADIRACHTA INDICA, A. JUSS¹**

3
4 **(HISTOMORPHOMETRY OF THE MYOCARDIUM OF DIABETIC RATS**
5 **TREATED WITH AZADIRACHTA INDICA, A. JUSS.)**

6
7 **RESUMO**

8 Esse estudo avaliou a histomorfometria dos cardiomiócitos tratados com extrato
9 aquoso e hidroalcoólico de *Azadirachta indica* a 10% e da estreptozotocina 6CH
10 em ratos com *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina. Vinte ratos
11 Wistar albinos machos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, sendo
12 um grupo controle. Após indução do diabetes com estreptozotocina, os animais
13 foram tratados durante 30 dias da seguinte forma: grupo diabético, sem
14 tratamento; extrato aquoso de *Azadirachta indica* a 10%; extrato hidroalcoólico de
15 *Azadirachta indica* a 10% e um grupo tratado com estreptozotocina 6CH. No 31º
16 dia, os animais foram eutanasiados e o coração foi fixado em solução de Bouin e
17 as secções semisseriadas foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE)
18 e PAS/Hematoxilina. Observou-se eosinofilia no citoplasma dos cardiomiócitos
19 pela coloração com HE, o que demonstra a presença de glicogênio no citoplasma
20 dos cardiomiócitos em todos os grupos. Além disso, observou-se que os grupos
21 tratados apresentaram semelhantes áreas e diâmetros, entretanto esses parâmetros
22 diferiram do controle. A maioria dos parâmetros morfométricos nos
23 cardiomiócitos apresentou valores inferiores nos animais diabéticos e em todos
24 grupos tratados. O fitoterápico com *Azadirachta indica* e homeopático com
25 estreptozotocina 6CH utilizados no *Diabetes mellitus* induzido pela
26 estreptozotocina não promove modificações morfométricas notáveis nos
27 cardiomiócitos no período de até 30 dias de tratamento.

28 Palavras-chave: coração, *Diabetes mellitus*, estreptozotocina 6CH, fator forma,
29 nim, Wistar.

30

ABSTRACT

31

This study evaluates the histomorphometry of cardiomyocytes treated with aqueous and hydro-alcoholic extracts of 10% *Azadirachta indica* and 6CH streptozotocin in rats with streptozotocin-induced *Diabetes mellitus*. A total of 20 male albino Wistar rats were divided into five groups. After inducing diabetes by streptozotocin injection, 16 animals were treated for 30 days as follows: 1) diabetic-induced group was not treated; 2) group with 10% *Azadirachta indica* aqueous extract; 3) group with 10% *Azadirachta indica* hydro-alcoholic extract; and, 4) group with 6CH streptozotocin. On day 31st, the animals were killed and the heart was fixed in Bouin's solution and histological sections were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and PAS/Hematoxylin. HE staining showed eosinophilia in the cytoplasm of cardiomyocytes, demonstrating the presence of glycogen in the cytoplasm of cardiomyocytes. Furthermore, it was observed that all treatment groups showed areas and diameters similar, however these parameters differ from the control. Cytoplasmic and nuclear morphometry showed that the control group had the highest values for almost all parameters measured in cardiomyocytes compared to other groups. The most of morphometric parameters in cardiomyocytes showed lower values in diabetic animals and in all treated groups. *Azadirachta indica* and streptozotocin 6CH used in *Diabetes mellitus* induced by streptozotocin not submitted morphological changes in cardiomyocytes.

51

Keywords: *Diabetes mellitus*, streptozotocin 6CH, heart, form factor, neem, Wistar

53

54

INTRODUÇÃO

55

A *Azadirachta indica* pertence à família Meliaceae (VILELA, 2008). Pesquisas recentes estão crescendo no Brasil e no mundo (BRASIL, 2013). Na literatura, têm sido descritas atividades antissépticas, curativas, anti-úlceras, antiinflamatória, antifertilidade, hipolipidêmica e hepatoprotetora (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005). A *Diabetes mellitus* (DM) está associada à cardiomiopatia, caracterizada por alterações no metabolismo e desempenho cardíaco. Em ratos Wistar

60

61 diabéticos aloxânicos, após emprego da reação histoquímica pelo Ácido Periódico
62 de Schiff (PAS), evidenciamos acúmulo acentuado de glicogênio nos
63 cardiomiócitos (GOMES, *et al.*, 2008). A alteração predominante que ocorre no
64 metabolismo cardíaco no DM é a supressão da utilização de glicose e o uso
65 excessivo de ácidos graxos associados ao estoque intracelular de lipídios, segundo
66 Ding e Rodrigues (2006). A maior intensidade da reação de PAS no miocárdio de
67 ratos diabéticos pode ser decorrente do glicogênio poupado nessa musculatura.
68 Segundo Jacob *et al.* (1999), o excesso de glicogênio pode ser maléfico para o
69 órgão ocasionando a doença de Pompe. Entretanto, Satyanarayana *et al.* (2015)
70 relataram que o nim promove a expressão de moléculas sinalizadoras da insulina e
71 no transportador de glicose citosólica (GLUT4) o que aumenta a oxidação do
72 músculo esquelético favorecendo a utilização de glicose. Silva *et al* (2013)
73 verificaram que o treinamento físico aeróbico, por oito semanas, reduziu a área
74 citoplasmática, as alterações mitocondriais e o conteúdo de colágeno em miócitos
75 ventriculares dos animais diabéticos. Apesar das suas atividades terapêuticas
76 terem sido comprovadas com trabalhos científicos, não foram encontrados dados
77 na literatura que relatam sua ação benéfica em relação ao *Diabetes Mellitus*.
78 Acreditamos também que as análises histomorfométricas dos cardiomiócitos
79 trarão contribuições científicas para estabelecer padrões morfométricos que
80 possam ser comparáveis às possíveis alterações que o *Diabetes mellitus* venha
81 causar nesta célula além do efeito benéfico da terapia com extratos de *Azadirachta*
82 *indica* A. Juss. e estrepto-zootocina (6CH) sobre esta enfermidade. Dessa forma,
83 avaliamos a histomorfometria das fibras musculares com a utilização de
84 tratamentos embasados na *Azadirachta indica*, A. Juss e estrepto-zootocina (6CH),
85 em ratos com *Diabetes mellitus*.

