

JOICE NAIARA BERTAGLIA PEREIRA

**Avaliação morfoquantitativa e ultraestrutural da cartilagem do  
processo condilar da mandíbula e da sincondrose basioccipital de ratos  
Wistar subnutridos e suplementados com resveratrol**

São Paulo

2015

**JOICE NAIARA BERTAGLIA PEREIRA**

**Avaliação morfoquantitativa e ultraestrutural da cartilagem do  
processo condilar da mandíbula e da sincondrose basioccipital de ratos  
Wistar subnutridos e suplementados com resveratrol**

Tese 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 Doutor em Ciências

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de concentração:**

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo

2015

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

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3207  
FMVZ

Pereira, Joice Naiara Bertaglia  
Avaliação morfoquantitativa e ultraestrutural da cartilagem do processo condilar da mandíbula e da sincondrose basioccipital de ratos Wistar subnutridos e suplementados com resveratrol / Joice Naiara Bertaglia Pereira. -- 2015.  
101 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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. Cartilagem. 2. Privação proteica. 3. MET. 4. IGF-I. 5. Polifenol. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da ação do resveratrol sobre as cartilagens primária e secundária de ratos Wistar desnutridos e submetidos à renutrição", protocolado sob o nº 2167/2011, utilizando 48 (quarenta e oito) 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 18/5/2011.

We certify that the Research "Resveratrol action on primary and secondary cartilages of the undernourished and refed Wistar rats", protocol number 2167/2011, utilizing 48 (forty-eight) 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 05/18/2011.

São Paulo, 18 de junho de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
São Paulo/SP - Brasil  
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7676/0904/8359  
Fax: +55 11 3032-2224  
E-mail: ceuavet@usp.br  
<http://www.fmvz.usp.br>

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PEREIRA, Joice Naiara Bertaglia

Título: Avaliação morfoquantitativa e ultraestrutural da cartilagem do processo condilar da mandíbula e da sincondrose basioccipital de ratos Wistar subnutridos e suplementados com resveratrol

Tese 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 Doutor em Ciências

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha eterna orientadora e grande idealizadora deste trabalho, Sílvia de Campos Boldrini (*In memoriam*). Obrigada pelo acolhimento nesta gigante (e até então) assustadora cidade, por todos os ensinamentos e conversas sempre agradáveis que tivemos. Agradeço imensamente o carinho, cordialidade e respeito com que fui recebida em seu laboratório, mesmo sem antes nos conhecermos. Seu entusiasmo e palavras de incentivo, dedicação, paciência e orientação foram essenciais no início de tudo, quando ainda estava presente, e posteriormente, fundamentais para que eu não fraquejasse na conclusão deste trabalho. Obrigada por ter confiado a mim a realização desta pesquisa, mesmo quando eu não acreditava que era capaz de tanto. Você se foi, e eu tentei... Fiz com todo amor e dedicação que consegui.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus por tudo.

Aos meus pais, Diassis Pereira Júnior (*In memoriam*) e Guiomar Bertaglia Pereira; irmãs, Gislaine Bertaglia Pereira e Jeissiane Bertaglia Pereira; e sobrinhas, Gabriella Bertaglia Ferreira e Graziella Bertaglia Ferreira, agradeço por todo amor, carinho e compreensão que tiveram comigo, principalmente durante essa fase, onde na maioria do tempo fui filha, irmã e tia à distância. Vocês são meu alicerce.

Ao meu orientador Edson Aparecido Liberti, agradeço pelo acolhimento diante das incertezas, frente a um momento extremamente difícil e por sua orientação nesse trabalho. O convívio diário me fez, aos poucos, perder o medo e substituí-lo por carinho e respeito, obrigada por poder conhecer e aprender com o ser humano que há por trás do "Professor Doutor". Levarei os ensinamentos destes anos de convivência para o resto da minha vida.

À minha professora, amiga e (sempre) orientadora Renata de Britto Mari agradeço do fundo do meu coração por ser a pessoa na qual me inspirei para prosseguir a minha vida acadêmica. Obrigada pelo incentivo e apoio nas horas em que eu mais preciso e por se mostrar sempre uma pessoa disposta a ajudar os outros. Minha confiança em você vai além do profissional. Fico muito feliz em tê-la na banca da minha tese. À você "Rê", toda minha gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Aos amigos Aline Gonçalves e Jodonai Barbosa da Silva. Agradeço pelo trabalho em grupo, troca de experiências, e acima de tudo, a amizade. O estresse diário existiu, as reclamações também, mas com certeza, passamos por tudo isso e demos boas risadas. A convivência e a ajuda de vocês foi fundamental para o desenvolvimento e finalização dessa pesquisa, bem como para meu crescimento pessoal e profissional. Meus queridos, obrigada por tudo.

À Prof. Dra. Flávia de Oliveira por todas as "curtas", valiosas e agradáveis conversas que tivemos, e também por oferecer ajuda em outros experimentos para o enriquecimento da minha pesquisa. Admiro sua pessoa encantadora e também a excelente profissional que você é. Obrigada por participar da qualificação e também da banca do meu doutorado, suas contribuições são sempre muito valiosas.

À Prof. Dra. Thelma Renata Parada Simão Marsola que conquistou meu carinho e respeito com seu jeito um tanto quanto peculiar de ser. Obrigada por fazer parte da banca do meu doutorado.

Ao Prof. Dr. Rogério Albuquerque Azeredo, por gentilmente, ter aceito o convite para compor a banca examinadora dessa tese.

À Simone Cardozo Stone que, juntamente com o Preto, fizeram parte da minha família postiça em São Paulo. Si, obrigada pela agradável convivência e por sua amizade nesses anos de pós graduação.

Ao amigo Leomar Emanuel de Almeida Mecca, agradeço seu companheirismo, nossos momentos de descontração, e também a insistência em manter contato comigo, mesmo com meus "sumiços repentinos" devido à pós graduação.

À Aline Marosti por todos os "socorros" atendidos e pelos anos de convivência dentro e fora do laboratório.

Ao amigo Kainã Fagundes pela ajuda prestada.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à



Cirurgia- LAFACC, e também aos "agregados", por todos os momentos de alegria, superação e companheirismo, principalmente a : Adriano Ciena, Aline Gonçalves, Aline Marosti, Ananda Schroeter, Catarina Tivane, Cristina Bolina, Eduardo Beber, Gisele Martins, Giovanna Campos, Ivone Benigno, Jodonai Barbosa, Josemberg Baptista, Josy Rosa, Karina do Valle, Lídia Rocha, Luciano César, Marcelo Cavalli, Marcos Vinícius da Silva, Maria Brito, Marina Gazzano, Natália Camargo, Paulo Henrique, Regina Bolina, Sonja Lobo e Thelma Parada.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-ICB-USP, especialmente a: Kelly Patrícia Nery Borges, Marta Maria Righetti, Sônia Regina Yokomizo de Almeida e Sebastião Boleta, por todo auxílio prestado nas diferentes etapas desse trabalho e também pelo carinho e acolhimento de sempre.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-FMVZ/USP, principalmente a: Elza Maria Rosa, Jaqueline Martins, Maicon Barbosa e Lia Flávia Rodrigues, pelo auxílio nas partes burocráticas da Tese.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (processos n. 2012/06902-3 e n. 2013/11278-0) pelo apoio financeiro através da concessão do Auxílio à Pesquisa e também da bolsa de doutorado.

## RESUMO

PEREIRA, J. N. B. **Avaliação morfoquantitativa e ultraestrutural da cartilagem do processo condilar da mandíbula e da sincondrose basioccipital de ratos Wistar subnutridos e suplementados com resveratrol.** [Morphoquantitative and ultrastructural evaluation of the mandibular condylar cartilage and basioccipital synchondrosis of Wistar rats subjected to protein undernutrition and supplementation with resveratrol]. 2015. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A subnutrição é uma doença causada pela ingestão inadequada e/ou insuficiente de energia ou de outras biomoléculas, que pode comprometer o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos. Em conjunto, a cartilagem do processo condilar da mandíbula e a sincondrose basioccipital representam os dois centros efetivos do crescimento craniofacial, que depende, dentre outros, de fatores locais como a produção do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e seu receptor (IGF-IR). Alterações tanto no peptídeo quanto no receptor estão associadas a graves atrasos no crescimento e desenvolvimento ósseo. Dentre os nutrientes alternativos com a capacidade de promoção da recuperação nutricional, destaca-se o resveratrol, um polifenol contido na uva e derivados que pode promover a melhora do crescimento através de propriedades osteogênicas, além de atuar como condroprotetor. Assim, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos da subnutrição proteica na cartilagem do processo condilar da mandíbula (PC) e na sincondrose basioccipital (SBo) de ratos, bem como os processos de renutrição e suplementação com resveratrol nos períodos pré-púbere (21 dias) e púbere (60 dias). Os grupos nutrido (N) e subnutrido (S) foram formados por filhotes cujas mães receberam dieta normoproteica e hipoproteica, respectivamente, desde o período de acasalamento; ao completarem 21 dias de vida extrauterina, época determinada para o desmame, os filhotes foram eutanasiados. A partir do 22º dia de vida, filhotes dos grupos N e S foram mantidos com as respectivas dietas até o 60º dia de vida quando constituíram, respectivamente, os grupos NN e SS. Dois grupos considerados renutridos foram formados por animais do grupo S, que a partir do 22º dia passaram a receber, o primeiro, a dieta normoproteica com 20% de caseína (grupo RN), e o segundo, a dieta normoproteica acrescida de resveratrol (RRv). A cartilagem do PC e a SBo foram processadas através das técnicas histológicas rotineiras e posteriormente submetidas às colorações da HE, Picrossíruis e Safranina-O, para a evidenciação dos componentes

celular e colágeno e imunohistoquímica para a marcação de células reativas ao IGF-I e IGF-IR. Os aspectos ultraestruturais também foram analisados através da microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que a subnutrição foi capaz de alterar os componentes da matriz extracelular (MEC), acarretando em modificações na secreção das fibrilas colágenas e acúmulo de proteoglicanas nos tecidos; diminuição do número de células imunorreativas ao IGF-I e IGF-IR na cartilagem do PC e atraso no crescimento ósseo endocondral, comprovado através das avaliações quantitativas e morfométricas, em ambos os tecidos. A renutrição com dieta normal foi parcialmente eficaz na recuperação dos parâmetros avaliados, e pode ter provocado uma diminuição da capacidade de resposta celular ao IGF-I. Os efeitos condroprotetores do resveratrol foram fundamentados através da recuperação dos componentes da MEC e organelas dos condrócitos e uma possível diminuição da insensibilidade ao IGF-I; o atraso no crescimento ósseo endocondral foi minimizado através do seu potencial osteogênico (mais acentuado na SBo). Muito embora a recuperação dos tecidos não tenha ocorrido totalmente, diante dos dados apresentados, pode-se afirmar que a suplementação de resveratrol na dieta auxiliou de forma mais efetiva no restabelecimento dos parâmetros afetados pela subnutrição do que somente a recuperação proteica com dieta normal.

Palavras-chave: Cartilagem. Privação proteica. MET. IGF-I. Polifenol.

## ABSTRACT

**PEREIRA, J. N. B. Morphoquantitative and ultrastructural evaluation of the mandibular condylar cartilage and basioccipital synchondrosis of Wistar rats subjected to protein undernutrition and supplementation with resveratrol.** [Avaliação morfoquantitativa e ultraestrutural da cartilagem do processo condilar da mandíbula e da sincondrose basioccipital de ratos Wistar subnutridos e suplementados com resveratrol]. 2015. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Undernutrition is a disease caused by inadequate and / or insufficient intake of energy or other biomolecules, which can compromise growth and development of tissues. Together, the mandibular condylar cartilage and basioccipital synchondrosis represent the two effective centers of craniofacial growth, which depends of the factors such as the local production of insulin like growth factor I (IGF-I) and receptor (IGF-IR). Changes in both the peptide and receptor are associated with serious delays in growth and bone development. Among the alternative nutrients to the promotion capacity of nutritional recovery, there is resveratrol, a polyphenol contained in grapes and derivatives that can promote improved growth through osteogenic properties, besides acting as chondroprotective. Thus, the present study aimed to evaluate in rats the effects of protein undernutrition in the mandibular condylar cartilage and basioccipital synchondrosis, as well renutrition and supplementation with resveratrol in pre pubertal periods (21 days) and pubertal (60 days). The nourished groups (N) and undernourished (S) were formed by young whose mothers received normal protein and hypoproteic diet respectively since the breeding season; to complete 21 days of extra-uterine life, given time to weaning, puppies were euthanized. From the 22nd day of life, puppies from N and S groups were kept with their diets until the 60th day of life when constituted, respectively, NN and SS groups. Two groups considered re-nourished were formed by the S group, which from day 22 began receiving, the first, the normal protein diet with 20% casein (RN group), and the second, the normal protein diet plus of resveratrol (RRv). The cartilage of PC and SBo were processed through routine histological techniques, and then subjected to HE, Sirius red and Safranin-O staining for the disclosure of cellular components and collagen and immunohistochemistry for marking cells responsive to IGF-I and IGF-IR. The ultrastructural aspects were also analyzed by transmission electron microscopy. The results showed that undernutrition was able to change the components of

the extracellular matrix (ECM) leading to changes in the secretion of collagen fibrils and proteoglycans accumulation in the tissues; decrease in the number of immunoreactive cells to IGF-I and IGF-IR in PC cartilage and delayed endochondral bone growth, confirmed by quantitative and morphometric analysis in both tissues. Renutrition with normal diet was partially effective in recovering the parameters evaluated, and may have caused a decrease in cell responsiveness to IGF-I. The chondroprotective effects of resveratrol were founded by recovering the ECM components and organelles of chondrocytes and a possible decrease in the insensitivity to IGF-I; the delay in endochondral bone growth was minimized by osteogenic potential (more pronounced in SBo). Although the tissue recovery has not fully occurred, the resveratrol supplementation in the diet helped more effectively in restoring the parameters affected by undernutrition than just protein recovery with normal diet.

**Keywords:** Cartilage. Protein deprivation. MET. IGF-I. Polyphenol.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| a               | Camada articular  |
| ATM             | Articulação temporomandibular   |
| ATP             | Adenosina trifosfato  |
| c               | Camada condroblástica   |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono  |
| DAB             | Diaminobenzidine terahydrochloride                                    |
| DP              | Desvio padrão   |
| EDTA            | Solução desmineralizadora etileno-diamino-tetra-acetatodissódico      |
| fi              | Zona fibrilar do nucléolo   |
| EPR             | Erro padrão relativo  |
| g               | Zona granular do nucléolo   |
| GH              | Hormônio de crescimento   |
| h               | Camada hipertrófica   |
| HE              | Hematoxilia-eosina  |
| ICB/USP         | Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo         |
| IGFBP           | Proteína de ligação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina |
| IGF-I           | Fator de crescimento semelhante à insulina-I                          |
| IGF-II          | Fator de crescimento semelhante à insulina- II                        |
| IGF-IR          | Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina- I             |
| MEC             | Matriz extracelular   |
| MET             | Microscopia eletrônica de transmissão                                 |
| ML              | Microscopia de luz  |
| N               | Grupo nutrido de 21 dias  |
| NN              | Grupo nutrido de 60 dias  |
| p               | Camada pré-condroblástica   |
| PBS             | Tampão fosfato salino   |
| PC              | Processo condilar da mandíbula  |
| Pt              | Sistema teste   |
| Pp              | Número de pontos  |
| r               | Zona de repouso   |
| RER             | Retículo endoplasmático rugoso  |

|     |   |
|-----|---|
| RN  | Grupo renutrido com dieta normal                          |
| RRv | Grupo renutrido com dieta normal acrescida de resveratrol |
| RSV | Polifenol resveratrol                                     |
| S   | Grupo subnutrido de 21 dias                               |
| SBo | Sincondrose basioccipital                                 |
| s   | Camada seriada  |
| SS  | Grupo subnutrido de 60 dias                               |
| t   | Espessura total   |
| Vv  | Densidade de volume                                       |

## SUMÁRIO

|                |  |           |
|----------------|--|-----------|
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2</b>       | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>21</b> |
| 2.1            | SUBNUTRIÇÃO: PREVALÊNCIA E REPERCUSSÕES .....                                | 21        |
| 2.2            | O EIXO IGF-I.....  | 22        |
| 2.3            | REGULAÇÃO NUTRICIONAL DO IGF-I E DAS PROTEÍNAS<br>LIGANTES .....             | 24        |
| 2.4            | CRESCIMENTO CRANIOFACIAL .....   | 24        |
| 2.5            | POLIFENÓIS E RESVERATROL .....   | 27        |
| <b>3</b>       | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>30</b> |
| 3.1            | GERAIS .....   | 30        |
| 3.2            | ESPECÍFICOS .....  | 30        |
| <b>4</b>       | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>32</b> |
| 4.1            | ACASALAMENTO E GESTAÇÃO .....  | 32        |
| 4.2            | OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....                                       | 33        |
| <b>4.2.1</b>   | <b>Formação dos grupos de 21 dias (N e S).....</b>                           | <b>33</b> |
| <b>4.2.2</b>   | <b>Formação dos grupos de 60 dias .....</b>                                  | <b>33</b> |
| 4.3            | AVALIAÇÕES QUALITATIVAS .....  | 34        |
| 4.4            | IMUNOHISTOQUÍMICA .....  | 34        |
| 4.5            | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....                            | 35        |
| 4.6            | AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA .....  | 36        |
| <b>4.6.1</b>   | <b>Espessura das camadas, área e densidade de volume dos condrócitos....</b> | <b>36</b> |
| <b>4.6.2</b>   | <b>Área da matriz extracelular.....</b>                                      | <b>38</b> |
| 4.7            | TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....   | 38        |
| <b>5</b>       | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>40</b> |
| 5.1            | CARTILAGEM DO PC .....   | 40        |
| <b>5.1.1</b>   | <b>Aspectos qualitativos .....</b>   | <b>40</b> |
| <i>5.1.1.1</i> | <i>Características gerais do tecido.....</i>                                 | <i>40</i> |
| <i>5.1.1.2</i> | <i>Tipificação das fibras colágenas.....</i>                                 | <i>43</i> |
| <i>5.1.1.3</i> | <i>Matriz Extracelular (MEC).....</i>  | <i>45</i> |



|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 5.1.1.4      | <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i> ..... | 46        |
| <b>5.1.2</b> | <b>Análise quantitativa</b> .....                        | <b>50</b> |
| 5.1.2.1      | <i>Área da MEC</i> .....                                 | 50        |
| 5.1.2.2      | <i>Espessura das camadas</i> .....                       | 50        |
| 5.1.2.3      | <i>Densidade e área dos condrócitos</i> .....            | 52        |
| 5.1.2.4      | <i>Expressão de IGF-I e IGF-IR</i> .....                 | 53        |
| 5.2          | SINCONDROSE BASIOCCIPITAL (SBo).....                     | 56        |
| <b>5.2.1</b> | <b>Aspectos qualitativos</b> .....                       | <b>56</b> |
| 5.2.1.1      | <i>Características gerais do tecido</i> .....            | 56        |
| 5.2.1.2      | <i>Tipificação das fibras colágenas</i> .....            | 59        |
| 5.2.1.3      | <i>Matriz Extracelular (MEC)</i> .....                   | 61        |
| 5.2.1.4      | <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i> ..... | 61        |
| <b>5.2.2</b> | <b>Análise quantitativa</b> .....                        | <b>66</b> |
| 5.2.2.1      | <i>Área da MEC</i> .....                                 | 66        |
| 5.2.2.2      | <i>Espessura das camadas</i> .....                       | 67        |
| 5.2.2.3      | <i>Densidade e área dos condrócitos</i> .....            | 68        |
| 5.2.2.4      | <i>Expressão de IGF-I e IGF-IR</i> .....                 | 69        |
| <b>6</b>     | <b>DISCUSSÃO</b> .....                                   | <b>73</b> |
| 6.1          | CONDROCITOS .....  | 73        |
| 6.2          | MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....                           | 74        |
| 6.3          | CAMADAS DO TECIDO CARTILAGÍNEO .....                     | 77        |
| 6.4          | IGF-I E IGF-IR .....                                     | 79        |
| <b>7</b>     | <b>CONCLUSÕES</b> .....                                  | <b>83</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                 | <b>87</b> |

## ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

A subnutrição é uma doença crônica causada pela ingestão inadequada e/ou insuficiente de energia ou de outras biomoléculas, como por exemplo, as proteínas: macronutrientes responsáveis pela construção e manutenção dos tecidos corpóreos que estão presentes na maior parte dos alimentos (KATSILAMBROS et al., 2011). Dada a importância destes compostos em processos celulares, bem como seus efeitos biológicos e protetores, possíveis distúrbios nutricionais podem comprometer o crescimento e o desenvolvimento teciduais (WU et al., 2012).

A cartilagem do processo condilar da mandíbula e a sincondrose esfenoccipital, são tecidos cartilagíneos que representam sítios efetivos de crescimento craniofacial (TAKANO-YAMAMOTO et al., 1991). A primeira é definida como uma cartilagem articular, ainda que, diferentemente das cartilagens assim classificadas, exiba distinções biológicas e sofra alterações adaptativas em resposta a estímulos externos (GARANT, 2003). Já a segunda, a sincondrose esfenoccipital, é semelhante à cartilagem epifisial dos ossos longos, apresentando uma zona de repouso em comum que contribui de forma eficaz para o crescimento da base do crânio a partir de células que darão origem a condrócitos proliferativos (ABAD et al., 2002).

O crescimento cartilagíneo é parcialmente determinado por fatores epigenéticos e também influenciado por fatores extrínsecos como estímulos mecânicos, sistêmicos (hormônios) e mediadores locais (fatores de crescimento e citocinas). Quanto a esses mediadores, sabe-se que condições derivadas da subnutrição, apresentam associação com a atividade do IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I). Na cartilagem, este é um polipeptídeo que estimula a proliferação, diferenciação e maturação dos condrócitos (SHUM, NUCKOLLS, 2002). É sintetizado e secretado por muitos tipos de células, atuando sistemicamente através do hormônio de crescimento (GH) e localmente por mecanismos autócrinos e parácrinos (DELATTE et al., 2004). Os efeitos celulares do IGF-I são mediados através da ligação em receptores específicos (IGF-IR), os quais são encontrados principalmente em células de origem mesenquimal como os fibroblastos, osteoblastos e condrócitos. Alterações tanto no peptídeo quanto no receptor estão associadas a graves atrasos no crescimento e desenvolvimento ósseos (BAKER et al., 1993).

Efeitos deletérios na cartilagem do processo condilar da mandíbula frente à subnutrição foram relatados (OLIVEIRA et al., 2010; MARTÍN et al., 2014; CAVALLI et al., 2015) comprovando que a depleção proteica compromete efetivamente o crescimento

craniofacial. Até onde se teve acesso à literatura, as pesquisas que correlacionam sincondrose esfenoccipital e a subnutrição são escassas. No entanto, estudos que utilizaram a cartilagem epifisial de diferentes ossos, demonstraram que a privação de proteínas compromete a espessura total, número de condrócitos da camada proliferativa e o tamanho das células hipertróficas da cartilagem, provocando atraso no crescimento ósseo endocondral (HENRICHS et al., 1997; FARNUM et al., 2003; GAT-YABLONSKI et al., 2004).

Considerando o desempenho de alguns nutrientes alternativos com propriedades funcionais benéficas e capacidade de promoção da recuperação nutricional, destaca-se um composto denominado resveratrol, polifenol presente em uma ampla variedade de vegetais, incluindo amoras, uvas e amendoins, sendo, portanto, um componente presente na dieta humana. Trata-se de nutriente membro da família dos estilbenos, produzido em resposta a ataques de patógenos, radiação UV e exposição ao ozônio. Pesquisas mostram que o resveratrol tem efeitos anti-inflamatórios, antitumorais, anticarcinogênicos, antienvhecimento, antioxidantes (ALARCÓN DE LA LASTRA et al., 2005). Além disso, também atua como condroprotetor, e promove melhora no crescimento através de propriedades osteogênicas (CSAKI et al., 2008; KARIMIAN et al., 2013; KIM et al., 2014).

Com base nesses dados, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a cartilagem do processo condilar da mandíbula e a sincondrose basioccipital de ratos nutridos, subnutridos, renutridos e suplementados com resveratrol, na tentativa de reconhecer as alterações morfológicas decorrentes da privação proteica, a possível recuperação dos tecidos cartilagíneos, bem como avaliar a imunorreatividade celular ao IGF-I e ao seu receptor (IGF-IR) nesses tecidos fundamentais para os processos de formação, manutenção e integridade do esqueleto crânio-facial.

***REVISÃO DE LITERATURA***

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção reúne, a partir de um levantamento bibliográfico detalhado, a descrição da literatura sobre os assuntos que fundamentam o tema da presente pesquisa.

### 2.1 SUBNUTRIÇÃO: PREVALÊNCIA E REPERCUSSÕES

A subnutrição é um problema social apontada como um marcador de pobreza, presente, em sua grande maioria, nas áreas subdesenvolvidas do mundo, acometendo mais especificamente crianças (ISSLER et al., 1996; UNCF, 2003). Pode ser definida como uma doença complexa e multicausal, que ocorre pela carência dos nutrientes necessários ao organismo para o seu metabolismo fisiológico determinada, ou pela falta de aporte, ou inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), nos países em desenvolvimento, esta doença é a segunda maior causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade. No Brasil, estima-se que a mortalidade de crianças entre zero e quatro anos, diretamente afetadas pela subnutrição, seja de aproximadamente 2 %.

Alterações metabólicas e endócrinas devido à baixa ingestão calórica ou proteica são relatadas em mamíferos em geral, inclusive em humanos (GOBATTO, 1993). Com a subnutrição, o organismo responde às restrições de maneira singular manifestando, dentre outros sintomas, fraqueza, caquexia e retardo no crescimento (OLIVEIRA et al., 1998). Desta forma, duas síndromes são descritas desde há muito, e que correspondem a manifestações extremas da subnutrição (SHILS et al., 1994). O **marasmo** representa o produto final da adaptação metabólica à carência energética, onde a ingestão de calorias é insuficiente para satisfazer tal privação, caracterizando-se pela perda severa de massa muscular e pele enrugada (CHANDRA, 1992; WATERLOW, 1997). Já o **kwashiorkor** pode ser definido como uma incapacidade de adaptação à deficiência proteica, determinando modificações que se manifestam como hipoplasia, atrofia dos tecidos e diminuição do tamanho corporal e dos órgãos (MADI et al., 1975; NUNES et al., 2002).

Definido como o resultado da interação de um conjunto de influências ambientais, o crescimento pode ser afetado por fatores como a atividade física e dieta adequada, e também fatores orgânicos, no qual se incluem a herança genética e o sistema neuroendócrino (ONIS et al., 1993), que regem a proliferação celular na cartilagem de crescimento e consequente alongamento linear dos ossos (ROGOL et al., 2009). Desta forma, subentende-se que crescimento e nutrição estão intrinsecamente ligados, pois os indivíduos não conseguem alcançar seus potenciais genéticos de crescimento se não tiverem atendido às suas necessidades nutricionais básicas, acarretando inúmeros déficits, dentre eles os estaturais (RIVERA et al., 2003).

