ALINE GONÇALVES

Avaliação morfoquantitativa das expressões do IGF-I, Insulina e de seus receptores na polpa dentária e no epitélio juncional de ratos wistar na fase púbere, submetidos à subnutrição proteica pré e pós-natal e à renutrição pós-natal.

São Paulo
2012

ALINE GONÇALVES

Avaliação morfoquantitativa das expressões do IGF-I, Insulina e de seus receptores na polpa dentária e no epitélio juncional de ratos wistar na fase púbere, submetidos à subnutrição proteica pré e pós-natal e à renutrição pós-natal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

4/1/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2533
FMVZ

Gonçalves, Aline

Avaliação morfoquantitativa das expressões do IGF-I, Insulina e de seus receptores na polpa dentária e no epitélio juncional de ratos wistar na fase púbere, submetidos à subnutrição proteica pré e pós-natal e à renutrição pós-natal / Aline Gonçalves. -- 2012.

91 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Subnutrição. 2. Polpa dentária. 3. Epitélio juncional. 4. IGF-I.
5. Insulina. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação morfoquantitativa das expressões de IGF-I, insulina e de seus receptores na polpa dentária e no epitélio juncional de ratos Wistar na fase púbere, submetidos à subnutrição protéica pré e pós-natal e à renutrição pós-natal", protocolado sob o nº 2163/2011, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Morfoquantitative evaluation of the expressions of IGF-I, insulin and their receptors on dental pulp and junctional epithelium of pubescent Wistar rats subjected to protein undernutrition and postnatal refeeding", protocol number 2163/2011, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 17 de novembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GONÇALVES, Aline

Título: Avaliação morfoquantitativa das expressões do IGF-I, Insulina e de seus receptores na polpa dentária e no epitélio juncional de ratos wistar na fase púbere, submetidos à subnutrição proteica pré e pós-natal e à renutrição pós-natal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Eu entrei em sua sala com a mais abstrata das intenções de realizar uma iniciação científica, e você simplesmente me recebeu com aquele sorriso singelo. Depois disso, foram alguns poucos anos de convivência que valeram uma vida inteira. Eu não sabia ao certo o caminho a seguir, mas sabia exatamente com que tipo de pessoa eu queria estar. E foi no seu incansável entusiasmo que eu encontrei muito mais do que um rumo acadêmico, pois além da sua sabedoria e competência, você demonstrava durante todo o tempo que o caminho que realmente importava era aquele que me definia como pessoa. Dessa forma, mudei muitos conceitos e a vida definitivamente não foi mais a mesma depois de você. Durante a nossa trajetória, você me garantiu que havia dificuldades, ao mesmo tempo em que me fez acreditar que eu não podia deixar ninguém me fazer sentir como se eu não merecesse o meu sonho. E no meu imaginário você sempre estaria ali, naquela mesma sala, com aquele mesmo jeitinho sábio, acolhedor e afetuoso. Mas, subitamente a vida mostrou que é ela quem faz as escolhas, por mais que nos dê outra ilusão. E foi essa vida irônica e interrompida que fez surgir da delicadeza de cada momento, a necessidade do ontem, do imprescindível e do essencial, mesmo que mais tarde tenha transformado um pouco disso em calma e resignação. E foi assim, repleta de uma calma triste resultante do que não poderia ser mudado e sobre as revoluções por trás de tudo, que restou reinventar toda uma estória. Hoje a sua sala permanece lá, e muitas vezes eu ainda imagino a sua presença. Mas a verdade é que restaram algumas fotos, uma dissertação de mestrado e uma saudade do tamanho do mundo. E assim, movida pelo amor e pela falta, pela vontade de realizar e de entender, só me restou dedicar este trabalho a você que o idealizou. À memória da amiga, colega de profissão, estimada professora e eterna orientadora, que me acolheu, confiou e muito me ensinou: Sílvia de Campos Boldrini. Apesar da sua ausência, cada parágrafo deste trabalho possui sua participação viva e marcante. A você, minha querida, um obrigada repleto de reconhecimento pelo que você significou e sempre significará em minha vida. Onde quer que você esteja, tão perto do meu coração, não importa o quão longe, saiba que foi o trabalho com mais amor e dedicação que já fiz na vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço do fundo do meu coração ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, exemplo maior de comprometimento com o ensino e pesquisa, em primeiro lugar por ser o responsável pelo meu “amor á primeira vista” pela Anatomia. É impossível transpor o quanto os seus ensinamentos conseguem conciliar sabedoria, rigor, generosidade e amor.

Também sou extremamente grata por sua prontidão e disposição em me orientar dentro de um cronograma apertado e em um momento muito difícil para todos, sobretudo para ele. Apesar de tudo, eu ainda o tive como meu orientador, e tenho absoluta certeza que isso fez toda a diferença, não só para este trabalho, como para a minha vida.

Muito obrigada pelo acolhimento no laboratório, pelo amparo acadêmico, por todo tempo a mim despendido, pela força demonstrada em todos os momentos, por ser a minha grande referência de mestre e pelos ensinamentos constantes, sobretudo de ética e respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos Gonçalves e Maria Aparecida Martins Gonçalves, pelo amor incondicional, carinho desmedido e pelo encorajamento e incentivo constante durante todo o tempo de formação.

À minha irmã Renata pelos laços afetivos que compartilhamos e por toda a colaboração nos momentos difíceis.

Ao meu querido Erinson Otenio por infinitas coisas, por ser a pessoa mais presente, pela correção de grande parte deste trabalho, por dividir comigo seus conhecimentos e as suas inquietações de vida, e, sobretudo, por sempre demonstrar amor mesmo em tempos de ceticismo.

À amiga de graduação e da vida, Adriana Paiato, pela cumplicidade e confiança que me oferece.

À amizade de Lia Flávia Rodrigues que tem resistido a todas as vicissitudes da vida.

À Amanda Nardis pelo incentivo inicial e por ter me colocado em contato com aquela que foi uma das pessoas mais especiais que já conheci na vida: professora Sílvia.

À Diana Vono e Lucilene Ferreira que tiveram participação efetiva na realização dos experimentos deste trabalho. Agradeço pela amizade e principalmente pelas infindas horas de animadas reações de imunohistoquímica.

À amiga Joice Bertaglia pela presença importante nos angustiantes momentos decisivos para a conclusão desse trabalho e por toda a ajuda nas partes burocráticas envolvidas.

Ao casal: Paulo Henrique Matos e Regina Bolina-Matos que compartilharam dos bons momentos, mas também estiveram presentes durante as dificuldades, me ajudaram muito em quase todas as etapas, contribuíram, incentivaram e apoiaram minha pesquisa em diversos sentidos.

Ao amigo Marcelo Cavalli pelo auxílio em diversas ocasiões e, sobretudo, pela generosa amizade.

Ao amigo Ricardo Bandeira pela disposição em colaborar com esse trabalho a qualquer momento e principalmente pelos momentos de descontração e de boas risadas.

Este trabalho também seria completamente inviável sem a enorme contribuição dos companheiros, colegas e amigos do LAFACC, os de antes, os de agora e os de sempre: Adriano Ciena, Any Kelly Lima, Bruna Caixeta, Caroline Gebra, Catarina Tivane, Cristina Bolina, Eduardo Beber, Jodonai Silva, Josemberg Baptista, Josy Rosa, Karina do Valle, Lynda Tamayo, Mariana Pazos, Márcio Cristófar, Naianne Clébis, Ricardo Eustáquio, Sabrina Caixeta, Sofia Beviláqua, Thelma Parada, Thiago Habacuque e Valquíria Mariotti.

Ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, especialmente à Professora Dra. Maria Angélica Miglino.

À Professora Dra. Flávia de Oliveira pelos ensinamentos ainda como monitora da disciplina de Anatomia durante a minha graduação e também por ser uma grande referência do LAFACC.

Ao Professor Dr. Renato Paulo Chopard pela dedicação e competência como docente da disciplina de Anatomia para o curso de Odontologia diurno, o qual eu pude acompanhar durante a época de monitoria durante a graduação e pós-graduação.

Estendo meus agradecimentos a todos os funcionários da FMVZ e do ICB, especialmente ao Maicon Barbosa da Silva, secretário do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, que esteve durante todo o curso sempre disposto a atender às minhas solicitações.

À técnica do Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Sra. Marta Maria da Silva Righetti, pela parceria, empenho e auxílio durante todo o curso.

À Sra. Cleide Rosana Duarte Prisco, responsável pelo setor de estatística do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, agradeço pela análise estatística dos dados deste trabalho, pela atenção, competência e amizade.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CNPq sem o qual o trabalho não poderia ter sido executado.

“Uma das coisas que aprendi é que se deve viver apesar de. Apesar de, se deve comer. Apesar de, se deve amar. Apesar de, se deve morrer. Inclusive muitas vezes é o próprio apesar de que nos empurra para frente.

Foi o apesar de que me deu uma angústia que insatisfeita foi a criadora de minha própria vida...”

Clarice Lispector

RESUMO

GONÇALVES, A. **Avaliação morfoquantitativa das expressões do IGF-I, Insulina e de seus receptores na polpa dentária e no epitélio juncional de ratos wistar na fase púbere, submetidos à subnutrição proteica pré e pós-natal e à renutrição pós-natal.** [Morfoquantitative evaluation of the expressions of IGF-I, Insulin and their receptors on dental pulp and junctional epithelium of pubescent wistar rats subjected to protein undernutrition and postnatal refeeding]. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Fatores nutricionais e metabólicos são capazes de comprometer o desenvolvimento pleno dos tecidos dentários, especialmente quando impingidos em períodos críticos. Estudos revelam que condições derivadas da subnutrição precoce e também tardia, interferem na atividade da insulina e do sistema IGF, demonstrando possível envolvimento com algumas patologias e apontando, em sua maioria, caráter permanente em alto grau, se não imediato, prospectivo e comprometedor da performance morfológica e funcional dos tecidos. Desta maneira, o presente estudo teve o propósito de avaliar os efeitos da subnutrição proteica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o desenvolvimento da polpa dentária e do epitélio juncional do periodonto de ratos wistar, visando encontrar possível correspondência entre as alterações metabólicas e morfofuncionais decorrentes da subnutrição proteica, previamente relacionadas em estudos relativos à ação desses hormônios. Para tanto, formou-se grupos de animais heterogênicos (n=3) que, de acordo com a ração oferecida, normoproteica ou hipoproteica, e as respectivas idades, foram divididos nos seguintes grupos experimentais: nutridos (N) e subnutridos (S) com 60 dias de vida (fase na qual o período púbere termina) e nutridos (R), recuperados a partir de 22 até alcançarem 60 dias de vida. Após a eutanásia, os espécimes foram submetidos às técnicas de microscopia de luz (coradas com Azo-Carmim, Hematoxilina-Eosina e Picro-Sirius, esta última para a avaliação do componente colágeno) e imunohistoquímica para a identificação da expressão do IGF-I, insulina e respectivos receptores. A polpa dentária apresentou-se debilitada sob subnutrição o que foi verificado através da desorganização da camada odontoblástica e da estagnação dos componentes colágenos nos animais subnutridos. A renutrição não foi capaz de promover a recuperação de nenhum dos dois parâmetros. O estudo morfométrico permitiu verificar que a porcentagem média do número de expressões

ao IGF-I foi maior nos animais do grupo N e que houve diferenças estatísticas significantes entre estes e os animais dos grupos S e R. Da mesma forma, a maior expressão de seus receptores (IGF-IR) foi encontrada nos animais do grupo N com indicação de diferença estatística apenas entre este e o grupo de animais subnutridos. A maior porcentagem média das expressões de insulina ocorreu nos animais nutridos (N), mas estatisticamente não foi detectada diferença significativa entre os grupos. Já em relação ao receptor de insulina (IR), foram constatadas diferenças estatísticas significativas entre o grupo N em relação aos grupos S e R. No epitélio juncional, a subnutrição determinou modificações no padrão das células e camadas epiteliais nos animais subnutridos, além de uma maior quantidade de colágeno do tipo III no tecido conjuntivo que o sustenta, caracterizando um atraso no desenvolvimento desses tecidos. A renutrição não foi capaz de recuperar satisfatoriamente os seus componentes estruturais. Sobre as expressões imunohistoquímicas a todos os anticorpos utilizados (para IGF-I, IGF-IR, I e IR), a análise estatística demonstrou não haver diferenças significativas entre os valores encontrados nos diferentes grupos N, S e R no epitélio juncional.

Palavras-chave: Subnutrição. Polpa dentária. Epitélio juncional. IGF-I. Insulina.

ABSTRACT

GONÇALVES, A. **Morfoquantitative evaluation of the expressions of IGF-I, Insulin and their receptors on dental pulp and junctional epithelium of pubescent wistar rats subjected to protein undernutrition and postnatal refeeding** [Avaliação morfoquantitativa das expressões do IGF-I, Insulina e de seus receptores na polpa dentária e no epitélio juncional de ratos wistar na fase púbere, submetidos à subnutrição protéica pré e pós-natal e à renutrição pós-natal]. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Nutritional and metabolic factors can cause serious injury of the development of dental tissue, especially when occurred in critical periods. Several studies reveal that conditions derived from early and later under nutrition interfere in insulin and IGF system activities; in these studies has been demonstrated the possible involvement of some pathologies most of them pointing to permanent in high degree (if not immediate) prospective and “possible dangerous” morphological and functional performance of tissues. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of the pre and post-natal protein under nutrition, and, post-natal refeeding on the development of the dental pulp and periodontal junctional epithelium of wistar rats, in order to find possible correlation between the metabolic and morph-functional changes arising from protein under nutrition, previously associated with studies related to the effects of these hormones. For this purpose, heterogenic animal groups were formed (n=3) divided in accordance of their diets (protein or hypo protein) and their ages into the following experimental groups: nourished (N) under nourished (S) aged 60 days (final of pubescent I periods) and renourish (R), recovered from the 22nd to 60th day old. After euthanasia, the specimens were analyzed by light microscopy (stained with Azo-carmin, Hematoxylin-Eosin and Picro Sirius, the later for collagen component analysis) and immunohistochemistry examination for identification of IGF-I expression, Insulin and respective receptors. The dental pulp turned out to be impaired in the context of undernutrition. This phenomenon was seen through disorganization of the odontoblastic layer and the stagnation of collagen components in undernourished animals. The refeeding procedure was unable to promote the recovery from any of the two parameters. With the immunohistochemistry on the dental pulp, it was found that the number of IGF-I expression was higher in group N and that there were significant differences involving these animals and those from groups S and R. Similarly, the highest

expression of their receptors (IGF-IR) was found in group N, demonstrating statistical difference between this one and the group of undernourished animals. The highest average percentage of the expressions of insulin occurred in nourished animals (N), but no statistically significant difference was detected among the groups. In regard to the insulin receptor (IR), statistically significant differences were found when the group N was compared to groups S and R. In the junctional epithelium, the undernutrition determined changes in the pattern of epithelial cells in undernourished animals and the prevalence of type III collagen fibers in the connective tissue that supports it, featuring a delay in the development of these tissues. The refeeding was not able to satisfactorily recover their structural components. About immunohistochemical expressions of all antibodies used for IGF-I, IGF-IR, I e IR in the junctional epithelium, the statistical analysis showed no significant differences among the values found in the groups N, S and R.