MATERIAL E MÉTODOS

86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com protocolo nº 025471-05. Foram preparados dois extratos de *Azadirachta indica* A. Juss., um aquoso e outro etanólico, com as folhas do “nim” cultivadas e fornecidas pela EMBRAPA-CNPAP (Goiânia, Go), que previamente passaram por processo de estabilização à sombra, em ambiente coberto e ventilado. Após secagem e posterior trituração das folhas, preparou-se extrato etanólico a 70% (p/p) por percolação, até esgotamento do ativo, numa velocidade de 8 gotas por minuto, e em seguida, esse foi concentrado até a obtenção de um extrato de consistência pastosa. O outro foi um extrato aquoso, utilizando a água destilada para realizar a percolação até esgotamento do ativo, nas mesmas condições anteriores, e posteriormente, o extrato aquoso foi liofilizado. A relação da droga/insumo inerte foi 1:10 (p/v) (10%). As ultra-alta diluições foram preparadas em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6CH) usando estreptozotocina (Sigma, SP) como ponto de partida e soluções de etanol de diferentes concentrações (30% ou 70%) como veículo. As diluições por um fator de 100 foram realizadas mecanicamente³. Foram utilizados 20 ratos albinos, machos, da raça Wistar com peso entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP. Estes foram divididos em cinco grupos de quatro animais cada, adaptados em caixas no biotério, com temperatura controlada e ciclo de claro-escuro de 12 horas, e alimentados com ração e água *ad libitum*, durante cinco dias. Após o período de adaptação, todos os animais foram passados por jejum de 14 a 16 horas. Em seguida foram anestesiados com éter, e, amostras de sangue de 1,0mL foram coletadas da artéria infraorbitária para determinar a glicemia - tempo zero (KING e GARNER, 1947). Em seguida, foi

111 administrada a 16 ratos, 35mg/kg de estreptozotocina diluída em tampão citrato
112 de sódio (pH 4,5), intravenosamente, no seio venoso do pênis, com os animais
113 ainda anestesiados para indução do *Diabetes mellitus*. Os outros quatro ratos
114 serviram como controle. Após cinco dias, coletou-se sangue, como anteriormente,
115 para determinar a glicemia. Os animais que apresentaram hiperglicemia foram
116 divididos em cinco grupos, com quatro ratos cada, que receberam tratamento oral
117 uma vez por dia, com os diferentes extratos de *Azadirachta indica*, A. Juss. e com
118 estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizados
119 (estreptozotocina 6CH).

120 Todos os animais foram tratados diariamente, por via oral (0,2mL/100g de
121 animal), através de gavagem da seguinte forma: grupo controle, sem tratamento,
122 só recebeu água; controle diabético, sem tratamento, só recebeu água; grupo
123 tratado com água associado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss. a
124 10%; grupo tratado com água associado com extrato hidroalcoólico (70%) de
125 *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% e tratamento com água associado com
126 estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizado
127 (estreptozotocina 6CH).

128 No 31º dia, os animais foram eutanasiados e o coração inteiro foi removido da
129 cavidade torácica e fixado em solução de Bouin durante 24 horas. Em seguida, o
130 material foi desidratado em série crescente de álcool. As amostras foram
131 recortadas, diafanizadas em benzol e inclusas em parafina. Após a microtomia
132 semisseriada, a intervalos de 200µm, os cortes histológicos à espessura de 5µm
133 foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e PAS/Hematoxilina
134 (TOLOSA *et al.*, 2003) e fotomicrografados utilizando fotomicroscópio (LEICA
135 DM 5000 B). Para cada animal foi confeccionada uma lâmina com cinco cortes

136 histológicos, somando-se assim, 20 cortes histológicos para cada grupo
137 experimental. As análises citoplasmáticas e cariométricas foram realizadas nas
138 fibras musculares estriadas cardíacas transversais, medindo-se a área (μm^2),
139 perímetro (μm), diâmetro máximo (μm), diâmetro mínimo (μm) e o fator de
140 forma (FF). O FF, bem como outros parâmetros foram analisados em panorâmica
141 no programa Image Pro-Plus 4.0, *Media Cybernetics Brazil*, SP. O menor valor
142 deste fator é igual a 1, significando que a forma do citoplasma e/ou do núcleo se
143 assemelha à forma de um círculo. Quando este fator for maior que a unidade,
144 entende-se que a forma do citoplasma e/ou do núcleo não é circular.

145 O experimento foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado
146 com cinco tratamentos e quatro repetições e a análise de variância foi avaliada
147 mediante procedimentos GLM do programa computacional Statistical Analysis
148 Systems (SAS, 1999). As médias foram obtidas por meio do teste de Tukey a 5%
149 de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 2000).

150

151

RESULTADOS E DISCUSSÃO

152

HISTOLOGIA DO CORAÇÃO

153

154

155

156

157

158

159

160

As características histológicas do coração de ratos machos adultos Wistar estão
ilustradas nas figuras de 1 a 7. Os cortes histológicos desse órgão, em todos os
grupos experimentais, apresentaram células musculares cardíacas com um ou dois
núcleos centralmente localizados e com pequena quantidade de glicogênio. Além
dos cardiomiócitos, verificamos a presença das fibras de Purkinje, as quais foram
perceptivelmente maiores comparadas aos cardiomiócitos e revelaram quantidade
significativa de glicogênio em um ou dois núcleos centralizados, à semelhança de
Jacob *et al.* (1999) e Gomes *et al.* (2008)

161 O músculo estriado cardíaco contém numerosas mitocôndrias que ocupam,
162 aproximadamente, 40% do volume citoplasmático, refletindo intenso metabolismo
163 aeróbio desse tecido. Por outro lado, em outro trabalho, utilizando Microscopia
164 Eletrônica de Transmissão (GOMES *et al.*, 2008), os autores verificaram nos
165 cardiomiócitos de ratos Wistar diabéticos aloxânicos, modificações nas
166 mitocôndrias do grupo diabético, que foram aparentemente maiores e com
167 numerosas cristas, quando comparadas ao controle sem nenhum tipo de
168 tratamento. Essas alterações mitocondriais são devidas ao estresse oxidativo que o
169 *Diabetes mellitus* ocasiona (SHEN *et al.*, 2004). Desta forma, é plausível aventar
170 a hipótese de que os ratos diabéticos não apresentaram alterações dessas organelas
171 durante o período experimental havendo, portanto, necessidade de estudos
172 duradouros e ulteriores, em casos desta enfermidade. Esses mesmos autores
173 afirmaram que, em caso de hipoinsulinemia, ocorre deposição de glicogênio no
174 miocárdio para poupar sua reserva em necessidades momentâneas (SHEN *et al.*,
175 2004). Portanto, a maior intensidade da reação de PAS no miocárdio de ratos
176 diabéticos pode ser decorrente ao glicogênio preservado nessa musculatura. Esse
177 acúmulo pode ser maléfico para o órgão (JACOB *et al.*, 1999) pois a presença do
178 glicogênio pode causar a enfermidade de Pompe. A cardiomegalia, hipotonia
179 muscular (acúmulo de glicogênio na musculatura e no sistema nervoso) e
180 insuficiência cardíaca são sintomas possíveis desse acúmulo.