## 2.2 O EIXO IGF-I

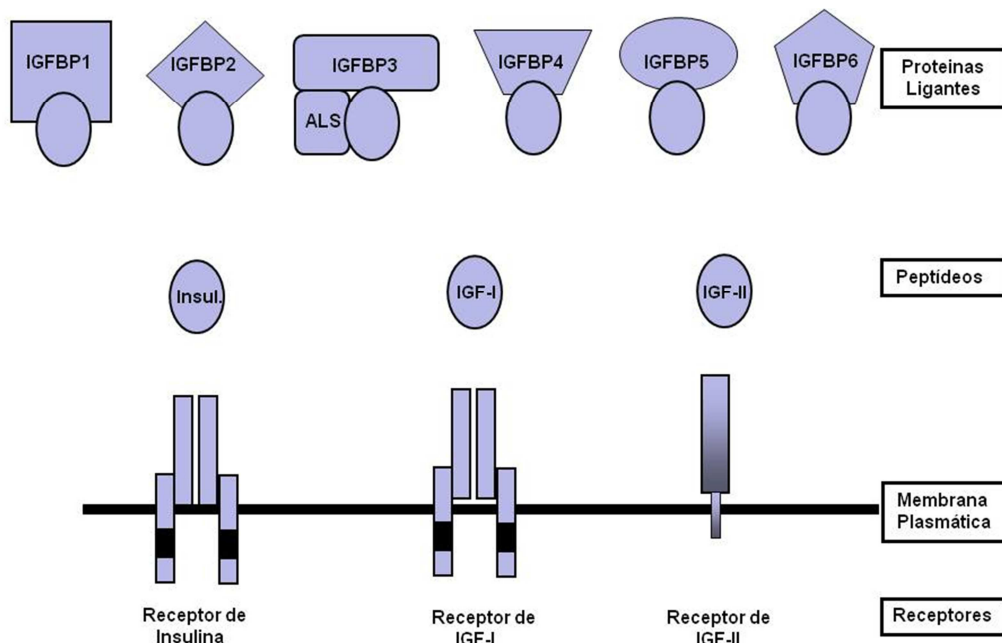
O hormônio de crescimento (GH), que atua diretamente através da ligação aos seus receptores na cartilagem epifisial, e indiretamente, no processo de diferenciação celular e na síntese do colágeno tipo I, é um dos responsáveis pelo crescimento ósseo e também tecidual (BORBA et al., 2003; GODFREY et al., 2003; SEIK et al., 2003). Um dos principais braços de ação do GH é o IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina-I), um polipeptídeo produzido pela maioria dos tecidos, principalmente pelo fígado, que possui função vital na regulação do crescimento somático e da proliferação celular. No esqueleto, assume funções importantes como: a diferenciação, a maturação e o recrutamento de osteoblastos (BORBA et al., 2003), bem como a estimulação da síntese da matriz cartilaginosa (FLECHTENMACHER et al., 1996; SAH et al., 1994).

O IGF-I está amplamente associado a seis proteínas de ligação extracelulares, as IGFBP's - 1-6 (KETELSLEGERS et al., 1995), sendo seus efeitos biológicos em todos os tipos de células e tecidos, mediados por receptores específicos de alta afinidade com homologia estrutural aos receptores de insulina (conhecidos como IGF-IR), capazes de se ligar também, aos fatores de crescimento semelhantes à insulina tipo II (IGF-II). Os receptores IGF-IR são formados por duas subunidades alfa, unidas por pontes dissulfeto (que contêm os sítios de ligação para o IGF-I), e duas subunidades intracelulares beta com propriedade transmembrana, onde em uma ocorre o sítio de ligação do ATP (adenosina trifosfato), e na outra, a ligação com a tirosina quinase, ambas constituindo o mecanismo de transdução de sinal para o receptor. De um modo geral, acredita-se que todos os efeitos da

ativação do IGF-IR estão relacionados com a ação da tirosina quinase e a fosforilação de substratos que ativam propriedades celulares específicas, desencadeando diversas ações biológicas (HOLZENBERGER, et al., 2004). Devido à grande variedade dos sítios de produção do IGF-I e seu receptor, além das ações endócrinas clássicas, eles atuam também por mecanismos autócrinos e parácrinos (HOLLY; WASS, 1989).

O GH estimula a secreção do IGF-I, que por sua vez participa dos mecanismos de controle fisiológico de GH, sendo por isso utilizado para avaliar indiretamente a sua ação. Por sua vez, a insulina está amplamente envolvida com todo esse processo, uma vez que, além de atuar em receptores comuns ao IGF-I, é um importante hormônio ligado a regulação da homeostase, da glicose e de eventos celulares que regulam os efeitos metabólicos e de crescimento. Além disso, ela é amplamente aceita como um substrato e provedor de energia (FRYBURG et al., 1995), visto que pode promover aumento da síntese de DNA, RNA e proteínas no tecido alvo (MANCHESTER, 1972; LARON, 2008); porém, pouco aparecendo nas listas dos hormônios de crescimento (LIFSHITZ, 2007) (Figura 1).

Figura 1- Sistema IGF



Fonte: (WERNER, KATZ, 2004).

Legenda: 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 (IGBP1-6).



### 2.3 REGULAÇÃO NUTRICIONAL DO IGF-I E DAS PROTEÍNAS LIGANTES

Os níveis de IGF-I e seu receptor podem ser afetados por inúmeros fatores, como atividade física, índice de massa corporal e principalmente o consumo energético e o estado nutricional (YU, ROHAN, 2000). Devine et al. (1998), em experimento com adultos cujo estado nutricional foi considerado normal, revelaram uma correlação positiva entre a ingestão proteica e os níveis séricos de IGF-I. Com a subnutrição proteico-calórica, os níveis de IGF-I diminuem, podendo ocasionar a redução do efeito do IGF-I em órgãos alvo; porém, com a melhora no consumo de energia, estes tendem a voltar ao seu valor normal (MANRAL, SINGH, 2011). Para Smith et al. (1995), a redução de 50% na ingestão de calorias ou de 30% de proteína, pode resultar no declínio dos níveis de IGF-I e IGFBP-3.

Com a subnutrição, são observadas algumas alterações hormonais adaptativas que funcionam como mecanismo de proteção, objetivando direcionar a energia residual para a sobrevivência e não para o crescimento. Desta forma, ocorre uma redução da velocidade de crescimento e da idade óssea, promovendo um atraso no desenvolvimento púbere, onde o GH basal encontra-se elevado, enquanto que o IGF-I é baixo, demonstrando uma insensibilidade ao GH em atuar como mecanismo de proteção (RIVERA et al., 2003; LIBERMAN et al., 2004).

Nas cartilagens, a insulina e também os IGFs, exibem intensa atividade na regulação da proliferação dos condrócitos (DELATTE et al., 2004).

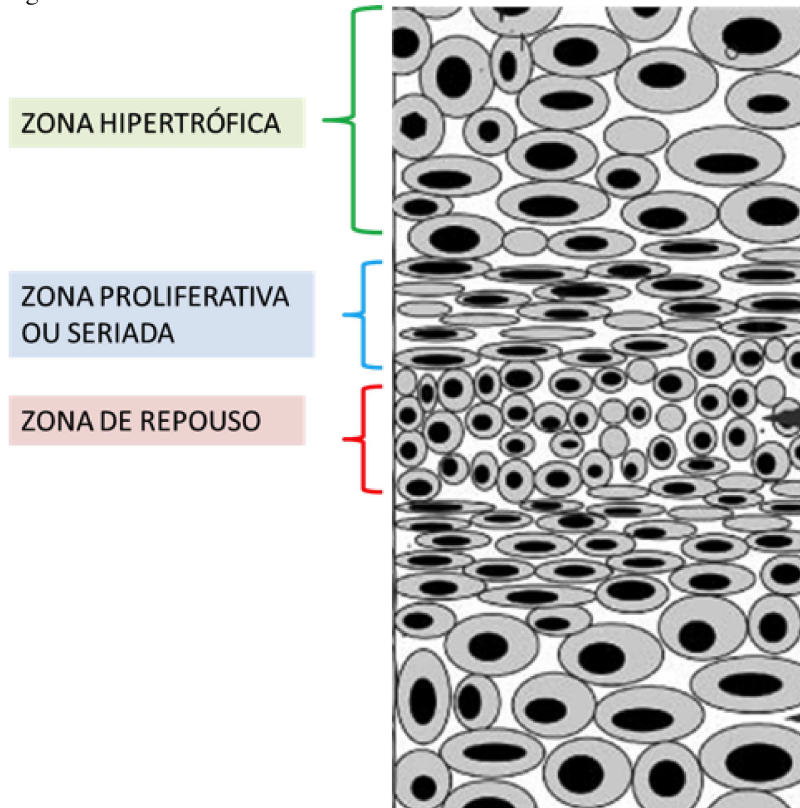
### 2.4 CRESCIMENTO CRANIOFACIAL

As sincondroses basioccipital (SBo) ou esfenoccipital são constituídas por cartilagem primária, fazendo parte do esqueleto primário cartilágneo, precursor do processo de ossificação endocondral. Esses locais representam os sítios do crescimento rostro-caudal e ântero-posterior da base do crânio de roedores e humanos, respectivamente. Diferentemente do que ocorre com a sincondrose intra-occipital, que se ossifica completamente no período de aproximadamente cinco semanas de desenvolvimento pós-natal, a SBo ainda apresenta uma pequena parte cartilágnea na idade adulta (CENDEKIAWAN et al., 2010). Morfológicamente, a SBo é similar a cartilagem epifisial dos ossos longos, exceto pelo seu

crescimento, que ocorre de forma bidirecional. Pode ser considerada como duas placas de crescimento que compartilham uma zona comum de ativa proliferação condroblástica, as quais direcionam a formação e a organização da sincondrose, conhecida como zona de repouso (ABAD et al., 2002). As diferentes zonas da parte da SBo voltada para o osso basioccipital refletem-se na parte oposta voltada para o osso basiesfenóide, com um centro cartilágneo comum para ambas.

Da parte média para as extremidades distais, a sincondrose é constituída por uma zona ou camada de repouso, zonas proliferativas (ou seriadas) e zonas hipertróficas (NIE, 2005) (Figura 2).

Figura 2- Sincondrose da base do crânio



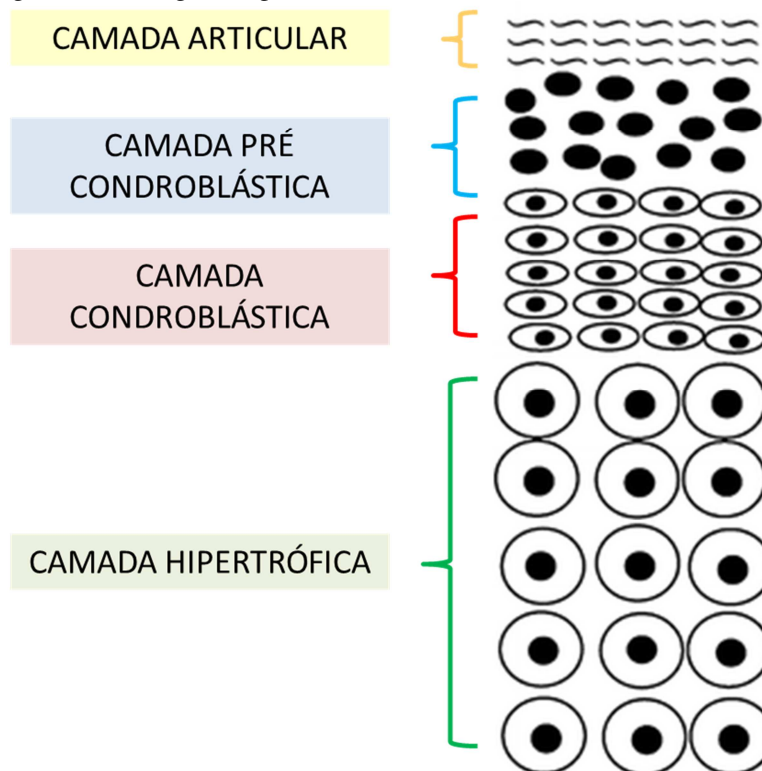
Fonte: (NIE, 2005).

Legenda: Zonas constituintes das sincondroses basicranianas: Uma zona de repouso em comum, localizada na região central, duas zonas proliferativas e duas zonas hipertróficas em suas extremidades distais.

Além dessas estruturas da base do crânio, em ratos, o processo condilar da mandíbula (PC) representa outro sítio importante relacionado ao crescimento craniofacial, exercendo papel fundamental durante o desenvolvimento da mandíbula. Sua estrutura cartilágnea,

classificada como uma cartilagem secundária é capaz de fornecer adaptações regionais de crescimento do osso, crescimento ósseo endocondral e mobilidade articular (RAMFJORD et al., 1971; VINKKA, 1982). A cartilagem do PC é constituída por quatro camadas distintas: 1- articular, composta principalmente por fibroblastos e colágeno tipo I, que suporta as forças transmitidas para a articulação temporomandibular (ATM); 2- pré condroblástica, constituída por células mesenquimais ou indiferenciadas, que possuem a capacidade de se diferenciar em fibroblastos (constituintes da camada fibrosa), ou em condroblastos (células encontradas na cartilagem hialina); 3- condroblástica, formada por condroblastos que promovem a síntese de matriz cartilágnea, principalmente colágeno tipo II e 4- hipertrófica, organizada a partir de condrocitos hipertrofiados, conhecida como zona de ossificação endocondral (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004) (Figura 3).

Figura 3 - Cartilagem do processo condilar da mandíbula



Fonte: KIMURA et al., 2008)

Legenda: Camadas constituintes da cartilagem do PC da mandíbula.

Segundo Von Den Hoff e Dellate (2008), além da determinação genética, o crescimento cartilágneo é influenciado por fatores sistêmicos (hormônios e vitaminas) e locais (fatores de crescimento e estímulos mecânicos). A presença do IGF-I tem sido relatada

na cartilagem do PC (MAOR et al., 1993; VISNAPUU et al., 2001), cujo receptor foi também encontrado na camada pré condroblástica em camundongos, e na camada condroblástica em ratos, nos períodos pré e pós natal, respectivamente (MAOR et al., 1993; LIVNE et al., 1997; FUENTES et al., 2002).

A cartilagem do PC é do tipo fibrosa em sua superfície, hialina na parte inferior, e sofre mudanças adaptativas a estímulos externos. Possui capacidade multidirecional de crescimento e remodelação e, portanto, se adapta a mudanças mecânicas e posicionais, por alterar ou regenerar a condrogênese (SAKAMOTO et al., 2002). Em estudos com ratos, Oliveira et al. (2010) verificaram que no período pré- púbere, a subnutrição proteica e a lesão térmica corporal afetaram o crescimento do PC; entretanto, os efeitos na matriz extracelular variaram, com a deficiência de proteína alterando a quantidade e o conteúdo de deposição óssea, e a lesão térmica corporal interferindo, principalmente, na maturação do colágeno.

## 2.5 POLIFENÓIS E RESVERATROL

Os efeitos benéficos da ação dos antioxidantes sobre os diversos sistemas corpóreos têm sido descritos em experimentos com diferentes espécies animais, destacando-se: a redução do risco de doenças cardiovasculares, inibição do crescimento tumoral, diminuição da absorção de gordura, de gasto energético e de processos inflamatórios, assim como abrandamento da severidade da artrite (YANG et al., 2001; HIGDON et al., 2003; WILLIAMSON et al., 2005).

Os polifenóis são os antioxidantes presentes em maior quantidade nos alimentos como frutas, verduras e legumes, e em bebidas tais como café, o chá e o vinho (D'ARCHIVIO et al., 2007). De acordo com Francis (2000), dentre as frutas, a uva é uma das principais fontes de compostos fenólicos, destacando-se entre eles, os flavonóides (antocianinas e flavonóis), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos), e os estilbenos (rapontienina, resveratrol). Pequenas quantidades de estilbenos estão presentes na dieta humana, sendo o mais representativo o resveratrol (RSV) que, encontrado principalmente na casca e semente das uvas escuras e seus derivados (como o vinho tinto), é produzido pela planta como um mecanismo de defesa em resposta a infecções por fungos ou a condições de estresse (MARTIN et al., 2004).

O RSV é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno),

sendo o isômero trans convertido para cis em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável. Possui propriedades funcionais importantes, atuando como antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, cardioprotetor, modulador de enzimas fundamentais que regulam a vida celular, agindo também, no processo de retardo do envelhecimento (FENG et al., 2002; BAUR et al., 2006). Além disso, a ação do RSV sobre sirtuínas e a cascata de sinalização insulina/IGF-I, fornece evidências fortes da ligação entre este composto e a melhoria do metabolismo (FRODJO et al., 2008). Uma melhora na saúde e maior tempo de sobrevivência após o tratamento com RSV foram relatadas por Baur et al. (2006) em camundongos que receberam dieta hipercalórica, demonstrando sua indução a uma “downregulation” na via insulina/IGF-I.

Estudos têm demonstrado que o RSV age sobre o estado metabólico e hormonal do organismo. Assim, em experimentos com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina verificaram-se seus efeitos benéficos, como a diminuição do peso corporal, redução da polifagia e polidipsia, e expressiva redução da glicemia e triglicérides contribuindo, ainda, para a diminuição da mortalidade e da sensibilidade à insulina, bem como para a melhora das funções motoras (SHARMA et al., 2006; SU et al., 2006; CHI et al., 2007).

Os efeitos anti-inflamatórios deste polifenol também têm sido descritos em doenças graves incluindo a artrite, que apresenta como característica principal, a perda progressiva da cartilagem articular. Desta forma, foi relatado que a aplicação intra-articular RSV por um período de duas semanas em coelhos com osteoartrite, inibiu a apoptose dos condrócitos e reduziu a produção de óxido nítrico, promovendo um efeito protetor contra a destruição da cartilagem, impedindo a progressão da doença (WANG et al., 2011). Foi descrito ainda, a sua contribuição ativa para a inibição da inflamação em articulações sinoviais (ELMALI et al., 2005) e na redução da infiltração inflamatória e de edema, decorrentes da pancreatite (MA et al., 2005).

No tecido ósseo, estudos com mulheres idosas revelaram que a ingestão de uma a três taças de vinho durante as refeições, contribuiu para um ganho em massa óssea e a consequente proteção contra a osteoporose, efeito este atribuído principalmente a um dos componentes do vinho, o RSV, (GANRY et al., 2000), que é capaz de prevenir a formação dos osteoclastos e estimular a proliferação e diferenciação dos osteoblastos *in vitro* (MIZZUTANI, et al., 1998; BOISSY et al., 2005; SONG et al., 2006). Uysal et al (2011) relataram em ratos, que a administração local de RSV, durante as fases iniciais da expansão ortopédica da sutura intermaxilar, estimula a formação óssea, encurta o período de retenção e melhora a cicatrização.

***OBJETIVOS***

### 3 OBJETIVOS

Esta seção apresenta os objetivos gerais e específicos do trabalho

#### 3.1 GERAIS

Investigar em ratos Wistar subnutridos, os componentes celular e colágeno e a função da suplementação com resveratrol, no crescimento dos tecidos cartilagíneos primário (SBo) e secundário (PC), com o uso de técnicas de microscopia de luz, imunohistoquímica e de ultraestrutura.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Em animais subnutridos (S, SS), nutridos (N, NN), renutridos (RN, RRv) avaliar na cartilagem do PC e da SBo:

- os aspectos qualitativos das camadas constituintes;
- qualitativamente os componentes estruturais de colágeno (fibras dos tipos I, II e III) e as proteoglicanas da matriz extracelular;
- os aspectos ultraestruturais dos constituintes da matriz extracelular e dos condrócitos (fibrilas colágenas, cisternas do retículo endoplasmático rugoso, membrana nuclear, densidade dos ribossomos e nucléolo);
- A espessura das camadas;
- a densidade e a área dos condrócitos das camadas condroblástica do PC e de repouso da SBo, através de método estereológico;
- a densidade de matriz extracelular evidenciada pelo método da Safranina – O.
- a expressão de IGF-I e de seu receptor (IGF-IR) nas camadas condroblástica do PC e de repouso da SBo.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção compreende a descrição detalhada da metodologia utilizada.

### 4.1 ACASALAMENTO E GESTAÇÃO

Para a formação dos grupos experimentais, foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, com peso entre 280 e 320 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas do Biotério da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno dispostas em estante vertical, no biotério do departamento de anatomia do mesmo instituto, onde serão mantidos em salas climatizadas, com temperatura controlada entre 23 e 25°C, e em ciclo de claro/escuro de 12 horas. Depois de ambientados no biotério, os animais foram acasalados destinando-se um macho para duas fêmeas em uma mesma gaiola, por um período de 10 dias (sistema poligâmico).

No primeiro dia do acasalamento a ração padrão de biotério (*pelets*) foi alterada para a ração para roedores AIN-93G preconizada pelo “*American Institute of Nutrition*” (REEVES; NIELSEN; FAHEY-JÚNIOR, 1993), preparada em laboratório especializado (Rhostrer Indústria e Comércio Ltda.), e fornecida sem restrições. Para a formação do grupo controle ou nutrido (grupo N) os animais receberam a dieta contendo 20% de caseína; já o grupo experimental ou subnutrido (grupo S) foi tratado com a dieta contendo 5% de caseína. Para ambos os grupos, a água foi fornecida sem restrições.

Decorrido o período de acasalamento, durante a gestação, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais de acordo com as respectivas dietas, mantidas durante o período de amamentação juntamente com as crias. Para as diferentes ninhadas, foi estabelecido um número mínimo quatro e número máximo de seis animais, desprezando-se aquelas com menos de quatro filhotes, ninhadas cujas mães alimentaram-se dos filhotes e o excedente de ninhadas com seis filhotes.

## 4.2 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste item foram descritos os procedimentos para a obtenção dos grupos experimentais de 21 dias (N e S) e de 60 dias (NN, SS, RN e RRv).

### 4.2.1 Formação dos grupos de 21 dias (N e S)

Os grupos N e S (n=8) foram formados por filhotes cujas mães receberam dieta normoproteica e hipoproteica, respectivamente, desde o período de acasalamento; ao completarem 21 dias de vida extrauterina, época determinada para o desmame, os filhotes foram eutanasiados.

### 4.2.2 Formação dos grupos de 60 dias

A partir do 22º dia de vida, filhotes dos grupos N e S foram mantidos com as respectivas dietas até o 60º dia de vida quando constituíram, respectivamente, os grupos NN e SS. Dois grupos considerados renutridos foram formados por animais do grupo S, que a partir do 22º dia passaram a receber, o primeiro, a dieta normoproteica com 20% de caseína (grupo RN), e o segundo, a dieta normoproteica acrescida de resveratrol, à concentração de  $22,4 \pm 0,4 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (grupo RRv), que segundo Baur et al. (2006) seria uma dose viável diária para os seres humanos.

Após o período experimental, foi realizada a eutanásia dos animais em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e estes tiveram o processo condilar da mandíbula (PC) do lado esquerdo e a sincondrose basioccipital (SBo) removidos, após cuidadosa microdissecção sob lupa estereoscópica. Os espécimes foram então processados para as técnicas descritas a seguir.

### 4.3 AVALIAÇÕES QUALITATIVAS

Após microdissecção, o PC e a SBo de 5 animais de cada grupo foram fixados com formalina tamponada por um período de 48 horas, e descalcificados em solução desmineralizadora de 7% de EDTA (etileno-diamino-tetra-acetatodissódico) em pH básico (7,0 - 7,4), numa quantidade equivalente a 20 vezes o seu volume, renovada a cada 48 horas e avaliada a cada período, com a utilização de solução de oxalato de amônia a 5%.

Confirmada a descalcificação, os espécimes foram desidratados em série crescente de álcoois (do 70° ao absoluto), diafanizados em xilol, incluídos em parafina histológica e submetidos a cortes semiseriados com 3 $\mu$ m de espessura (no plano horizontal para a SBo e no plano sagital para o PC). Posteriormente, as lâminas foram desparafinadas em estufa a 60°C, e desidratadas em série crescente de álcoois (do 70% ao absoluto).

Os cortes do PC e SBo assim obtidos, foram corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (HE), para a avaliação dos aspectos gerais dos tecidos e das camadas constituintes dessas estruturas. A tipificação das fibras colágenas foi realizada com o emprego da técnica do Picrosíríus analisado sob luz polarizada (JUNQUEIRA et al., 1979), e a avaliação da matriz cartilágínea, através do método da Safranina- O (LUNA, 1968).

### 4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a localização do IGF I e do IGF-IR (receptor), os cortes foram reidratados, por um período de 2 minutos, em solução contendo 50% de etanol em tampão fosfato PBS - 0.1M, pH 7.3) e em seguida lavados durante 2 minutos, em água destilada. O desmascaramento antigênico foi realizado, utilizando-se pepsina a 4% em HCl 0,01N por 30 minutos, por se tratar de material previamente formolizado. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada com solução específica (peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol) por cinco minutos. A incubação foi realizada com soro de cabra na proporção 1:5 em PBS, por um período de 30 minutos, a temperatura ambiente. O IGF-I e o IGF-IR foram evidenciados utilizando-se os anticorpos anti-IGF-I e anti-IGF-IR (Santa Cruz Biotechnology-Santa Cruz, CA) na diluição 1:50, que por prévia titulação, foi considerada a mais adequada. Os cortes assim tratados foram incubados com o anticorpo primário, na

diluição descrita anteriormente, por 24 horas, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavados em PBS (3×10 min), incubados em peroxidase conjugada a imunoglobulinas anti-coelho e anti-camundongo obtidos de soro de cabra por 30 minutos, incubados com Vectain ABC (Avidina e Biotina) por 30 minutos, lavados em PBS 10% (3×10 min), e incubados em solução cromogênica 3,3'-diamino-benzidina em tampão PBS 10% contendo peróxido de hidrogênio a 6% para a revelação dos cortes. Todas as reações foram acompanhadas por lâminas controle contendo diversos cortes, submetidos a todas as etapas do procedimento suprimindo-se, entretanto, a aplicação do anticorpo primário.

#### 4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados 18 animais (3 por grupo), anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal e posteriormente perfundidos com solução fixadora de *Karnovsky* modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2%) em solução tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4).