Keywords: Undernutrition. Dental pulp. Junctional epithelium. IGF-I. Insulin.

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DP	Desvio padrão
EPI	Equipamento de proteção individual
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GH	Hormônio do crescimento
HE	Hematoxilina eosina
I	Insulina
IgG	Imunoglobulina G
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I
IGFBP	Proteína ligante de IGF
IR	Receptor de Insulina
MEC	Matriz extracelular
N	Grupo experimental nutrido de 60 dias
PBS	Solução tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Grupo experimental renutrido de 60 dias
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
S	Grupo experimental subnutrido de 60 dias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Componentes estruturais do sistema IGF	34
Figura 2-	Esquema do processo de formação dos grupos experimentais	43
Figura 3-	Gaiolas metabólicas	46
Figura 4-	Técnica morfométrica com o uso do sistema teste. Polpa dentária corada pelo método de HE. Objetiva de 100x	50
Figura 5-	Fotomicrografia da estrutura dentária de rato wistar. Azo-carmim. Objetiva de 5x	54
Figura 6-	Corte histológico evidenciando a camada odontoblástica na periferia da polpa dentária (*) e seus elementos vasculares (setas). Azo-carmim. Objetiva de 40x	55
Figura 7-	Corte histológico da polpa dentária demonstrando células odontoblásticas caracteristicamente distribuídas em paliçada. (Azo-carmim). Objetiva de 100x	55
Figura 8-	Microscopia de luz. Coloração pelo método de HE. Aspectos estruturais da periferia da polpa dentária dos animais dos grupos: nutrido (N), subnutrido (S) e renutrido (R). Objetiva de 100x	56
Figura 9-	Microscopia de luz polarizada. Coloração pelo método do Picro-sírius. Detecção de fibras colágenas do tipo I (amarelo, laranja e vermelho) na polpa dentária dos animais do grupo nutrido (A) e de fibras do tipo III (verde) principalmente na polpa dentária dos animais dos grupos subnutridos (B) e renutridos(C). Objetiva de 40x	57
Figura 10-	Microscopia de luz. Coloração pelo método de HE. Características estruturais do epitélio juncional dos animais dos grupos: nutrido (A e D), subnutrido (B e E) e renutrido (C e F). Objetiva de 100x	58

- Figura 11- Microscopia de luz polarizada. Coloração pelo método do Picro-sírius. Detecção de fibras colágenas do tipo I (amarelo, laranja e vermelho) no tecido conjuntivo que sustenta o epitélio juncional, principalmente nos animais dos grupos nutrido (A) e renutrido (C) e de fibras do tipo III (verde), principalmente nos animais do grupo subnutrido (B). Objetiva de 40x 59
- Figura 12- Fotomicrografia de cortes histológicos da polpa dentária demonstrando células sensibilizadas (setas) pelo IGF-I (A) e pelo receptor IGF-IR (B). Aumento 100x 60
- Figura 13- Fotomicrografia de cortes histológicos da polpa dentária demonstrando células sensibilizadas (setas) pela Insulina (A) e pelo seu receptor IR- (B). Aumento 100x 63
- Figura 14- Fotomicrografia de cortes histológicos do epitélio juncional corados em HE (A, B e C), demonstrando núcleos corados de células (setas) em diferentes camadas do epitélio; e presença de imunomarcações (D, E e F) referentes ao IGF-I, IGF-IR e ao IR (setas). Aumento 100x 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Média e desvio padrão da porcentagem média de imunomarcações ao IGF-I e ao IGF-IR nos diferentes grupos (N, S e R) na polpa dentária	61
Tabela 2-	Média e desvio padrão da porcentagem média de imunomarcações à Insulina (I) e ao seu receptor (IR) nos diferentes grupos (N, S e R) na polpa dentária	63
Tabela 3-	Média e desvio padrão da porcentagem média de imunomarcações ao IGF-I, ao IGF-IR, à Insulina (I) e ao seu receptor (IR) nos diferentes grupos (N, S e R) no epitélio juncional	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica do IGF-I (média $\pm$ desvio padrão).	61
Gráfico 2-	Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica do IGF-IR (média $\pm$ desvio padrão).	62
Gráfico 3-	Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica da Insulina (média $\pm$ desvio padrão).	64
Gráfico 4-	Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica do receptor de insulina (IR) (média $\pm$ desvio padrão)	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	A SUBNUTRIÇÃO: PANORAMA ATUAL E CONCEITOS.....	26
2.2	A SUBNUTRIÇÃO, A RENUTRIÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO	27
2.3	MORFOLOGIA E DINÂMICA DA POLPA DENTÁRIA.....	29
2.4	O EPITÉLIO JUNCIONAL.....	31
2.5	O SISTEMA IGF E A CONDIÇÃO NUTRICIONAL.....	33
3	PROPOSIÇÃO.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	40
4.2	OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	47
4.3	HISTOLOGIA.....	47
4.4	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O IGF-I, INSULINA E SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES (IGF-I E IR).....	48
4.5	MORFOMETRIA.....	49
4.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	51
5	RESULTADOS.....	52
5.1	ASPECTOS QUALITATIVOS.....	53
5.1.1	Generalidades da estrutura dentária.....	53
5.1.2	Padrão morfológico do tecido pulpar.....	55
5.1.3	Padrão morfológico do epitélio juncional.....	58
5.2	ASPECTOS QUANTITATIVOS.....	60

5.2.1	Polpa dentária.....	60
5.2.1.1	<i>Relativos à expressão do IGF-I e do IGF-IR.....</i>	60
5.2.1.2	<i>Relativos à expressão da Insulina (I) e seu receptor (IR).....</i>	62
5.2.2	Epitélio juncional.....	65
6	DISCUSSÃO.....	67
6.1	ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DA POLPA DENTÁRIA.....	68
6.2	ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DO EPITÉLIO JUNCIONAL.....	74
7	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que deficiências de nutrientes em uma dieta imposta a ratos em períodos críticos de desenvolvimento estão associadas com alterações morfológicas verificadas em estruturas do complexo orofacial, incluindo os ossos da face e os dentes (SHAW; GRIFFITHS, 1963; PUCCIARELLI et al., 1983). Nos tecidos dentários, os distúrbios nutricionais levam a uma variedade de efeitos, compreendendo desde modificações nos tamanhos dos dentes até retardos na cronologia de erupção (DIORIO et al., 1973). No entanto, alguns autores sugerem que os efeitos nocivos causados por uma restrição na dieta, são processos frequentemente reversíveis, desde que uma dieta apropriada seja precocemente restabelecida (MENAKER; NAVIA, 1973; PUNYASINGH et al., 1984; LOZUPONE; FAVIA, 1994).

Considerando estudos populacionais em humanos, a subnutrição proteica ganha especial importância, por se relacionar com a atual condição nutricional de alto consumo de carboidratos em detrimento de micronutrientes essenciais, situação encontrada principalmente nos países em desenvolvimento (FAO, 1997; 2006).

Partindo dessas constatações, pretende-se avaliar no presente trabalho as repercussões morfológicas da subnutrição proteica na polpa dentária e no epitélio juncional do periodonto. Estudar esses dois tecidos em uma única pesquisa, não se justifica apenas por uma intenção descritiva que busca dar conta de seus elementos constitutivos, pois a análise da polpa dentária mostrou-se relevante, especialmente devido à sua dinâmica e seu potencial de regeneração, que permanecem mesmo após o seu desenvolvimento embrionário. Já o epitélio juncional foi considerado, devido ao fato de outros tipos de epitélios terem apresentado na sua taxa de renovação celular, uma dependência de fatores nutricionais e metabólicos (LANSDOWN, 1978).

Quanto à maneira como o aporte proteico interfere no metabolismo e pode afetar a morfologia dos tecidos, considerou-se aqui o fato de a subnutrição estar relacionada a alterações endócrinas complexas a partir das quais, de maneira geral, o desenvolvimento tecidual é comprometido negativamente. (WOODALL et al., 1998). Nesse sentido, substâncias relacionadas ao hormônio do crescimento (GH),

tais como os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e a própria Insulina, foram consideradas para o entendimento de tal processo.

De fato, os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), produzidos como resposta ao hormônio do crescimento, desempenham um papel fundamental nos processos morfofisiológicos do organismo, sendo reconhecidamente relacionados com o crescimento e desenvolvimento de diversos tecidos nos estágios precoces da embriogênese, e com a regulação de funções específicas durante o período pós-natal. Ademais, estão envolvidos tanto com a homeostase como também com diferentes condições patológicas, inclusive nos tecidos orais e dento-faciais (LeROITH, 2003; GÖTZ et al., 2006).

Sobre a insulina, existem hoje dados experimentais que demonstram sua ação como um poderoso hormônio anabólico capaz de aumentar a síntese de ácidos nucléicos e proteínas em tecidos-alvo, além de evidências clínicas de que o Diabetes melito pode ser diretamente relacionado ao retardo de crescimento por causar resistência secundária ao GH e, dessa forma, uma menor estimulação de geração de IGF-I. A insuficiência insulínica também resulta em altos níveis de IGFBP1 que, por sua vez, reduz a quantidade avaliável da livre circulação de IGF-I. Assim, o retardo de crescimento na Diabetes melito pode ser uma interação da insulina, da deficiência do IGF-I e de um desequilíbrio metabólico (LARON, 2008).

Com base nesses pressupostos, foram estudados na presente pesquisa, os efeitos da subnutrição proteica na polpa dentária e no epitélio juncional, a partir das ações dos IGFs e da Insulina sobre eles, porém com especial atenção para as repercussões morfológicas causadas pela privação nutricional e pela recuperação proteica precoce.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A partir de um levantamento bibliográfico detalhado, esta seção reúne os conceitos, definições e resultados de investigações prévias que fundamentam e norteiam o tema da presente pesquisa.

2.1 A SUBNUTRIÇÃO: PANORAMA ATUAL E CONCEITOS

Dados recentes da FAO/OMS (2010-2011) apontam um declínio do número de pessoas subnutridas no mundo. Em 2009 constatou-se um pico de mais de 1 bilhão de pessoas subnutridas, diminuindo para cerca de 925 milhões em 2010. Tais números estão relacionados à crise financeira global seguida da recuperação econômica ocorridas no período. Apesar da redução, o número de indivíduos que sofrem com algum tipo de deficiência nutricional no mundo continua inaceitavelmente alto, especialmente em países pobres e em desenvolvimento.

No Brasil, ainda que nos últimos anos os dados epidemiológicos apontem o decréscimo da prevalência de subnutrição, a persistência de doenças parasitárias e infecciosas - que estão associadas à subnutrição, entre as cinco primeiras causas de óbito - e a ocorrência de altas taxas de mortalidade hospitalar por subnutrição, indicam que esta continua sendo importante nas estatísticas de morbidade e mortalidade no país (BITTENCOURT et al., 2009).

Assim, as deficiências nutricionais persistem como um dos principais problemas de saúde pública mundial, que afeta principalmente faixas etárias mais suscetíveis, como lactentes e crianças em períodos críticos de desenvolvimento, resultando em alterações morfológicas, comportamentais e cognitivas (LEVITSKY; STREEP, 1995).

Além de representar uma relação *causa-mortis*, os distúrbios nutricionais podem também resultar em diferentes anormalidades sistêmicas no organismo. Assim, são amplamente estudados e reconhecidos os aspectos derivados da subnutrição proteico-calórica, incluindo os tipos severos denominados marasmo e

kwashiorkor; bem como algumas deficiências de micronutrientes, como as de ferro (anemias), de vitaminas e de iodo (KHAN et al., 2010).

Não há consenso a respeito da nomenclatura e dos conceitos relacionados às alterações do estado nutricional. A FAO/OMS (2006) define a subnutrição como sendo o estado das pessoas cuja alimentação fornece menos nutrientes do que a quantidade mínima requerida para manter o peso do corpo constante. Por sua vez, a desnutrição é o resultado de uma insuficiente e prolongada ingestão de alimentos e/ou de uma baixa absorção dos alimentos consumidos, geralmente aplicada a deficiências de energia (ou de proteínas e energia) ou de vitaminas e minerais, que podem ser provocadas pela incapacidade de manter as reservas destes nutrientes no organismo.

Com base nessas duas definições, concluiu-se que o conceito de subnutrição é o mais adequado para descrever a privação de nutriente – no caso em questão, a proteica – a que os ratos foram submetidos na presente pesquisa.

2.2 A SUBNUTRIÇÃO, A RENTRIÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO

Eventos biológicos complexos e dinâmicos caracterizam a odontogênese, um processo de desenvolvimento dos tecidos dentários que culmina com a formação completa do dente. Tais eventos envolvem uma série de interações indutivas entre célula-célula, célula-matriz e moléculas sinalizadoras, que, por sua vez, levam á subseqüentes etapas de histo/morfodiferenciação, progredindo até a formação dos tecidos constituintes dos dentes (esmalte, dentina e polpa dentária). Por tratar-se de um período crítico, é fundamental que nestas etapas as condições metabólicas e orgânicas sejam fisiologicamente adequadas, a fim de se garantir o padrão morfológico e funcional do órgão dentário (SAXÉN et al., 1976; TEN CATE, 2001; NADIRI et al., 2005).

Os dentes começam a se formar ainda no período intrauterino, mas o processo de desenvolvimento é contínuo, o que significa que distúrbios durante a odontogênese irão refletir como defeitos permanentes no dente erupcionado (KIEDORF et al., 2005).