181 Com alusão ao glicogênio cardíaco, os cardiomiócitos (observado em todas as
182 figuras) dos animais apresentaram afinidade tintorial ao método histoquímico do
183 PAS/Hematoxilina, observada pela coloração magenta do glicogênio, comum em
184 polissacarídeos, enquanto os núcleos celulares foram contracorados de azul pela
185 hematoxilina. Como o glicogênio é reserva energética citoplasmática de

186 disponibilidade imediata, quando há anormalidade no seu metabolismo ou no da
187 glicose, são observados depósitos glicogênicos em excesso na forma de vacúolos
188 claros no citoplasma, conferindo tom rosa-violeta a este metabólito na
189 musculatura estriada cardíaca (KUMAR *et al.*, 2010).

190 Os tratamentos com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10%, extrato
191 hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10%, e estreptozotocina
192 6CH foram semelhantes à coloração rosa-violeta evidenciada nos cardiomiócitos
193 do grupo diabético, entretanto, mostraram coloração mais intensa que aos
194 cardiomiócitos do grupo controle, corroborando com as afirmações de Jacob *et al.*
195 (1999) e Gomes *et al.* (2008) e contrariando as afirmações de Satyanarayana *et al.*
196 (2015).

197

198 **MORFOMETRIA**

199 Os parâmetros de diâmetro máximo (μm) e área (μm^2) indicada na Tabela 1
200 revelaram que houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos controle; diabético;
201 extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10%; extrato hidroalcoólico
202 (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% e estreptozotocina, 6CH). O
203 perímetro (μm), por sua vez, não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os
204 tratamentos.

205 Em relação à área, observamos diferença significativa na comparação entre o
206 grupo controle e estreptozotocina (6CH) ($p < 0,05$). Os demais grupos
207 experimentais não diferiram entre si, ($p > 0,05$). No caso do diâmetro máximo foi
208 observada diferença ($p < 0,05$), na comparação entre o grupo controle e o tratado
209 com extrato aquoso (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% e grupo
210 estreptozotocina (6CH). Os demais grupos experimentais tratados não diferiram

211 entre si, ($p>0,05$). Com referência ao perímetro, diâmetro mínimo e ao fator
212 forma, não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos controles e os demais grupos
213 experimentais.

214 O grupo controle apresentou os maiores valores médios na maioria dos
215 parâmetros analisados no citoplasma, comparado aos demais grupos
216 experimentais, excetuando-se o FF cujo maior valor médio foi encontrado no
217 grupo tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss. a
218 10%.

219 Os resultados indicados na Tabela 2, referentes aos parâmetros mensurados no
220 núcleo dos cardiomiócitos de ratos machos albinos Wistar, revelaram que houve
221 diferenças significativas entre os tratamentos (controle, diabético, grupo tratado
222 com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10%, extrato hidroalcoólico
223 (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% e grupo tratado com
224 estreptozotocina (6CH). Estas diferenças foram avaliadas nas probabilidades de
225 1% para o diâmetro máximo (μm) e de 5% para a área (μm^2), perímetro (μm) e
226 diâmetro mínimo (μm). Porém, o fator forma não diferiu ($p>0,05$) entre os
227 tratamentos. Comprovaram-se diferenças ($p<0,05$) entre os valores médios do
228 diâmetro máximo no controle e diabético com os grupos tratados com extrato
229 hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% e estreptozotocina
230 6CH. Os demais grupos experimentais tratados não diferiram entre si, ($p>0,05$).

231 O grupo controle apresentou, na maioria dos parâmetros analisados no núcleo dos
232 cardiomiócitos, os maiores valores médios, excetuando-se os diâmetros máximo e
233 mínimo, cujos maiores valores foram encontrados no controle diabético, assim
234 como o FF que apresentou o maior valor médio no grupo tratado com extrato
235 aquoso (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10%.

236 Os resultados morfológicos revelaram que o grupo sem nenhum tratamento
237 prévio, apresentou os maiores valores para a maioria dos parâmetros analisados no
238 citoplasma e núcleo dos cardiomiócitos. Sugere-se que os tratamentos não
239 favoreceram a contratilidade cardíaca, diferente de Silva et al. (2006) que
240 observaram maior amplitude de contratilidade e aumento do volume de
241 cardiomiócitos em ratos Wistar diabéticos que praticaram natação.

242 Desta forma, acreditamos que o tratamento fitoterápico mediante o uso do extrato
243 aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% e do extrato hidroalcoólico (70%)
244 de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% não proporcionou modificações nas
245 dimensões dos parâmetros analisados no citoplasma e núcleo dos cardiomiócitos.
246 O extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss. a 10% não aumentou as
247 dimensões do citoplasma e núcleo destas células quando comparado ao controle
248 diabético, excetuando-se o fator forma que, provavelmente, não interfere nas
249 dimensões celulares. O extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A.
250 Juss. a 10% aumentou discretamente apenas o perímetro, diâmetro mínimo e o FF
251 do citoplasma dos cardiomiócitos. Em relação ao núcleo, o nim não promoveu
252 aumento nos parâmetros analisados. No que diz respeito ao tratamento
253 homeopático com estreptozotocina (6CH), também notamos que os valores
254 médios, na maioria dos parâmetros analisados no citoplasma e núcleo dos
255 cardiomiócitos foram inferiores ao grupo diabético, excetuando-se apenas o
256 diâmetro mínimo e o fator de forma do citoplasma.