O PC e a SBo foram coletados, microdissecados sob estereomicroscópio (mantendo-se somente a parte cartilagínea) e imersos em solução fixadora durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por 3 vezes com solução tampão fosfato de sódio 0,1M e pós fixadas com solução tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas a 4°C. Novamente, as amostras foram lavadas com tampão fosfato de sódio e contrastadas com solução de acetato de uranila (0,5%) overnight. Feita a desidratação em série crescente de álcoois (do 70° ao absoluto, por 20 minutos cada) e óxido de propileno ( 2 vezes por 20 minutos), as amostras permaneceram overnight em mistura de resina e óxido de propileno (1:1), sob agitação, em seguida, substituída por resina e óxido de propileno (3:1) (por 8 horas), depois colocada em resina pura overnight. A inclusão das amostras foi feita utilizando-se resina pura, mantida em estufa a 60°C por 3 dias.

As telas foram examinadas através de microscópio eletrônico de transmissão FEI-Morgagni 268D, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP.

## 4.6 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

Este item contém a descrição detalhada dos métodos utilizados para a obtenção dos dados quantitativos do trabalho.

### 4.6.1 Espessura das camadas, área e densidade de volume dos condrócitos

Os métodos *morfométricos* descritos por Mandarim-de-Lacerda (1995) foram utilizados para as seguintes avaliações quantitativas no PC e na SBo: espessura das camadas e área dos condrócitos.

A *estereologia* foi aplicada a fim de se determinar a densidade de volume dos condrócitos. Para tanto, foram selecionados por grupo (N, NN, S, SS, RN, RRv) 60 cortes do PC e da SBo (10 por animal). Em cada corte do PC foi avaliado um campo por corte, correspondente à sua parte central; na SBo foram avaliados três campos por corte, sendo um central e dois laterais. Os campos foram documentados e analisados através de um sistema de análise de imagem computadorizada (câmera AxioCam acoplada a um microscópio binocular Carl Zeiss Axioscope 40, e software Axiovision).

A estereologia para a determinação da densidade dos condrócitos nas lâminas coradas pela HE foi submetida à regra da **amostra progressiva** (MANDARIM-DE-LACERDA, 1994), a fim de se estabelecer o menor tamanho da amostra para esse parâmetro passível de ser avaliado com resultados estatisticamente significativos. O exemplo a seguir, aplicado ao animal um, é válido para os demais (dois a cinco) de cada grupo (N, S, NN, SS, RN e RRv).

Como, com essa metodologia, seriam contados 125 campos por animal (ou seja, 625 campos para um grupo de cinco animais, um número extremamente excessivo) aplicou-se a seguinte fórmula, preconizada por HALLY (1964):

$$EPR = \sqrt{\frac{(1-Vv)}{n}}$$

Desta forma, estabeleceu-se preliminarmente, em alguns campos, a densidade de volume dos condrócitos ( $Vv$ ), de acordo com um sistema teste ( $P_T$ ) contendo 100 pontos.

De acordo com esse sistema-teste, foi determinado no campo, o número de pontos ( $P_p$ ) que incidiram sobre os condrócitos; no caso, uma média de 30 pontos, cerca de 30% dos pontos totais.

Aplicando-se a seguinte formula:

$$V_v = \frac{P_p}{P_T}$$

e, aceitando o índice de significância de 0,05 ou seja, a probabilidade de 95%, obtém-se:

$$0,05 = \sqrt{\frac{1 - 0,30}{n}}$$

portanto,

$$(0,05)^2 = \left( \sqrt{\frac{0,70}{n}} \right)^2$$

$$0,0025 = \frac{0,70}{n} \text{ ou seja,}$$

$$\mathbf{n = 280 \text{ pontos}}$$

Esses seriam, a princípio, os pontos totais que deveriam ser contados para a determinação da densidade dos condrócitos; porém, como estes ocupam somente uma pequena porcentagem da amostra, calculou-se o **n corrigido** para o  $V_v$  do material a ser estudado. Assim, determinou-se o número total de pontos, da seguinte maneira:

$$\mathbf{n \text{ corrigido} = \frac{n \text{ calculado}}{V_v}}$$

assim,

$$\mathbf{n \text{ corrigido} = \frac{280}{0,30} = \mathbf{933 \text{ pontos}}}$$

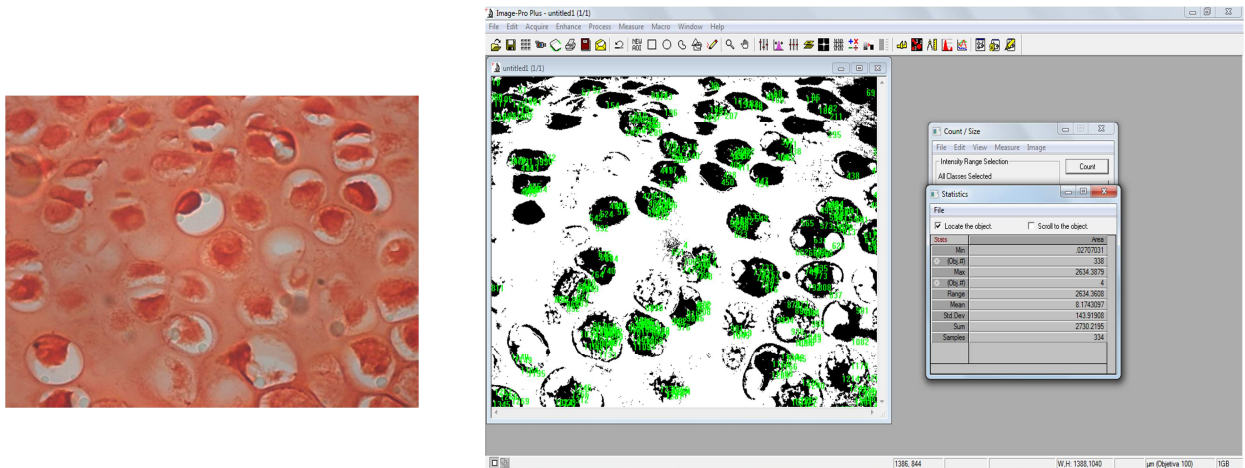
Posteriormente, calculou-se o número de campos utilizados para a determinação da densidade dos condrócitos, dividindo-se o número de pontos do **n corrigido** pelo **número de pontos totais** do sistema teste utilizado (100 pontos), que daria um total de **nove campos** (com  $0,012 \text{ mm}^2$ ), então na presente pesquisa foram utilizados 10 campos para cada animal de cada grupo de estudo (N, S, NN, SS, RN e RRv).

Para a realização da contagem, foi elaborado um sistema teste quadrangular com cinco cm de lado posicionado frente ao monitor do computador, de modo a cobrir totalmente a área das imagens do PC e da SBo. Dessa forma, foram contados todos os condrócitos contidos nessa área, evidenciados pela HE. O mesmo método foi aplicado para a determinação desse parâmetro dos condrócitos imunorreativos ao IGF-I e ao IGF-IR.

#### 4.6.2 Área da matriz extracelular

Para a quantificação da área ocupada pela MEC foram utilizados 25 cortes/grupo de cada tecido (PC e SBo), onde a região central de cada corte foi fotografada e logo após, a quantificação foi realizada no programa Image Pró Plus, selecionando a parte da matriz. O programa transformava a imagem em escala de cinza, e apresentava a área ocupada em pixels (Figura 4).

Figura 4 - Avaliação da área ocupada pela MEC



Fonte: (PEREIRA, 20015).

Legenda: Procedimento de quantificação da área da MEC. Objetiva 100X.

#### 4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise estatística foi realizada através da análise de variância- ANOVA com dois fatores (dieta e idade) e quando necessário, aplicou-se comparações múltiplas pelo método de Scott Knott.

O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% (ZAR, 1984), ou seja, valores foram considerados como significativos quando a probabilidade e índice de significância forem menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

***RESULTADOS***



## **5 RESULTADOS**

Este tópico compreende os resultados obtidos a partir das análises qualitativas e quantitativas da cartilagem do PC da mandíbula e da SBo.

### **5.1 CARTILAGEM DO PC**

Este tópico apresenta os dados relativos à cartilagem do PC da mandíbula.

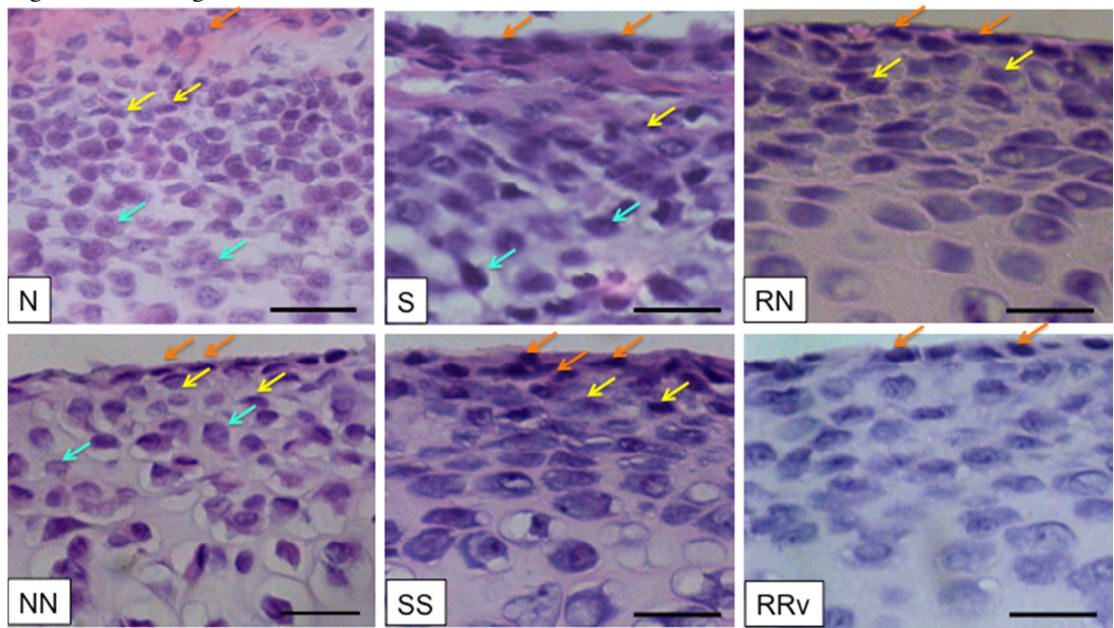
#### **5.1.1 Aspectos qualitativos**

Os resultados qualitativos estão descritos neste ítem.

##### **5.1.1.1 Características gerais do tecido**

Ao se avaliar o revestimento cartilágneo do PC, verificam-se as suas camadas constituintes básicas (articular - **a**; pré condroblástica – **p**; condroblástica – **c**), que exibem diferenças estruturais entre os grupos (Figura 5 e Tabela 1).

Figura 5 - Cartilagem do PC

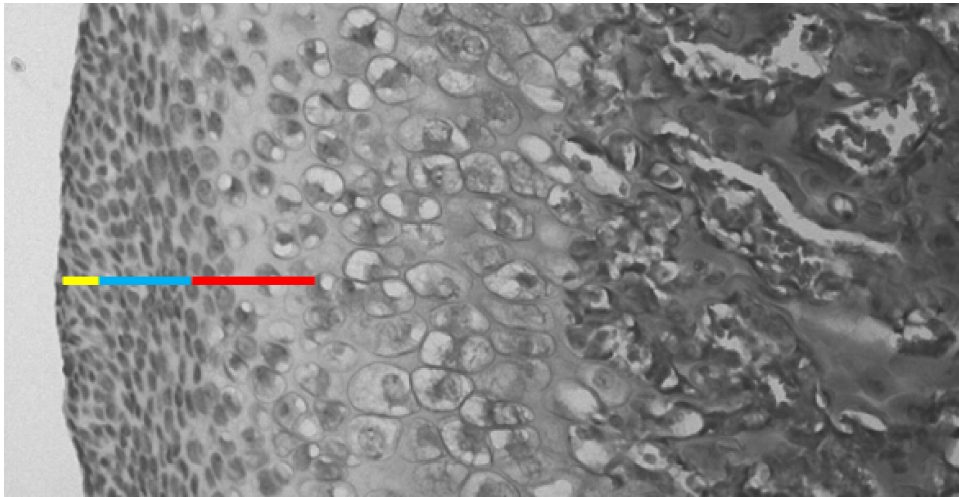


Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Células constituintes das camadas a (seta laranja), p (seta amarela) e c (seta azul) do PC nos grupos N, S, RN, NN, SS e RRv. Ver descrições das características na Tabela 1. (HE. Barra de calibração: 10 $\mu$ m).

Tabela 1- Características morfológicas das camadas constituintes do PC nos grupo N, S, NN, SS, RN e RR.v

|                                |   | <b>CAMADA/GRUPOS</b>  |  |   |   |  |  |
|--------------------------------|---|---|--|---|---|--|--|
|                                |   | <b>N</b>  | <b>S</b>   | <b>NN</b>   | <b>SS</b>   | <b>RN</b>  | <b>RRv</b>   |
| <p><b>ARTICULAR</b> ↑</p>      | <p>Geralmente com 2 lamelas, núcleos irregulares e ovalados, densamente corados</p>                                       | <p>Camada irregularmente arranjada, núcleos alongados, densamente corados</p>                         | <p>Camada única de núcleos alongados alinhados entre si</p>                                    | <p>Irregular com núcleos alongados e desalinhados</p>   | <p>A maioria dos núcleos alongados com alinhamento tendendo ao observado em NN</p>  | <p>Camada com núcleos e aspecto de arranjo semelhantes ao NN</p>                 |  |
|                                | <p><b>PRÉ-CONDROBLÁSTICA</b> ↑</p>  | <p>Irregular com núcleos ovalados, alongados e arredondados (vários contornos)</p>                    | <p>Muito irregular com baixa densidade celular, núcleos achatados e intensamente corados</p>   | <p>Delgada, com núcleos arredondados ou ovalados com diferentes intensidades de coloração</p> | <p>Individualizada, com núcleos alongados de diferentes tamanhos e intensidades</p> | <p>Irregularmente arranjada com núcleos irregulares e de diferentes tamanhos</p> | <p>Camada delgada com núcleos arredondados ou ovalados, porém maiores do que os observados no NN</p> |
| <p><b>CONDROBLÁSTICA</b> ↑</p> | <p>Exibe densidade elevada de células, a maioria de formato arredondado e basicamente a mesma intensidade de marcação</p> | <p>Irregularmente arranjada com a maioria das células de aspecto alongado e intensamente coradas.</p> | <p>Caracteriza-se por apresentar células de diferentes contornos, tamanhos e intensidades.</p> | <p>Bem definida com predomínio de células alongadas</p>                                       | <p>Bem definida, células com características semelhantes ao observado em SS</p>     | <p>Predomínio de células grandes e de contorno variado</p>                       |  |



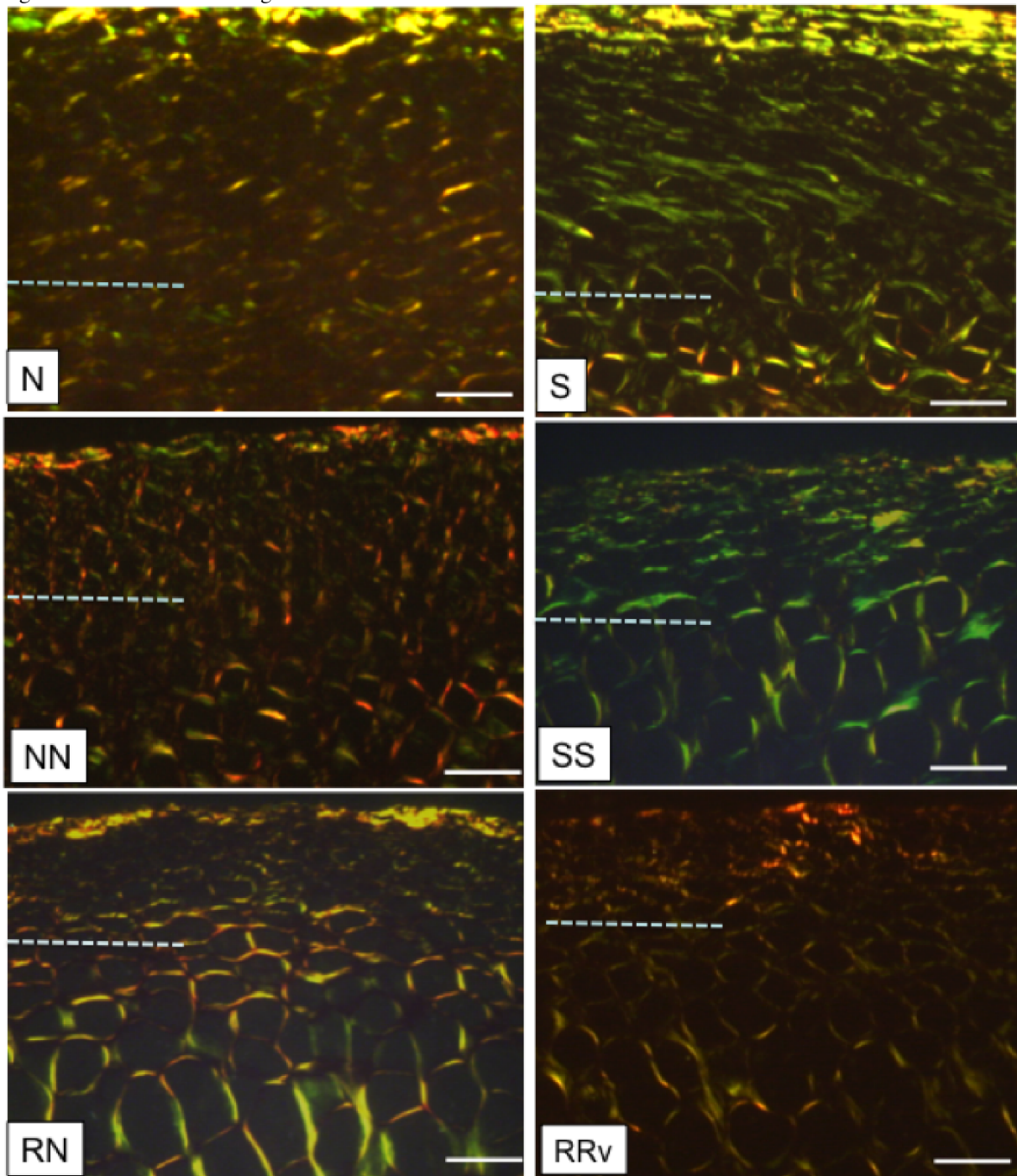
### 5.1.1.2 Tipificação das fibras colágenas

Os tipos de fibras colágenas constituintes do PC detectados nas lâminas coradas pelo método do Picrossírius, sob luz polarizada foram as do tipo I (vermelhas, laranjas e amarelas), tipo III (verdes delgadas).

Ao se comparar o PC dos espécimes dos diferentes grupos (Figura 6) verificou-se que na camada **a**, embora com diferentes espessuras de acordo com os grupos, ocorreu o predomínio das fibras colágenas do tipo I nos animais nutridos (N, NN) e renutridos (RN e RRv); as fibras predominantes nessa camada dos animais subnutridos (S e SS) foram as do tipo III.

Nas camadas **p** e **c**, analisadas conjuntamente, os animais dos grupos NN e RRv exibem uma organização em rede pantográfica, típica de malhas amplas, constituída principalmente por fibras colágenas do tipo I. Nos animais do grupo N, essa organização é detectada; porém com as fibras do tipo I formando uma rede de malhas estreitas. Ao se avaliar os animais subnutridos (S e SS) é nítida uma organização achatada das malhas, formadas quase que exclusivamente por fibras colágenas do tipo III. Organização semelhante pode ser notada nos animais RN, porém com as malhas constituídas por colágeno tipo I.

Figura 6 - Picrosíríus cartilagem do PC



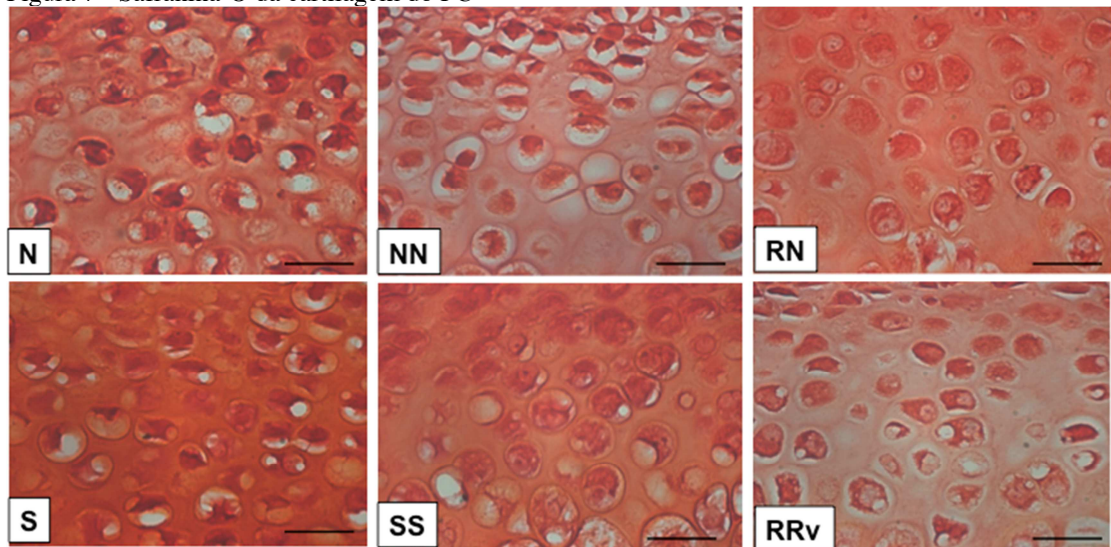
Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III nas camadas a, p e c (em conjunto acima da linha tracejada) constituintes do PC dos animais dos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. (Picrosíríus sob luz polarizada. Barra de calibração 20  $\mu$ m).

### 5.1.1.3 Matriz Extracelular (MEC)

As características da MEC da cartilagem do PC estão expressas na figura 7. Ao se avaliar inicialmente o padrão de intensidade de coloração na cartilagem do PC nos grupos estudados, verificou-se uma gradação que foi classificada em menos intensa, intermediária e mais intensa. Desta forma, a coloração menos intensa foi observada nos grupos NN e RRv; a intermediária nos grupos RN e N, e a mais intensa, nos grupos S e SS. Esses dados sugerem que a MEC do PC do grupo RRv assemelha-se àquela dos animais do grupo NN, considerado normal para os parâmetros estabelecidos na presente pesquisa.

Figura 7 - Safranina-O da cartilagem do PC



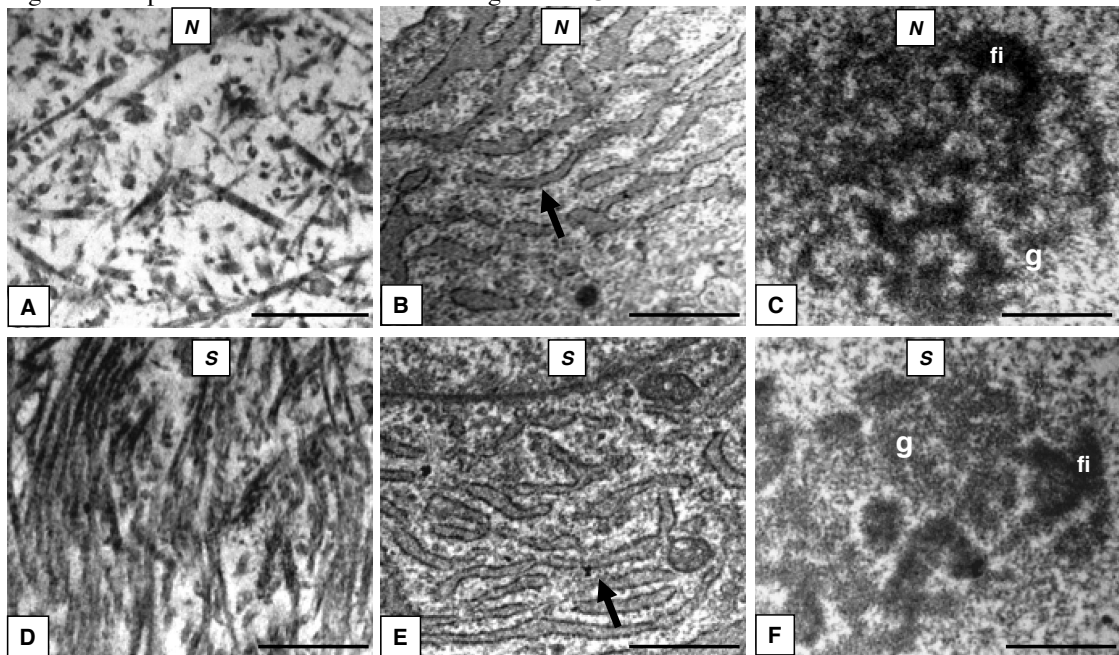
Fonte: (PEREIRA, 2015)

Legenda: Características da MEC evidenciadas pela técnica da Safranina-O nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. (Barra de calibração: 10µm).

#### 5.1.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Por essa metodologia foram avaliadas as estruturas dependentes de conteúdo proteico. Desta forma, comparou-se entre os grupos: A matriz extracelular (MEC) da cartilagem, e nos condrócitos, o retículo endoplasmático rugoso (RER) e o nucléolo (Figuras 8-10).

Figura 8 - Aspectos ultraestruturais da cartilagem do PC



Fonte: (PEREIRA, 2015).

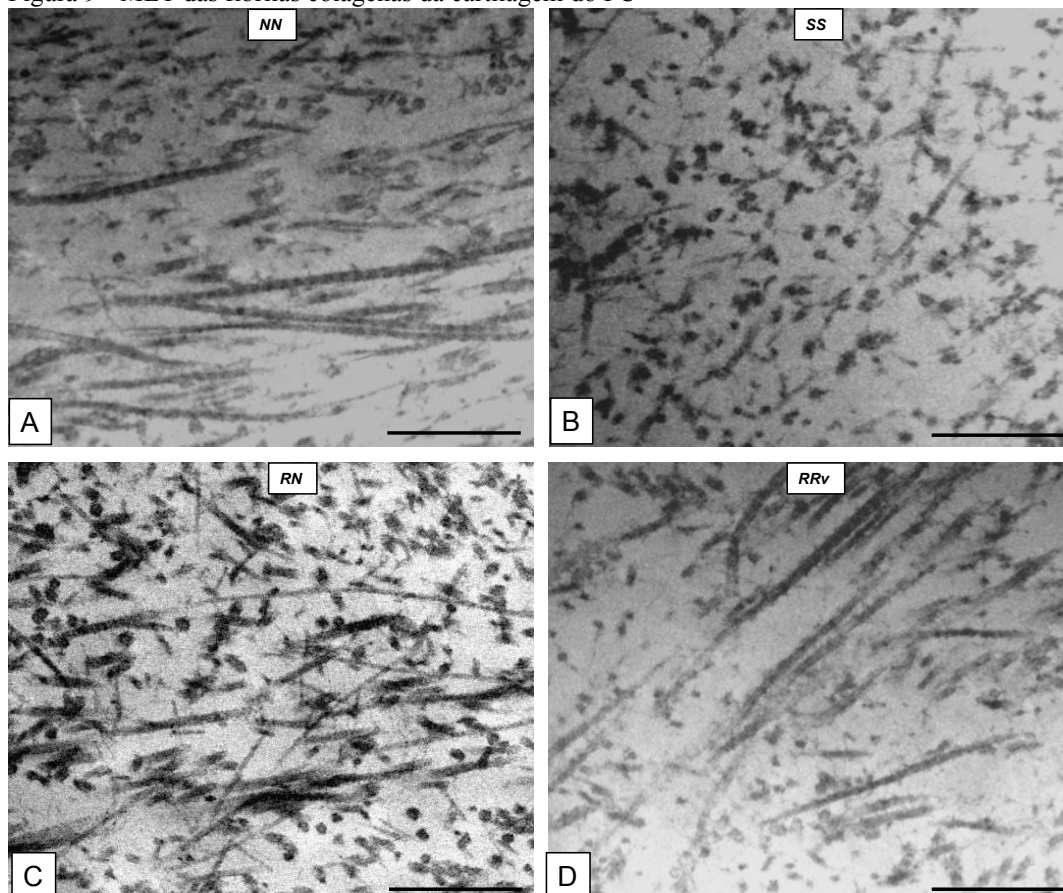
Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da MEC e dos condrócitos da camada c do PC dos grupos N e S evidenciando as fibrilas colágenas (A, D), RER (seta) (B, E) e nucléolo (C, F). (Barra de calibração: 0,5  $\mu$ m).