Fatores endógenos e exógenos são capazes de modificar determinadas fases da odontogênese, como a fase de iniciação e as do crescimento do estágio de botão do dente, que envolvem a proliferação e a histodiferenciação. Além disso, podem estimular com diferentes intensidades os processos de aposição de dentina e esmalte (MACIEJEWSKA et al., 2000).

Dentre os fatores exógenos, é amplamente reconhecido que a ingestão nutricional e os hábitos alimentares afetam a integridade estrutural das dentições decídua e permanente. E, ainda, que a ingestão adequada de calorias e proteínas, bem como de vitamina A, C e D, de cálcio e de fósforo, são essenciais para a formação dentária (LIGH et al., 2011).

Sobre a vitamina A, sabe-se que sua ausência é capaz de provocar disfunções na morfogênese dentária e um decréscimo da diferenciação dos odontoblastos (ALVAREZ et al., 1993). Por sua vez, a deficiência de vitamina C é relacionada com diminuição da síntese de colágeno, e, ainda, com a inibição da odontogênese *in vitro* causada por uma desdiferenciação dos odontoblastos, com consequente interrupção na formação de dentina (OGAWARA et al., 1997).

Já a vitamina D, por estar relacionada ao metabolismo do cálcio e do fosfato, quando ausente, resulta em distúrbios na mineralização dos tecidos duros, incluindo ossos, esmalte e dentina. Stewart et al. (1982), demonstraram em ratos que receberam uma dieta com vitamina D insuficiente, uma camada de pré-dentina com uma larga extensão, bem como uma desorganização dos odontoblastos.

Diorio et al. (1973), estudando filhotes de ratos mal nutridos, encontrou discrepâncias de tamanho dos dentes e retardo na erupção dos mesmos, quando comparados a grupo controle adequadamente nutrido. A subnutrição proteica pré-natal também foi associada com a diminuição dos germes de incisivos e molares de ratos subnutridos, e presença de menor quantidade de células em ambos (NAKAMOTO et al., 1982).

Mais recentemente, Gonçalves et al. (2009), estudando os efeitos da subnutrição em molares de ratos observaram algumas alterações no complexo dentina-polpa e também no periodonto. Assim, o grupo subnutrido apresentou baixa densidade celular, camada odontoblástica sem disposição característica em paliçada, predomínio de fibras colágenas do tipo III e área seccional sagital da dentina 30% menor do que o grupo controle (nutrido).

As pesquisas atentam, ainda, para outras alterações dentárias causadas pela subnutrição, cujos efeitos podem ser correlacionados a uma maior suscetibilidade à cárie dentária. Rugg-Gunn (1993) relatou essa problemática, e ainda a estreita relação existente entre tipo de dieta, a erupção e os aspectos dentários estruturais. Aponte-Merced e Navia (1980) verificaram um aumento da solubilidade ácida do esmalte nos molares de filhotes de ratas lactantes, tratadas com dieta proteico-calórica deficiente.

Por sua vez, Alvarez et al. (1993) em um estudo longitudinal, demonstraram a possibilidade de um único episódio de subnutrição moderada em crianças, ocorrida durante o desenvolvimento da dentição primária, ser capaz de aumentar a incidência de cáries dentárias em períodos posteriores, possivelmente como consequência de um efeito deletério sobre a formação do esmalte. Em um estudo anterior associaram, ainda, a má nutrição crônica com o atraso na esfoliação de dentes decíduos (1988).

Huomonen e Larmas (2005), investigando os efeitos causados pela deficiência de proteínas e sacarose na formação e mineralização da dentina, bem como a prevalência de cáries em molares de ratos, observaram que o déficit proteico associado ou não a sacarose, reduziu a formação de dentina, ao mesmo tempo em que protegeu o dente contra cáries dentinárias, mesmo em ambiente altamente cariogênico.

Já Menaker et al. (1973), avaliando separadamente os efeitos da caloria e da proteína no desenvolvimento dentário quanto à suscetibilidade à cárie, concluiu que os efeitos adversos da má nutrição podem ser superados pela adição de proteína, exclusivamente, sendo assim, revertidos mediante a renutrição.

2.3 MORFOLOGIA E DINÂMICA DA POLPA DENTÁRIA

A polpa dentária é definida como um tecido conjuntivo frouxo, originado da papila dentária do órgão do esmalte com funções relacionadas à nutrição, sensibilidade, defesa e reparação do dente. Como em qualquer outro tecido conjuntivo do corpo, os principais componentes do tecido pulpar podem ser divididos em três classes: células, fibras e substância fundamental. Os fibroblastos são as

células locais mais comuns, envolvidas na síntese dos componentes fibrosos do próprio tecido e na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Outra característica é a presença de quantidade abundante de matriz extracelular (MEC), que além de propiciar um meio através do qual nutrientes e catabólicos são trocados entre as células e o sangue, apresentam proteínas fibrosas, na sua maioria, colágeno. As proteínas colágenas formam fibras, principalmente dos tipos I e III, que são em parte responsáveis pela sustentação do tecido (TEN CATE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Além de desempenhar uma evidente função estrutural, a grande variedade de moléculas do tecido conjuntivo desempenha importantes papéis biológicos, como, por exemplo, o de reserva para muitos hormônios que controlam o crescimento e a diferenciação celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Um aspecto distinto da polpa dentária diz respeito à presença dos odontoblastos, tipos celulares responsáveis pela deposição de matriz orgânica de dentina, tecido mineralizado que a rodeia e com o qual a polpa mantém uma estreita relação topográfica, embriológica e funcional. Tal relação faz com que ambos os tecidos sejam denominados por um único termo: complexo dentina-polpa (TEN CATE, 2001).

Além disso, é amplamente reconhecida a presença de células indiferenciadas no tecido pulpar, as quais permanecem mesmo em dentes completamente formados. Isso faz com que a polpa mantenha não só a sua capacidade indutora e formativa durante toda a vida, como forma de proteção frente a possíveis estímulos agressores, como também uma forte semelhança com o tecido conjuntivo embrionário (ZHANG et al., 2008; FENG et al., 2010). No entanto, apesar do potencial para regeneração e reparo ser muito mais uma realidade na polpa do que em outros tecidos conjuntivos do corpo, o bom desempenho dessa função parece depender de muitos fatores (COHEN; BURNS, 2000).

Pesquisas recentes envolvendo técnicas moleculares têm alcançado o isolamento de células altamente proliferativas derivadas da polpa dentária, constatando a multipotencialidade das mesmas e considerando-as similares às encontradas no cordão umbilical. De acordo com Miura et al. (2003), as SHED (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) são capazes de se diferenciar em odontoblastos maduros, células neurais e adipócitos, podendo ainda, após transplantação *in vivo*, estimular a osteogênese.

Diante de todos esses aspectos relacionados, Bath-Balogh e Fehreback (2008) afirmam que tanto em condições normais como após injúrias, a vitalidade do complexo dentina-polpa está na dependência de mecanismos de sinalização que regulam o comportamento de suas células. Nesse contexto, os fatores de crescimento desempenham um papel fundamental na sinalização de eventos de formação e reparo tecidual do complexo dentina-polpa. A utilização e o domínio desses fatores de crescimento podem constituir-se em oportunidades animadoras para o estabelecimento de protocolos biológicos que levem ao reparo do tecido dentário bem como, por meio da bioengenharia, a um manual que codifique os tecidos do dente. Essas novas metodologias oferecem um potencial significativo para a realização de ajustes necessários ao alcance de uma conduta clínica, que possibilite a cura de doenças do dente e a manutenção de sua vitalidade.

2.4 O EPITÉLIO JUNCIONAL

O epitélio juncional, juntamente com o epitélio sulcular, formam a junção dentogengival, ou seja, a união entre a superfície do dente e os tecidos gengivais. Mais especificamente, o epitélio juncional é um tecido derivado do epitélio reduzido do órgão do esmalte, que reveste o fundo do sulco gengival e insere-se na superfície do dente por meio da aderência epitelial (BATH-BALOGH; FEHREBACH, 2008). É um tecido localizado em uma interface de importância estratégica entre o sulco gengival, o periodonto de proteção e os tecidos mineralizados, que precisam ser protegidos de periodontopatógenos. Sua adaptação estrutural e funcional permite um constante controle microbiológico (BOSSHARDT; LANG, 2005).

Além disso, trata-se de um epitélio delgado, porém altamente elástico, de forma a resistir aos esforços mastigatórios. Apresenta uma espessura variável, tendo de 2 a 30 camadas de células, mas as poucas camadas presentes desde a camada basal até a camada suprabasal, diferente de outros tecidos gengivais, não exibem alterações na aparência celular relativas à maturação. Ou seja, suas células não amadurecem para constituir uma camada granulosa ou intermediária. Portanto, o epitélio juncional não se constitui em um epitélio queratinizado, tampouco em um tecido não queratinizado. Seu limite com a lâmina própria é relativamente liso, sem

interdigitações epiteliais ou papilas conjuntivas. Sua taxa de renovação celular é alta, indicando tratar-se de um tecido não diferenciado. Apesar disso, suas células apresentam diversas organelas citoplasmáticas tais como: retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de golgi, sugerindo um intenso metabolismo (BATH-BALOGH; FEHREBACH, 2008).

Assim como ocorre em outros epitélios, este também se encontra apoiado sobre um tecido conjuntivo que o nutre e permite sua aderência às estruturas subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Embora tanto sua estrutura quanto sua função sejam influenciadas pela lâmina basal e pelo contato com os substratos sólidos (esmalte, dentina e/ou cimento), o mecanismo exato que leva à sua formação e regeneração, permanece indefinido (NISHIO et al., 2010).

Tem sido descrito em mamíferos, que as células epiteliais são funcionalmente prejudicadas na deficiência de diferentes substâncias, como a vitamina A, que segundo Reifen et al. (1998), provavelmente está associada à diminuição nos processos de sua diferenciação.

Tongue e Mccance (1965) avaliaram os efeitos da subnutrição nas gengivas de ratos, com o intuito de correlacionar os efeitos de sua reabilitação com as dos tecidos dentários. Verificaram que as membranas mucosas dos animais controle apresentaram camada delgada de queratina, mas com cobertura completa, sem quaisquer sinais de formação de paraqueratina. Já os animais subnutridos, demonstraram gengivas mais desenvolvidas, com camada de queratina espessa e evidências de paraqueratina.

Embora alguns relatos na literatura demonstrem aspectos estruturais da mucosa oral relacionados à etiologia nutricional, (NAKAMOTO et al., 1982; OHARA et al., 1995; BOLDRINI et al., 1998); raros são os estudos sobre os efeitos da subnutrição nos tecidos moles da cavidade oral, particularmente nos tecidos de proteção do dente, incluindo o epitélio juncional.

2.5 O SISTEMA IGF E A CONDIÇÃO NUTRICIONAL

Em diversos tecidos, os fatores de crescimento têm sido apontados como elementos fundamentais no desenvolvimento embrionário e em funções fisiológicas específicas. A presença de fatores de crescimento e de seus receptores e suas diferentes expressões em vários estágios de desenvolvimento sugerem que esses peptídeos promotores de crescimento estão envolvidos na regulação de eventos morfogenéticos e de diferenciação (PARTANEN; THESLEFF, 1989).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina são uma família de polipeptídeos envolvidos no controle do crescimento, no metabolismo e na manutenção das funções de diferenciação em diversos tecidos (LeROITH et al., 2003). Existem evidências crescentes de que seus elementos desempenham um papel importante na biologia dos tecidos orais, incluindo o seu desenvolvimento, homeostase e regeneração (WERNER; KATZ, 2004).

O sistema IGF inclui 3 ligantes: a insulina e um par de peptídeos denominados IGF-I e IGF-II, cujas moléculas apresentam uma sequência marcante de aminoácidos, estruturalmente semelhantes à pró-insulina humana (MERCOLA; STILES, 1988).

Além disso, os IGFs I e II, diferentemente dos demais hormônios proteicos, encontram-se na circulação e no espaço extracelular em associação com uma família de 6 proteínas transportadoras denominadas IGFBPs, cada qual apresentando reguladores distintos. Além desses componentes, os IGFs podem ligar-se a, pelo menos, dois tipos de receptores de IGF, bem como ao receptor de insulina, porém com afinidades diferentes (KING; KAHN, 1985).

Os receptores de insulina (IR) e os receptores de IGF tipo I (IGF-IR) são receptores do tipo tirosina-quinase e dividem uma homologia de mais de 50% entre si. Como resultado das heterogeneidades estruturais, existem diferenças na fosforilação da tirosina, e consequentemente nos efeitos biológicos. O IGF-IR modula, primariamente, efeitos mitogênicos, agindo como um fator de progressão, enquanto o IR está relacionado a efeitos metabólicos. Diferenças na sinalização entre os dois receptores também podem ocorrer devido a: diferenças de distribuição dos receptores em tipos celulares distintos, ativação de receptores, taxa de

internalização e transdução de sinal intracelular (Le ROITH et al., 1994; BACK et al., 2011) (Figura 1).

Figura 1 – Componentes estruturais do sistema IGF. O sistema IGF é constituído de 3 peptídeos (insulina, IGF-I e IGF-II), 3 receptores (IR, IGF-IR e IGF-IIR) e de até 6 proteínas ligantes (IGFBP1-6). Adaptado de WERNER, H.; KATZ, J. The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology. *Journal of Dental Research*, v.83, n.11,p. 833, 2004.

Os receptores de IGF tipo I (IGF-IR) e tipo II (IGF-IIR) são bastante dinâmicos, e as concentrações séricas de seus ligantes também podem variar na dependência de alguns fatores, tais como: estado nutricional, presença de doenças crônicas, fatores inflamatórios, excesso ou deficiência de outros hormônios, utilização de determinadas medicações, etc. (HOUSTON et al., 2005). Dentre esses fatores, a nutrição é o principal regulador da circulação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina do tipo I (IGF-I).

Segundo McDonald et al. (2007) o sistema IGF é altamente sintonizado com a disponibilidade de nutrientes, o que garante que o crescimento seja adequado ao seu fornecimento. Para Houston et al. (2005), além do estado nutricional, outros fatores regulam a biossíntese de IGF-I, dentre eles o próprio hormônio do crescimento (GH) e a insulina.