257

258

259

CONCLUSÕES

260 A *Azadirachta indica*, A. Juss. aclimatada no Brasil e o tratamento homeopático
261 tanto com o extrato aquoso como o hidroalcoólico de estreptozotocina (6CH)
262 utilizados em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina não modificam o
263 perímetro celular e as reservas de glicogênio nos cardiomiócitos. Além disso, o
264 extrato líquido ou hidroalcoólico proporcionam resultados semelhantes na
265 histologia cardíaca. A manutenção das dimensões das fibras musculares estriadas
266 cardíacas demonstra que o fitoterápico com *Azadirachta indica* A. Juss.
267 aclimatada no Brasil e homeopático com estreptozotocina (6CH) utilizados no
268 *Diabetes mellitus* não interferem na histomorfometria cardíaca em um período de
269 30 dias de tratamento. Estudos futuros e com tempo maior de tratamento,
270 possivelmente permitirão detectar alterações nos cardiomiócitos, utilizando-se
271 técnicas mais acuradas, tais como microscopia eletrônica de transmissão ou
272 confocal.

273

274

AGRADECIMENTOS

275

Os autores agradecem a concessão da bolsa de Iniciação Científica (2011/00121-

276

7) e do apoio financeiro concedido pela FAPESP - Fundação de Amparo à

277

Pesquisa do Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. R. B. Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de *Azadirachta indica* (NEEM. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17, 2013.

DING, A.; RODRIGUES, B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology*, v. 291, p. 1489-506, 2006.

GOMES, R. J.; LEME, J. A. C. A.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E.; CAETANO, F. H. Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. *Motriz*, v.14, p. 320-328, 2008.

JACOB, J. L. B.; LEANDRO, R. L.; PARRO, A. J. Doença de Pompe ou Glicogenose Tipo IIa. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 76, n. 6, p. 435-437, 1999.

KING, E. J.; GARNER, R. J. Colorimetric determination of glucose. *Journal of Clinical Pathology* v. 1, n.1, p. 30-33, 1947.

Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. *Robins e Cotran: Patologia – Bases Patológicas das doenças*. 8. ed., Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.1480p

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. *Acta farmacéutica bonaerense*, v. 24, p. 139-148, 2005.

PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. Piracicaba (SP). Nobel, v.14, p. 477, 2000.

SATYANARAYANA, K.; SRAVANTHI, K.; ANAND SHAKER, I.; PONNULAKSHMI, R. Molecular approach to identify antidiabetic potential of *Azadirachta indica*. Journal Ayurveda Integrative Medicine, v.6, n.3, p. 165-174, 2015.

SAXENA, R. C. Scope of Nim developing countries. In: World Nim conference Souvenir-Bengalure; Proceedings. Nairobi, p. 24-28, 1998

SHEN, X.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. The unfolded protein response - a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. Journal Chemical Neuroanatomy, v.28 n.1-2, p. 79-92, 2004.

SILVA, R. F.; LOPES, R. A.; SALA, M. A.; VINHA, D.; REGALO, S. C. H.; SOUZA, A. M.; GREGÓRIO, Z. M. O. Action of trivalent chromium on rat liver structure. Histometric and haematological studies. Internal Journal Morphology, v.24 n.2, p. 197-203, 2006.

SILVA, M. F.; PELÚZIO, M. C. G.; AMORIM, P. R. S.; LAVORATO, V. N.; SANTOS N. P.; BOZI, L. H. M.; ARLETE RITA PENITENTE, A. R. P; FALKOSKI, D. L.; BERFORT F. G.; NATALI, A. J. Treinamento em Natação Atenua a Disfunção Contrátil de Cardiomiócitos de Ratos Diabéticos. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abc/v97n1/aop04611>. Acesso em: 22/10/2015

STATISTICAL ANALISYS SYTEMS INSTITUTE INC. SAS User's Guide: Statistics (version 5 edn). SAS Institute. INC., Cary, NC, 200, 1999.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, A. O.; FREITAS-NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ª ed. São Paulo (SP): Manole, p. 331, 2003.

VILELA, J. A. R. Efeito da utilização de Óleo de nim (*Azadirachta indica*) por via Dérmica e da Moxidectina por via Subcutânea na Prevenção de Infestação por *Dermatobia hominis* (LINNAEUS JR., 1781) (DIPTERA; CUTEREBRIDAE) em Bovinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, p. 53, 2008.