Nos animais de 21 dias, a MEC do grupo S caracterizou-se por exibir uma alta densidade de fibrilas com espessura regular e estrias transversais características. No grupo N, essas fibrilas eram poucas e, embora tenha se observado uma densidade maior de fibrilas delgadas, estas encontravam-se distribuídas de maneira esparsa (Figura 8, A, D).

Aparentemente, não se detectou diferenças dos componentes do RER entre os grupos N e S, ou seja, as cisternas apresentaram-se alongadas, estreitas e com a mesma densidade de ribossomos (Figura 8, B, E).

Diferenças significativas foram observadas no nucléolo. Enquanto nos animais do grupo N destacou-se a zona fibrilar (fi), no grupo S ocorreu um amplo predomínio da zona granular (g) (Figura 8, C, F).

Figura 9 - MET das fibrilas colágenas da cartilagem do PC



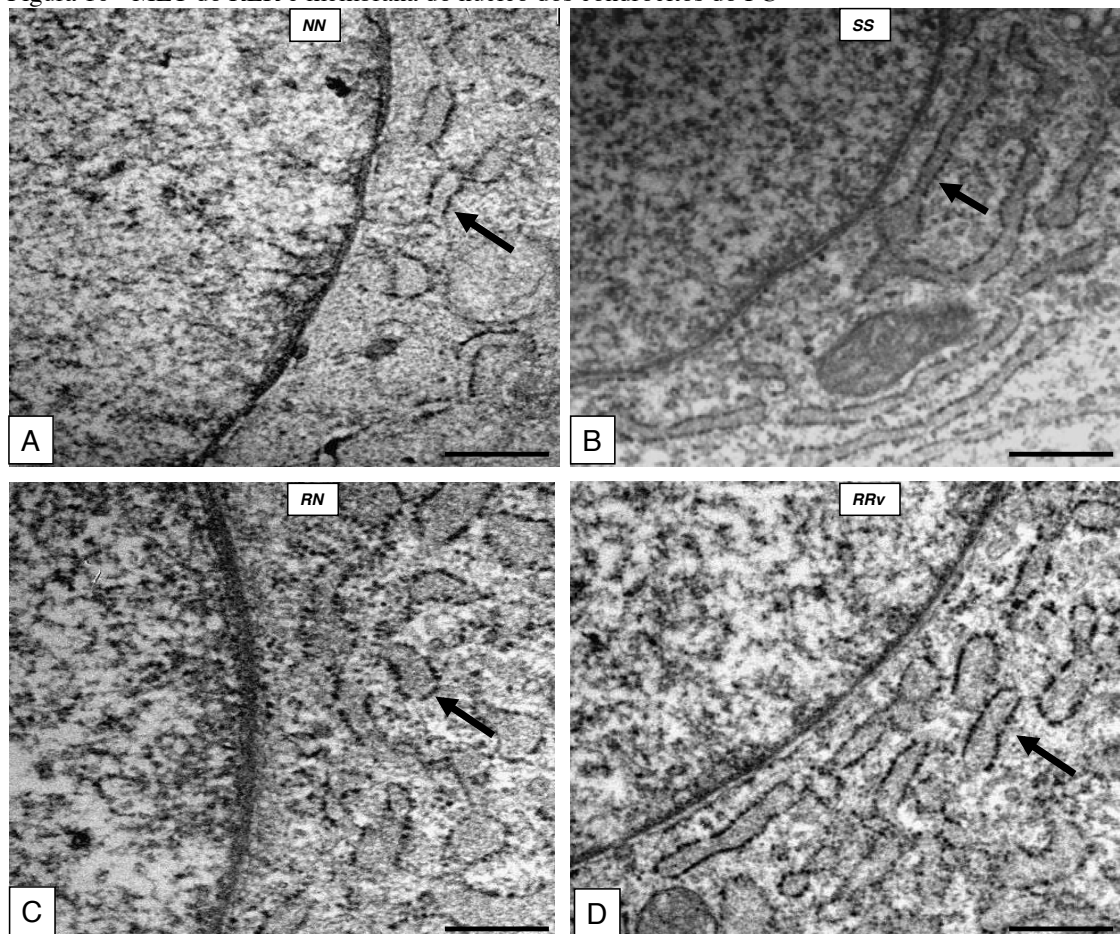
Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da MEC da cartilagem do PC evidenciando as fibrilas colágenas dos grupos NN(A), S (B), RN (C) e RRv (D). (Barra de calibração: 0,5  $\mu$ m).

Nos animais de 60 dias (NN, SS, RN e RRv) quanto ao padrão de distribuição das fibrilas colágenas da MEC, verificou-se uma menor densidade de fibrilas de largura regular com as estrias transversais características. A maior densidade dessas fibrilas foi detectada nos grupos NN e RRv que não diferiram entre si quanto a esse aspecto (Figura 9, A, D). O grupo RN assemelhou-se aos animais subnutridos (SS) na densidade de fibrilas delgadas (Figura 9, B, C).



Figura 10 - MET do RER e membrana do núcleo dos condrócitos do PC

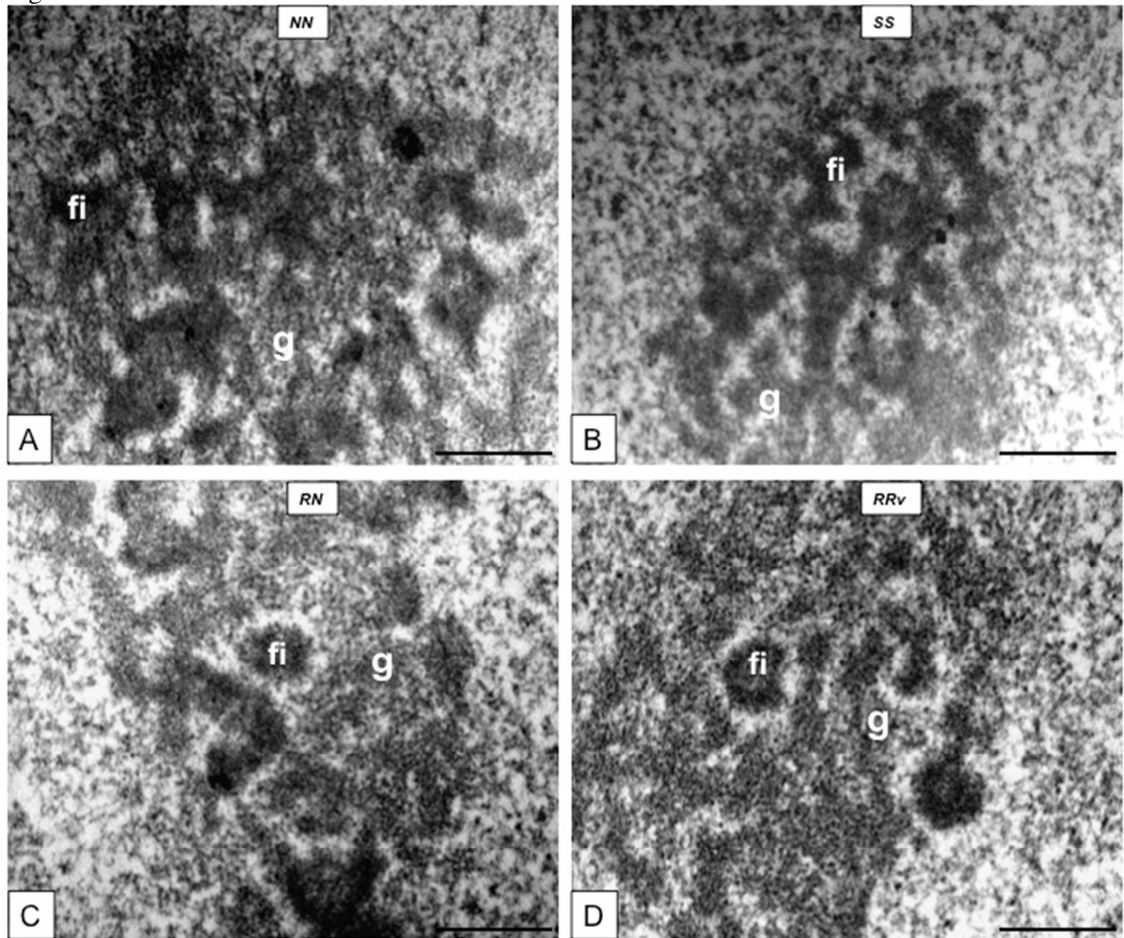


Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos condrócitos da cartilagem do PC evidenciando o RER (seta) e a membrana nuclear dos grupos NN (A), S (B), RN (C) e RRv (D). (Barra de calibração:  $0,5 \mu\text{m}$ ).

Ao se avaliar a distribuição da cromatina nuclear nos animais de 60 dias, não foram observadas diferenças marcantes entre os grupos relativos à eucromatina (dispersa) e heterocromatina (condensada). Quanto ao RER, as cisternas do grupo SS eram delgadas e alongadas, diferentemente daquelas dos grupos NN, RN e RRv, dilatadas e menos extensas (Figura 10, A-D)

Figura 11 - MET do nucléolo dos condrócitos do PC



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos condrócitos da cartilagem do PC evidenciando as regiões fibrilar (fi) e granular (g) dos nucléolos dos grupos NN(A), S (B), RN (C) e RRv (D). (Barra de calibração: 0,5  $\mu$ m).

No nucléolo, em linhas gerais, a zona granular (g) dos animais NN, RN e RRv apresentaram uma ampla distribuição na área da organela, sem distinção entre os grupos ; no grupo SS, essa região foi bem restrita. Particularmente em relação à zona fibrilar (fi), enquanto nos grupos RN e RRv sua distribuição tenha sido equivalente à da zona granular, foi nítido o seu predomínio nos grupos SS e NN (Figura 11, A-D).

### 5.1.2 Análise quantitativa

Os resultados quantitativos estão descritos neste item.

#### 5.1.2.1 Área da MEC

Na tabela 2 estão expressos os dados relativos à área ocupada pela MEC obtidos dos cortes corados com a Safranina-O, nos diferentes grupos.

Tabela 2 - Média ( $\pm$ DP) da área ocupada pela MEC (pixels) na camada c da cartilagem do PC

| <b>Grupos</b> | <b>Área MEC</b>                 |
|---------------|---------------------------------|
| <b>N</b>      | 1382,0 $\pm$ 121,2 <sup>c</sup> |
| <b>S</b>      | 1825,8 $\pm$ 110,4 <sup>a</sup> |
| <b>NN</b>     | 1224,0 $\pm$ 170,1 <sup>c</sup> |
| <b>SS</b>     | 1541,3 $\pm$ 108,2 <sup>b</sup> |
| <b>RN</b>     | 1578,5 $\pm$ 130,7 <sup>b</sup> |
| <b>RRv</b>    | 1604,2 $\pm$ 120,8 <sup>b</sup> |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ .

Relativamente a área ocupada pela MEC, observou-se que os grupos expostos de alguma forma ao processo de subnutrição nos períodos de 21 e 42 dias (S, SS, RN e RRv), apresentaram maior área ocupada pela matriz do que os respectivos grupos controle (N e NN).

#### 5.1.2.2 Espessura das camadas

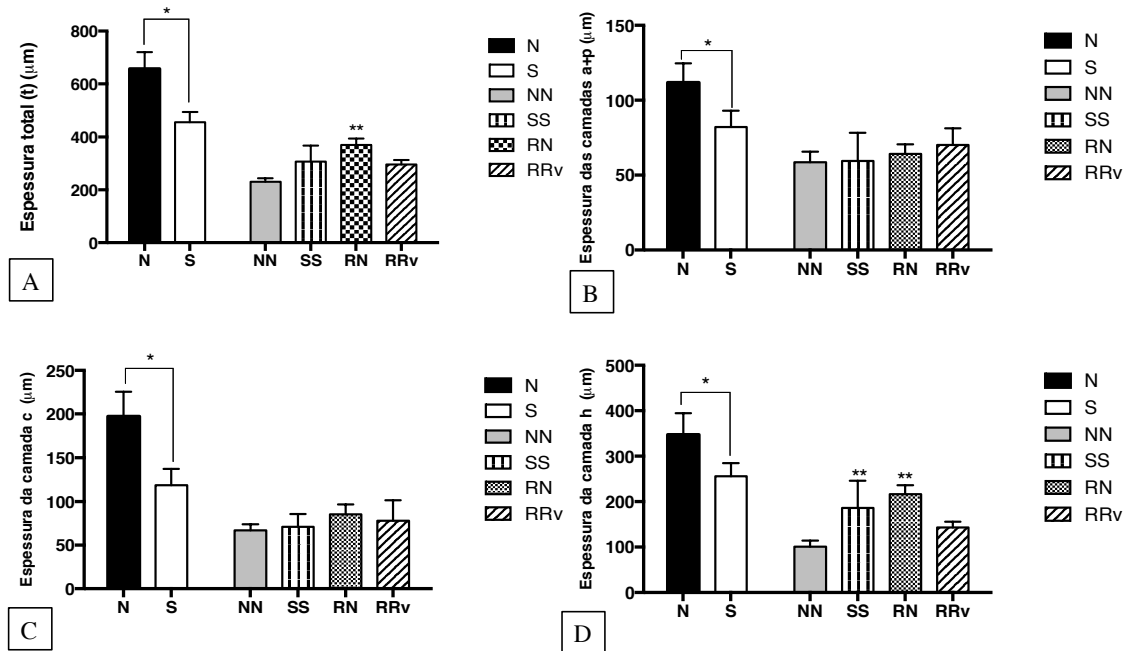
Na tabela 3 e figura 12, são observados os dados referentes à espessura total (t) da cartilagem do PC, das camadas a e p (a+p), c e h.

Tabela 3 - Média ( $\pm$ DP) da espessura das camadas da cartilagem do PC dos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv.

| Grupos | Espessura das camadas ( $\mu\text{m}$ ) |                               |                               |                               |
|--------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|        | t                                       | a+p                           | c                             | h                             |
| N      | 658,6 $\pm$ 62,6 <sup>a</sup>           | 111,7 $\pm$ 12,9 <sup>a</sup> | 197,4 $\pm$ 27,8 <sup>a</sup> | 347,4 $\pm$ 46,9 <sup>a</sup> |
| S      | 456,5 $\pm$ 38,1 <sup>b</sup>           | 82,1 $\pm$ 10,8 <sup>b</sup>  | 118,5 $\pm$ 18,5 <sup>b</sup> | 256,1 $\pm$ 28,2 <sup>b</sup> |
| NN     | 230,0 $\pm$ 14,5 <sup>d</sup>           | 58,6 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>   | 66,9 $\pm$ 7,0 <sup>c</sup>   | 100,1 $\pm$ 13,2 <sup>d</sup> |
| SS     | 306,0 $\pm$ 61,3 <sup>d</sup>           | 59,4 $\pm$ 18,8 <sup>b</sup>  | 70,8 $\pm$ 14,9 <sup>c</sup>  | 186,0 $\pm$ 59,3 <sup>c</sup> |
| RN     | 370,3 $\pm$ 23,7 <sup>c</sup>           | 64,1 $\pm$ 6,3 <sup>b</sup>   | 85,1 $\pm$ 11,4 <sup>c</sup>  | 216,6 $\pm$ 19,1 <sup>c</sup> |
| RRv    | 295,7 $\pm$ 18,0 <sup>d</sup>           | 70,1 $\pm$ 11,1 <sup>b</sup>  | 77,7 $\pm$ 23,5 <sup>c</sup>  | 142,5 $\pm$ 13,2 <sup>d</sup> |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ .

Figura 12 - Representação gráfica da espessura das camadas do PC



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Espessura total da cartilagem (A), das camadas articular+pré condroblástica (a+p) (B), condroblástica (c) (C) e hipertrófica (h) (D) que compõem a cartilagem do PC da mandíbula nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. Os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre os grupos.

Comparando-se os animais de 21 dias, nota-se um atraso no desenvolvimento da cartilagem do PC no grupo S, uma vez que a espessura das camadas do grupo N foram superiores. Ao completarem 60 dias, houve uma diminuição natural no tamanho da cartilagem (NN); entretanto, esta não foi acompanhada pelos animais do SS, onde houve aumento da espessura em todas as camadas estudadas.

No grupo RN, este parâmetro permaneceu elevado, superando, inclusive, os valores de SS. Já no grupo RRv, a espessura elevada foi minimizada, muitas vezes assemelhando-se estatisticamente ao grupo NN.

### 5.1.2.3 Densidade e área dos condrócitos

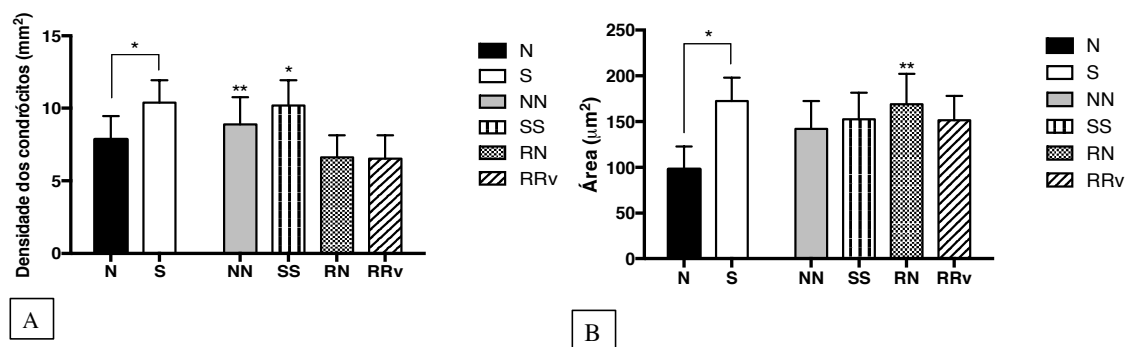
Os dados referentes à densidade e área dos condrócitos são expressos na tabela 4 e figura 14.

Tabela 4 - Média ( $\pm$ DP) da densidade e da área dos condrócitos da camada c da cartilagem do PC.

| Grupos | Densidade condrócitos ( $\text{mm}^2$ ) | Área ( $\mu\text{m}^2$ )      |
|--------|---|-------------------------------|
| N      | 7,8 $\pm$ 1,6 <sup>c</sup>              | 98,0 $\pm$ 25,5 <sup>c</sup>  |
| S      | 10,4 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>             | 172,5 $\pm$ 30,4 <sup>a</sup> |
| NN     | 8,9 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>              | 142,0 $\pm$ 24,5 <sup>b</sup> |
| SS     | 10,1 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>             | 152,4 $\pm$ 28,9 <sup>b</sup> |
| RN     | 6,6 $\pm$ 1,5 <sup>d</sup>              | 168,7 $\pm$ 33,4 <sup>a</sup> |
| RRv    | 6,5 $\pm$ 1,6 <sup>d</sup>              | 151,2 $\pm$ 26,7 <sup>b</sup> |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ .

Figura 14 - Representação gráfica da densidade e área dos condrócitos do PC



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Densidade ( $\text{mm}^2$ ) e área dos condrócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) da região central da camada condroblástica do PC da mandíbula nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. Os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre os grupos.

A subnutrição provocou aumento no número e na área dos condrócitos nos animais de 21 dias. No período púber, a densidade permaneceu a mesma no grupo SS seguida de

diminuição na área, enquanto que no grupo NN, houve aumento no número de condrócitos e também na área dos mesmos. Com a renutrição, a densidade de células encontrou-se diminuída significativamente em ambos os grupos, porém a área do RRv foi semelhante ao grupo NN, enquanto que a do RN assemelhou-se aos animais do grupo S.

#### 5.1.2.4 Expressão de IGF-I e IGF-IR

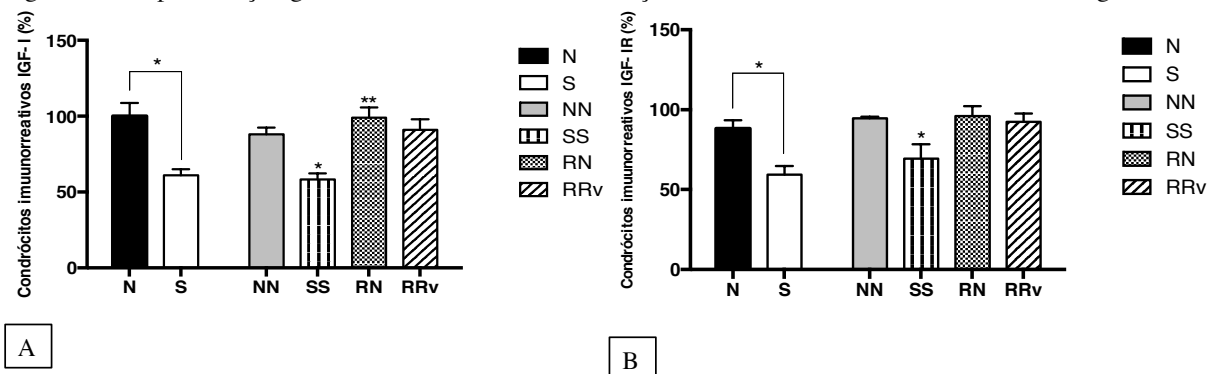
Os resultados das avaliações referentes à expressão do IGF-I e IGF-IR na cartilagem do PC estão expressos na tabela 5, e figuras 15-17.

Tabela 5 - Médias ( $\pm$ DP) das porcentagens de células imunorreativas ao IGF-I e IGF-IR na camada c do PC.

| Grupos | IGF-I                       | IGF-IR                      |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| N      | 100 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>  | 88,2 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup> |
| S      | 60,9 $\pm$ 4,1 <sup>c</sup> | 59,4 $\pm$ 5,4 <sup>c</sup> |
| NN     | 88,0 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup> | 94,6 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup> |
| SS     | 58,2 $\pm$ 4,1 <sup>c</sup> | 69,3 $\pm$ 9,0 <sup>b</sup> |
| RN     | 99,0 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup> | 96,0 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup> |
| RRv    | 91,0 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup> | 92,3 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup> |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ .

Figura 15 - Representação gráfica da média de imunomarcações celulares de IGF-I e IGF-IR na cartilagem do PC



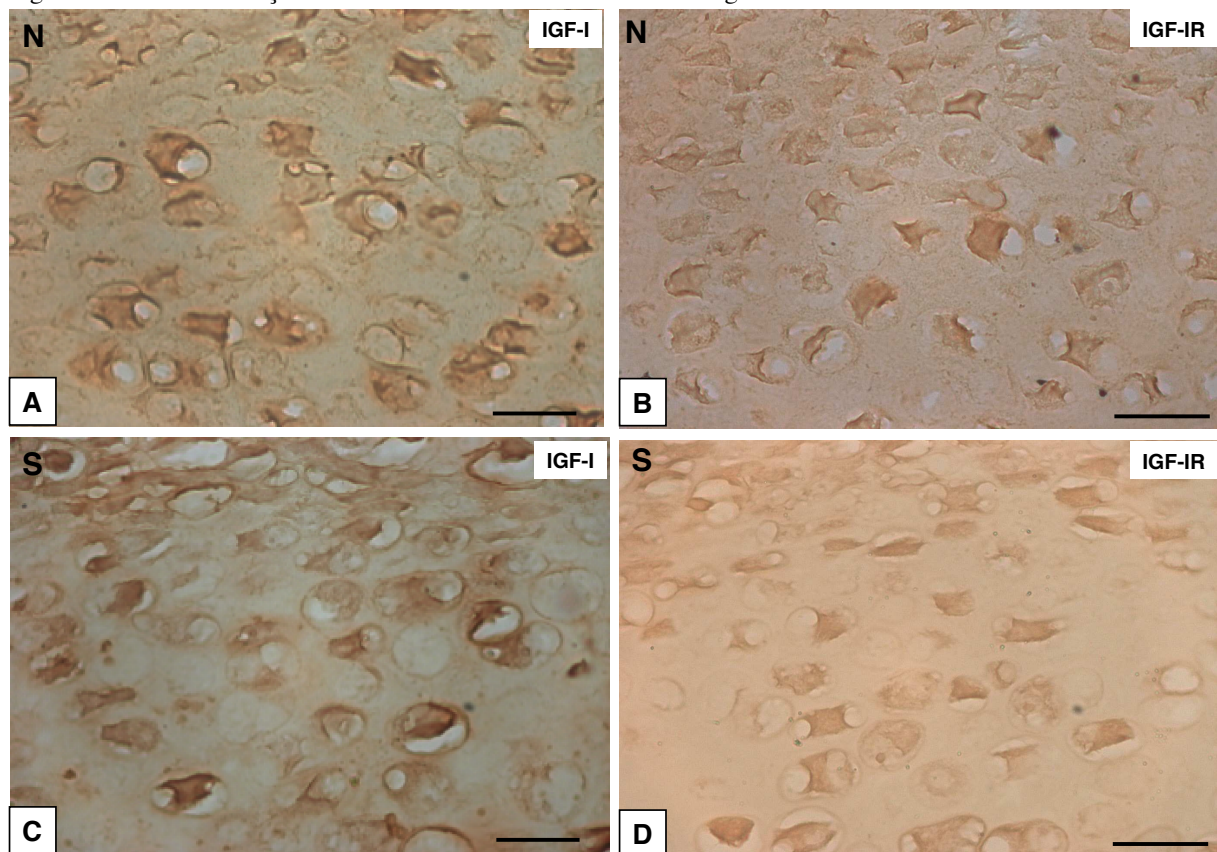
Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Médias ( $\pm$ DP) das porcentagens de células imunorreativas ao IGF-I (A) e IGF-IR (B) na camada C do PC. Os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre os grupos.