Donovan et al. (1991), analisando os efeitos da subnutrição no soro de ratos neonatos, através de uma restrição da amamentação, observaram redução significativa dos níveis de IGF-I e II após o 12º dia pós-natal, e, posteriormente com a renutrição, uma elevação dos mesmos, acompanhada por uma tendência à normalização dos perfis de IGFBP. Concluíram que IGFs e IGFBPs são diferencialmente regulados durante a subnutrição neonatal, e que a diminuição do IGF e indução de IGFBP-1 e 2 podem prever mecanismos de proteção, por inibirem o crescimento durante a subnutrição.

Alguns estudos imunohistoquímicos em ratos mostram marcações em células odontoblásticas e ameloblásticas em níveis variados, de acordo com o estágio da odontogênese, sugerindo que os IGFs participam na formação e mineralização dos tecidos dentários (CASASCO et al., 1996; JOSEPH et al., 1996).

Assim, investigações detalhadas realizadas em tecidos dentários, como as de Werner et al. (2005), demonstraram a ocorrência e localização dos componentes do sistema IGF, incluindo os ligantes IGF-I e -II, o receptor de IGF (IGF-IR) e as seis proteínas ligantes de IGF (IGFBP-1 a -6). Verificaram que após a indução de movimento dos dentes humanos permanentes, e durante os processos reparativos posteriores a remoção da força de indução, ocorriam marcações na matriz extracelular do ligamento periodontal aderido para IGF-I, -II e IGFBP-I e -6. Já na polpa dentária, principalmente em áreas fibróticas e áreas ao redor da dentina, observaram imunomarcações para IGF-I, IGFBP-I, -3, -5 e 6, sugerindo que, nesse

tecido, o sistema IGF pode estar envolvido com os processos de diferenciação dos odontoblastos, e conseqüentemente, com a formação de dentina e fibrose.

3 PROPOSIÇÃO

Dada à ampla literatura, baseada predominantemente em modelos de experimentação animal, que demonstra a correlação entre subnutrição e consequências estruturais e fisiológicas em diferentes tecidos, sistemas e órgãos, bem como o importante papel da insulina e do sistema IGF-I nestes processos, este trabalho teve o propósito de reconhecer os possíveis efeitos da subnutrição proteica em dois tecidos fundamentais na integridade e manutenção do órgão dentário: a polpa dentária e o epitélio juncional. Para isso, comparou-se nos diferentes grupos experimentais, a partir de um estudo morfológico e imunohistoquímico, os seguintes parâmetros:

1. Os componentes celulares presentes na polpa dentária e no epitélio juncional do periodonto;
2. O componente colágeno presente no arcabouço conjuntivo da polpa dentária e no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional;
3. O número de células reativas ao IGF-I e ao seu receptor (IGF-IR) na polpa dentária e no epitélio juncional;
4. O número de células reativas à Insulina (I) e ao seu receptor (IR), na polpa dentária e no epitélio juncional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção compreende a descrição detalhada, em ordem cronológica, da metodologia aplicada na presente pesquisa.

4.1 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a formação dos grupos experimentais foram utilizados ratos jovens, machos e fêmeas, da linhagem wistar (*Rattus norvegicus*), com peso entre 280 e 320 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, dispostas em estante vertical em salas climatizadas com temperatura controlada entre 21 e 24° C de maneira artificial e com ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 horas, no biotério do Departamento de Anatomia do mesmo instituto.

Primeiramente, todos os ratos passaram por um período de adaptação de 7 dias ao novo ambiente, no qual foram mantidos separados machos de fêmeas. Para que ocorresse o acasalamento, 1 macho foi mantido com 2 fêmeas (sistema poligâmico) durante um período 7 a 10 dias. Ao longo de todo o experimento, os animais foram mantidos, sem restrição, com uma dieta para roedores (AIN-93G), que segue as especificações do protocolo preconizado pelo “American Institute of Nutrition” (REEVES et al., 1993), preparada em laboratório especializado (Rhooster®).

Ao iniciar o período do acasalamento, alguns animais receberam ração denominada normoproteica contendo 20% de caseína e outros, ração hipoproteica, com apenas 5% de caseína. Findo este período, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais e continuaram recebendo as respectivas rações durante toda gestação e lactação. Logo após o nascimento da prole, as ninhadas foram reduzidas a seis animais, procurando-se manter o maior número de machos, gênero eleito com o objetivo de se evitar a variável sexual dimórfica. Além disso, foram desprezadas no caso do grupo S, ninhadas cujas mães comeram os filhotes. Ao atingirem 21 dias de

vida, época determinada para o desmame, os filhotes passaram a ser monitorados em gaiolas metabólicas individuais até atingirem a idade de 60 dias de vida, constituindo-se, assim, os grupos nutrido (N) – animais que receberam a ração normoproteica – e subnutridos (S) aqueles que receberam a ração hipoproteica. Para a formação do grupo de animais renutridos (R), animais mantidos com a ração hipoproteica até o 21º dia, passaram a receber, a partir do 22º dia, a ração normoproteica até que atingissem 60 dias de vida. Tal período foi estabelecido por corresponder, segundo Viau et al. (2005), à fase púbere do rato (Figura 2).

Figura 2 – Esquema de formação dos grupos experimentais de acordo com a dieta oferecida. N: animais do grupo nutrido; S: animais do grupo subnutrido; R: animais do grupo renutrido.

Os espécimes foram obtidos de um “pool” de animais utilizados em diferentes pesquisas no Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC). Como dito anteriormente, os animais dos grupos N e S, a partir do 22º dia, passaram a ocupar as gaiolas metabólicas, onde ocorreu também a formação dos animais do grupo R. Vinte e quatro gaiolas metabólicas foram utilizadas para o desenvolvimento dessa etapa (Figura 3).

Figura 3 – Gaiolas metabólicas. **A:** Paramento correto para o trabalho no Biotério (Dep. De Anatomia – ICB/USP); **B:** Estante com 12 gaiolas metabólicas, contendo tubo coletor de fezes e urina separadamente, bem como bebedouro e comedouro. **C:** Espaço destinado ao animal de acordo com os princípios da Comissão de Ética do ICB; **D:** Gaiola com a marcação (M7). Observar o comedouro e junto ao bebedouro o coletor de desperdício, bem como os coletores individuais de fezes e urina; **E:** Balança em ajuste com o recipiente que irá ser utilizado na pesagem do animal, para então desconsiderá-lo. **F:** Pesagem do animal. **G:** Pesagem do comedouro assim que é preenchido com a ração apropriada. Observe que há uma subdivisão no recipiente destinada a captação do desperdício enquanto o animal se alimenta. **H:** Comedouro em posição na gaiola metabólica. Observe o desperdício que foi armazenado no recipiente anterior. **I:** Pesagem do comedouro depois de 1 dia. A diferença entre os valores obtidos antes da alimentação e depois de um dia de alimentação, dá a informação de quanto o animal ingeriu de ração (em gramas). **J:** Bebedouro graduado em mililitros. **K:** Bebedouro em posição e coletor do desperdício da ingestão de água coletado. A soma dá a informação de quanta água o animal ingeriu durante o dia de experimento. **L:** Parte inferior da gaiola contendo os recipientes separados para a coleta da excreção, tanto sólida como líquida, durante o dia de experimento. **M:** Detalhe do mecanismo de separação entre o sólido e o líquido. Como o líquido excretado em pequenas quantidades se mantém pela propriedade da tensão superficial preso às paredes do funil presente no compartimento inferior da gaiola, pode ser então separado por um condutor que leva a urina até um recipiente diferente daquele que coleta as fezes que caem em “linha reta” no recipiente central. **N:** Pastas de controle. **O:** Detalhes dos registros tomados diariamente através das gaiolas metabólicas

A

B

C

D

E

F

G

H

I

J

K

L

M

N

GRUPO R Nêutro A Animal 3									
Dia do experimento	Data	Hora	Massa corporal (g)	Cação antes (g)	Cação depois (g)	(9) CAUDA Vermelha			Observações
						Água antes (ml)	Água depois (ml)	Volume de urina (ml)	
1	13/06	11:50	13,06	44,05	43,32	200	195		Urina < 2ml
2	14/07	12:30	14,90	44,37	44,07	190	189		Urina < 2ml (pouco)
3	15/07	12:00	16,45	48,70	45,60	177	169		Urina < 2ml (pouco)
4	16/07	12:00	17,23	49,43	45,20	360		2	
5	17/07	12:00	18,32	49,42					

O

4.2 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Aos 60 dias de vida, todos os animais de cada grupo (N, S, R) foram submetidos à eutanásia em câmara de dióxido de carbono (CO₂) e tiveram toda a maxila imediata e cuidadosamente retirada em bloco único contendo a sutura palatina mediana e os dentes superiores com suas estruturas de suporte.

Os blocos foram então mantidos por um período de 48 horas, em frascos individuais contendo solução fixadora de formaldeído (4%) tamponada e, após lavagem em água corrente por 24 horas, foram imersos em solução desmineralizadora de EDTA (etileno-diamino-tetra-acetatodissódico), 0,5 M tamponado em pH básico (7,0 - 7,4), por um período máximo de 4 semanas. Durante essa fase, as peças permaneceram em frascos contendo quantidade de EDTA equivalente a 20 vezes o seu volume, renovada a cada 72 horas, com o objetivo de preservar a matriz orgânica durante todo o processo. Após a descalcificação (confirmada com a utilização de solução de oxalato de amônia a 5%), os espécimes foram desidratados em solução crescente de álcoois (70% ao absoluto), diafanizadas em xilol e incluídas rotineiramente em parafina. Cortes semi-seriados de 5µm foram obtidos perpendicularmente ao eixo da sutura palatina mediana, no sentido corono-radicular.

Após permanecerem em estufa, em posição vertical, por 24 horas a 60° C para aderência do material, as lâminas foram submetidas às técnicas histológicas e imunohistoquímicas descritas a seguir.

4.3 HISTOLOGIA

Três lâminas (contendo 10 cortes cada) de três animais de cada grupo (N, S, R) foram submetidas às seguintes colorações: Hematoxilina-eosina, para o estudo morfológico geral; Azo-carmim, para evidenciação dos componentes celulares presentes na polpa dentária e Picro-sírius, para detecção, sob luz polarizada, dos tipos de fibras colágenas presentes no tecido pulpar (JUNQUEIRA et al., 1979).

Todos os cortes foram observados, avaliados e fotografados em um sistema de aquisição de imagens realizada por meio de software devidamente calibrado e câmera acoplada ao microscópio de luz (Axioscop/Axiocam/Axiovision, Zeiss/FAPESP 06-56045-9) do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC), do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O IGF-I, INSULINA E SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES (IGF-IR E IR).

De cada um dos três animais de cada grupo (N, S, R), três lâminas contendo 10 cortes foram submetidas à técnica de evidenciação da imunorreatividade ao IGF-I, receptor de IGF-I (IGF-IR), Insulina (I) e receptor de insulina (IR), na polpa dentária e no epitélio juncional.

Para isso, os cortes histológicos foram submetidos à diafanização em xilol absoluto por 2 minutos e passagem em série decrescente de etanol (desde o absoluto até 50° - 2 minutos cada). Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada (5 minutos) e expostos por 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% diluída em metanol 100% e lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 minutos. Seguiu-se a incubação dos cortes em soro normal de cabra, na proporção de 1:5 em PBS à temperatura ambiente por 30 minutos. Os espécimes assim tratados receberam outra lavagem em PBS 10% (3x10 minutos) e com os cortes já secos, procedeu-se à incubação com o anticorpo primário policlonal de coelho por 2 horas, que foi específico para cada técnica.

Para a marcação da insulina e de seu receptor foram usados, respectivamente, os anticorpos insulin (H-86) e insulin R β . Já para a marcação do IGF-I e IGF-IR, foram utilizados respectivamente os anticorpos, IGF-I (H-70) e IGF-IR β (H-60). A diluição considerada a mais adequada para todos foi a de 1: 250, determinada por prévia titulação.

Após este período, todos os cortes foram lavados em PBS (4x de 10 minutos) e incubados com anticorpo secundário de cabra (anti-mouse IgG biotinilado) diluído em PBS, durante 30 minutos. Posteriormente foram lavados com solução de Triton a

0,01% diluído em tampão fosfato. Os cortes foram então cobertos com solução refrigerada de Vectain ABC, preparado com 30 minutos de antecedência. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos. Então, foram submetidos à revelação com o cromógeno DAB (Vector Laboratories) por 8 minutos.

Finalmente, todos os fragmentos foram lavados em água destilada por 5 minutos, desidratados em graduação crescente de álcoois (70%, 95% e 100%, 2 minutos cada) e diafanizados em xilol por 2 minutos. As lâminas foram então montadas com lamínula e entelan.

Todas as reações foram acompanhadas por uma ou mais lâminas controle, submetidas a todas as etapas do procedimento suprimindo-se, entretanto, a aplicação do anticorpo primário. A documentação foi obtida no mesmo sistema de aquisição de imagens descrito no item anterior.

4.5 MORFOMETRIA

Os métodos morfométricos descritos por Mandarin-de-Lacerda (1995) foram utilizados para a avaliação quantitativa das estruturas presentes na polpa dentária e no epitélio juncional. Em primeiro lugar, foram selecionados cinco campos de diferentes cortes histológicos de cada grupo animal (N, S e R), tanto da polpa dentária quanto do epitélio juncional. Os campos foram escolhidos em intervalos regulares, com a finalidade de tornar a amostra mais homogênea. Após a aquisição das imagens, procedeu-se à contagem do número de células coradas em HE e números de células sensibilizadas pelo IGF-I, Insulina e seus respectivos receptores presentes nos dois tecidos estudados. Para a realização da contagem foi elaborado um sistema teste retangular, contendo pontos e medindo 24x18 cm, com 475 pontos equidistantes a 1,0 cm. Este sistema foi posicionado frente ao monitor do computador de modo a cobrir totalmente a área das imagens. Dessa forma, contaram-se os pontos que coincidiram localmente com a presença de núcleos corados de células pulpares em HE (Figura 4), e de imunomarcações, no caso do IGF-I, IR, I e IR. As contagens foram realizadas por um único observador e os dados fornecidos – expressos como pontos sobre estruturas – foram analisados como descrito no item a seguir.