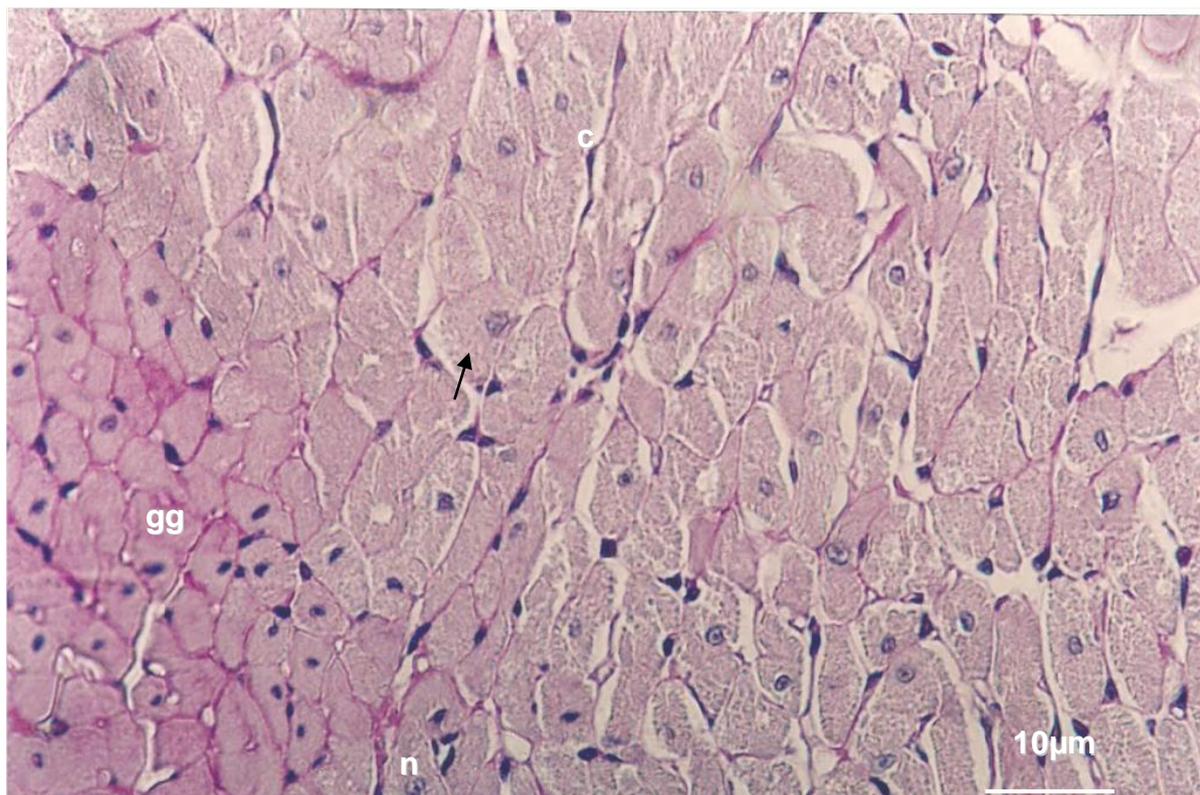


FIGURA 1. Fotomicrografia, em corte transversal, do coração de rato macho albino Wistar, do grupo controle, indicando: grânulos de glicogênio (→) corados em magenta no citoplasma (c), núcleo contracorado em azul (n) e fibras de Purkinje ricas em glicogênio (gg). PAS/Hematoxilina, 40X.

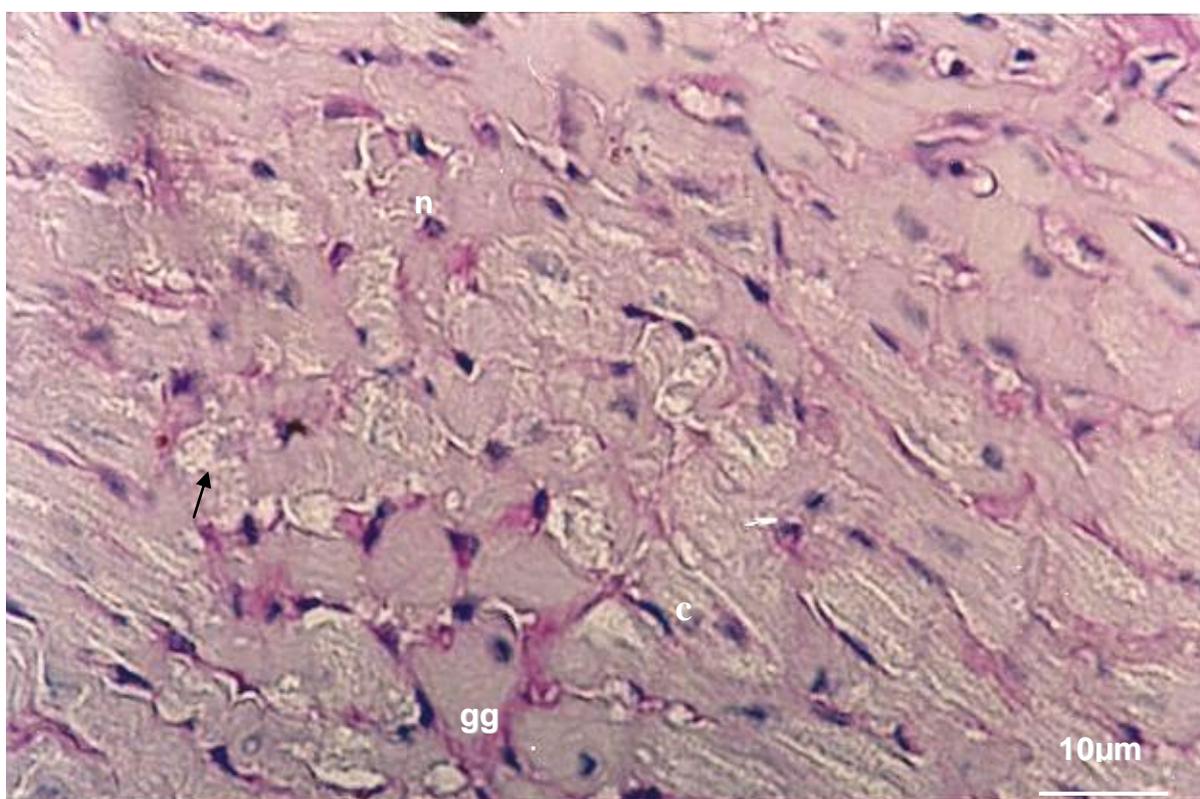


FIGURA 2. Fotomicrografia, em corte transversal, do coração de rato macho albino Wistar, grânulos de glicogênio (→) corados em magenta no citoplasma (c), núcleo contracorado em azul (n) e fibras de Purkinje ricas em glicogênio (gg). PAS/Hematoxilina, 40X.