Analisando-se os dados relativos ao IGF-I, verificou-se com a subnutrição no período pré-púbere (grupo S), uma diminuição da porcentagem de células imunorreativas ao peptídeo quando comparado ao seu respectivo controle (grupo N). Aos 60 dias, notou-se que no grupo NN a média de condrócitos reativos diminuiu; entretanto, a porcentagem exibida pelo grupo SS ainda foi comparativamente inferior. A renutrição promoveu no grupo RRv um aumento na porcentagem de imunomarcações, equiparando-o desta forma ao grupo controle. No grupo RN, esse aumento foi ainda mais acentuado, apresentando a maior média entre os grupos da fase púbere ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao IGF-IR, a diferença estatística significativa ocorreu nos dois grupos subnutridos (S, SS), que exibiam porcentagens inferiores aos demais grupos avaliados.

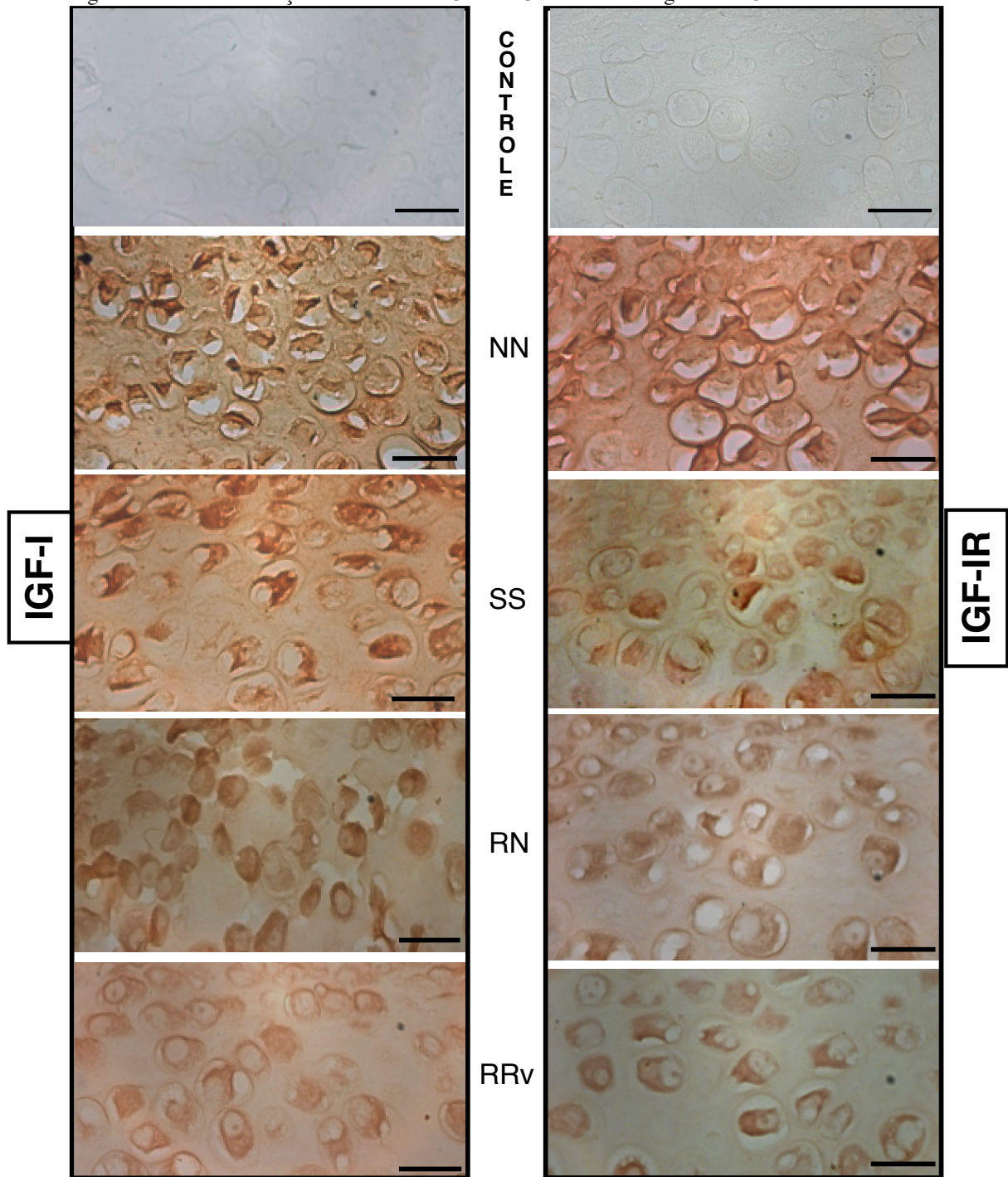
Figura 16 - Imunomarcações celulares de IGF-I e IGF-IR na cartilagem do PC



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Expressão do IGF-I e do IGF-IR na camada c da cartilagem do PC dos animais dos grupos N, S. (Barra de calibração: 10 $\mu$ m).

Figura 17 - Imunomarcações celulares de IGF-I e IGF-IR na cartilagem do PC



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Expressão do IGF-I e do IGF-IR na cartilagem do PC dos animais dos grupos NN, SS, RN e RRv. (Barra de calibração: 10 $\mu$ m).



## 5.2 SINCONDROSE BASIOCCIPITAL (SBO)

Esta seção compreende os dados relativos à SBo.

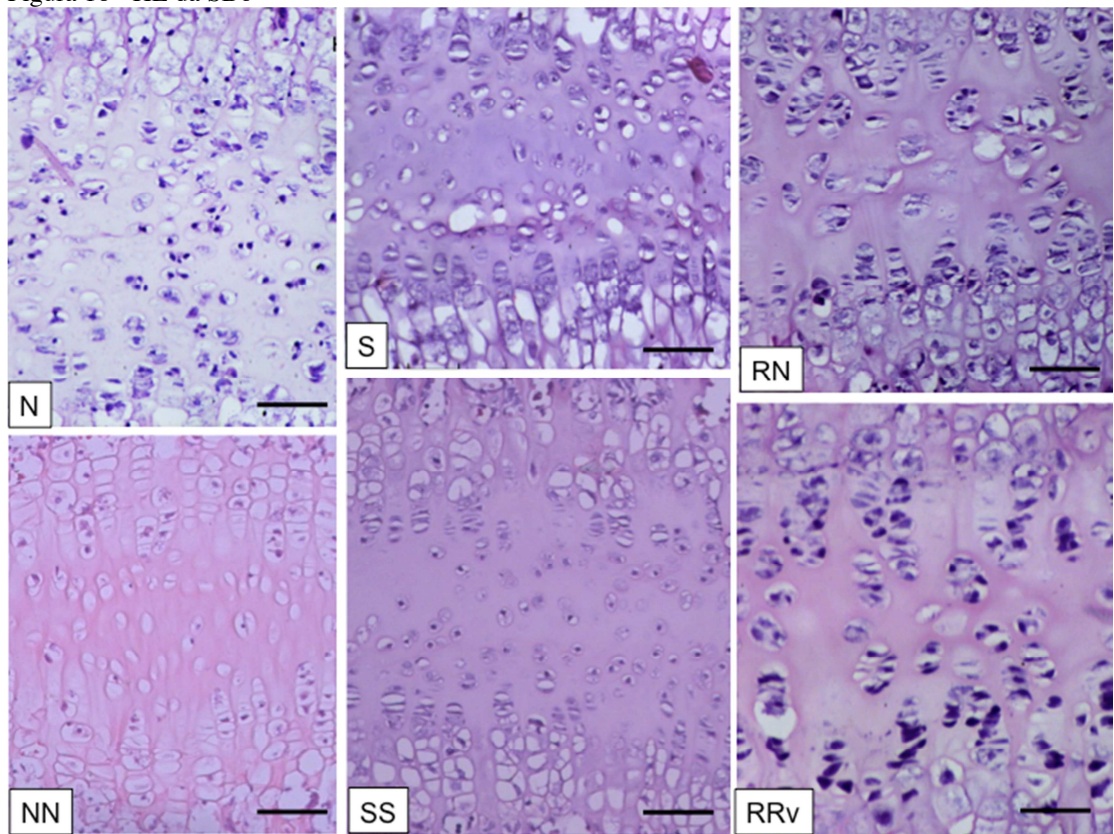
### 5.2.1 Aspectos qualitativos

Neste item estão descritos os dados qualitativos da SBo

#### 5.2.1.1 Características gerais do tecido

As camadas seriada (**s**) e de repouso (**r**) constituintes da SBo foram verificadas e assim, observadas diferenças estruturais entre os grupos (Figura 18 e Tabela 6).

Figura 18 - HE da SBo

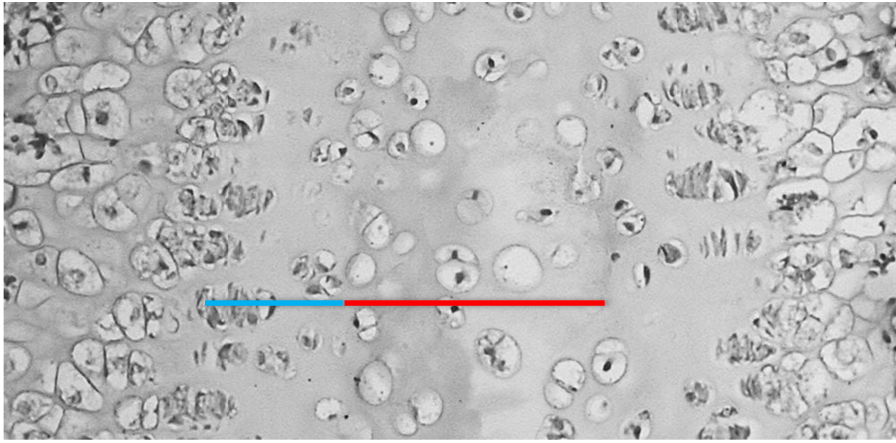


Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Camadas constituintes da SBo nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. Ver descrições das características na Tabela 6. (HE. Barra de calibração: 50µm)

**Tabela 6** - Características das camadas constituintes da SBo nos grupo N, S, NN, SS, RN e RRv

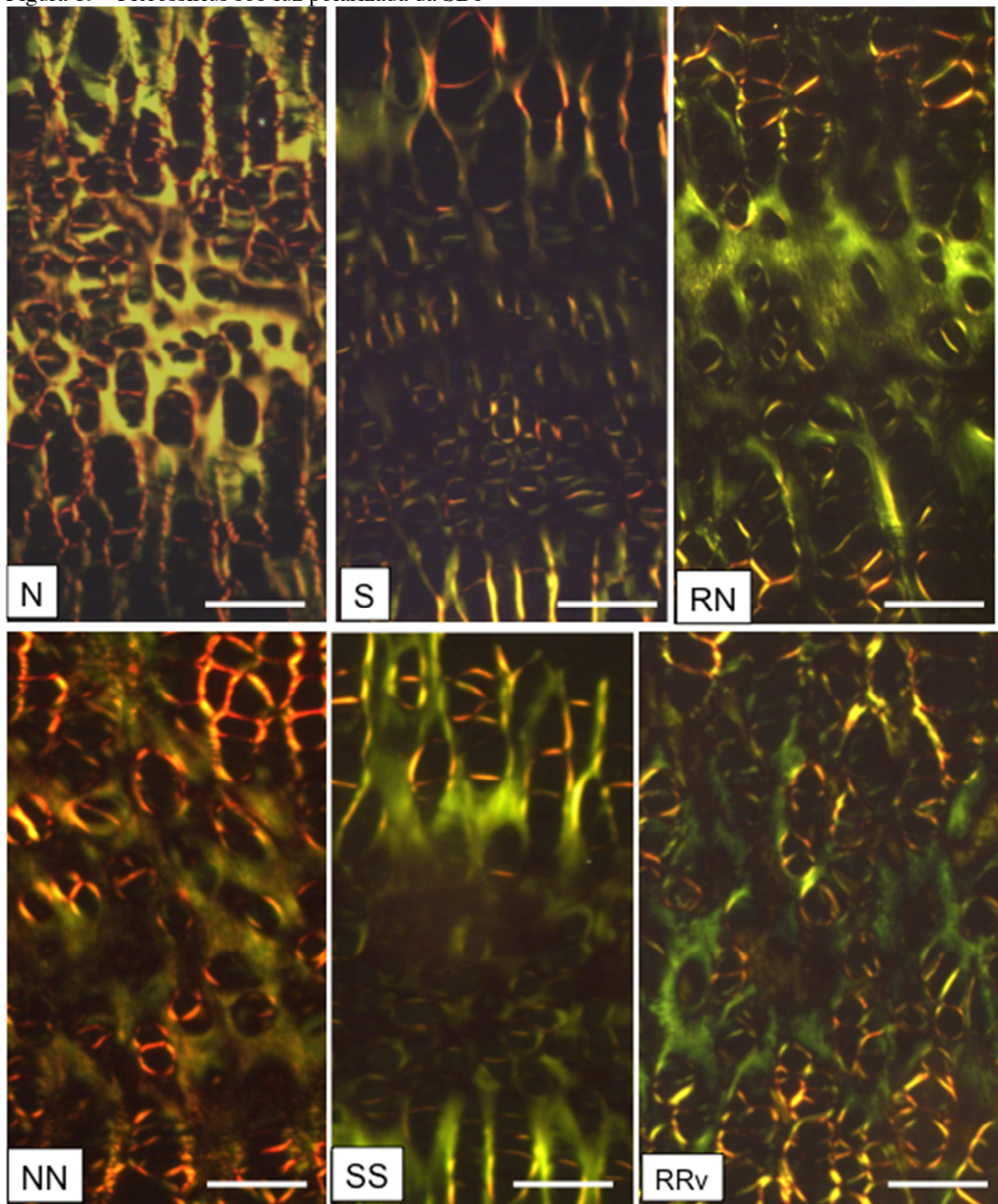
| CAMADA/GRUPO        | N  | S   | NN  | SS  | RN  | RRV   |
|---------------------|--|---|---|---|---|---|
| <b>SERIADA</b><br>↑ | Relativamente espessa e densamente povoada por condrócitos aglomerados | Mais delgada do que observado em N, porém com grande intensidade de condrócitos aglomerados                     | Individualizada, com poucos condrócitos de maior tamanho, e isolados entre si   | Espessa, com elevada quantidade de matriz e condrócitos de pequeno tamanho dispersamente arranjados                                     | Delgada e com grandes aglomerados de condrócitos  | Semelhante ao verificado em RN, todavia, os aglomerados de condrócitos são maiores, intercalando-se à camada de repouso |
|                     | <b>REPOUSO</b><br>↑  | Relativa espessura e quantidade de matriz. Muito celular, com predomínio de aglomerados de condrócitos pequenos | Espessura e matriz equivalentes ao N, entretanto com densidade menor de condrócitos com tamanho pequeno, dispostos preferencialmente isolados | De todos os grupos, é a mais delgada e aparenta ter menor densidade de condrócitos, que se apresentam isolados, e com tamanho aumentado | A mais espessa entre os grupos, com a quantidade de matriz predominando sobre a densidade de condrócitos que se encontram isolados e de pequeno tamanho | Espessura semelhante ao NN. Condrócitos com tamanho ainda maior, e em sua maioria, aglomerados entre si                 |



### 5.2.1.2 Tipificação das fibras colágenas

Na SBo, por tratar-se de estrutura formada essencialmente por cartilagem hialina, o predomínio é das fibras colágenas do tipo II. Entre todos os grupos estudados, destacou-se uma malha pantográfica formada essencialmente por fibras colágenas do tipo I. O diferencial entre os espécimes foi a deposição das fibras colágenas do tipo II nas camadas **s** e **r** da SBo. Assim, verificou-se que a densidade dessas fibras é reduzida nos grupos NN e RRv e elevada em SS e RN. Os animais do grupo S exibiram uma baixa densidade que se apresentou ligeiramente elevada no grupo N. Com relação à camada **s**, observou-se que nos animais mais jovens (N e S), há uma baixa densidade de fibras colágenas do tipo II (Figura 19).

Figura 19 - Picrossírius sob luz polarizada da SBo



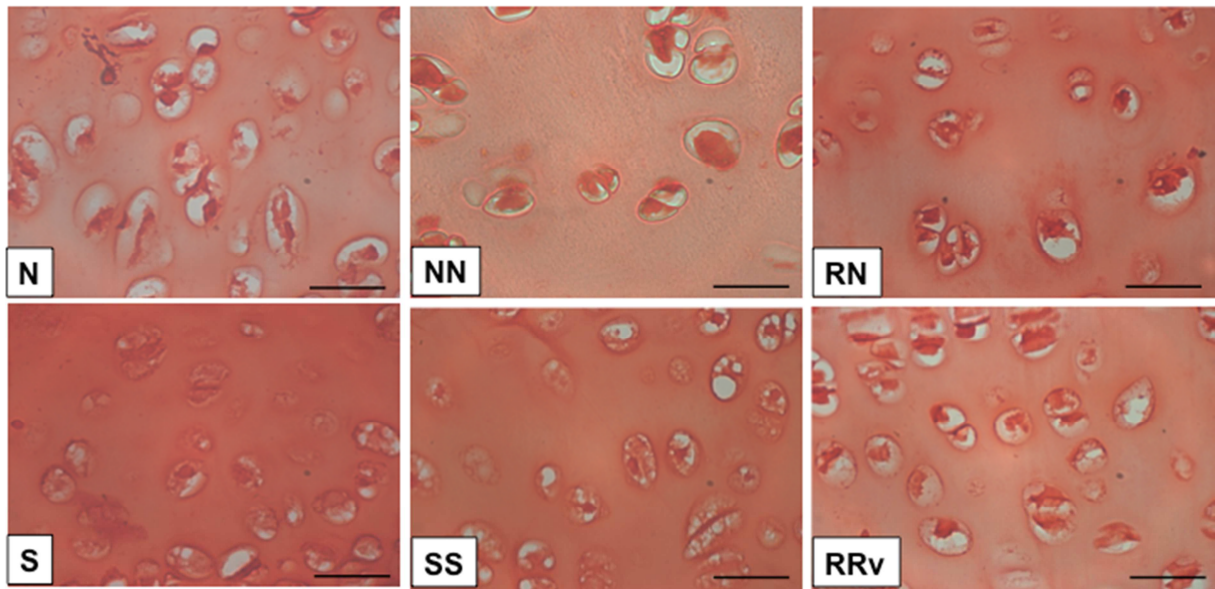
Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Tipos de fibras colágenas constituintes da SBo dos animais dos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. (Picrossírius sob luz polarizada. Barra de calibração 50  $\mu\text{m}$ ).

### 5.2.1.3 Matriz Extracelular (MEC)

As características da MEC da cartilagem da SBo estão expressas na figura 20. Ao se avaliar o padrão de coloração da Safranina-O, ocorreu uma gradação de intensidade, ou seja, a mesma variou de menos intensa para os grupos NN e RRv, até mais intensa para os grupos S e SS. Valores intermediários foram detectados nos grupos N e RN.

Figura 20 - Safranina-O da camada r da SBo



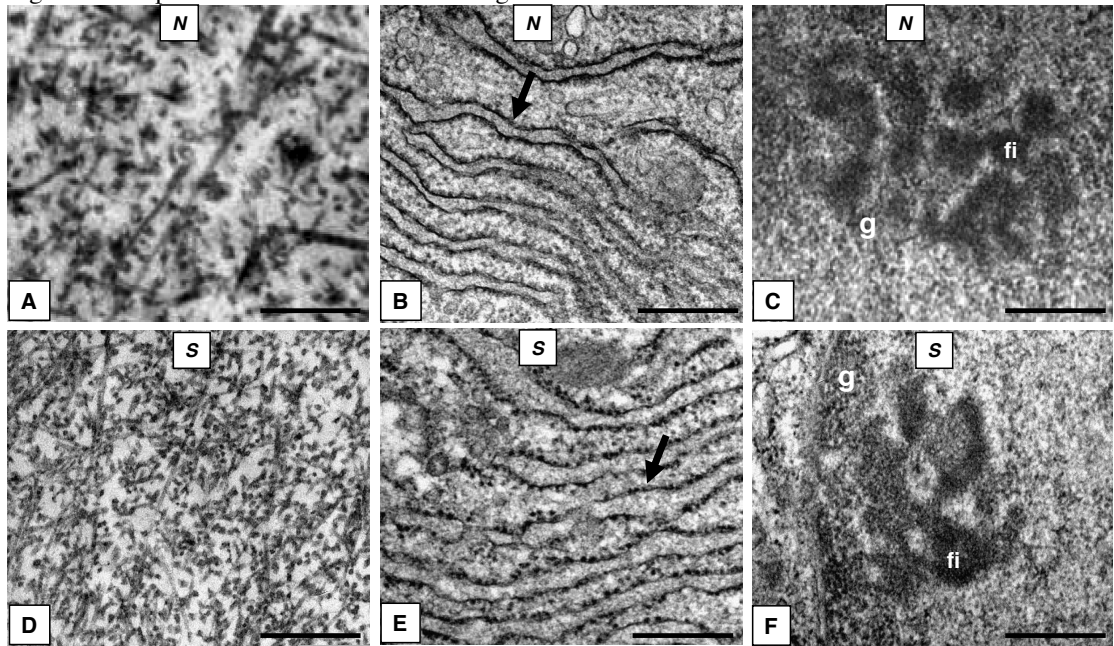
Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Características da MEC evidenciadas pela técnica de Safranina-O, na SBo nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. (Barra de calibração: 10µm).

### 5.2.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Por essa metodologia também foram avaliados comparativamente entre os grupos, o RER, a MEC e o nucléolo da SBo, todas elas, estruturas dependentes de conteúdo proteico (Figuras 21-24).

Figura 21- Aspectos ultraestruturais da cartilagem do PC



Fonte: (PEREIRA, 2015).

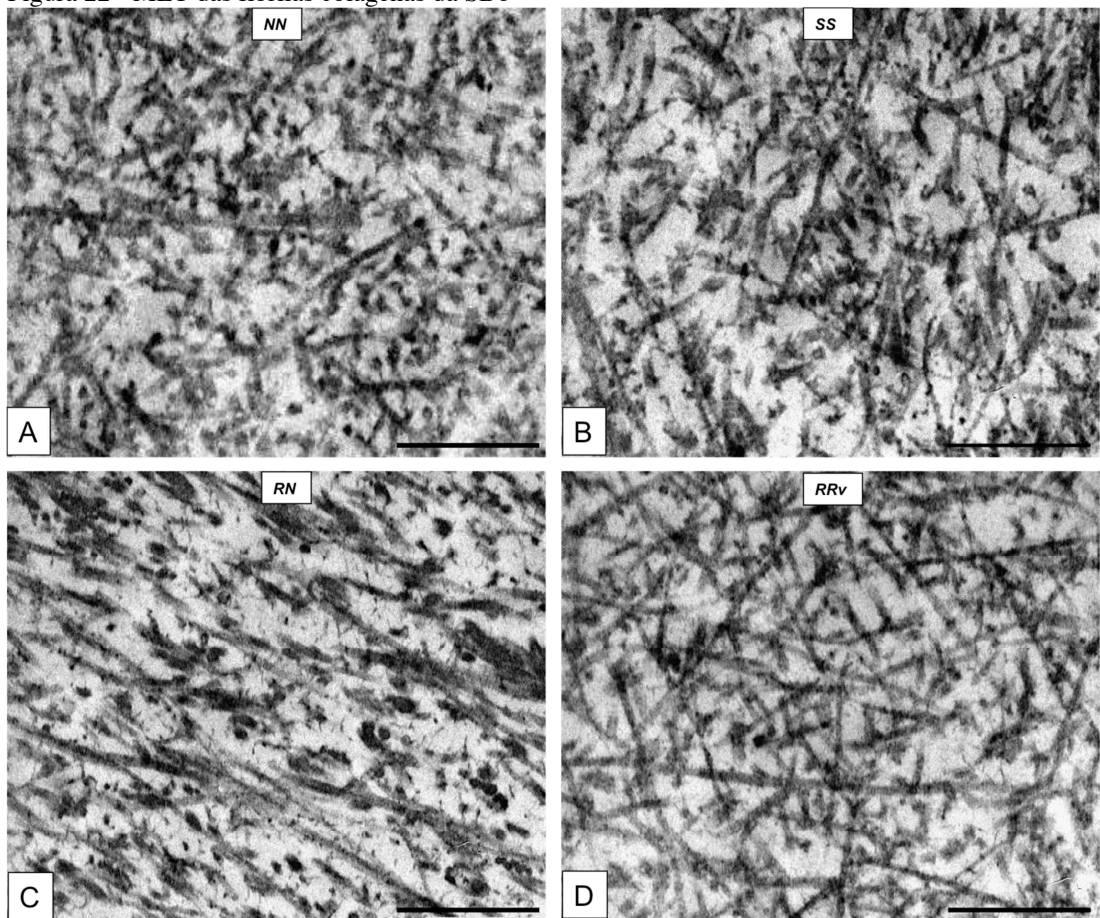
Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da MEC e dos condrócitos da camada r dos grupos N (A-C) e S (D-F) da SBo, evidenciando as fibrilas colágenas (A, D), o RER (seta) (B, E) e o nucléolo (C, F). (Barra de calibração: 0,5  $\mu\text{m}$ ).

Na MEC dos animais de 21 dias, predominaram as fibrilas delgadas. Todavia, no grupo S sua densidade foi maior do que a verificada para o grupo N, onde estavam distribuídas da maneira esparsa (Figura 21, A, D).

Em ambos os grupos, as cisternas do RER exibiram aspecto alongado; entretanto, eram visivelmente mais dilatadas nos animais do grupo S (Figura 21, B, E).

Em relação ao nucléolo, no grupo N a zona fibrilar (fi) predominou sobre a granular (g), enquanto que no grupo S, ocorreu o predomínio da zona granular (g) (Figura 21, C, F).