Figura 4 – Técnica morfométrica com uso do sistema teste. Esse sistema foi utilizado para obtenção do número de células coradas em HE e também daquelas que expressaram IGF-I, Insulina e seus receptores nos cortes submetidos à técnica imunohistoquímica. Observar o ponto contado sobreposto a um núcleo corado de célula pulpar (círculo azul). (HE 100x)

4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos através do método morfométrico foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com fator 1 (grupo), comparando os grupos N, S e R. Em caso de detecção de efeitos significativos ($p < 0,05$), prosseguiu-se a análise com comparações múltiplas pelo método de Tukey. A fim de se determinar variações entre as amostras também foi calculado o desvio padrão.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos são descritos ordenadamente nos seguintes tópicos: aspectos qualitativos e aspectos quantitativos.

5.1 ASPECTOS QUALITATIVOS

Neste item serão descritos em todos os grupos (N, S e R), os resultados referentes à análise sob microscopia de luz dos seguintes aspectos: generalidades da estrutura dentária; padrão morfológico do tecido pulpar; padrão morfológico do epitélio juncional.

5.1.1 Generalidades da estrutura dentária

Verificou-se que a dentina era espessa na região da coroa, tornando-se delgada a partir do colo, em direção à raiz dentária. Subjacente à dentina, observou-se nitidamente a presença da camada odontoblástica de espessura variável de acordo com a região do dente. A polpa dentária apresentou-se como um tecido de coloração mais clara que a camada odontoblástica e rico em vasos sanguíneos. O epitélio gengival revestindo a papila gengival, bem como o sulco gengival foram verificados em todos os grupos, sem alterações aparentes (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura dentária de rato wistar. Notar, além das estruturas assinaladas, a papila e os epitélios gengivais (Azo-carmim- Aumento 5x)

5.1.2 Padrão morfológico do tecido pulpar

As figuras 6 e 7 ilustram o aspecto morfológico do tecido pulpar. Desta forma, observam-se a presença de aglomerados intensamente corados em vermelho que correspondem aos elementos vasculares da polpa, bem como a distribuição característica “em paliçada” das células odontoblásticas.

Figura 6 – Camada odontoblástica (*), e a presença de elementos vasculares da polpa dentária (setas). (Azo-carmim; Aumento 40x)

Figura 7 – Extensão das células odontoblásticas caracteristicamente distribuídas em paliçada. (Azo-carmim; Aumento 100x)

Algumas características da periferia da polpa dentária comparativas entre os grupos N, S e R e evidenciadas nos cortes histológicos submetidos à coloração de HE, estão representadas na figura 8.

Figura 8 – Microscopia de luz. Coloração pelo método de HE. Aspectos estruturais da periferia da polpa dentária dos animais dos grupos: nutrido (A), subnutrido (B) e renutrido (C). Objetiva de 100x. Barra de calibração: 10 μ m.

Assim, no grupo N os odontoblastos apresentaram-se densamente arranjados na periferia, ou seja, subjacente à dentina (camada odontoblástica), ao passo que no grupo S eles estavam mais esparsamente distribuídos, evidenciando que a subnutrição ocorrida no período púbere comprometeu a estrutura do tecido pulpar. Muito embora tenha sido notada uma tendência a um maior adensamento celular nos animais do grupo R, a recuperação proteica durante o período estudado, não foi suficiente para restabelecer as características verificadas para o grupo N.

Relativamente às fibras colágenas, na polpa dentária dos animais do grupo N, ainda que tenha ocorrido um predomínio de fibras colágenas do tipo III evidenciadas na cor verde, correspondentes a um colágeno recém-depositado na matriz extracelular, também foi verificada uma quantidade expressiva de fibras do tipo I, destacadas nas cores amarelo, vermelha e laranja, características de fibras maduras. Tal fato sugere-nos que a produção de fibras colágenas mantenha-se dinâmica na matriz dentinária em condições normais (grupo N), mas que tal atividade parece estar comprometida pela subnutrição nos grupos S e R, já que nestes grupos observa-se a predominância do colágeno III, indicando que a subnutrição impediu a maturação das fibras nos tecidos destes animais e que a retomada nutricional não foi suficiente para restabelecer adequadamente o seu padrão morfológico (Figura 9).

Figura 9 – Fotomicrografia da polpa dentária dos animais dos grupos nutrido (A), subnutrido (B) e renutrido (C). Notar a predominância das fibras colágenas do tipo I (vermelho, laranja, amarelo) nos animais nutridos. As fibras colágenas do tipo III (verde) são características dos grupos subnutrido e renutrido. (Picro-sírius sob luz polarizada 40x. Barra de calibração: 10 μ m)

5.1.3 Padrão morfológico do epitélio juncional

Figura 10 – Microscopia de luz. Coloração pelo método de HE. Características estruturais do epitélio juncional dos animais dos grupos nutrido (A e D), subnutrido (B e E) e renutrido (C e F). Notar as diferenças quanto aos aspectos das células e das camadas nos animais nutridos comparados ao subnutridos e renutridos. Aumento 100x. Barra de calibração: 10μm.

Os resultados referentes ao estudo histológico do epitélio juncional pela técnica de HE nos ratos do grupo N, demonstraram a presença de um típico epitélio pavimentoso estratificado, ocorrendo variação do formato das células de acordo com a camada. Assim, na camada mais profunda, próxima à membrana basal, as células apresentam-se de forma cúbica ou cilíndrica. Acima desta, pode-se observar outras camadas de células poliédricas irregulares que, à medida que vão se aproximando da superfície livre, tornam-se cada vez mais achatadas, até que as camadas superficiais constituem-se em pavimentosas e delgadas.

Já nos animais do grupo S observa-se um padrão distinto, sendo ausentes as células do tipo cúbica ou cilíndrica na camada basal. Contudo, há predomínio de células delgadas, achatadas ou afiladas, com aparência de estruturas sem vitalidade em todas as suas camadas. Tal aspecto torna toda a extensão do epitélio muito semelhante a uma camada superficial ou camada córnea propriamente dita.

Os animais do grupo R, por sua vez, apresentaram os dois tipos morfológicos de epitélio acima descritos, alternando ora regiões semelhantes aos animais do grupo N, ora regiões semelhantes aos animais do grupo S (Figura 10).

Figura 11- Microscopia de luz polarizada. Coloração pelo método do picro-sírius. Detecção de fibras colágenas no tecido conjuntivo que sustenta o epitélio juncional dos animais dos grupos nutrido (A), subnutrido (B) e renutrido (C). Notar a predominância das fibras colágenas do tipo I (vermelho, laranja, amarelo) principalmente em A e C e fibras colágenas do tipo III (verde), mais evidentes em B. Objetiva de 40x. Barra de calibração: 10 μ m

No tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional, os cortes corados pelo método de picro-sírius (Figura 11) demonstraram em todos os grupos (N, S e R) a presença de fibras colágenas do tipo I, onde as fibras apresentam

birrefringência de cores amarela, vermelha e laranja, além de fibras do tipo III, evidenciadas na cor verde. Entretanto, a densidade não foi a mesma, uma vez que nos animais dos grupo N (A) predominaram as fibras colágenas do tipo I. Já nos animais do grupo S (B) ocorreu um nítido predomínio das fibras do tipo III; um relativo equilíbrio entre as fibras colágenas dos tipos I e III foi observado nos animais do grupo R (C).

5.2 ASPECTOS QUANTITATIVOS

Nesse item serão descritos os resultados referentes aos cortes submetidos à reação de imunohistoquímica e analisados através da morfometria.

5.2.1 Polpa dentária

5.2.1.1 Relativos à expressão do IGF-I e do IGF-IR

A figura 12 ilustra as células da polpa dentária sensibilizadas pelo IGF-I e pelo IGF-IR.

Figura 12 – Fotomicrografia de cortes histológicos da polpa dentária demonstrando células sensibilizadas (setas) pelo IGF-I (A) e pelo receptor IGF-IR (B). Aumento 100x

Os valores das porcentagens médias ($\pm$ Desvio Padrão) referentes à expressão do IGF-I e do IGF-IR de todos os grupos, encontram-se expressos na tabela 1 e gráficos 1 e 2.

Tabela 1 – Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica do IGF-I e IGF-IR, na polpa dentária dos grupos Nutrido (N), Subnutrido (S) e Renutrido (R). (Média $\pm$ DP).

Técnicas	N	S	R
IGF-I	78,4 $\pm$ 5,4*	65,3 $\pm$ 2,5*	61,9 $\pm$ 7,2
IGF-IR	74,6 $\pm$ 16,0*	36,9 $\pm$ 12,8*	44,1 $\pm$ 10,9

ANOVA*P<0,05

Gráfico 1 – Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica ao IGF-I (média $\pm$ desvio padrão). p< 0,05*

Gráfico 2 – Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica do IGF-IR (média $\pm$ desvio padrão). $p < 0,05^*$

Ao se analisar os dados relativos ao IGF-I verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para as porcentagens médias entre os animais nutridos (N) e subnutridos (S), ou seja, a expressão foi maior para o grupo N ($p=0,05$). A comparação estatística entre as porcentagens médias obtidas para os animais subnutridos e renutridos permitiu verificar que não houve diferença significativa entre os valores, muito embora o grupo S tenha apresentado uma porcentagem média ligeiramente maior do que a determinada para o grupo R.

Com relação ao IGF-IR, na polpa dentária dos animais do grupo N ocorreu a maior expressão dos receptores de IGF, com indicação de diferença estatística apenas entre este e o grupo S ($p < 0,033$). Muito embora a porcentagem média de imunomarcações tenha sido menor nos animais do grupo S e R, não foram detectadas diferenças estatísticas entre si.

5.2.1.2 Relativos à expressão da Insulina (I) e seu receptor (IR)

A figura 13 ilustra células da polpa dentária sensibilizadas pela insulina (I) e pelo seu receptor (IR).

Figura 13 – Fotomicrografia de cortes histológicos da polpa dentária demonstrando as células sensibilizadas (setas) pela Insulina (A) e pelo seu receptor IR- (B). Aumento 100x

Os valores das porcentagens médias ($\pm$ Desvio Padrão) referentes à expressão da Insulina e do seu receptor (IR) de todos os grupos encontram-se expressos na tabela 2 e gráficos 3 e 4.

Tabela 2 – Descrição das médias da expressão imunohistoquímica da Insulina e do seu receptor (IR), na polpa dentária dos grupos Nutrido (N), Subnutrido(S) e Renutrido (R). (Média $\pm$ DP)

Técnicas	N	S	R
Insulina	59,1 $\pm$ 13,2	50,8 $\pm$ 9,5	52,7 $\pm$ 11,3
IR	62,4 $\pm$ 8,5*	24,7 $\pm$ 1,2*	27,0 $\pm$ 0,4*

ANOVA*P<0,05

Gráfico 3 – Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica da Insulina (média $\pm$ desvio padrão).

Gráfico 4 – Porcentagens médias da expressão imunohistoquímica do receptor de insulina (IR) (média $\pm$ desvio padrão). $p < 0,05^*$

Ainda que a percentagem média das expressões de insulina tenha sido maior na polpa dentária dos animais do grupo N, estatisticamente não foi detectada diferença significativa entre os grupos.

Para o receptor de insulina (IR), os animais do grupo N foram os que apresentaram uma percentagem média maior de imunomarcações, enquanto nos animais dos grupos S e R, as médias foram bem menores e muito

próximas entre si. Desta forma, foram constatadas diferenças estatísticas significativas entre o grupo N em relação aos grupos S e R. ($p < 0,0002$).

5.2.2 Epitélio juncional

Os valores das porcentagens médias ($\pm$ Desvio Padrão) referentes à expressão do IGF-I, IGF-IR, Insulina (I) e receptor de insulina (IR) de todos os grupos, encontram-se expressos na tabela 3 e figura 14.

Tabela 3 – Médias da expressão imunohistoquímica de todos os marcadores (IGF-I, IGF-IR, Insulina-I e IR) no epitélio juncional dos grupos Nutrido (N), Subnutrido(S) e Renutrido (R). (Média $\pm$ DP).

Técnicas	N	S	R
IGF-I	19,4 $\pm$ 2,4	22,6 $\pm$ 6,7	18,5 $\pm$ 2,5
IGF-IR	19,6 $\pm$ 3,2	23,5 $\pm$ 2,8	19,7 $\pm$ 3,5
Insulina (I)	18,8 $\pm$ 4,3	22,8 $\pm$ 5,4	16,8 $\pm$ 5,9
IR	19,2 $\pm$ 2,5	23,3 $\pm$ 4,1	19,5 $\pm$ 4,8
ANOVA* $p < 0,05$			

A análise das porcentagens médias das expressões de todos os marcadores utilizados na presente pesquisa (IGF-I, IGF-IR, Insulina-I e receptor de insulina-IR) demonstrou que não houve diferença estatística entre os grupos N, S e R no epitélio juncional.

Figura 14 – Fotomicrografia de cortes histológicos do epitélio juncional corados em HE (A, B e C), demonstrando núcleos corados de células (setas) em diferentes camadas do epitélio; e presença de imunomarcações (D, E e F) referentes ao IGF-I, IGF-IR e ao IR (setas). Aumento 100x. Barra de calibração: 10µm

6 DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, serão discutidos os aspectos morfológicos da polpa dentária e do epitélio juncional, relacionando-os com estudos já presentes na literatura científica.

6.1 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DA POLPA DENTÁRIA

A avaliação histológica demonstrou que, com relação ao padrão morfológico do tecido pulpar, o grupo S apresentou um distanciamento dos aspectos de normalidade observados nos animais do grupo controle (nutrido). Assim, foi característica dos animais que sofreram com a subnutrição, uma quantidade menor de células distribuídas de maneira dispersa, e uma camada odontoblástica sem o aspecto característico “em paliçada” (ou seja, exibindo as células desgarradas entre si e estas com a dentina adjacente). Relativamente à recuperação proteica, o aspecto da polpa dos animais do grupo R, apesar de aparentar um possível restabelecimento do padrão normal (grupo N), a rigor não exibiu a mesma densidade celular, nem tampouco o padrão da camada odontoblástica destes. A diminuição na quantidade de células indica que a subnutrição proteica pré-natal estendida até a fase final do período púbere (60 dias), retardou o crescimento do tecido pulpar. Sobre a perda da morfostase pulpar, evidenciada através tanto do número reduzido de odontoblastos, quanto da sua falta de disposição característica em “paliçada”, é possível admitir que o estresse fisiológico promovido pela subnutrição tenha desencadeado adaptações celulares nas polpas dos animais desse grupo, alterando o processo de diferenciação celular. Já a incompleta restituição da polpa dos animais do grupo R, pode ser resultado da reprogramação das células mesenquimais indiferenciadas da polpa, como forma de reação diante da retomada nutricional. Assim, com base nessas alterações morfológicas, não se pode afirmar que a perda do equilíbrio estrutural é irreversível, visto que, o ciclo completo do desenvolvimento dos molares dos ratos se dá em torno dos 100-120 dias iniciais de vida dos animais (SCHOUR; MASSLER, 1963) e os espécimes aqui utilizados são

de 60 dias. Além disso, a presença de células mesenquimais indiferenciadas no tecido pulpar garante mecanismos de reparação à polpa, mesmo em períodos tardios da vida.