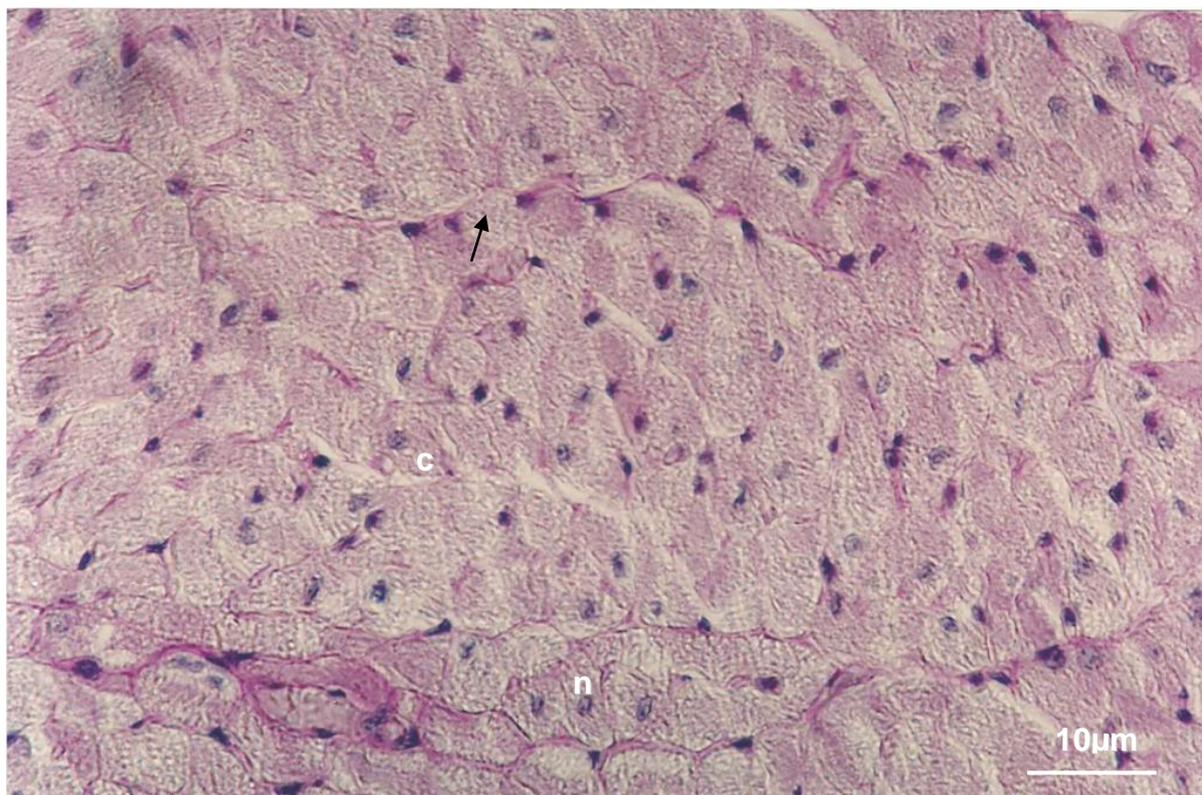


FIGURA 3. Fotomicrografia, em corte transversal, do coração de rato macho albino Wistar, do grupo tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10%, indicando: grânulos de glicogênio (→) corados em magenta no citoplasma (c) e núcleo contracorado em azul (n). PAS/Hematoxilina, 40X.

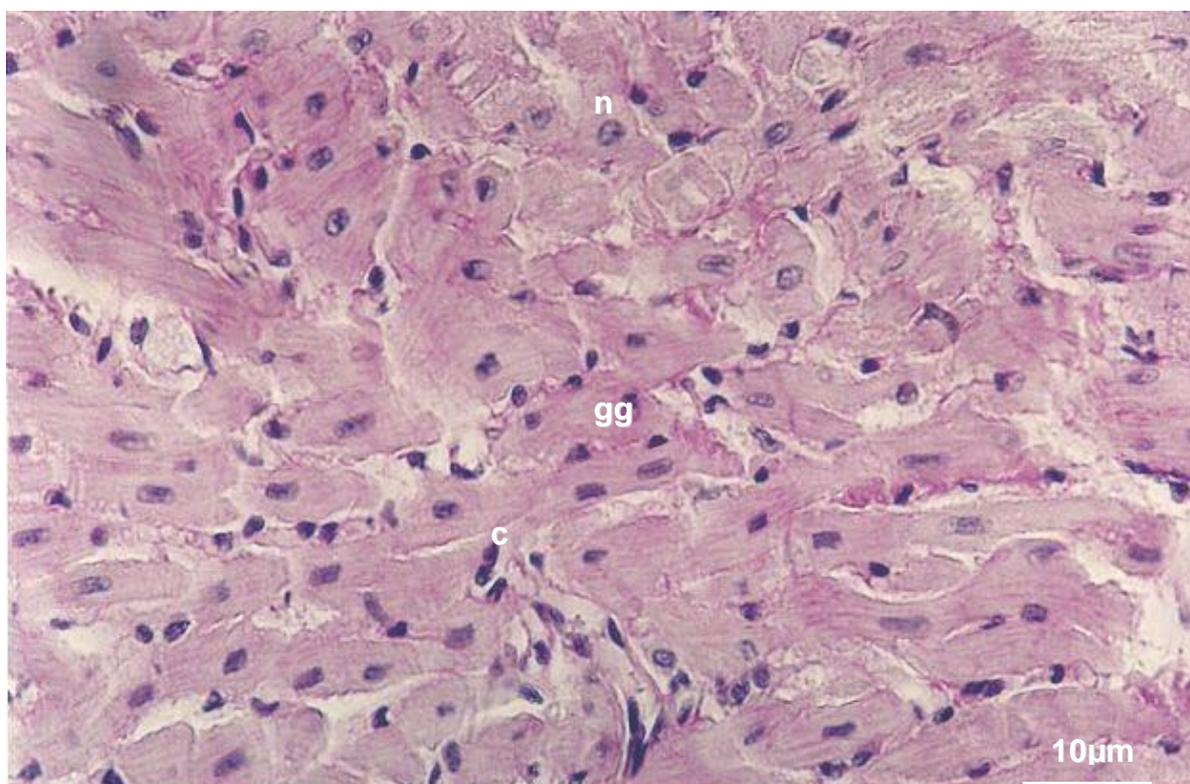


FIGURA 4 – Fotomicrografia, em corte transversal e longitudinal, do coração de rato macho albino Wistar, do grupo tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10%, indicando: citoplasma (c) rico em grânulos de glicogênio (gg) corados em magenta nas fibras de Purkinje em azul e núcleo contracorado em azul (n). PAS/Hematoxilina, 40X.