Figura 22 - MET das fibrilas colágenas da SBo



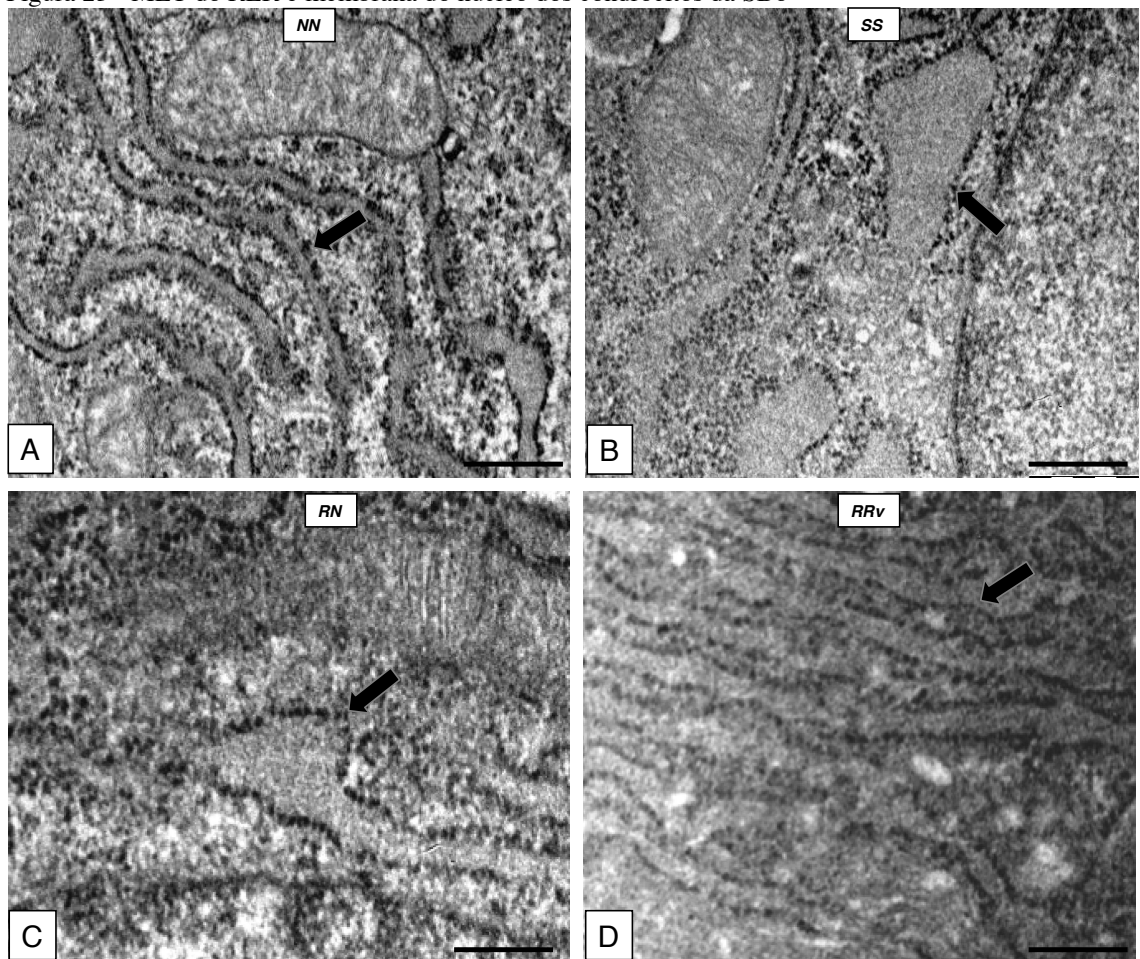
Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da MEC da SBo evidenciando as fibrilas colágenas dos grupos NN(A), S (B), RN (C) e RRv (D). (Barra de calibração: 0,5  $\mu\text{m}$ ).

Relativamente às fibrilas de colágeno, não foram observadas diferenças significativas aparentes nas densidades entre os grupos NN, SS, RN e RRv (Figura 22, A-D).



Figura 23 - MET do RER e membrana do núcleo dos condrócitos da SBo

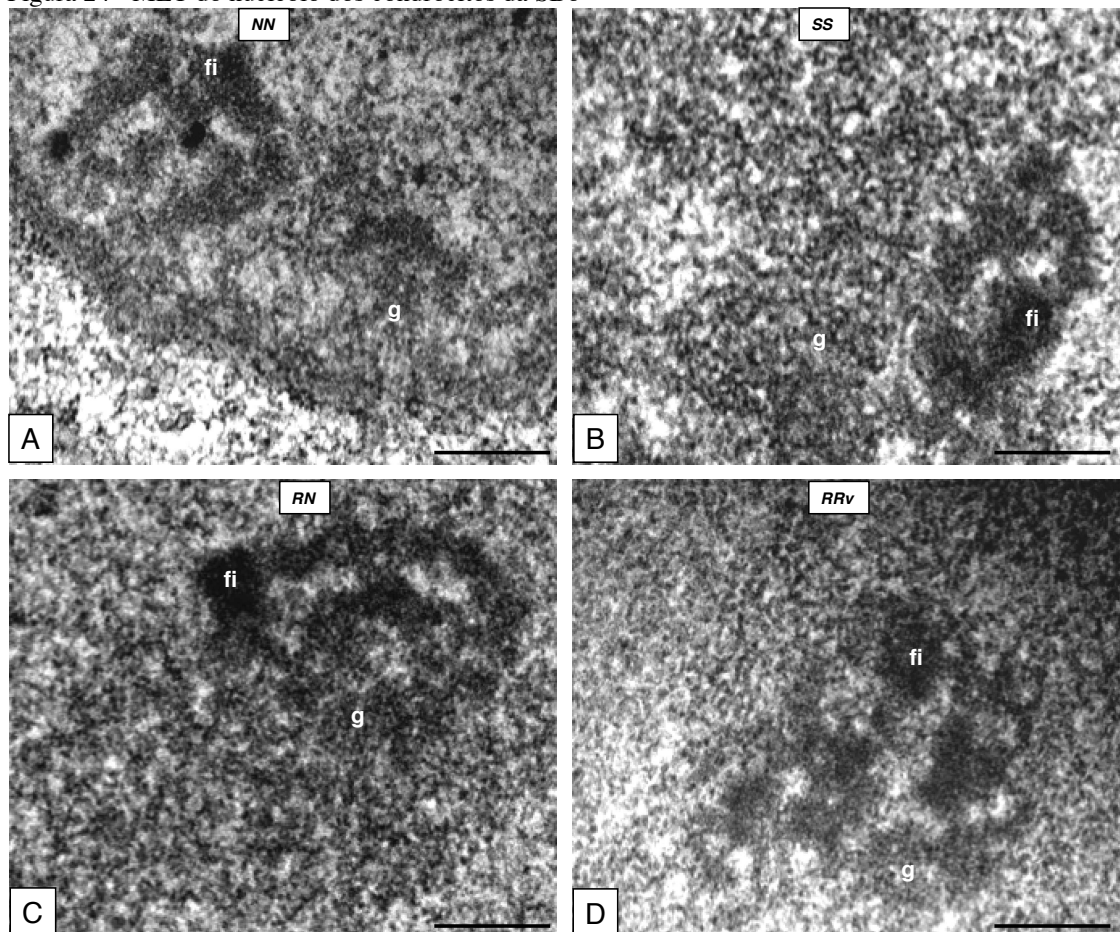


Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos condrócitos da SBo evidenciando o RER (seta) dos grupos NN(A), S (B), RN (C) e RRv (D). (Barra de calibração: 0,5  $\mu$ m).

Ao se avaliar o RER o padrão alongado característico de cisternas normais foi observado nos grupos NN e RRv (Figura 23, A, D), contrastando sobremaneira com o padrão dilatado da maioria das cisternas constituintes do retículo dos grupos RN e RRv (Figura 23, B, C).

Figura 24 - MET do nucléolo dos condrócitos da SBo



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos condrócitos da SBo evidenciando as regiões fibrilar (fi) e granular (g) dos nucléolos dos grupos NN(A), S (B), RN (C) e RRv (D). (Barra de calibração: 0,5  $\mu\text{m}$ ).

Nos nucléolos dos condrócitos da SBo, detectou-se uma certa proporcionalidade entre as regiões fibrilar (f) e granular (g) nos grupos NN e RRv (Figura 24, A, D). A região granular predominou sobre a fibrilar nos animais dos grupos SS e RN (Figura 24, B, C).

## 5.2.2 Análise quantitativa

Neste item estão descritos os dados quantitativos da SBo.

### 5.2.2.1 Área da MEC

Os dados referentes à área ocupada pela MEC na camada **r** da SBo estão expressos na tabela 7.

Tabela 7 - Média ( $\pm$ DP) da área ocupada pela MEC (pixels) na camada **r** da SBo.

| <b>Grupos</b> | <b>Área MEC</b>                 |
|---------------|---------------------------------|
| <b>N</b>      | 2543,6 $\pm$ 301,7 <sup>c</sup> |
| <b>S</b>      | 2607,1 $\pm$ 538,0 <sup>c</sup> |
| <b>NN</b>     | 3285,0 $\pm$ 255,8 <sup>a</sup> |
| <b>SS</b>     | 2874,2 $\pm$ 279,8 <sup>b</sup> |
| <b>RN</b>     | 3017,8 $\pm$ 206,5 <sup>b</sup> |
| <b>RRv</b>    | 3122,6 $\pm$ 167,8 <sup>a</sup> |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ ).

A análise dos resultados permitiu verificar que não houve alteração na área ocupada pela MEC entre os animais de 21 dias (N, S); entretanto, aos 60 dias, notou-se que os grupos RN e SS apresentaram as menores médias, e que o RSV foi eficiente na recuperação deste parâmetro no grupo RRv, uma vez que seus valores foram estatisticamente semelhantes ao NN.

## 5.2.2.2 Espessura das camadas

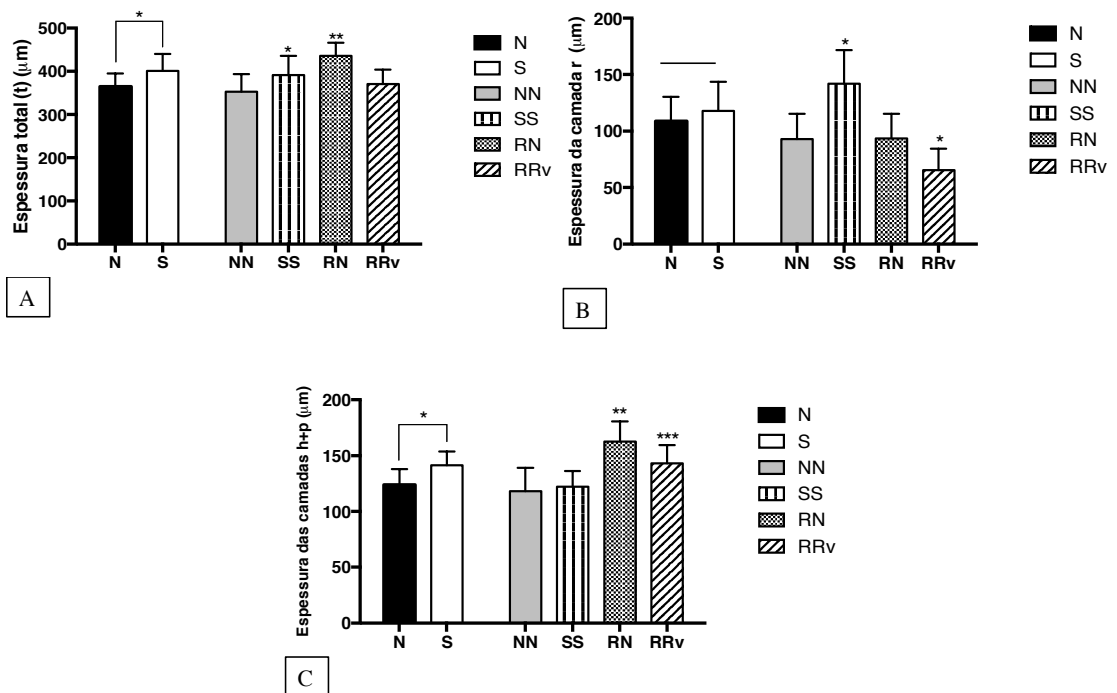
Na tabela 8 e figura 25 estão expressos os valores das medidas obtidas das espessuras total (**t**), e das camadas **h**, **s** e **r** da SBo.

Tabela 8 - Média ( $\pm$ DP) da espessura das camadas da cartilagem as SBo dos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv

| Grupos | Espessura das camadas ( $\mu\text{m}$ ) |                               |                               |
|--------|---|-------------------------------|-------------------------------|
|        | t                                       | h+p                           | r                             |
| N      | 364,8 $\pm$ 30,2 <sup>c</sup>           | 123,7 $\pm$ 14,2 <sup>c</sup> | 108,9 $\pm$ 21,4 <sup>b</sup> |
| S      | 400,8 $\pm$ 39,2 <sup>b</sup>           | 141,2 $\pm$ 12,3 <sup>b</sup> | 117,6 $\pm$ 25,8 <sup>b</sup> |
| NN     | 352,6 $\pm$ 40,9 <sup>c</sup>           | 118,1 $\pm$ 20,9 <sup>c</sup> | 93,1 $\pm$ 22,2 <sup>c</sup>  |
| SS     | 391,3 $\pm$ 43,6 <sup>b</sup>           | 122,0 $\pm$ 14,2 <sup>c</sup> | 141,7 $\pm$ 29,9 <sup>a</sup> |
| RN     | 435,7 $\pm$ 29,8 <sup>a</sup>           | 162,4 $\pm$ 18,1 <sup>a</sup> | 93,4 $\pm$ 22,0 <sup>c</sup>  |
| RRv    | 370,0 $\pm$ 33,3 <sup>c</sup>           | 143,1 $\pm$ 16,0 <sup>b</sup> | 65,3 $\pm$ 19,1 <sup>d</sup>  |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ .

Figura 25 - Representação gráfica da espessura das camadas da SBo



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Espessura total da cartilagem (A), da camada de repouso (r) (B) e hipertrófica+seriada (h+s) (C) que compõem a SBo nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. Os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre os grupos.

Em todas as medidas analisadas, os grupos nutridos (N e NN) tiveram médias menores que os subnutridos (S e SS). Relativamente à espessura total (**t**) a renutrição com RSV (grupo RRv) mostrou-se mais eficiente do que a renutrição com dieta normal, fazendo com que este parâmetro se assemelhe ao grupo NN. Nas camadas h+s, o grupo RN diferenciou-se dos demais devido ao aumento significativo da espessura dessas camadas. Já na camada **r**, os valores de RN e NN foram semelhantes, ao passo que nos animais do grupo RRv, a média foi significativamente inferior aos outros grupos.

### 5.2.2.3 Densidade e área dos condrócitos

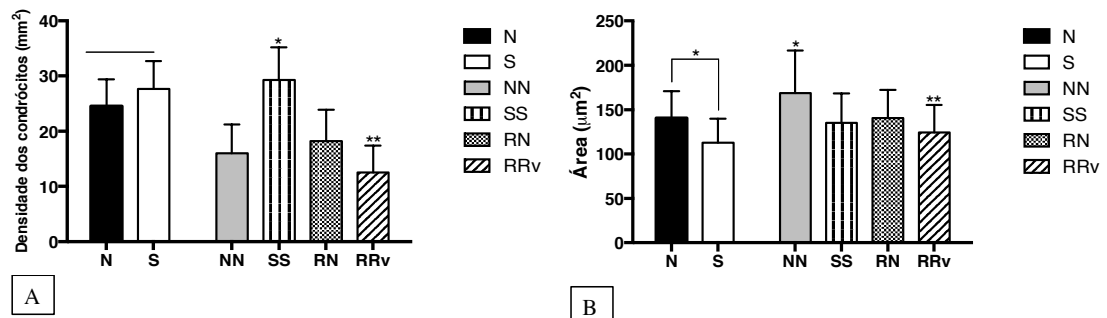
Os valores referentes à densidade média e área dos condrócitos da SBo podem ser verificados na tabela 9 e figura 26.

Tabela 9 - Média ( $\pm$ DP) da densidade e da área dos condrócitos da camada **r** da cartilagem da SBo

| Grupos | Densidade condrócitos/mm <sup>2</sup> | Área ( $\mu$ m <sup>2</sup> ) |
|--------|---------------------------------------|-------------------------------|
| N      | 24,5 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>           | 140,5 $\pm$ 30,3 <sup>b</sup> |
| S      | 27,6 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>           | 112,5 $\pm$ 27,2 <sup>c</sup> |
| NN     | 16,0 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>           | 168,5 $\pm$ 48,0 <sup>a</sup> |
| SS     | 29,3 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>           | 135,2 $\pm$ 33,0 <sup>b</sup> |
| RN     | 18,1 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>           | 140,4 $\pm$ 31,7 <sup>b</sup> |
| RRv    | 12,5 $\pm$ 4,8 <sup>c</sup>           | 124,2 $\pm$ 31,1 <sup>c</sup> |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ .

26 - Representação gráfica da densidade e área dos condrócitos da SBo



Fonte: (PEREIRA, 2015).

Legenda: Densidade (mm<sup>2</sup>) e área dos condrócitos ( $\mu$ m<sup>2</sup>) da região central da SBo da camada **r** nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. Os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre os grupos.

A densidade média de condrócitos nos animais de 21 dias foi semelhante, com tendência a aumento no grupo S. Esta tendência foi comprovada ao se analisar os grupos de 60 dias, no qual a média para o grupo SS foi maior ( $p < 0,05$ ). A renutrição se mostrou eficaz neste aspecto, uma vez que o grupo RN atingiu os valores alcançados para os animais do grupo N; já nos animais renutridos com resveratrol (grupo RRv), a média foi inferior àquela encontrada em todos os outros grupos. Ao se avaliar a área dos condrócitos, os valores encontrados nos grupos S e RRv tiveram semelhança estatística, sendo as menores médias encontradas.

#### 5.2.2.4 Expressão de IGF-I e IGF-IR

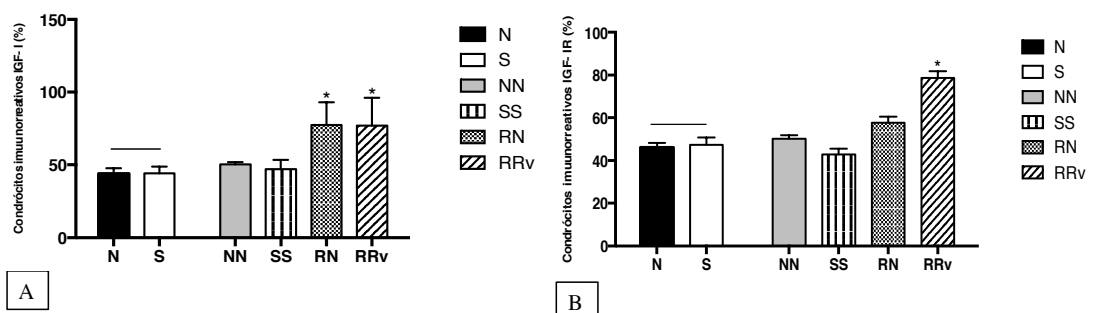
Os resultados das avaliações referentes à expressão do IGF-I e IGF-IR na SBo estão expressos na tabela 10 e figuras 27-29.

Tabela 10 - Porcentagens médias ( $\pm$ DP) das expressões de IGF-I e IGF-IR na camada r da SBo.

| Grupos | IGF-I                         | IGF-IR                      |
|--------|-------------------------------|-----------------------------|
| N      | 43,9 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>   | 46,1 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup> |
| S      | 44,6 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>   | 47,3 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup> |
| NN     | 50,4 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>   | 50,2 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup> |
| SS     | 47,1 $\pm$ 6,3 <sup>b</sup>   | 42,9 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup> |
| RN     | 77,6 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>  | 57,6 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup> |
| RRv    | 78,08 $\pm$ 19,0 <sup>a</sup> | 78,7 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup> |

\*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott.  $p < 0,05$ ).

Figura 27 - Representação gráfica da média de imunomarcações celulares de IGF-I e IGF-IR na SBo

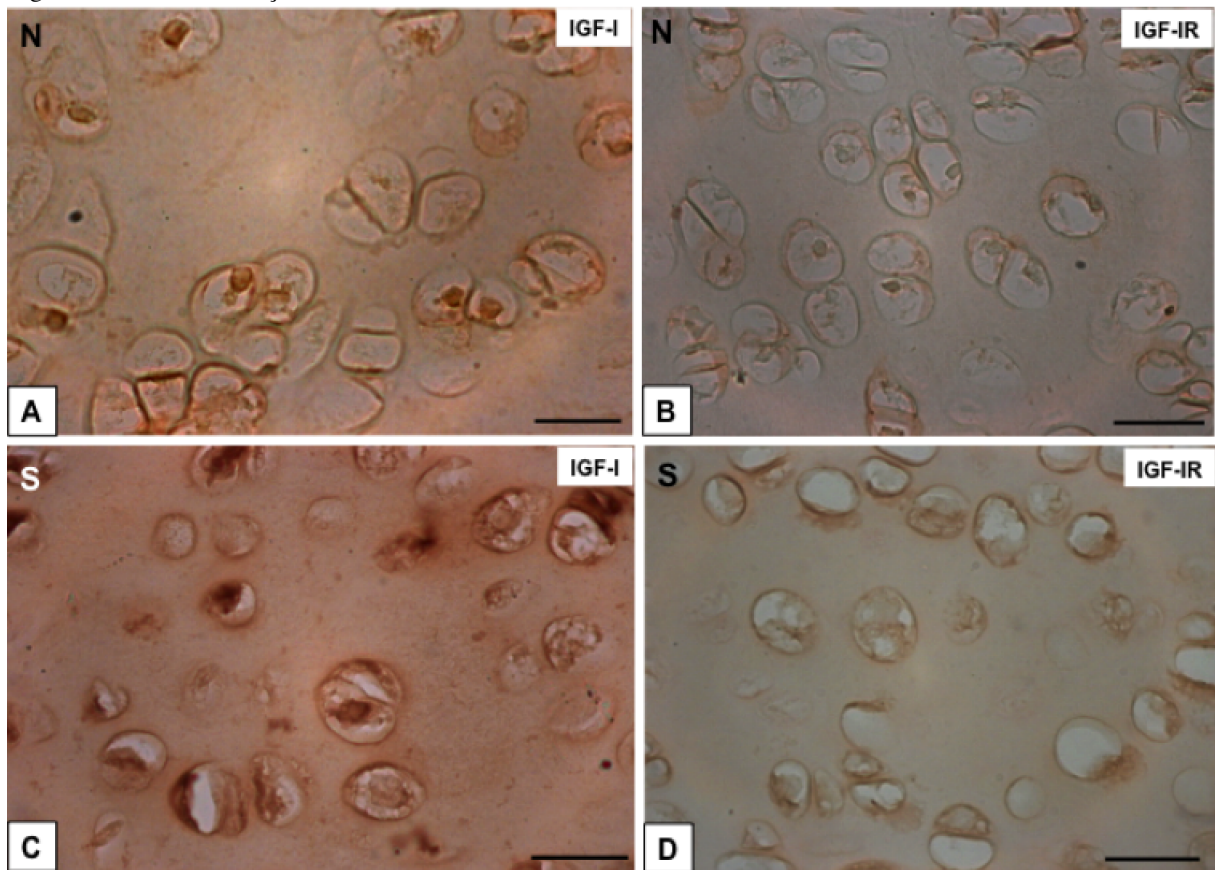


Fonte: (PEREIRA, 2015)

Legenda: Médias ( $\pm$ DP) das porcentagens de células imunorreativas ao IGF-I e IGF-IR na camada r da SBo nos grupos N, S, NN, SS, RN e RRv. Os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre os grupos.

Relativamente às expressões do IGF-I e seu receptor, não foram observadas alterações quantitativas relacionadas à subnutrição nos períodos pré-pubere e púbere. Todavia, com a recuperação proteica, as porcentagens de células imonorreativas ao peptídeo (grupos RN e RRv) e seu receptor (grupo RRv) aumentaram significativamente.

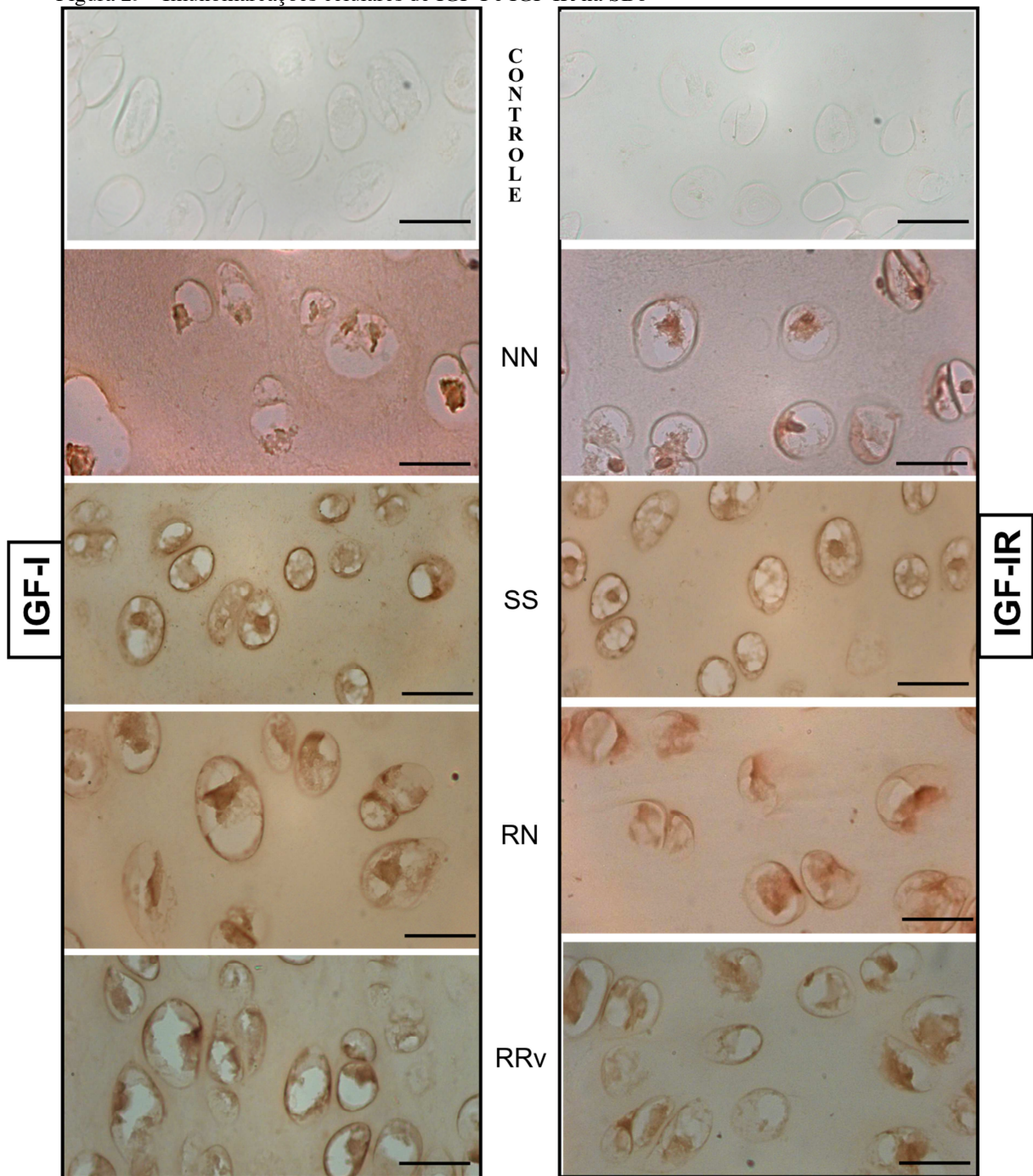
Figura 28 - Imunomarcações celulares de IGF-I e IGF-IR na SBo



Fonte: (PEREIRA, 2015)

Legenda: Expressão do IGF-I e do IGF-IR na SBo dos animais dos grupos N, S. (Barra de calibração: 10 $\mu$ m).