Quanto ao colágeno presente na polpa dentária dos diferentes grupos (N, S e R), foi relevante observar que no período púbere, em condições de nutrição normal (grupo N), há a predominância de fibras colágenas maduras do tipo I, enquanto que nos animais que sofreram com a subnutrição (grupo S) predominam fibras recém-secretadas, ou seja, de colágeno do tipo III.

Sabe-se que os componentes fibrosos compostos por colágenos, são importantes em qualquer tecido do corpo para garantir a solidez necessária à sustentação das células, e permitir que a MEC exerça seu papel regulatório na determinação da forma e das atividades celulares (ALBERTS et al., 2011). E ainda, a síntese regulada dos colágenos intersticiais, em especial do colágeno tipo I, é importante durante o desenvolvimento, sendo também envolvida em condições patológicas (LINDE, 1985). Spainheimer et al. (1991) investigando a influência da subnutrição sobre o metabolismo proteico em cartilagem de ratos, encontraram uma diminuição da produção de colágeno, relacionada com uma redução de níveis circulantes de IGF-I.

Diante de todos esses aspectos, os resultados da presente pesquisa sugerem que a dinâmica na produção de fibras colágenas foi mantida pelos fibroblastos pulpares em condições normais (grupo N), e que a atividade dessas células parece estar comprometida pela subnutrição (grupo S), assim mantendo-se após a renutrição (grupo R). Ou, ainda, que a subnutrição impediu a maturação das fibras no tecido pulpar, que sob retomada nutricional, apresentou evidente estagnação, confirmada com a predominância do colágeno reticular (tipo III). Ademais, considerando que a MEC está envolvida na interação epitélio-mesênquima durante a morfogênese e diferenciação do dente, e que o desenvolvimento dentário pode ser perturbado por mutações de genes do colágeno (MAAS; BEI, 1997), a existência de uma disfunção massiva dos fibroblastos com a consequente produção de uma matriz com certo grau de imaturidade, poderia interferir nos processos que regulam a diferenciação de células indiferenciadas em odontoblastos e, conseqüentemente, causar alterações na formação de dentina. Tal hipótese pode ser sustentada, também, por pesquisas de bioengenharia tecidual como as de Deng et al. (2005) que têm utilizado um sistema de matriz extracelular com a configuração tri-

dimensional, a partir do colágeno I, para o cultivo de células tronco, visando sua diferenciação em odontoblastos. Essas pesquisas demonstram que células-tronco tratadas sem esse arcabouço similar ao natural, não desenvolvem tecido semelhante ao complexo dentina-polpa, sugerindo que proteínas derivadas da MEC desempenham uma função essencial na diferenciação odontoblástica.

Ao se comparar esses resultados com os obtidos para a dentina por Gonçalves et al. (2009), verifica-se certas semelhanças, pois os autores também observaram baixa densidade celular e camada odontoblástica sem disposição característica em paliçada nos animais subnutridos, além de predominância de fibras colágenas do tipo III nos mesmos.

Com relação à técnica de imunohistoquímica, foram observadas expressões de dois componentes específicos da família de fatores de crescimento semelhante à insulina, o IGF-I e IGF-IR, na polpa dentária de ratos wistar. Tais observações corroboram os resultados obtidos em outros estudos realizados por Gotz et al. (2006) e por Caviedes-Bucheli et al. (2004), pois esses autores também demonstraram que os IGFs do tipo I e seus receptores (IGF-IR) respectivamente, podem ser detectados por imunohistoquímica no tecido pulpar. Além disso, sugeriram que a presença dos IGFs na polpa dentária durante o desenvolvimento pós-natal indica o envolvimento de tais elementos, não somente nos processos de formação embrionária como muitos estudos já demonstraram (ZHANG et al., 1996), mas também nos eventos de proliferação e diferenciação, possivelmente agindo em processos regenerativos após injúrias ao complexo dentinopulpar.

Recentemente, essa hipótese tem sido testada em muitos estudos com animais, considerando que os IGFs localizados na polpa podem, a partir de ações autócrinas e parácrinas, estimularem os odontoblastos a formar dentina reparativa (JOSEPH et al., 1996; WERNER; KATZ, 2004). Dessa forma, os experimentos iniciais sugerem, dentre outras coisas, o uso potencial dos fatores de crescimento em capeamentos pulpaes (LOVSCHALL et al., 2001) e no tratamento de perfurações apicais (KIM et al., 2001).

As explicações dos diferentes autores, que levam em consideração a formação de dentina reacional ou fibrose pulpar, são condizentes com os resultados aqui expostos, ao se considerar somente que os anticorpos para IGF-I e IGF-IR reagiram imunopositivamente em todos os grupos estudados, indicando a presença tanto dos peptídeos quanto dos receptores para IGF-I na polpa dentária. Entretanto,

a importância dos dados obtidos no presente estudo, reside especialmente no fato de se ter mostrado também a correlação dos IGFs com as condições nutricionais nos diferentes grupos, evidenciando que a subnutrição influenciou na regulação do peptídeo IGF-I e na expressão dos receptores (IGF-IR). Segundo Le Roith et al. (1995), o estado nutricional é o regulador mais importante da expressão dos receptores de IGF-I. A privação proteica (ou energética) afeta a transcrição de RNAm do peptídeo de IGF-I, resultando em redução dos seus níveis sanguíneos e locais. Como forma de neutralizar essa diminuição e manter os seus efeitos biológicos, é possível que ocorra um aumento da expressão do receptor, secundário à diminuição da concentração local de IGF-I, por um mecanismo fisiológico denominado “upregulation” (PAS; EVERTS; HAAGSMAN, 2004).

Assim, no presente estudo, houve diferenças estatisticamente significantes de suas expressões entre os grupos N e S, uma vez que os animais do grupo controle (nutridos) demonstraram uma alta expressão de ambos – peptídeo e receptor – com quantidades semelhantes entre si. Considerando que a presença de IGF-I é importante para o crescimento da polpa e a formação de dentina, esta função estaria preservada na polpa dos animais do grupo N, possivelmente regulando a atividade mitótica (FUJIWARA et al., 2005), ou relacionadas com a secreção de proteínas atuantes na dentinogênese, como proposto por Young et al. (1995). Além disso, os resultados aqui expostos demonstram, também, que a subnutrição foi capaz de modificar o padrão de expressão das proteínas e receptores do sistema IGF-I no tecido pulpar, e que a renutrição precoce não foi capaz de aumentá-la de forma considerável. Assim, houve uma diminuição de expressões de receptores (IGF-IR) mais acentuada e secundária à diminuição de peptídeos IGF-I, nos animais dos grupos S e R. Diante disso, pode-se sugerir que os animais dos grupos que, de alguma forma, sofreram com a subnutrição (S e R), tiveram os seus mecanismos de crescimento, em termos quantitativos, alterados pela subnutrição proteica.

Existem controvérsias a respeito dos efeitos da restrição de nutrientes, sobre as concentrações de IGF-IR, em diferentes tecidos. No encéfalo de ratos com 13 dias de vida, submetidos à subnutrição proteica pré-natal, Maheshwary et al. (1997) relataram um decréscimo de receptores de IGF-I no córtex cerebral e no cerebelo. No entanto, avaliaram também a concentração das proteínas ligantes IGFBPs, e observaram uma quantidade relativamente mais alta de IGFBP- 2 e IGFBP-3, do que a encontrada para os receptores. Os autores especularam que o significado dessas

mudanças poderia ser a manutenção da atividade metabólica, enquanto há um retardo da proliferação e diferenciação.

No entanto, no presente trabalho não foram realizadas técnicas para se avaliar as concentrações séricas das proteínas ligantes (IGFBPs) no soro de ratos. Por isso, não se pode afirmar que a restrição proteica, ao apresentar decréscimo de peptídeos IGF-I circulantes nos animais do grupo S e R, devido a um mecanismo de “downregulation”, determinou uma redução ainda maior na expressão dos seus receptores (GUYTON; HALL, 2006). A hipótese mais plausível é a que leva em consideração a complexidade de interação dos hormônios peptídicos com seus receptores de membrana celular. Assim, considerando que o IGF-I raramente está ausente no ambiente celular e sua dissociação dos receptores ocorre de forma lenta (ZHONG et al., 1993), é possível que em todos os grupos (N, S e R) os receptores (IGF-IRs) estivessem sempre ocupados pelos ligantes (peptídeos), dificultando a interpretação em separado dos dados referentes ao peptídeo e ao receptor, apenas pela técnica de imunohistoquímica.

Além do estado nutricional, sabe-se que a expressão dos receptores de IGF-I é regulada por outras condições fisiológicas, como hormônios e outros fatores de crescimento (D' ERCOLE, 1996). Assim, como segundo fator que se aplicaria às respostas obtidas, o presente trabalho mostrou que outros membros do sistema IGF, a insulina e seu o seu respectivo receptor (IR), também podem ser detectados na polpa dentária de ratos através de imunohistoquímica. Até onde se teve acesso à literatura, este é o primeiro estudo que descreve a ocorrência de tais componentes no tecido pulpar.

Os resultados aqui expressos demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos referentes às expressões do peptídeo insulina. Considerando que a insulina não é produzida localmente em nenhum outro tecido além do pâncreas, mas que o hormônio é amplamente distribuído pelos tecidos, conclui-se que a concentração hormonal local não foi suficiente para impor diferenças relativas à subnutrição. Além disso, apesar de ter ocorrido expressividade ao anticorpo para insulina, observou-se que essa reação ocorreu de forma dispersa e não distinguível por toda a polpa dentaria. Isto leva a questionar se essa imunorreatividade está ocorrendo devido ao reconhecimento de epitopos presentes na matriz extracelular, ou se o anticorpo estaria ligando-se a epitopos presentes nas membranas celulares, a partir da combinação com o próprio receptor de insulina (IR)

e os receptores de IGF-I (IGF-IR), ou ainda, se estaria ocorrendo reação inespecífica do anticorpo com elementos da matriz extracelular.

Quanto à expressão de seus receptores (IR), os animais do grupo N foram os que apresentaram uma expressão mais acentuada, enquanto nos animais dos grupos S e R, as médias foram bem menores e muito próximas entre si. Desta forma, foram constatadas diferenças estatísticas significativas apenas entre o grupo N em relação aos grupos S e R. Assim, os dados quantitativos relativos à expressão dos IRs apresentaram-se similares aos da expressão dos IGFIRs na polpa dentária. Por um lado, isso poderia sugerir a manutenção das respostas anabólicas específicas da insulina (LARON, 2008) somente nos animais do grupo N, e redução de seus efeitos metabólicos – transporte de glicose e aminoácidos, síntese de RNA, proteínas e glicogênio (McGOWAN et al., 1995; SUMMERS et al., 1999) – frente à subnutrição sofrida pelos animais dos grupos S e R. Contudo, a falta de associação da relação: receptores versus ligação com o peptídeo em todos os grupos, sem uma evidente relação na ligação das expressões dos receptores em decorrência direta do aumento ou declínio peptídico, não permite que se conceba uma explicação para o mecanismo fisiológico envolvido. Dessa forma, os dados podem indicar também reações cruzadas com os outros componentes do sistema IGF-I, através de alterações na afinidade do receptor por insulina ou IGF-I (RECHLER; NISSLEY, 1985).

Assim, ainda que a produção de IGF-I hepático seja reconhecidamente inibida pela subnutrição (KWAN; HARTMAN, 2007) e considerando que a subnutrição é capaz de ocasionar um dano na homeostasia da glicose, consequentemente afetando a síntese e a armazenagem de insulina (MARTÍN et al., 2005), para o entendimento da atuação parácrina/autócrina do IGF-I, da insulina e de seus receptores em eventos fisiológicos nos tecidos dentários são necessários mais estudos que considerem mais do que apenas a relação de peptídeos e receptores do sistema IGF.

6.2 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DO EPITÉLIO JUNCIONAL

A integridade do epitélio juncional tem um papel primordial na manutenção da homeostase do periodonto de proteção, sendo a única estrutura capaz de manter contato tanto com a superfície dentária não renovável quanto com a membrana basal, que o limita do tecido conjuntivo subjacente (SHIMONO et al., 2003). Apesar do fundamental envolvimento desse epitélio na proteção do dente e na manutenção da saúde periodontal (LINDHE et al., 1999), pouco é conhecido sobre o seu comportamento, bem como de outros tecidos periodontais frente a um quadro de subnutrição. Os resultados aqui expressos demonstraram mudanças estruturais no epitélio juncional, caracterizadas pela variação nos formatos das células, diminuição da espessura epitelial e ocorrência de uma “pseudo” camada córnea nos animais do grupo S. Já os animais do grupo R demonstraram um padrão intermediário, intercalando aspectos similares aos subnutridos e outras vezes aparências mais semelhantes aos nutridos (grupo N). Tal fato indica que a capacidade dos animais renutridos em responder ao estresse funcional provocado pela subnutrição, é aparentemente maior do que o observado nos animais do grupo subnutrido.