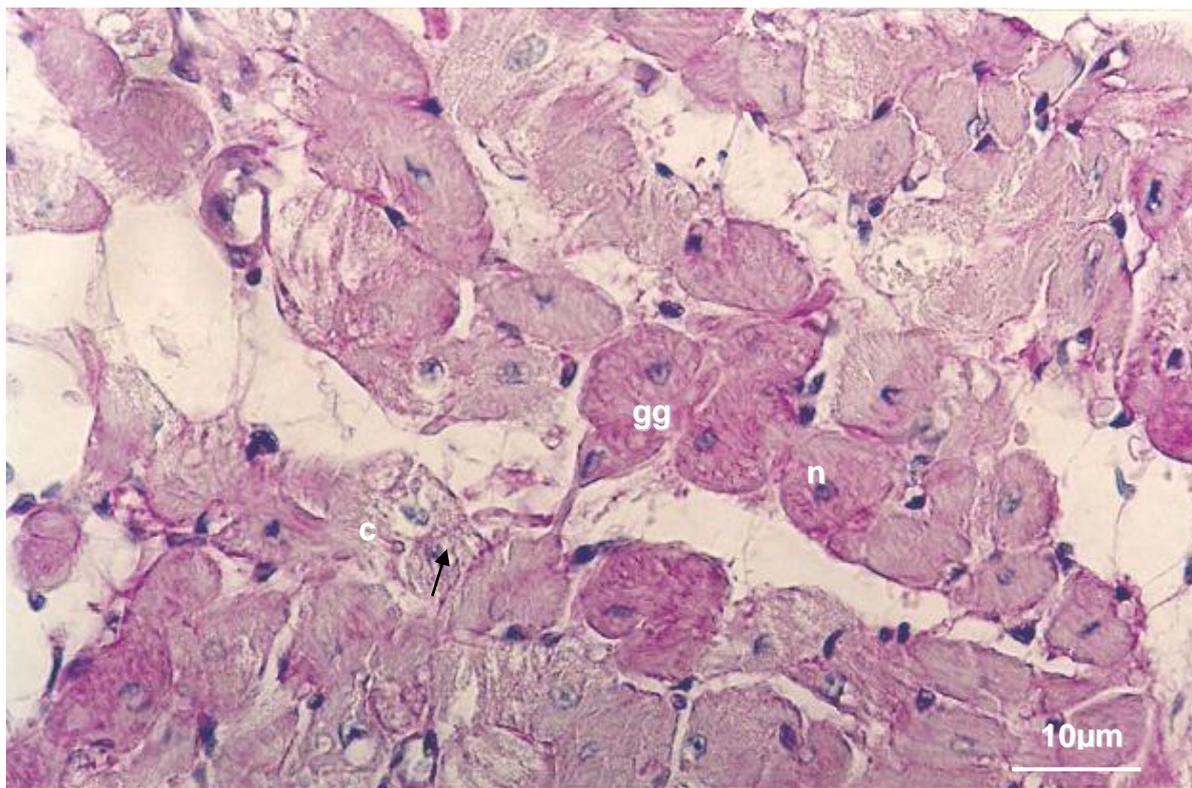


FIGURA 5– Fotomicrografia, em corte transversal, do coração de rato macho albino Wistar, do grupo tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10%, indicando: grânulos de glicogênio (→) corados em magenta no citoplasma (c) dos cardiomiócitos e fibras de Purkinje ricas em glicogênio (gg) e núcleo contracorado em azul (n). PAS/Hematoxilina, 40X.

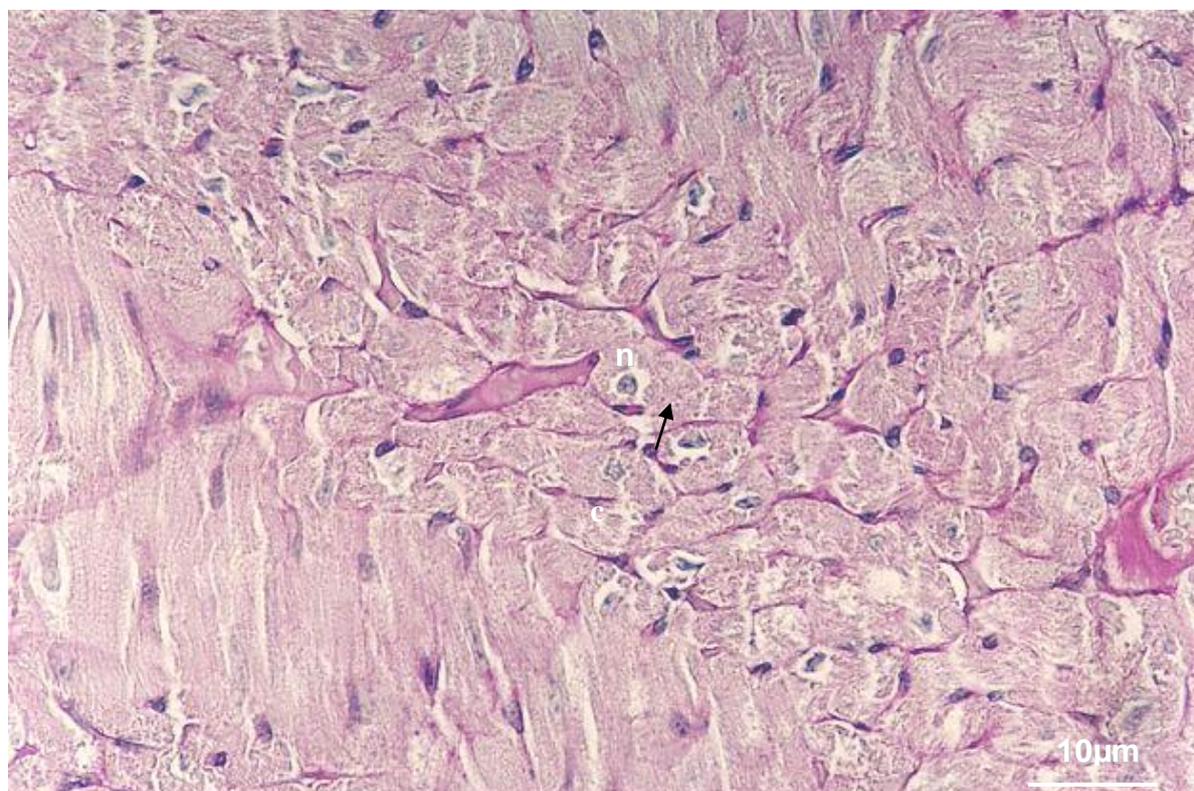


FIGURA 6. Fotomicrografia, em corte transversal e longitudinal, do coração de rato macho albino Wistar, do grupo tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10%, indicando: grânulos de glicogênio (→) corados em magenta e núcleo contracorado em azul (n). PAS/Hematoxilina, 40X.