Figura 29 - Imunomarcações celulares de IGF-I e IGF-IR na SBo



Fonte: (PEREIRA, 2015)

Legenda: Expressão do IGF-I e do IGF-IR na camada r da SBo dos grupos NN, SS, RN e RRv. (Barra de calibração: 10 $\mu$ m)



***DISCUSSÃO***

## 6 DISCUSSÃO

Nesta seção os resultados obtidos são discutidos de acordo com a literatura consultada.

### 6.1 CONDRÓCITOS

A variabilidade da área média dos condrócitos em ambas as estruturas (PC e SBo) nos diferentes grupos, pode ser explicada pelo estado nutricional e, em parte, pelo formato dessas células (alongado, arredondado). Todavia, é quando se analisa a ultraestrutura celular, que se consegue estabelecer algumas diferenças importantes. Trabalhos que envolvem esse tipo de avaliação têm sido realizados, por exemplo, em neurônios da hipófise macacos e do plexo mioentérico de ratos subnutridos (CÓNSOLE et al., 2001; LIBERTI et al., 2007), e em condrócitos da cartilagem articular de camundongos submetida a processos degenerativos como a osteoartrite e o envelhecimento (YAMAMOTO et al., 2005).

Assim, ao se considerar na presente pesquisa os aspectos de organelas onde variações no conteúdo proteico são relativamente bem avaliados, como é o caso específico do RER e do nucléolo, é possível estabelecer o grau de comprometimento celular.

Em linhas gerais, na SBo dos animais com 60 dias, características ultraestruturais semelhantes permitiram que se avaliasse conjuntamente os grupos NN/RRv e RN/SS. As dilatações nas cisternas do RER em RN/SS, relatadas por Cónsole et al. (2001) e Yamamoto et al. (2005) são sinais sugestivos de alterações no metabolismo celular. Da mesma forma, o predomínio da zona granular, também relatado por Liberti et al. (2007) demonstram que a subnutrição interfere na função dessa zona, descrita como o local onde ocorre a montagem dos ribossomos. Também nesses grupos, aparentemente, a densidade de ribossomos apresenta-se diminuída, como descrito por Liberti et al. (2007). Ao se considerar que quanto a essas características os grupos NN/RRv exibiram semelhanças, pode-se inferir que o RSV exerceu um papel decisivo no restabelecimento da dinâmica dos condrócitos.

NO PC, quanto a essas características ultraestruturais, destaca-se no grupo SS dois aspectos importantes. O primeiro, relacionado ao seu menor tamanho em comparação com os demais grupos dessa fase (NN, RN, RRv) e o predomínio da zona fibrilar no nucléolo, local onde a transcrição do RNAr, o que pode indicar menor atividade metabólica da célula. O

segundo refere-se ao aspecto alongado das cisternas do RER, que deve estar relacionado ao formato, também alongado, do condrócito que, coincidentemente, predominou nesse grupo. Isso fica evidente quando se compara as cisternas do RER dos demais grupos onde, devido ao predomínio de células arredondadas, as mesmas eram nitidamente mais dilatadas. Se o formato alongado dos condrócitos efetivamente está relacionado ao estado nutricional do indivíduo, é assunto ainda em aberto nas pesquisas que envolvam a subnutrição.

## 6.2 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

O maior contingente de fibras colágenas que constituem a MEC do PC são do tipo I, presentes em todo o tecido (OHASHI et al., 1997) e do tipo II, encontradas nas camadas condroblástica e hipertrófica (CHEN et al., 2012); em condições normais, fibras do tipo III, embora em menor quantidade, também são detectadas (YOUNG et al., 2000). Segundo Kirsch et al. (2000) na cartilagem epifisial, a constituição da MEC é semelhante, com o predomínio de fibras do tipo II. No presente estudo, ao se avaliar os tipos de fibras colágenas do PC, verificou-se que a subnutrição promoveu uma predominância de fibras do tipo III nos grupos S e SS, e de fibras do tipo I nos respectivos controles (N, NN), comprovado ultraestruturalmente, onde o predomínio de fibrilas com largura regular foi detectado nos grupos NN e RRv, e o de fibrilas delgadas nos animais dos grupos SS e RN.

Além disso, a subnutrição interferiu na deposição das fibras colágenas do tipo II constituintes da SBo, elevando a densidade de fibrilas no período pré-púbere (grupo S). Nos grupos renutridos, a melhora destes parâmetros foi mais evidenciada nos animais suplementados com resveratrol (grupo RRv). Dada a função estrutural do colágeno, sua característica de remodelamento contínuo durante as fases de crescimento e de desenvolvimento (ODA et al., 2007), e a sua capacidade de fornecer resistência aos tecidos quanto às forças tensionais (EYRE et al., 1991), é plausível afirmar que a alteração na predominância entre os diferentes tipos de fibras colágenas promovidas pela subnutrição aqui verificadas, pode determinar prejuízos estruturais da MEC tanto do PC como da SBo. Como consequência, as alterações nas propriedades mecânicas dessas estruturas irão interferir na funcionalidade das articulações como um todo.

Como os animais de todos os grupos da presente pesquisa são considerados jovens, o processo de crescimento tanto do PC como da SBo encontra-se em franco andamento. Desta

forma, a menor densidade de colágenos verificada nos animais dos grupos NN e RRv corrobora com as investigações sobre a secreção de colágeno durante o processo de ossificação endocondral, onde a reabsorção das fibras colágenas do tipo II é um fato comum. Isso ocorre, por exemplo, durante a remodelação fisiológica da MEC da cartilagem epifisial, com conseqüente secreção de colágeno tipo X (MWALE et al., 2002), fruto de fatores externos, como a ação de forças assimétricas sobre a ATM de ratos com conseqüente aumento na densidade de colágeno tipo III (ZHANG et al., 2015). A elevação da densidade dessas fibras também é observada em doenças degenerativas da cartilagem (EYRE et al., 2006).

Por tratar-se de animais jovens, outro ponto a ser considerado é a ocorrência de mudanças na expressão do colágeno durante o processo de desenvolvimento dos condrócitos, que secretam primeiramente fibras colágenas do tipo III, como relatado por Reddi et al. (1977) em estudo sobre a ossificação endocondral *in vitro*. Neste demonstrou-se que essas fibras, apesar de imaturas, ocorrem nessa fase devido às próprias características do processo de desenvolvimento/remodelamento.

Diante desses aspectos, a predominância de colágeno III na cartilagem do PC aponta para uma provável atividade compensatória dos condrócitos que, ao produzirem fibras imaturas mais rapidamente, complementam a perda de outros tipos de fibras colágenas. Já o atraso na degeneração natural da MEC observado na SBo dos grupos SS e RN, pode ser caracterizado como um comprometimento do processo de ossificação endocondral. Os animais suplementados com resveratrol (grupo RRv) apresentaram um padrão na constituição de fibras colágenas semelhante ao controle (NN) nos dois tecidos estudados, um indicativo de uma regulação da expressão do colágeno e de moléculas envolvidas na sua degradação, como também demonstrado por autores como Dave et al. (2008) e EO et al. (2014).

Sabe-se que as proteoglicanas são formadas por um eixo proteico, que se ligam às cadeias laterais de glicosaminoglicanos, os quais, por sua vez, estão presentes em grânulos citoplasmáticos na membrana ou na matriz extracelular (SCHAEFER et al., 2014). Dentre suas diversas funções biológicas, destacam-se: interação com as proteínas fibrosas da matriz (MICHELACCI et al., 1979), regulação da atividade de moléculas sinalizadoras (ALMEIDA et al., 2001), proliferação celular (MATAVELI et al., 2009), controle do tráfego de células e moléculas (IRVING-RODGERS et al., 2010). Com a técnica histoquímica aqui utilizada para a avaliação das proteoglicanas da MEC (Safranina-O) foi possível inferir que a maior intensidade de coloração verificada no grupo S, é indicativo de uma concentração mais elevada de proteoglicanas. Como aos 60 dias, tanto na cartilagem do PC quanto na SBo a maior intensidade foi verificada ainda nos animais subnutridos (grupo SS) e os grupos NN e

RRv exibiram fraca intensidade, tais resultados merecem ser avaliados em animais subnutridos até a fase adulta, uma vez que MacDonald et al. (2013) ao avaliarem a cartilagem articular do joelho de camundongos com displasia espondiloepifisária congênita, observaram o aumento de proteoglicanas e outras alterações estruturais na MEC, relacionando esse achado a um início precoce de osteoartrite. Considerando-se que as proteoglicanas atraem sódio e água em decorrência de sua carga negativa, conferindo à matriz extracelular propriedades absorventes (FRASER et al., 1997), o aumento dos seus níveis verificado no presente estudo pode indicar acúmulo indevido de água e sódio no tecido, acarretando inchaço da cartilagem, em prejuízo das funções básicas da matriz extracelular. Em contrapartida, como umas das propriedades descritas para o RSV é justamente a sua capacidade em proteger a degradação da MEC no caso de doenças degenerativas da cartilagem (DAVE et al., 2008), a coloração observada no grupo RRv reitera esse papel protetor, uma vez que a sua intensidade foi semelhante àquela do grupo controle (NN).

A maior área ocupada pela MEC na cartilagem do PC dos animais que foram submetidos à restrição proteica nos períodos pré-púbere (S) e púbere (SS), pode associar-se valores mais elevados na densidade de condrócitos nesses grupos do que nos respectivos controles (N, NN), uma vez que na cartilagem do PC, a MEC é produzida e secretada principalmente por células da camada condroblástica. Uma vez que em animais subnutridos de 42 dias Oliveira et al. (2010) não observaram diferenças na densidade celular na cartilagem do PC, é possível que o aumento na densidade de condrócitos aqui verificada represente uma resposta biológica na tentativa de restaurar o tecido. Como Moskowitz et al. (1992), relacionaram a proliferação paralela de condrócitos com a fase precoce de osteoartrite, dada a fase da vida em que se encontram os animais do presente estudo, não se pode considerar que o tecido encontre-se em fase de degeneração, mas sim desestruturado mediante a subnutrição proteica.

Com o processo de renutrição (grupos RN e RRv) os animais apresentaram uma diminuição no número de condrócitos na cartilagem do PC, que para Luder (1998) é atribuída a uma característica natural durante o processo de envelhecimento. Todavia, essa diminuição não foi observada no grupo controle da fase púbere (NN), o que, como já descrito anteriormente, talvez relacione-se à idade jovem em que se encontram esses animais (SENGUPTA, 2013). Dessa forma, os resultados também podem sugerir que a renutrição predisponha a cartilagem a alterações patológicas em fases mais tardias da vida. Isto corrobora com autores como Goggs et al. (2003) que correlacionaram a redução progressiva no número de condrócitos a um processo de degradação da cartilagem.

Na SBo, a média da área ocupada pela MEC significativamente maior nos grupos NN e RRv do que aquela dos grupos SS e RN pode ser atribuída, como relatado por Cendekiawan et al. (2010) a um aumento no potencial de formação óssea.

### 6.3 CAMADAS DO TECIDO CARTILAGÍNEO

As mensurações das camadas constituintes da cartilagem do PC, principalmente da camada h, que evidenciaram na fase pré-púbere maior espessura no grupo N do que no grupo S, e a sua diminuição aos 60 dias no grupo NN e consequente manutenção da espessura elevada no grupo SS, corrobora com as descrições acerca da sua grande capacidade de crescimento e remodelação alterada, por exemplo pela idade (KILIARIDS et al., 1999). Em relação a esse parâmetro, isto pode ocorrer de maneira relativamente rápida, uma vez que a grande espessura da camada h no PC de crianças recém-nascidas (WRIGHT, MOFFETT, 1974), reduz acentuadamente devido ao crescimento ósseo endocondral em crianças com três anos (THILANDER et al., 1976). Todavia, além da idade devem ser considerados outros fatores como a perda oclusal (ISHIMARU et al., 1994), lesão térmica corporal (OLIVEIRA et al., 2010) e retrusão mandibular (SÁ et al., 2013) e, de acordo com o observado na presente pesquisa o estado nutricional (grupos N, S, e NN, SS).

Inoue et al. (1995) dividem o processo de crescimento condilar em duas fases: maturação e mineralização. Durante essas fases, a maturação dos condrócitos é iniciada com a diferenciação das células do mesênquima e finalizada com condrócitos altamente amadurecidos, que se degeneram na camada hipertrófica e são substituídos por tecido ósseo através da invasão de capilares e osteoblastos (CANCEDDA et al., 2000; GARANT, 2003). Diante do aumento observado na camada h do grupo SS, pode-se inferir que a subnutrição provocou alterações no metabolismo celular, e como consequência, determinou um atraso na ossificação endocondral, que ocorreu possivelmente por meios de fatores de proliferação e maturação celular. Desta forma, as células permanecem em estado degenerativo, atrasando a osteogênese e consequentemente o crescimento. A renutrição apenas com dieta normoproteica não auxiliou no restabelecimento desse parâmetro (grupo RN). No entanto, quando acrescida de resveratrol (grupo RRv), a dieta promoveu efetiva recuperação na espessura, estatisticamente semelhante ao NN. Esses dados estão de acordo com estudos que mostram que o resveratrol promove a diferenciação osteoblástica e osteogênica nas células do

ligamento periodontal humano (LEE et al., 2011) e células tronco mesenquimais (TSENG et al., 2011), além de impulsionar a produção de genes hipertróficos em condrócitos (KIM et al., 2014). Na presente pesquisa, verificou-se que a estimulação da ossificação endocondral ocorreu, uma vez que foi observada a diminuição da espessura da camada h no grupo RRv, reforçando o descrito na literatura sobre os efeitos osteogênicos deste polifenol.

As alterações promovidas pela subnutrição nas camadas que compõem a SBo, tais como o aumento da espessura da zona de repouso em SS podem ser atribuídas, também, à diminuição da área dos condrócitos (provavelmente um indicativo de baixa atividade celular), e à elevada densidade no número dessas células nessa camada. Como a zona de repouso funciona como um banco de “células tronco” com capacidade de proliferação finita (SCHRIER et al., 2006) e que geram os clones de condrócitos colunares da zona proliferativa (ABAD et al., 2002), pode-se admitir que no período púbere, a subnutrição compromete precocemente o crescimento da base do crânio, uma vez que essas células deveriam ter migrado para a zona seriada para futura hipertrofia e ossificação. Muito embora a área dos condrócitos do grupo RN tenha se apresentado diminuída em relação ao grupo NN, a recuperação proteica mostrou-se efetiva pelo menos para o período estudado, uma vez que melhoras foram notadas neste grupo, tais como a diminuição da zona de repouso e da densidade celular, dados equivalentes aos do grupo controle (NN). Esses achados estão de acordo com Schrier et al. (2006), que encontraram na zona de repouso da cartilagem epifisial do fêmur e da tíbia de coelhos, uma diminuição no número de condrócitos, e que atribuíram a um processo natural que ocorre gradualmente com o avanço da idade.

Mesmo considerando-se que os condrócitos da zona de repouso possam ter migrado para a camada seriada, a espessura elevada das camadas h+s em RN relativamente aos demais grupos da fase púbere, é um forte indicativo de um atraso na substituição dos condrócitos por tecido ósseo. O diferencial encontrado com a renutrição suplementada com resveratrol (grupo RRv) foi a diminuição da densidade e área celulares, e da espessura das camadas da SBo, quando comparadas ao respectivo controle (NN), características atribuídas por Weiss et al. (2010), à ossificação da cartilagem epifisária.

Esses dados sugerem que o RSV parece potencializar o processo de ossificação endocondral que ocorre na SBo. Como a capacidade osteogênica do RSV é atribuída principalmente à regulação de COL1, COL10 e RUNX2 (marcadores de progressão hipertrófica de condrócitos), auxiliada pela ativação da via SIRT1 (MIZUTANI et al., 1998; KIM et al., 2015) não se pode descartar a possibilidade do RSV ter atuado por algumas dessas vias, o que abre espaço para que se realizem pesquisas que permitam avaliar mais

especificamente se há um benefício na ação deste polifenol na dinâmica do desenvolvimento e manutenção do tecido cartilágneo.

#### 6.4 IGF-I E IGF-IR

A condrogênese e a conseqüente formação óssea endocondral tem início e progride devido à sinalização contínua entre as células do pericôndrio e os condrócitos das cartilagens, que ocorre através de diversos fatores de crescimento (ITOH et al., 2004). São bem conhecidos alguns fatores que regulam a proliferação celular, a diferenciação e a maturação dos condrócitos, destacando-se os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) (SHUM, NUCKOLLS, 2002). Desta forma, no presente estudo, aplicou-se a técnica de imunohistoquímica para demonstração da presença do peptídeo IGF-I e de seu receptor IGF-IR, tanto na camada condroblástica da cartilagem do PC quanto na zona de repouso da SBo, uma vez que Makower et al. (1989); Reinecke et al. (2000); Visnapuu et al. (2001) e Fuentes et al. (2002) demonstraram que o IGF-I e o IGF-IR são detectáveis através dessa metodologia em ambos os tecidos.

As alterações promovidas pela subnutrição, relativas ao peptídeo e seu receptor, mostraram-se mais pronunciadas na cartilagem do PC da mandíbula do que na SBo, uma vez que nesse tecido, nos dois períodos abordados, os animais subnutridos (S e SS) apresentaram baixo número de células imunopositivas tanto para o IGF-I quanto para o IGF-IR, enquanto que na SBo não foram detectadas diferenças significativas. Este fato pode estar relacionado ao potencial de crescimento relativamente independente da sincondrose (cartilagem primária) que seria menos sensível a fatores funcionais (como por exemplo, a ação muscular), enquanto que a cartilagem do PC da mandíbula (cartilagem secundária) é considerada mais sensível, e altamente adaptável a forças biomecânicas (PIRTTINIEMI et al., 1996; NAKAI et al., 1998).

Como a via IGF-I/IGF-IR relaciona-se principalmente aos processos de crescimento, maturação e com a fase final de hipertrofia dos condrócitos (COOPER et al., 2013), a diminuição do número de células imunorreativas ao IGF-I e seu receptor nos grupos S e SS na cartilagem do PC da mandíbula, pode ter interferido no processo normal dessa via acarretando, principalmente, um atraso no crescimento ósseo endocondral, previamente confirmado pela elevada espessura da camada h nesse tecido.



A porcentagem de células reativas ao IGF-I foi elevada na cartilagem do PC da mandíbula no grupo RN, e na SBo nos grupos RN e RRv da SBo também foi detectada em condrócitos de cartilagens osteoartríticas (MIDDLETON et al., 1992; DORÉ et al., 1995; OLNEY et al., 1995). Quanto à capacidade de resposta das células ao fator de crescimento, embora a expressão do IGF-I esteja aumentada, estudos revelaram uma diminuição nessa resposta, relacionada à idade e também à osteoartrite (DORÉ et al., 1994; GUERNE et al., 1995; MARTIN et al., 1997). Tal fato poderia explicar o atraso no crescimento encontrado nos grupos RN dos dois tecidos, pois mesmo possuindo um número maior de células reativas, as mesmas não responderam ao estímulo do peptídeo.

Para Loeser et al. (2000) essa redução à resposta ao fator de crescimento pode ocorrer por diversas modificações como a transdução de sinal defeituoso, diminuição dos níveis de receptores de IGF-I e também a produção de proteínas de ligação (IGFBPs) que inibem sua ação na cartilagem. Na SBo do grupo RN, a média de condrócitos reativos ao IGF-IR foi menor do que as células positivas para o IGF-I, o que permite inferir que a desproporção entre peptídeo e receptor tenha contribuído para uma possível diminuição da resposta celular ao IGF-I, uma vez que nesses animais houve atraso no crescimento ósseo endocondral.

No grupo RRv, a proporcionalidade entre o número de condrócitos imunorreativos ao peptídeo e receptor e a espessura da cartilagem semelhante ao grupo controle (NN), indicam o seu crescimento normal. Já a redução à resposta dos condrócitos ao IGF-I pode ter sido minimizada pelo RSV através do aumento da expressão do receptor, no qual o peptídeo irá interagir e desencadear as respostas celulares correlacionadas. Na cartilagem do PC da mandíbula no grupo RRv, a porcentagem média de condrócitos imunorreativos ao IGF-I e IGF-IR foi semelhante ao NN, indicando que o RSV pode ter diminuído uma possível insensibilidade ao IGF-I provocada pela subnutrição, controlando o aumento na expressão desse peptídeo e seu receptor, permitindo assim que o fator de crescimento desempenhe suas funções na cartilagem.

As IGFBPs são proteínas plasmáticas que se ligam ao IGF-I com maior afinidade do que o IGF-IR (JONES et al., 1995) e podem regular negativamente as ações do fator de crescimento, impedindo-o de interagir com seus receptores específicos (MARTIN et al., 1997). Na SBo dos grupos subnutridos (S, SS), não foram observadas diferenças nas médias de condrócitos reativos ao IGF-I e IGF-IR; entretanto, estas células apresentaram características morfológicas que indicam atraso no crescimento. Muito embora na presente pesquisa não se tenha avaliado as IGFBPs circulantes, diante das modificações já relatadas, não se descarta a possibilidade de um aumento na produção dessas proteínas e uma possível competição com os

receptores do IGF-I, provocando uma redução na capacidade de resposta celular ao peptídeo. Desta forma, deve-se enfatizar aqui, a necessidade de se realizar pesquisas que contemplem esse tipo de avaliação, em diferentes modelos experimentais.

***CONCLUSÕES***

## 7 CONCLUSÕES

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

1. Na cartilagem do PC da mandíbula, a subnutrição provocou alterações em suas camadas, na morfologia dos condrócitos e também nas organelas destas células, comprometendo sua atividade metabólica normal.

2. A suplementação de resveratrol na dieta mostrou-se mais satisfatória do que a renutrição com dieta normoproteica na recuperação desses parâmetros.

3. As características das camadas da SBo e organelas dos condrócitos também foram alteradas com a depleção proteica, onde destaca-se as cisternas dilatadas do RER e predomínio da zona granular do nucléolo, indícios do comprometimento na produção de ribossomos e proteínas por essas células.

4. Os animais renutridos com dieta normal (RN) apresentaram sinais de reparação tecidual evidentes, entretanto, esta foi significativamente mais efetiva no grupo RRv, o que demonstra a ação deste polifenol sobre o metabolismo celular.

5. Relativamente ao colágeno, através da coloração de Picrossírius, observou-se que a cartilagem do PC foi constituída predominantemente por fibras do tipo III no grupo subnutrido (SS) e também no RN, fato este comprovado ultraestruturalmente, onde foram detectadas fibrilas colágenas mais delgadas nesses dois grupos. Estes resultados apontam para uma provável atividade compensatória dos condrócitos que produzem fibras consideradas imaturas para compensar a perda de outros tipos de colágeno, interferindo na funcionalidade desse tecido.

6. O grupo RRv apresentou um padrão na constituição de fibras colágenas semelhante ao grupo NN, indicativo de que este polifenol promoveu uma regulação na expressão do colágeno.

7. Na SBo, destacou-se a elevada deposição de fibras colágenas do tipo II nos grupos SS e RN, que foi reduzida através da suplementação de resveratrol na dieta, o que aponta para uma capacidade de regulação da expressão de moléculas envolvidas na degradação do colágeno por este polifenol.

8. Tanto na cartilagem do PC quanto na SBo a subnutrição promoveu aumento na concentração de proteoglicanas da MEC, podendo acarretar no inchaço da cartilagem e comprometendo efetivamente as funções básicas da matriz extracelular.

9. No grupo RN verificou-se uma ligeira recuperação sobre este parâmetro, entretanto nos animais do RRv esta foi mais concreta, reiterando o papel protetor do resveratrol relativo à degradação da MEC frente à doenças degenerativas.

10. A subnutrição provocou aumento na secreção da MEC (S, SS) na cartilagem do PC da mandíbula, o que pode estar associado ao grande número de condrócitos encontrados nesses grupos.

11. Os animais renutridos (grupos RN e RRv) apresentaram diminuição no número de condrócitos na camada **c** cartilagem do PC, diferentemente do ocorrido em NN, sugerindo que a renutrição predisponha a cartilagem a alterações patológicas em fases mais tardias da vida.

12. Ainda na cartilagem do PC, relativamente às suas camadas constituintes, destacou-se a espessura elevada na camada **h** com a subnutrição (grupo SS), indicativo de alterações no metabolismo celular, consequentemente determinando atraso na ossificação endocondral. Através da renutrição com dieta normal, este parâmetro não foi recuperado, entretanto, com a suplementação de resveratrol, houve efetiva recuperação na espessura.

13. Na SBo, a média da área ocupada pela MEC foi significativamente maior nos grupos NN e RRv, indicando um aumento no potencial de formação óssea.

14. Alterações relacionadas à subnutrição (grupo SS) foram verificadas na camada de repouso na SBo, como o aumento de sua espessura, que pode estar relacionado à elevada densidade celular encontrada, e diminuição da área dos condrócitos (provavelmente um indicativo de baixa atividade celular).

15. Muito embora em RN a área dos condrócitos ainda encontrou-se diminuída, a recuperação proteica mostrou-se efetiva atuando na diminuição da zona de repouso e densidade celular, equiparando-se a grupo NN.

16. Na SBo, o atraso no processo de ossificação endocondral foi constatado principalmente através da espessura das camadas h+s, que foram elevadas em SS e RN, demonstrando uma demora na substituição dos condrócitos por tecido ósseo.

17. O resveratrol apresentou potencial osteogênico elevado, quando comparado a todos os outros grupos, promovendo a diminuição da área e densidade celular, e também das camadas h+s.

18. As alterações promovidas pela subnutrição relativas ao IGF-I e IGF-IR foram mais pronunciadas na cartilagem do PC do que na SBo, uma vez que nesse tecido, os animais subnutridos (S, SS) apresentaram baixo número de células imonopositivas tanto para o peptídeo quanto para o receptor, enquanto que na SBo não foram observadas diferenças significativas. Este fato pode estar relacionado à grande capacidade de crescimento e remodelação da cartilagem do PC, considerada mais sensível à fatores funcionais. A diminuição do número de células reativas ao IGF-I e seu receptor nesses grupos pode ter interferido no crescimento ósseo endocondral, previamente confirmado pela espessura da camada h.

19. A porcentagem de células imunorreativas ao IGF-I no grupo RN na cartilagem do PC foi muito elevada, podendo levar a uma diminuição da resposta celular a esse fator de crescimento. No RRv, a média dos condrócitos positivos para o peptídeo e receptor foi semelhante ao grupo controle, indicando que o resveratrol pode ter diminuído uma possível insensibilidade ao IGF-I provocada pela subnutrição.