A literatura demonstrou diferentes estudos relacionados à privação nutricional em epitélios. Lansdown et al. (1978) estudaram a influência do retardo de crescimento pré-natal sobre o crescimento epidermal e da queratinização em pele de humanos, de ratos e de porcos. Nos bebês humanos e nos fetos de ratos que foram sujeitos à privação de proteína materna, a epiderme apresentou-se reduzida, mas os padrões de diferenciação estavam presentes. No presente estudo, os animais subnutridos também apresentaram diminuição da espessura do epitélio juncional; todavia e, contrastando com os resultados acerca da pele, os padrões de diferenciação das células em suas diferentes camadas demonstraram alterações nos aspectos celulares entre os diferentes grupos (N, S e R). Tal fato chama atenção, pois segundo Feherenbach e Bach-Balogh (2008) normalmente, as poucas camadas presentes no epitélio juncional desde a camada basal até a superficial, não apresentam modificações nas aparências celulares relativas à maturação, uma vez que esse tecido é caracterizado pela ausência da camada granulosa ou intermediária, o que determina uma dificuldade em classificá-lo em queratinizado ou não-queratinizado. Contudo, a partir dos resultados aqui expostos, pode-se notar

que os animais do grupo N exibiram um padrão típico de um epitélio estratificado pavimentoso, enquanto nos animais do grupo S ocorreu um grau de atipia e uniformização celular, independente da camada do epitélio. Por sua vez, esta singular conformação epitelial mostra-se bastante delgada, dando indícios de atraso nas taxas diferenciais de crescimento.

Além disso, sabe-se que o epitélio juncional, juntamente com outros tecidos do periodonto de proteção (gengiva e junção dentogengival), apresenta estreita dependência do seu desenvolvimento, com os processos eruptivos. À medida que progride o movimento axial intraósseo do dente, a superfície coronária recoberta pelo epitélio reduzido do órgão do esmalte aproxima-se da mucosa gengival, provocando a lise do seu cório e a fusão desta cobertura epitelial com o epitélio da mucosa na região. Esta fusão torna o epitélio mais espessado ocorrendo, conseqüentemente, a redução no fornecimento de nutrientes às suas células, o que, juntamente com a pressão sobre o epitélio fusionado decorrente do deslocamento axial do dente, acarretam processos degenerativos das células mais centrais, originando o sulco gengival (BRITO, 1998). Esta situação de diferenciação do epitélio juncional, bastante dependente do desenvolvimento dos tecidos dentários, e o fato do controle cronológico ser capaz de interferir nos processos de desenvolvimento (GOODMAN; ARMELAGOS, 1985), pressupõe uma interdependência de tais processos.

Assim, não se pode descartar a possibilidade de que tenham ocorrido reorganizações histológicas, a partir de uma falta de sincronização da fusão dos tecidos gengivais dos ratos do grupo S, visto que o retardo eruptivo pós-privação proteica é uma alteração descrita por diversos autores (DIORIO et al., 1973; MENAKER; NAVIA, 1973). Isto pode explicar a alta incidência de células indiferenciadas (achatadas) presentes no epitélio dos animais subnutridos, e ainda, um aparente equilíbrio nos animais submetidos à recuperação proteica (grupo R), entre células com esse aspecto e aquelas predominantes nos animais do grupo N.

Por sua vez, os resultados da tipificação do colágeno na papila gengival que sustenta o epitélio juncional, demonstraram diferenças quanto à predominância de tipos de fibras colágenas entre os grupos nutridos (N) e aqueles que, de alguma forma, sofreram com o processo de subnutrição (S e R). Dessa forma, ocorreu o predomínio de colágeno tipo I nos nutridos, diferentemente do observado nos animais subnutridos e renutridos, onde predominou o colágeno do tipo III. Resultado

semelhante foi verificado nos componentes do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos jovens submetidos à subnutrição proteica pré e pós-natal, onde as fibras colágenas do tipo III predominaram na constituição da cápsula ganglionar, reforçando a suposição de que a subnutrição promove um atraso no desenvolvimento estrutural dos diferentes órgãos (BRANDÃO et al., 2003).

De acordo com Mjör e Fejerskov (1990), as fibras da lâmina própria da gengiva se encontram densamente arranjadas, e firmemente aderidas ao perióstio do osso alveolar. Feixes espessos de fibras colágenas se entrelaçam com fibras do perióstio e da mucosa oral, e também com o sistema de fibras do ligamento periodontal. Os feixes de fibras colágenas na gengiva livre, em particular as fibras dentogengivais (que ligam a gengiva ao cimento) e as fibras circulares (circunscvem o dente), servem para manter a íntima proximidade entre a gengiva e o dente.

A gengiva situada na região interproximal é denominada papila interdentária ou papila gengival. Por fazer parte dos tecidos periodontais esse tecido obedece ao mesmo padrão básico de aderência epitelial às paredes do esmalte dentário (junção dento-gengival). No entanto, por preencher a região interproximal, esse conjunto de tecidos relaciona-se, na verdade, com duas superfícies de esmalte ao mesmo tempo, e conseqüentemente, com dois dentes contíguos.

Nesse contexto e, considerando também o fibroblasto como sendo uma célula adaptativa, capaz de manter um equilíbrio quantitativo e qualitativo da proteína colágena (SIMÕES et al., 1986), a coexistência de dois tipos de fibras colágenas e, ainda, a preponderância das fibras de colágeno do tipo I nos animais do grupo N, sugerem tanto um equilíbrio no potencial fibroblástico de biossíntese proteica, quanto a manutenção de uma dinâmica no remodelamento tecidual, que ocorre através da síntese crescente do colágeno tipo I, ao mesmo tempo em que collagenases digerem o colágeno tipo III (secretado nas fases anteriores). Por sua vez, a predominância do colágeno do tipo III verificada nos animais dos grupos S e R, indica que a subnutrição afetou os processos de síntese das proteínas colágenas, bem como os processos de maturação do tecido. Assim, pode-se inferir que nos animais do grupo N a integridade da papila gengival foi mantida, e que isso permite uma maior adesão do periodonto de proteção ao dente e maior resistência às forças de tensão impostas pelos movimentos mastigatórios. Com os dados sobre os animais dos grupos S e R, é possível afirmar que houve uma perda de resistência

papilar, visto que o colágeno do tipo III, por ser uma rede delicada de fibras com pequeno diâmetro e disposição frouxa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), não confere a essa gengiva a mesma estabilidade estrutural daquelas que possuem o colágeno do tipo I. Isso, além de representar uma perda da função protetora da própria papila, compromete a estrutura de todo o periodonto de proteção, incluindo o ligamento periodontal, podendo trazer consequências tardias aos dentes.

Com relação à técnica de imunohistoquímica no epitélio juncional, apesar de terem sido observadas imunomarcações a todos os anticorpos utilizados, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos nutridos (N), subnutridos (S) e renutridos (R), e nem correlação estreita entre as expressões dos peptídeos IGF-I e Insulina, com as expressões de seus respectivos receptores, IGF-IR e IR. Os resultados indicam que nos grupos estudados, a imunoexpressão a esses anticorpos não se encontra alterada pela subnutrição. A falta de identificação dessa associação sugere que a subnutrição não apresentou efeito durante a renovação desse epitélio em relação aos hormônios estudados, e que a presença dos mesmos pode ser explicada pela expressão ubíqua dos IGFs (IGF-I, IGF-IR, I e IR).

A despeito dos resultados iniciais do presente estudo, experimentos com animais e estudos pré-clínicos, têm testado o IGF-I em combinação com outros fatores de crescimento para o tratamento e regeneração dos defeitos periodontais, considerando a capacidade de tais substâncias na modulação dos processos de diferenciação (WERNER; KATZ, 2004). Entretanto, com os dados até aqui descritos, é evidente que são necessárias mais pesquisas que consigam elucidar todos os aspectos inerentes ao processo de crescimento envolvendo os elementos do sistema IGF, uma vez que a técnica de imunohistoquímica isoladamente impõe limitações para inferências mais conclusivas a respeito das alterações endócrinas ocorridas na subnutrição.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos por meio da metodologia empregada, é possível concluir que:

1. A polpa dentária apresentou-se debilitada sob subnutrição proteica na puberdade. Nos animais do grupo S ocorreu evidente irregularidade das células da camada odontoblástica, com perda do seu arranjo característico em paliçada.

2. Ainda que tenha sido observada uma tendência à recuperação do padrão da camada odontoblástica nos animais do grupo R, a retomada nutricional no período púbere não foi capaz de promover a sua completa reestruturação.

3. A subnutrição afetou os componentes fibrosos do arcabouço de sustentação da polpa dentária dos animais dos grupos S e R que apresentaram um padrão predominante de colágeno do tipo III, característico de fibras colágenas reticulares jovens, demonstrando evidente estagnação dos processos de maturação da matriz extracelular desses animais.

3. Na polpa dentária dos três grupos estudados (N, S e R), foi detectada por imunohistoquímica, marcação expressiva de todos os anticorpos utilizados na presente pesquisa (IGF-I, IGF-IR, Insulina (I) e IR), sugerindo a participação de tais elementos em eventos de proliferação e diferenciação, possivelmente agindo em processos regenerativos após injúrias ao complexo dentinopulpar.

4. Ocorreu alteração do padrão de expressão do IGF-I e do seu receptor (IGF-IR), na polpa dentária dos animais que sofreram de alguma forma com a subnutrição (grupos S e R), com diferenças estatísticas significantes entre estes e o grupo de animais nutridos.

5. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos N, S e R com relação à expressão de insulina (I) na polpa dentária.

6. A quantificação da imunoexpressão do receptor de insulina (IR), na polpa dentária, demonstrou diferenças estatísticas apenas entre os animais do grupo N em relação ao grupo S e N em relação a R.

7. O epitélio juncional apresentou modificações morfológicas notadas através de certo grau de atipia e de atrofia epitelial nos animais do grupo S. A renutrição não foi capaz de recuperar de forma satisfatória o padrão de seus componentes estruturais, já que os animais do grupo R exibiram camadas epiteliais ora semelhantes aos animais do grupo N, ora regiões semelhantes aos animais do grupo S.

8. As observações sob luz polarizada demonstraram qualitativamente um predomínio de fibras colágenas do tipo I nos animais do grupo N, e uma maior quantidade de fibras do tipo III nos animais dos grupos S no tecido conjuntivo da papila gengival subjacente ao epitélio juncional. A renutrição demonstrou aparente tendência de recuperação do padrão característico do grupo controle (N) através do equilíbrio entre fibras do tipo I e do tipo observado nos animais do grupo R.

9. No epitélio juncional, não houve diferenças quantitativas entre os grupos N, S e R, quando se comparou a imunoexpressão tanto do IGF-I e de seu receptor, quanto da Insulina (I) e de seu receptor, indicando que a imunoexpressão a seus anticorpos não foi alterada pela subnutrição.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3. ed. Rio de Janeiro. Artmed, 2011.

ALVAREZ, J. O.; CACEDA, L.; WOOLEY, T. W.; CARLEY, K. W.; BAIOCCHI, N.; CARAVEDO, L.; NAVIA, J. M. A longitudinal study of dental caries in the primary teeth of children who suffered from infant malnutrition. **Journal of Dental Research**, v.72, n.12, p.1573-1576, 1993.

ALVAREZ, J. O.; LEWIS, C. A.; SAMAN, C.; CACEDA, J.; MONTALVO, J.; FIGUEROA, M. L.; IZQUIERDO, J.; CARAVEDO, L.; NAVIA, J. M. Chronic malnutrition, dental caries and tooth exfoliation in Peruvian children aged 3-9 years. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.48, p.368-72, 1998.

APONTE-MERCEDES, L.; NAVIA, J. M. Pré-eruptive protein-energy malnutrition and acid solubility of rat molar enamel surfaces. **Archives of Oral Biology**, v.25, p.701-705, 1980.

BÄCK, K.; BRÄNNMARK, C.; STRALFORS, P.; ARNQVIST, H. J. Differential effects of IGF-I, IGF-II and insulin in human preadipocytes and adipocytes – Role of insulin and IGF-I receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.339, p.130-135, 2011.

BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. **Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais**. 2. ed. São Paulo. Manole, 2006.

BITTENCOURT, S. A.; NIQUINI, R. P.; REIS, A. C.; LEAL, M. A.; Care for malnourished children: an analysis of Brazilian National Health Service Hospital Information System Data. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.9, n.3, p. , 2009.

BOLDRINI S. C.; WATANABE, I.; KONIG-JÚNIOR, B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and post natal protein deprivation on rats palatine mucosae: a scanning electron microscopic study of the connective tissue papillae. **Annals of Anatomy**, v.180, p.445-448, 1998.

BOSSHARDT, D. D.; LANG, N. P. The junctional epithelium: from health to disease. **Journal of Dental Research**, v.84, n.1, p.9-20, 2005.

BRANDÃO, M. C. S.; De ANGELIS, R. C.; De SOUZA, R. R.; FRÓES, L. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. **Nutrition Research**, v.23, n.2, p.215-223, 2003.

BRITO, J. H. M. **Fundamentos de embriologia bucodentária**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998.

CAVIEDES-BUCHELI, J.; MUÑOZ, H. R.; RODRÍGUEZ, C. E.; LORENZANA, T. C.; MORENO, G. C.; LOMBADA, N. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human dental pulp. **Journal of endodontics**, v.30, p. 767-769, 2004.

CASASCO, A.; CASASCO, M.; CALLIGARO, A.; REGUZZONI, M.; MARRONE, G.; ROMEO, E. Localization of proliferating cell nuclear antigen-immunoreactivity in human dental pulp and gingiva. **Bulletin du Groupement International Pour la Recherché Scientifique en Stomatology et Odontologie**, v.39, p.81-85, 1996.

COHEN, S.; BURNS, R. C. **Caminhos da polpa**. 7. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DENG, M.; SHI, J.; SMITH, A. J.; JIN, Y. Effects of transforming growth factor beta1 (TGFbeta-1) and dentin non-collagenous proteins (DNCP) on human embryonic ectomesenchymal cells in a three-dimensional culture system. **Archives of Oral Biology**, v.50, n.11, p.937-45, 2005.

D'ERCOLE, A. J.; YE, P.; CALIKOGLU, A. S.; GUTIERREZ-OSPINA, G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v.13, p.227-255, 1996.

DIORIO, L. P.; MILLER, S. A.; NAVIA, J. M. The separate effects of protein and calorie malnutrition on the development and growth of rat bones and teeth. **Journal of Nutrition**, v.103, p.856-865, 1973.

DONOVAN, S. M.; ATILANO, L. C.; HINTZ, R. L.; WILSON, D. M.; ROSENFELD, R. G. Differential regulation of the insulin-like growth factors (IGF-I and -II) and IGF binding proteins during malnutrition in the neonatal rat. **Endocrinology**, v.129, p.149-157, 1991.