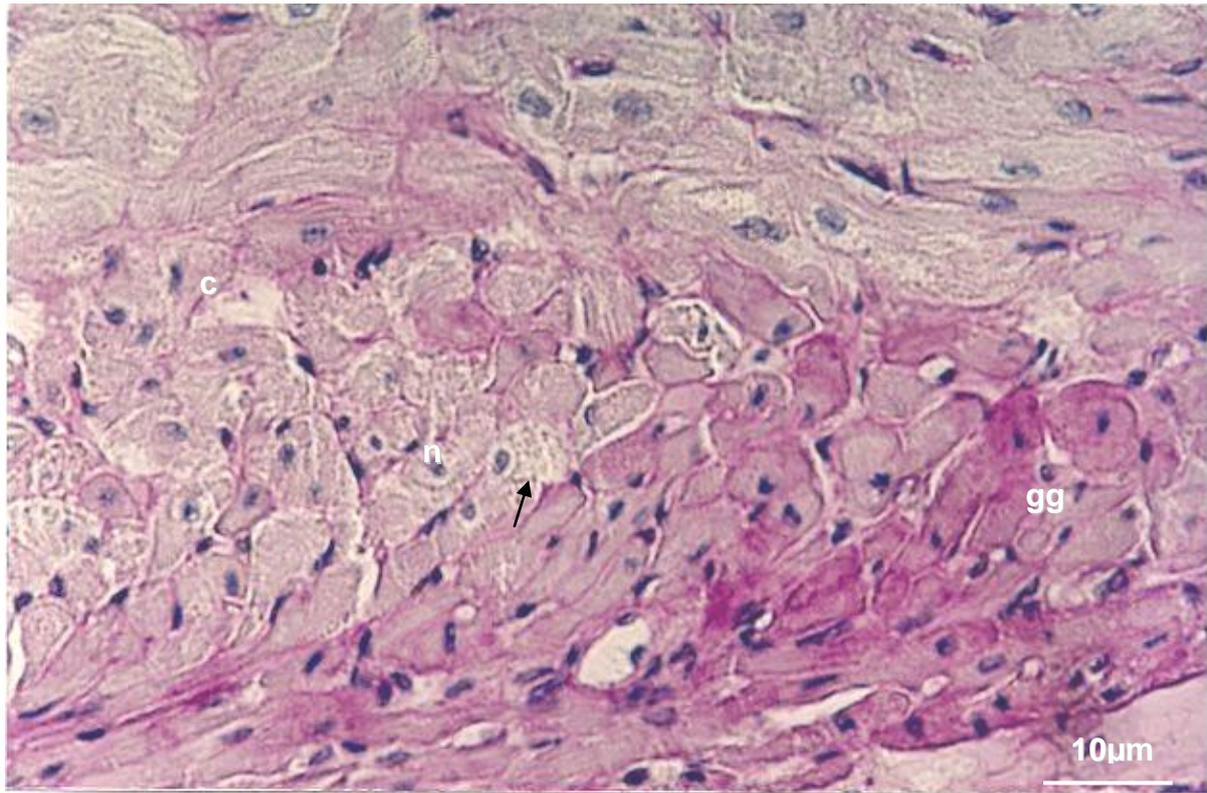


FIGURA 7. Fotomicrografia, em corte transversal e longitudinal, do coração de rato macho albino Wistar, do grupo tratado com estreptozotocina, indicando: grânulos de glicogênio (→) corados em magenta no citoplasma (c) dos cardiomiócito e fibras de Purkinje ricas em glicogênio (gg) e núcleo contracorado em azul (n). PAS/Hematoxilina, 40X.

Tabela 1. Médias e desvio padrão dos parâmetros morfométricos do citoplasma de cardiomiócitos de ratos machos albinos Wistar dos grupos controle e diabéticos tratados com extrato aquoso e hidroalcoólico de *A. indica*, A. Juss. e estreptozotocina 6CH

Tratamento	Área (μm^2)*	Perímetro (μm)	Diâmetro máximo (μm)**	Diâmetro mínimo (μm)	Fator Forma
Controle	205,64 \pm 19,35 [†]	46,09 \pm 2,85 [†]	16,28 \pm 1,04 [†]	10,02 \pm 1,38 [†]	0,84 \pm 0,038 [†]
Diabético	190,51 \pm 17,93 ^{†‡}	42,98 \pm 2,66 [†]	14,60 \pm 0,93 ^{†‡}	8,26 \pm 1,14 [†]	0,78 \pm 0,035 [†]
Extrato Aquoso	171,35 \pm 16,12 ^{†‡}	41,20 \pm 2,55 [†]	13,99 \pm 0,89 [‡]	7,96 \pm 1,09 [†]	0,80 \pm 0,036 [†]
Extr. Hidroalcoólico	178,37 \pm 16,78 ^{†‡}	43,19 \pm 2,67 [†]	14,38 \pm 0,91 ^{†‡}	8,33 \pm 1,15 [†]	0,85 \pm 0,038 [†]
Estreptozotocina 6CH	167,56 \pm 15,77 [‡]	41,67 \pm 2,58 [†]	13,99 \pm 0,89 [‡]	8,80 \pm 1,21 [†]	0,84 \pm 0,038 [†]

Médias seguidas de símbolos diferentes nas colunas diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 1% e 5% de probabilidade. $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Tabela 2. Médias e desvio padrão dos parâmetros morfométricos no núcleo de cardiomiócitos de ratos machos albinos Wistar dos grupos controle e diabéticos tratados com extrato aquoso e hidroalcoólico de *A. indica*, A. Juss. e estreptozotocina 6CH

Tratamento	Área (μm^2)*	Perímetro (μm)	Diâmetro máximo (μm)**	Diâmetro mínimo (μm)	Fator forma
Controle	13,96 \pm 2,84 [†]	14,17 \pm 1,39 [†]	4,42 \pm 0,33 [†]	3,34 \pm 0,40 [†]	1,20 \pm 0,06 [†]
Diabético	13,43 \pm 2,73 [†]	14,02 \pm 1,37 [†]	4,43 \pm 0,33 [†]	3,36 \pm 0,40 [†]	1,22 \pm 0,06 [†]
Extr. Aquoso	11,02 \pm 2,24 [†]	12,68 \pm 1,24 [†]	3,84 \pm 0,28 ^{†‡}	2,68 \pm 0,32 [†]	1,23 \pm 0,06 [†]
Extr. Hidroalcoólico	9,48 \pm 1,93 [†]	11,66 \pm 1,14 [†]	3,62 \pm 0,27 [‡]	2,70 \pm 0,33 [†]	1,18 \pm 0,06 [†]
Estreptozotocina 6CH	9,80 \pm 1,99 [‡]	11,87 \pm 1,16 [†]	3,75 \pm 0,28 [‡]	2,72 \pm 0,33 [†]	1,21 \pm 0,06 [†]

Médias seguidas de símbolos diferentes nas colunas diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 1% e 5% de probabilidade. $P < 0,05$; $**P < 0,01$