20. Na SBo, embora o número de imunomarcações para o IGF-I tenha sido elevado nos dois grupos renutridos, houve uma proporcionalidade entre peptídeo e receptor no RRv, que não ocorreu em RN. Este fato indica que, se ocorreu uma resposta diminuída ao IGF-I em decorrência do menor número de receptores disponíveis em RN, esta pode ter sido minimizada pelo resveratrol através do aumento da média de receptores.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

ABAD, V.; MEYERS, J. L.; WEISE, M.; GAFNI, R. I.; BARNES, K. M.; NILSSON, O.; BACHER, J. D.; BARON, J. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. **Endocrinology**, v. 143, n. 5, p. 1851-1857, 2002.

ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 5, p. 405-430, 2005.

ALMEIDA, P. C.; NANTES, I. L.; CHAGAS, J. R.; RIZZI, C. C. A.; ALARIO, A. F.; CARMONA, E.; JULIANO, L.; NADER, H. B.; TERSARIOL, I. L. S. Cathepsin B activity regulation heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 944-951, 2001.

Baker, J.; Liu, J. P.; Robertson, E. J.; Efstratiadis, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 73-82, 1993.

BAUR, J. A.; PEARSON, K. J.; PRICE, N. L.; JAMIESON, H. A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V. V.; ALLARD, J. S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P. J.; POOSALA, S.; BECKER, K. G.; BOS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K. W.; SPENCER, R. G.; LAKATTA, E. G.; COUTEUR, D. L.; SHAW, R. J.; NAVAS, P.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D. K.; CABO, R.; SINCLAIR, D. A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high calorie diet. **Nature**, v. 444, p.337-42, 2006.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential or resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews**, v.5, p.493-506, 2006.

BOISSY, P.; ANDERSEN, T. L.; ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M.; PLESNER, T.; DELAISSE, J. M. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. **Cancer Research**, v.65, p.9943-52, 2005.

BORBA, V. Z. C.; KULAK, C. A. M.; LAZZARETTI-CASTRO, M. Controle neuroendócrino da massa óssea: mito ou verdade? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.47, p.453-457, 2003.

Bozzini, C; Barcelo, A. C.; Alippi, R. M.; Leal, T. L.; Bozzini, C. E. The concentration of dietary casein required for normal mandibular growth in the rat. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 5, p. 840-842, 1989.



CANCEDDA, R.; CASTAGNOLA, P.; CANCEDDA, F. D.; DOZIN, B. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, v. 44, n. 6, p. 707-714, 2000.

CAVALLI, M. A.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, J. N. B.; SILVA, J. B.; BOLDRINI, S. D. C.; LIBERTI, E. A. Evaluation of protein undernourishment on the condylar process of the Wistar rat mandible correlation with insulin receptor expression. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 2, p. 135-144, 2015.

CENDEKIAWAN, T; WONG, R. W. K; RABIE, A. B. M. Relationships between cranial base synchondroses and craniofacial development: a review. **The Open Anatomy Journal**, v. 2, p. 67-75, 2010.

CHANDRA, R. K. Protein-Energy Malnutrition and immunological responses. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 597-600, 1992.

CHEN, C. G.; THUILLIER, D.; CHIN, E. N.; ALLISTON, T. Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 10, p. 3278-3289, 2012.

CHI, T. C. ; CHEN, W. P.; CHI, T. L.; KUO, T. F.; LEE, S. S.; CHENG, J. T. ; SU, M. J. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 80, p. 1713–1720, 2007.

CÓNSOLE, G. M.; JURADO, S. B.; OYHENART, E.; FERESE, C.; PUCCIARELLI, H.; GÓMEZ DUMM, C. L. A. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 65-74, 2001.

COOPER, K. L.; OH, S.; SUNG, Y.; DASARI, R. R.; KIRSCHNER, M. W.; TABIN, C. J. Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 375-378, 2013.

COPRAY, J. C. V. M.; JANSEN, H. W. B.; DUTERLOO, H. S. Effects of compressive forces on proliferation and matrix synthesis in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 30, n. 4, p. 299-304, 1985.

CSAKI, C.; KESHISHZADEH, N.; FISCHER, K.; SHAKIBAEI, M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 677-687, 2008.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DAVE, M.; ATTUR, M.; PALMER, G.; AL-MUSSAWIR, H. E.; KENNISH, L.; PATEL, J.; ABRAMSON, S. B. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 9, p. 2786-2797, 2008.

DELATTE, M.; VON den HOFF, J.W.; MALTHA, J.C.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Growth stimulation of mandibular condyles and femoral heads of newborn rats by IGF-I. **Archives of Oral Biology**, v. 49, p. 165-175, 2004.

DEVINE, A.; ROSEN, C.; MOHAN, S.; BAYLINK, D.; PRINCE, L.R. Effects of zinc and other nutritional factors on insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 200-206, 1998.

DORÉ, S.; PELLETIER, J. P.; DIBATTISTA, J. A.; TARDIF, G., BRAZEAU, P.; MARTEL-PELLETIER, J. Human Osteoarthritic Chondrocytes Possess an Increased Number of Insulin-Like Growth Factor 1 Binding Sites but are Unresponsive to its Stimulation. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, n. 2, p. 253-263, 1994.

DORÉ, S.; ABRIBAT, T.; ROUSSEAU, N.; BRAZEAU, P.; TARDIF, G.; DIBATTISTA, J. A.; CLOUTIER, J. M.; PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J. Increased insulin-like growth factor 1 production by human osteoarthritic chondrocytes is not dependent on growth hormone action. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 3, p. 413-419, 1995.

ELMALI, N.; BAYSAL, O.; HARMA, A.; ESENKAYA, I.; MIZRAK, B. Effects of Resveratrol in Inflammatory Arthritis. **Inflammation**, v. 54, p. 158-162, 2005.

EO, SEONG-HUI; CHO, HONG-SIK; KIM, SONG-JA. Resveratrol regulates type II collagen and COX-2 expression via the ERK, p38 and Akt signaling pathways in rabbit articular chondrocytes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 3, p. 640-648, 2014.

EYRE, D. R.; WU, J. J.; WOODS, P. E. The cartilage collagens: structural and metabolic studies. **The Journal of Rheumatology**, v. 27, p. 49-51, 1991.

EYRE, D. R.; WEIS, M. A.; WU, J-J. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework. **Eur Cell Mater**, v. 12, n. 1, p. 57-63, 2006

FARNUM, C. E.; LEE, A. O.; O'HARA, K.; WILSMAN, N. J. Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats. **Pediatric Research**, v. 53, n. 1, p. 33-41, 2003.

FENG, Y. H.; ZHOU, W. L.; WU, Q. L. Low dose resveratrol enhanced immune response of mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 10, p. 893-7, 2002.

FLECHTENMACHER, J.; HUCH, K.; THONAR, E. J. M. A. Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. **Arthritis & Rheumatology**, v. 39, p. 1896-1904, 1996.

FRANCIS, F. J. **Anthocyanins and betalains: composition and applications**. Cereal Foods World, v. 45, p. 208-213, 2000.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**, v. 242, n. 1, p. 27-33, 1997.

FRÖJDÖ, S.; DURAND, C; PIROLA, L. Metabolic Effects of Resveratrol in Mammals - a Link Between Improved Insulin Action and Aging. **Current Aging Science**, v. 1, p. 45-151, 2008.

FRYBURG, D. A.; JAHN, L. A.; HILL, S. A.; OLIVERAS, D. M.; BARRETT, E. J. Insulin and insulin-like growth factor-I enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms. **Jornal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 4, p. 1722-1729, 1995.

FUENTES, M. A.; OPPERMAN, L. A.; BELLINGER, L. L.; CARLSON, D. S.; HINTON, R. J. Regulation of cell proliferation in rat mandibular condylar cartilage in explant culture by insulin-like growth factor-1 and fibroblast growth factor-2. **Archives of Oral Biology**, v. 47, n. 9, p. 643-654, 2002.

GANRY, O.; BAUDOIN, C.; FARDELLONE, P. Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: The EPIDOS Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 15, p. 773-780, 2000.

GARANT, P. R. **Oral cells and tissues**. Quintessence Publishing Company, 2003.

GAT-YABLONSKI, G.; BEN-ARI, T.; SHTAIF, B.; POTIEVSKY, O.; MORAN, O.; ESHET, R.; MAOR, G.; SEGEV, Y.; PHILLIP, M. Leptin reverses the inhibitory effect of caloric restriction on longitudinal growth. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 343-350, 2004.

GOBATTO, C. A. **Alterações metabólicas do treinamento físico em ratos previamente subnutridos e recuperados**. Campinas: UNICAMP, 1993.

GODFREY, R. J.; MADGWICK, Z.; WHYTE, G. P. The exercise-induced growth hormone response in athletes. **Sports Medicine**, v. 33, n. 8, p. 599-613, 2003.

GOGGS, R.; CARTER, S. D.; SCHULZE-TANZIL, G.; SHAKIBAEI, M.; MOBASHERI, A. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v. 166, n. 2, p. 140-158, 2003.

MOSKOWITZ, R. W.; HOWELL, D. S.; GOLDBERG, V. M.; MANKIN, H. J. **Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management**. Filadelfia: Saunders WB, 1992.

GUERNE, P. A.; BLANCO, F.; KAELIN, A.; DESGEORGES, A.; LOTZ, M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 7, p. 960-968, 1995.

HALLY, A. D. A Counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopical sections. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. 105, p. 503-517, 1964.

HEINRICHS, C.; COLLI, M.; YANOVSKI, J. A.; LAUE, L.; GERSTL, N. A.; KRAMER, A. D.; UYEDA, J. A.; BARON, J. Effects of Fasting on the Growth Plate: Systemic and Local Mechanisms 1. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5359-5365, 1997.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 89-143, 2003.

HOLLY, J. M. P.; WASS, J. A. H. Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. **Journal of Endocrinology**, v. 122, p. 611-618, 1989.

HOLZENBERGER, M.; KAPELLER, L.; MAGALHÃES-FILHO, C. IGF-1 signaling and aging. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 1761-1764, 2004.

INOUE, H.; NEBGEN, D.; VEIS, A. Changes in phenotypic gene expression in rat mandibular condylar cartilage cells during long-term culture. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 11, p. 1691-1697, 1995.

IRVING-RODGERS, Helen F. et al. Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 3, p. 613-624, 2010.

ISHIMARU, J. I.; HANDA, Y.; KURITA, K.; GOSS, A. N. The effect of occlusal loss on normal and pathological temporomandibular joints: an animal study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 22, n. 2, p. 95-102, 1994.

ISSLER, R. M.; GIUGLIANI, E. R. Identification of the groups most vulnerable to infant malnutrition through the measuring of poverty level. **Jornal de Pediatria**, v. 73, n. 2, p. 101, 1997.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 11, p. 563-569, 2004.

JONES, J. I.; CLEMMONS, David R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-34, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KARIMIAN, E.; TAMM, C.; CHAGIN, A. S.; SAMUELSSON, K.; KJARTANSDÓTTIR, K. R.; OHLSSON, C.; SÄVENDAHL, L. Resveratrol treatment delays growth plate fusion and improves bone growth in female rabbits. **Plos One**, v. 8, e 67859, 2013.

KATSILAMBROS, N.; DIMOSTHENOPOULOS, C.; Kontogianni, M. D.; Manglara, E., Poulia, K. A. **Weight Management and Eating Disorders. Clinical Nutrition in Practice.** John Wiley & Sons, 2011.

KETELSLEGERS, J-M.; MAITER, D.; MAES, M.; UNDERWOOD, L. E.; THISSEN, J-P. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I. **Metabolism**, v. 44, p. 50-57, 1995.

KILIARIDIS, S.; THILANDER, B.; KJELLBERG, H.; TOPOUZELIS, N.; ZAFIRIADIS, A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 116, n. 2, p. 121-125, 1999.

KIM, H. J.; BRAUN, H. J.; DRAGOO, J. L. The effect of resveratrol on normal and osteoarthritic chondrocyte metabolism. **Bone and Joint Research**, v. 3, n. 3, p. 51-59, 2014.

KIMURA, M.; MIYAZAWA, K.; TABUCHI, M.; MAEDA, H.; KAMEYAMA, Y.; GOTO, S. Bisphosphonate treatment increases the size of the mandibular condyle and normalizes growth of the mandibular ramus in osteoprotegerin-deficient mice. **Calcified Tissue International**, v. 82, n. 2, p. 137-147, 2008.

KIRSCH, T.; HARRISON, G.; GOLUB, E. E.; NAH, H. D. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 45, p. 35577-35583, 2000.

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

LEE, Y. M.; SHIN, S. I.; SHIN, K. S.; LEE, Y. R.; PARK, B. H.; KIM, E. C. The role of sirtuin 1 in osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 6, p. 712-721, 2011.

LIBERMAN, B.; CUKIERT, A. **Fisiologia e fisiopatologia do hormônio do crescimento**. Fisiologia e fisiopatologia do hormônio do crescimento. Lemos Editorial, São Paulo, 2004.

LIBERTI, E. A.; FONTES, R. B.; FUGGI, V. M.; MAIFRINO, L. B.; SOUZA, R. R. Effects of combined pre-and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: a histochemical, quantitative and ultrastructural study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 26, p. 3598-3604, 2007.

LIFSHITZ, F. **Pediatric endocrinology: a clinical guide**. Marcel Dekker Inc, New York, 1990.

LIVNE, E.; LAUFER, D.; BLUMENFELD, I. Differential response of articular cartilage from young growing and mature old mice to IL-1 and TGF-beta. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 24, p. 211-221, 1997.

LOESER, R. F.; SHANKER, G.; CARLSON, C. S.; GARDIN, J. F.; SHELTON, B. J.; SONNTAG, W. E. Reduction in the chondrocyte response to insulin-like growth factor 1 in aging and osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 9, p. 2110-2120, 2000.

LUDER, H. U. Age changes in the articular tissue of human mandibular condyles from adolescence to old age: a semiquantitative light microscopic study. **The Anatomical Record**, v. 251, n. 4, p. 439-447, 1998.

LUNA, Lee G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 1968.

MA, L. C.; MA, Q. Y.; WANG, L. C.; SHA, H. C.; WU, S. L.; ZHANG, M. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. **Inflammation Research**, v. 54, p. 522-527, 2005.

MACDONALD, D. W.; SQUIRES, R. S.; AVERY, S. A.; ADAMS, J.; BAKER, M.; CUNNINGHAM, C. R.; HEIMANN, N. B.; KOOYMAN, D. L.; SEEGMILLER, R. E. Structural variations in articular cartilage matrix are associated with early-onset osteoarthritis in the spondyloepiphyseal dysplasia congenita (sedc) mouse. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 16515-16531, 2013.

MADI, K.; CAMPOS, S. D. Subnutrição experimental: resultados anátomo-patológicos e bioquímicos da administração de dietas hipoprotéicas a ratos albinos jovens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 73, n.3, p. 153-181, 1975.

MAKOWER, A. M.; SKOTTNER, A.; WROBLEWSKI, J. Binding of insulin-like growth factor-I (IGF-I) to primary cultures of chondrocytes from rat rib growth cartilage. **Cell Biology International Reports**, v. 13, n. 8, p. 655-665, 1989.

MANCHESTER, K. I. Effect of insulin on protein synthesis. **Diabetes**, v. 21, p.447-52, 1972.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria, estereologia**, 1994.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Eduerj, Rio de Janeiro, 1995.

MANRAL, M.; SINGH, S. Insulin like Growth Factor-1 as a Marker of Nutritional Status and Health. **Ameen Journal of Medical Science**, v. 4, n. 2, p. 113-122, 2011.

MAOR, G.; LARON, Z.; ESHET, R. ET AL: The early postnatal development of the murine mandibular condyle is regulated by endogenous insulin-like growth factor- I. **Journal of Endocrinology**, v. 137, p. 21-26, 1993.

MAOR, G.; HOCHBERG, Z.; SILBERMANN, M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. **Acta Endocrinologica (Copenhagen)**, v. 128, p.56-64, 1993.

MARTIN, A. R.; VILLEGAS, I.; CASA, C. L. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1399-1410, 2004.

MARTÍN, A. E.; PANI, M. D. R.; HOLGADO, N. R.; LÓPEZ MIRANDA, L. I.; MEHERIS, H. E.; GARAT, J. A. Facial development disorders due to inhibition to endochondral ossification of mandibular condyle process caused by malnutrition. **The Angle Orthodontist**, v. 84, n. 3, p. 473-478, 2014.

MARTIN, J. A.; ELLERBROEK, S. M.; BUCKWALTER, J. A. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: The role of growth factor binding proteins. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 4, p. 491-498, 1997.

MATAVELI, F. D. A.; HAN, S. W.; NADER, H. B.; MENDES, A.; KANISHIRO, R.; TUCCI, P.; LOPES, A. C.; SILVA, J. C. C. B.; MAROLLA, A. P. C.; CARVALHO, L. P.; DENAPOLI, P. M. A.; PINHAL, M. A. R. Long-term effects for acute phase myocardial infarct VEGF165 gene transfer cardiac extracellular matrix remodeling. **Growth Factors**, v. 27, n. 1, p. 22-31, 2009.

MICHELACCI, Y. M.; MOURÃO, P. A.; LAREDO, J.; DIETRICH, C. P. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage. **Connective Tissue Research**, v. 7, n. 1, p. 29-36, 1979.

MIDDLETON, J. F.; TYLER, J. A. Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. **Annals of The Rheumatic Diseases**, v. 51, n. 4, p. 440-447, 1992.



MIZUTANI, K.; IKEDA, K.; KAWAI, Y.; YAMORI, Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 859-863, 1998.

MWALE, F.; TCHETINA, E.; WU, C. W.; POOLE, A. R. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 2, p. 275-283, 2002.

NAKAI, H.; NIIMI, A.; UEDA, M. The influence of compressive loading on growth of cartilage of the mandibular condyle in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 43, n. 7, p. 505-515, 1998.

NIE, S. Cranial base in craniofacial development: developmental features, influence on facial growth, anomaly, and molecular basis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 63, p. 127-135, 2005.

NUNES, M. L.; BATISTA, B. B.; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 39-44, 2002.

ODA, J. Y.; LIBERTI, E. A.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Variation in articular cartilage in rats between 3 and 32 months old. A histomorphometric and scanning electron microscopy study. **Biogerontology**, v. 8, n. 3, p. 345-352, 2007.

OHASHI, N.; EJIRI, S.; HANADA, K.; OZAWA, H. Changes in type I, II, and X collagen immunoreactivity of the mandibular condylar cartilage in a naturally aging rat model. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 15, n. 2, p. 77-83, 1997.

OLIVEIRA, B. C. C.; OLIVEIRA, F.; Martini, D. T.; PRISCO, C. R. D.; RIGUETTI, M. M. S.; LIBERTI, E. A.; BOLDRINI, S. C. The relative effects of severe burn injury and pre- and post-natal protein deprivation on mandibular condyle morphology. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 45-54, 2010.

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, S. J. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier; 1998. p.61-4.

OLNEY, R. C.; TSUCHIYA, K.; WILSON, D. M.; MOHTAI, M.; MALONEY, W. J.; SCHURMAN, D. J.; SMITH, R. L. Chondrocytes from osteoarthritic cartilage have increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) and-

5, but not IGF-II or IGFBP-4. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 3, p. 1096-1103, 1996.

ONIS, M.; MONTEIRO, C.; AKRÉ, J.; CLUGSTON, G. **The worldwide magnitude of protein energy malnutrition**: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. **Bull WHO**, v. 71, p. 703-712, 1993.

PIRTTINIEMI, P.; KANTOMAA, T.; SALO, L.; TUOMINEN, M. Effect of reduced articular function on deposition of type I and type II collagens in the mandibular condylar cartilage of the rat. **Archives of Oral Biology**, v. 41, n. 1, p. 127-131, 1996.

RAMFJORD, S. P.; WALDEN, J. M.; ENLOW, D. H. Unilateral function and the temporomandibular joint in rhesus monkeys. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 32, p. 236-247, 1971.

RAMIREZ-YAÑEZ, G. O. The Mandibular Condylar Cartilage: a Review. **International Journal of Jaw Functional Orthopedics**, v. 1, p. 85-94, 2004.

REDDI, A. H.; GAY, R.; GAY, S.; MILLER, E. J. Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone, and bone marrow formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5589-5592, 1977.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, J. R. 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. 1939-31, 1993.

REINECKE, M.; SCHMID, A. C.; HEYBERGER-MEYER, B.; HUNZIKER, E. B.; ZAPF, J. Effect of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) on the Expression of IGF-I Messenger Ribonucleic Acid and Peptide in Rat Tibial Growth Plate and Articular Chondrocytes in Vivo 1. **Endocrinology**, v. 141, n. 8, p. 2847-2853, 2000.

RIVERA, J. A.; HOTZ, C.; GONZÁLEZ-COSSÍO, T.; NEUFELD, L.; GARCÍA-GUERRA, A. The effect of micronutrient deficiencies on child growth: a review of results from community-based supplementation trials. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 4010S-4020S, 2003.

ROGOL, A. D. Growth hormone and the adolescent athlete: What are the data for its safety and efficacy as an ergogenic agent? **Growth Hormone & IGF Research**, v. 19, p. 294-299, 2009.

ROMEIS, B. **Mikroskopische Technick**. 6.ed. Oldenbourg: München, 1968.

SÁ, M. P. N. D.; ZANONI, J. N.; SALLES, C. L. F. D.; SOUZA, F. D. D.; SUGA, U. S. G.; TERADA, R. S. S. Morphometric evaluation of condylar cartilage of growing rats in response to mandibular retractive forces. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 18, n. 4, p. 113-119, 2013.

SAH, R. L.; CHEN, A. C.; GRODZINSKY, A. J.; TRIPPEL, S. B. Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p.137-147, 1994.

SAKAMOTO, Y.; TAKANO, Y. Morphological influence of ascorbic acid deficiency on endochondral ossification in osteogenic disorder shionogi rat. **Anatomical Record**, v. 268, p. 93-104, 2002.

SCHAEFER, L. Proteoglycans, key regulators of cell–matrix dynamics. *Matrix Biology*, v. 35, p. 1-2, 2014.

SCHRIER, L.; FERNS, S. P.; BARNES, K. M.; EMONS, J. A.; NEWMAN, E. I.; NILSSON, O.; BARON, J. Depletion of resting zone chondrocytes during growth plate senescence. **Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 1, p. 27-36, 2006.

SEIK, D.; BOGUSZEWSKI, M. C. S. Testes de secreção de hormônio de crescimento e suas implicações no tratamento da baixa estatura. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 303-311, 2003.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, v. 4, n. 6, p. 624, 2013.

SHARMA, S.; ANJANEYULU, M.; KULKARMI, S. K.; CHOPRA, K. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, attenuates diabetic nephropathy in rats. **Pharmacology**, v. 76, p. 69–75, 2006.

SHILS, M.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Ed. Lea & Febiger, v. 2, p. 950-976, 1994.

SHUM, L.; NUCKOLLS, G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. **Arthritis Research**, v. 4, n. 2, p. 94-106, 2002.

SMITH, W. J.; UNDERWOOD, L. E.; CLEMMONS, D. R. Effects of caloric or protein restriction on insulin like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding proteins in children and adults. **Journal of Clinic Endocrinology and Metabolism**, v. 80, p. 443-449,1995.

SONG, L. H; PAN, W.; YU, Y. H.; QUARLES, L. D.; ZHOU, H. H.; XIAO, Z. S. Resveratrol prevents CsA inhibition of proliferation and osteoblastic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells through an ER/NO/cGMP pathway. **Toxicology In Vitro**, v. 20, p. 915– 22, 2006.

SU, H. C.; HUNG, L. M.; CHEN, J. K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats, **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 290, p. 1339–1346, 2006.

TAKANO-YAMAMOTO, T.; SOMA, S.; NAKAGAWA, K.; KOBAYASHI, Y.; KAWAKAMI, M.; SAKUDA, M. Comparison of the effects of hydrostatic compressive force on glycosaminoglycan synthesis and proliferation in rabbit chondrocytes from mandibular condylar cartilage, nasal septum, and spheno-occipital synchondrosis in vitro. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 99, n. 5, p. 448-455, 1991.

THILANDER, B.; CARLSSON, G. E.; INGERVALL, B. Postnatal development of the human temporomandibular joint I. A histological study. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 34, n. 2, p. 117-126, 1976.

TSENG, P. C.; HOU, S. M.; CHEN, R. J.; PENG, H. W.; HSIEH, C. F.; KUO, M. L.; YEN, M. L. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 10, p. 2552-2563, 2011.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FOUND. **The state of the world's children 2003**. <http://www.unicef.org/sowc03/tables/table2.htm> (acessado em 09/Jan/2011).

UYSAL, T.; GORGULU, S.; YAGCI, A.; KARSLIOGLU, Y.; GUNHAN, O.; SAGDIC, D. Effect of resveratrol on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture: early bone changes. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v.14, p. 80–87, 2011.

VINKKA, H. Secondary cartilage's in the facial skeleton of the rat. **Proceedings of Finnish Dental Society**, v.78, p.131–137, 1982.

VISNAPUU, V.; PELTOMÄKI, T.; RÖNNING, O.; VAHLBERG, T.; HELENIUS, H. Growth hormone and insulin-like growth factor I receptors in the temporomandibular joint of the rat. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 10, p. 1903-1907, 2001.

VON DEN HOFF, J. W.; DELATTE, M. Interplay of mechanical loading and growth factors in the mandibular condyle. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p. 709–715. 2008.

WANG, J.; GAO, J-S.; CHEN, J-W.; LI, F.; TIAN, J. Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. **Rheumatology International**, v. 32, n. 6, p. 1541-1548, 2012.

WATERLOW, J. C. Protein-energy malnutrition: the nature and extend of the problem. **Clinical Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 3-9, 1997.

WEISS, S.; HENNIG, T.; BOCK, R.; STECK, E.; RICHTER, W. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, n. 1, p. 84-93, 2010.

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.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243–25, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2010**. World Health Organization, 2010.

WRIGHT, D. M.; MOFFETT, B. C. The postnatal development of the human temporomandibular joint. **American Journal of Anatomy**, v. 141, n. 2, p. 235-249, 1974.

WU, G.; IMHOFF-KUNSCH, B.; GIRARD, A. W. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 26, n. s1, p. 4-26, 2012.

YAMAMOTO, K.; SHISHIDO, T.; MASAOKA, T.; IMAKIIRE, A. Morphological studies on the ageing and osteoarthritis of the articular cartilage in C57 black mice. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 13, n. 1, 2005.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381–406, 2001.

YOUNG, R. D.; LAWRENCE, P. A.; DUANCE, V. C.; AIGNER, T.; MONAGHAN, P. Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 423-432, 2000.

YU, H.; ROHAN, T. Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 18, p. 1472-1489, 2000.

Zhang, C.; Xu, Y.; Cheng, Y.; Wu, T.; Li, H. Effect of asymmetric force on the condylar cartilage, subchondral bone and collagens in the temporomandibular joints. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 4, p. 650-663, 2015.