ENGELBREGT, M. J., VAN WEISSENBRUCH M. M., LIPS P., VAN LINGEN A., ROOS J. C., DELEMARRE-VAN DE WAAL H. A. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished

male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. **Bone**, v.34, p.180-186, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Basic definitions**, 2006. Disponível em: <<http://www.feedingminds.org/info/definitions.htm>>. Acesso em: 17 ago. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Human nutrition in developing world**, 1997. Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/W0073e/w0073e05.htm>>. Acesso em: 17 ago. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Undernourishment around the world**, 2006. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0750e/a0750e02.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) **World food and agriculture review. part II**, 2010-2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/013/i2050e/i2050e07.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2011.

FENG, J.; MANTESSO, A.; DE BARIC, C.; NISHIYAMA, A.; SHARPE, P.T. Dual origino f mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. **Developmental Biology**, v.108, n.16, p.6503-6508, 2011.

FUJIWARA, N.; TABATA, M. J.; ENDOH, M.; ISHIZEKI, K.; NAWA, T. Insulin-like growth fator-I stimulates cell proliferation in the outer layer of Hertwig's ephitelial root sheath and elongation of the tooth root in mouse molars in vitro. **Cell and Tissue Research**, v.320, n.1, p.69-75, 2005.

GOODMAN, A. H.; ARMELAGOS, G. J. The chronological distribution of enamel hypoplasia in human permanent incisor and canine teeth. **Archives of Oral Biology**, v.30, n.6, p.503-507, 1985.

GONÇALVES, L. A, BOLDRINI, S. C., CAPOTE, T. S. O, BINOTTI, C. B., AZEREDO, R. A., MARTINI, D. T., ROSENBERG, B., BAUTZ, W. G., LIBERTI, E. A. Structural and ultra-structural features of the first mandibular molars of young rats submitted to pre and postnatal protein deficiencies. **The Open Dentistry Journal**, v.3, p.125-131, 2009.

GÖTZ, W.; KUNERT, D.; ZHANG, D.; KAWARIZADEH, S.; JÄGER, A. Insulin-like growth factor system components in the periodontium during tooth root resorption

and early repair processes in rat. **European Journal Oral Science**, v.114, p.318-327, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia médica**. 11. ed., Rio de Janeiro:Elsevier, 2006.

HOUSTON, M. S.; HOLLY, J. M. P; FELDMAN, E. L. **IGF-I and nutrition in health and disease**. Totowa: Humana Press, 2005.

HUMMONEN, S.; LARMAS, M. Effects of protein deficiency induced by raw soy with and without sucrose on dentine formation and dentinal caries in young rats. **Archives of Oral Biology**, v.50, p.453-459, 2005.

JOSEPH, B. K.; SAVAGE, N. W.; DALEY, T. J.; YOUNG, W. G. In situ hybridization evidence for a paracrine/autocrine role for insulin-like growth factor-I in tooth development. **Growth Factors**, v.13, n.1/2, p.11-17, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, E. J. **Histologia básica**. 35. ed. ED. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy: A specific method for collagen detection in tissues sections. **Journal of Histochemistry**, v.11, p.447-445, 1979.

KHAN, Y.; BHUTTA, Z.A. Nutritional deficiencies in the developing world: current status and opportunities for intervention. **Pediatric Clinics of North America**, v.57, n.6, p.1409:1441, 2010.

KIEDORF, H.; KIEDORF, U,; WITZEL, C. Deposition of cellular cementum onto hypoplastic enamel of fluorotic teeth in wild boars (*Sus scrofa* L.). **Anatomy and embryology**, v.209, n.4, p.281-6, 2005.

KIM, M.; KIM, B.; YOON, S. Effect on the healing of periapical perforations in dogs of the addition of growth factors to calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v.27, p.734-737, 2001.

KING, G. L.; KAHN, C. R. Effect of insulin on growth in vivo and cells in culture. In: BOYNTON, A. L.; LEFFERT, H. L. (Ed.) **Control of Animal Cell Proliferation**. Orlando, FL: Academic Press Inc, 1985. p. 201-249.

KWAN, A. Y.; HARTMAN, M. L. IGF-I measurements in the diagnosis of adult growth hormone deficiency. **Pituitary**, v.10, n.2, p.151-157, 2007.

LANSDOWN, A. B. Epidermal differentiation in normal and growth-retarded infants: studies in two animal models and human babies. **The British Journal of Dermatology**, v.99, p.139-146, 1978.

LARON, P. Insulin – a growth hormone. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v.114, p.11-16, 2008.

LeROITH, D. The insulin-like growth factor system. **Experimental Diabetes Research**, v.4, n.4, p.205-212, 2003.

LeROITH, D.; SAMPSON, P. C.; ROBERTS, C. T. How does the mitogenic insulin-like growth factor I receptor differ from the metabolic insulin receptor? **Hormone Research**, v.41, n.2, p.74-79, 1994.

LeROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS, C. T. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor, **Endocrine Reviews**, v.16, p.143-163, 1995.

LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. J. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. **Journal of Nutrition**, v.125, p.2221S-2232S, 1995.

LIGH, R. Q.; FRIDGEN, J.; SAXTON, C. The effect of nutrition and diet on dental structure integrity. **Journal California Dental Association**, v.39, n.4, p.243-9, 2011.

LINDE, A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. **Journal of Dental Research**, v.64, p.523-526, 1985.

LINDHE, J.; KARRING, T. Anatomia do periodonto. In: LINDHE J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 3-42.

LOVSCHALL, H.; FEJERSKOV, O.; FLYVBJERG, A. Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor-I (rhIGF-I) in rat molars. **Advanced in Dental Research**, v.15, p.108-112, 2001.

LOZUPONE, E.; FAVIA, A. Morphometric analysis of the deposition and mineralization of enamel and dentine from rat incisor during the recovery phase following a low-calcium regimen. **Archives of Oral Biology**, v.39, n.5, p.409-16, 1994.

MACIEJEWSKA, J.; ADAMOWICZ-KLEPALSKA, B.; KMIEC, Z. DZIEWIATKOWSKI, J. Influence of diet and fluoride on dentin and enamel deposition and maturation in rats. **Folia Morphologica**, v.59, n.2, p.131-136, 2000.

MAHESHWARI, H. G.; MERMELSTEIN, S.; VONSCHLEGELL, A. S.; SHAMBAUGH, G. E 3rd. Alteration in IGF-I binding in the cerebral cortex and cerebellum of neonatal rats during protein-calorie malnutrition. **Neurochemical Research**, v.22, n.3, p.313-319, 1997.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro, UERJ, 1991.

MARTÍN, M. A.; SERRADAS, P.; RAMOS, S.; FERNÁNDEZ, E.; GOYA, L.; GANGNERAU, M. N.; LACORNE, M.; PASCUAL-LEONE, A. M.; ESCRIVÁ, F.; PORTHA, B.; ALVAREZ, C. Protein-caloric food restriction affects insulin-like growth factor system in fetal wistar rat. **Endocrinology**, v.146, n.3, p.1364-1371, 2005.

MASS, R.; BEI, M. The genetic control of early tooth development. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.8, n.1, p.4-39, 1997.

McDONALD, T. J.; NIJLAND, M. J.; NATHANIELSZ, P. W. The insulin-like growth factor system and the fetal brain: Effects of poor maternal nutrition. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.8, n.2, p.71-84, 2007.

McGOWAN, K. M.; LONG, S. D.; PEKALA, P. H. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. **Pharmacology & Therapeutics**, v.66, n.3, p.465-505, 1995.

MERCOLA, M.; STILES, C. D. Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. **Development**, v.102, p.451-460, 1988.

MENAKER, L.; NAVIA, J.M. Effect of undernutrition during the perinatal period on caries. Development in the rat: II. Caries Susceptibility in underfed rats supplemented with protein or caloric additions during the suckling period. **Journal of Dental Research**, v.52, n.4, p.680-687, 1973.

MENAKER, L.; NAVIA, J. M. Effect of undernutrition during the perinatal period on caries. Development in the rat: IV. Effects of differential tooth eruption and exposure to a cariogenic diet on subsequent dental caries incidence. **Journal of Dental Research**, v.52, n.4, p.692-697, 1973.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.10, p.5807-5812, 2003.

MJÖR, I. A.; FEJERSKOV, O. **Embriologia e histologia oral humana**. 3. ed. São Paulo: Panamericana, 1990.

NADIRI, A. Dental ephitelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. **Archives of Oral Biology**, v.50, n.2, p.131-136, 2005.

NAKAMOTO, T.; PORTER, J. R.; WINKLER, M. M. The effect of prenatal protein-energy malnutrition on the development of mandibles and long bones in newborn rats. **British of Journal Nutrition**, v.50, p.75-80, 1983.

NISHIO, C.; WAZEN, R.; KURODA, S.; MOFFATT, P.; NANJI, A. Expression pattern of odontogenic ameloblast-associated and amelotin during formation and regeneration of the junctional ephitelium. **European Cells & Materials**, v.10, n.20, p.393-402, 2010.

MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectoring in paraffin. **Journal of Dental Research**, v.24, p.143-153, 1945.

OGAWARA, M.; AOKI, K.; OKIJI, T.; SUDA, H. Effect of ascorbic acid deficiency on primary and reparative dentinogenesis in non-ascorbate-synthesizing ods rats. **Archives of Oral Biology**, v.42, n.10, p.695-704, 1997.

OHARA, I.; TABUCHI, R.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. Decline of taste sensitivity in protein deficient adult rats. **Physiology & Behavior**, v.57, n.5, p.921-926, 1995.

PARTANEN, A.-M.; THESLEFF, I. Growth factors and tooth development. **International Journal of Development Biology**, v.33, p.165-172, 1989.

PAS, M. F. W.; HAAGSMAN, H. P.; EVERTS, M. E. **Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality**. Wallingford: CABI Publishing, 2004. 432 p.

PUCCIARELLI, H. M.; OYHENART, E. E.; MUÑE, M. C. Alterations in protein and mineral contents of rat skull bones, evoked by different protein levels of the diet. **Acta Anatomica**, v.117, p.331-338, 1983.

PUNYASINGH, J. T.; HOFFMAN, S.; HARRIS, S. S.; NAVIA, J. M. Effects of vitamin A deficiency on rat incisor formation. **Journal Oral Pathology**, v.13, n.1, p.40-51, 1984.

RECHLER, M. M.; NISSLEY, S. P. The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. **Annual Review of Physiology**, v.47, p.425-442, 1985.

REEVES P. G., NIELSEN F. H., FAHEY JR. G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1931, 1993.

REIFEN, R.; AGAMI, O.; WEISER, H.; BIESALSKI, H.; NAIM, M. Impaired responses to sweet taste in vitamin A-deficient rats. **Metabolism**, v.47, n.1, p.1, 1998.

RUGG-GUNN, A. J. Nutrition, diet and dental public health. **Community dent Health**, v.10, n.2, p.47-56, 1993.

SAXÉN, L. O.; KARKINEN-JÄÄSKELÄINEN, M.; LEHTONEN, E.; NORDLING, S.; WARTIOVAARA, J. Inductive tissue interactions. **In The cell surface in animal embryogenesis and development**. In: POSTE, G.; NICOLSON, G. L. (Ed). Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1976. p. 307-331.

SCHOUR, I.; MASSLER, M. The teeth. In: FARRIS, E. J.; GRIFFITH, J. Q. **The rat in laboratory investigation**. 2. ed. New York: Hafner Publishing Co., 1963. cap.6, p. 104-165.

SHAW, J. H.; GRIFFITHS, D. Dental abnormalities in rats attributable to protein deficiency during reproduction. **Journal of Nutrition**, v.80, p.123-41, 1963.

SIMÕES, M. J.; CABRAL, A. C. V.; BOYACIYAN, K.; KULAY JR., L.; SASSO, W. S. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Revista Paulista de Medicina**, v.104, p.132-135, 1986.

SHIMONO, M.; ISHIKAWA, T.; ENOKIYA, Y.; MURAMATSU, T.; MATSUZAKA, K.; INOUE, T.; ABIKO, Y.; YAMAZA, T.; KIDO, M.A.; TANAKA, T.; HASHIMOTO, S. Biological characteristics of the junctional epithelium. **Journal of Electron Microscopy**, v.52, n.6, p.627-39, 2003.

SPANHEIMER, R.; ZLATEV, T.; UMPIERREZ, G.; GIGIROLAMO, M. Collagen production in fasted and food-restricted rats: response to duration and severity of food deprivation. **Journal of Nutrition**, v.121, n.4, p. 517-524, 1991.

STEWART, R. E.; BARBER, T. K.; TROUTMAN, K. C. **Pediatric dentistry – scientific foundations and clinical practice**. St. Louis: Mosby, 1982. 1012p

SUMMERS, S. A.; YIN, V. P.; WHITEMAN, E. L.; GARZA, L. A.; CHO, H.; TUTTLE, R. L.; BIRNBAUM, M. J. Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.18, n.892, p.169-186, 1999.

TEN CATE, A. R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

TONGE, C. H.; MCCANCE, R. A. Severe undernutrition in growing and adult animals. The mounth, jaws and teeth of pigs. **British Journal of Nutrition**, v.19, n.3, p.361-372, 1965.

VIAU V., BINGHAM B., DAVIS J., LEE P., WONG M. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. **Endocrinology**, v.146, n.1, p.137-146, 2005.

WERNER, H.; KATZ, J. The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology. **Journal of Dental Research**, v.83, n.11,p. 832-6, 2004.

WOODWALL, S. M.; BASSETT, N. S.; GLUCKMAN, P. D.; BREIER, B. H. Consequences of maternal undernutrition for fetal and postnatal hepatic insulin-like growth factor-I, growth hormone receptor and growth hormone binding protein gene regulation in the rat. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.20, p.313-326, 1998.

YOUNG, W. G; RUCH, J. V.; STEVENS, M. R. BÈGUE-KIRN, C.; ZHANG, C. Z.; LESOT, H.; WATERS, M. J. Comparison of the effects of growth hormone, insulin-like growth factor I and fetal calf serum on mouse molar odontogenesis *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v.40, n.9, p.789-799, 1995.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1984. p. 191-195.

ZHANG, C. Z.; LI, H.; YOUNG, W. G.; BARTOLD, P. M.; CHEN, C.; WATERS, M. J. Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. **Growth Factors**, v.14, n.2/3, p.131-43, 1997.

ZHONG, P.; CARA, J. F.; TAGER, H. S. Importance of receptor occupancy, concentration differences, and ligand exchange in the insulin-like growth factor I receptor system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.24, p.11451-11455, 1993.