MARCELO ARTHUR CAVALLI

Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição
protéica no processo condilar da mandíbula de ratos wistar: uma
correlação com a expressão do receptor de insulina

São Paulo
2011

MARCELO ARTHUR CAVALLI

Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição protéica no processo condilar da mandíbula de ratos wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina

São Paulo
2011

MARCELO ARTHUR CAVALLI

Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição protéica no processo condilar da mandíbula de ratos wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2011

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 032076

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.2502
FMVZ

Cavalli, Marcelo Arthur

Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição protéica no processo condilar da mandíbula de ratos wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina / Marcelo Arthur Cavalli. -- 2011.
109 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

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. Ratos wistar. 2. Subnutrição. 3. Renutrição. 4. Processo condilar da mandíbula. 5. Morfometria. 6. Imunohistoquímica. 7. Microscopia. 8. Eletrônica de varredura I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **075** nas fls. **33** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Silvia de Campos Boldrini, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "***Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o crescimento craniofacial de ratos wistar nas fases puberal e adulta***" do qual participou(aram) o(s) alunos **Bruna Cecília Caixeta de Oliveira, Marcelo Arthur Cavalli, Marcio Cristóforo, Flávia de Oliveira, Mateus Elias Pacheco e os pesquisadores Patrícia Castelucci, Edson Aparecido Liberti**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.06.2006**.

São Paulo, 23 de junho de 2006,

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação subnutrição protéica pré e pós natal, da renutrição pós-natal e dos receptores de insulina no processo condilar da mandíbula de ratos Wistar", protocolado sob o nº 2161/2011, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Silvia de Campos Boldrini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Protein malnutrition assessment pre and post-natal, and renutrition post-natal and receptors in insulin mandibular condylar process Wistar rats", protocol number 2161/2011, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Silvia de Campos Boldrini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 20 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CAVALLI, Marcelo Arthur

Título: Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal no processo condilar da mandíbula de ratos wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

O início da minha trajetória acadêmica, se é que se posso dizer isso, com conseqüente desenvolvimento do tema deste trabalho só aconteceu porque tive como norte uma professora, uma anatomista, uma pesquisadora e odontóloga exemplar. Já estaria muito bem amparado se as qualidades daquela que se tornaria a minha orientadora se limitassem a estas, entretanto, para a minha sorte e a daqueles que a circundavam, haveria qualidades ainda mais expressivas. A verdade é que não consigo encontrar as palavras que se aproximam daquilo que tenho em mente, em meu coração. Todavia, posso afirmar com convicção que fui acolhido por esta pessoa, passando pouco a pouco a admirá-la de tal forma que pudesse considerá-la como uma mãe! Não se trata de egoísmo, é o sentimento que paira. Transformou-se em um dos meus alicerces, em uma referência, em um guia a ser lembrado para o resto da minha vida! Então, o sentimento de saudade naturalmente existente, é confortado por imaginar que uma pessoa como essa só pode estar em um lugar à sua altura, entretanto, se este local não for tão bom, ela o transformará no melhor ambiente que existe, com certeza.

Esta é uma singela menção àquela que, por onde passou, com quem conviveu, será sempre lembrada pela sua bondade, competência e devoção. À Silvia de Campos Boldrini (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Àquelas pessoas que sou eternamente grato, as quais fazem parte da minha vida e da minha história: a minha família.

Ao meu pai, José Carlos Cavalli, presente como figura de pai, por me ensinar o caminho do trabalho, da perseverança, da hombridade e da lealdade. Por ser um exímio colega de trabalho, um companheiro de conversas...por ser um amigo.

À minha querida mãe, Cleuza Arthur Cavalli, uma pessoa exemplar como mãe e como ser humano. Muito zelosa, ensinou-me a trilhar uma história que estivesse galgada no alicerce familiar, baseando-se no que é justo, sempre com amor.

Ao casal, símbolo de respeito e companheirismo, José Carlos Cavalli e Cleuza Arthur Cavalli.

À minha admirável irmã, Carla Arthur Cavalli, por sempre zelar pelo meu bem estar. Agradeço pela ajuda desprendida e pela nossa amizade.

À minha querida e amável sobrinha, Manuella Cavalli Muscat, por propiciar momentos incríveis, os quais foram fundamentais nesta jornada.

Não poderia faltar uma menção ao amigo e exemplo profissional Edson Aparecido Liberti. Um ser humano inigualável, que me orientou, ensinou Anatomia e mostrou através do trabalho quais devem ser os valores de uma pessoa, de um homem.

Ao professor Renato Paulo Chopard, por me apresentar a Anatomia desde quando aluno de graduação, até enquanto aluno da pós-graduação. Obrigado pela oportunidade e pelo aprendizado.

Ao ilustre professor Matsuyoshi Mori, que durante a minha graduação foi uma das pessoas que mostrou ter algo a mais do que as boas aulas ministradas. Sempre estive à disposição dos alunos, muito atencioso; mostrou, além de muito conhecimento acadêmico, as vertentes da profissão e da vida.

À professora Maria Angélica Miglino, pela oportunidade e confiança aplicadas.

Ao professor Luís Ronaldo Picosse que desde a época de monitoria em Anatomia, na graduação, muito me ensinou.

À professora Margareth Oda, por fazer parte diretamente do meu ensino e trajeto na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e, indiretamente, durante a pós-graduação.

Ao professor Pedro Primo Bombonato, que apesar de conhecê-lo pouco, passava em suas aulas o gosto que tinha em lecionar.

À Flávia de Oliveira, que sempre demonstrou humildade e consideração pelas pessoas que gosta. Obrigado por me ensinar os primeiros caminhos no LAFACC/VQM.

À Sra. Marta Maria da Silva Righetti, técnica do Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela amizade, disponibilidade e competência demonstradas durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Maicon Barbosa da Silva pela amizade e por me ajudar em todo o meu percurso no Mestrado.

À Sra. Cleide Rosana Duarte Prisco, Estatística do Instituto de Ciências Biomédicas, por ter a paciência de me introduzir à Estatística e por se dedicar com tanto interesse ao meu trabalho. Agradeço, além disto, por propiciar momentos de reflexão e, assim, estar aberta a conversas.

Aos “amigos do bloco didático”, funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP: Adevair Urenha Alves e Everton Luis Pavan Torres.

Ao Sr. Sebastião Aparecido Boleta, funcionário Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela ajuda desprendida.

Aos colegas do LAFACC/VQM e demais por estarem presentes no dia-a-dia de trabalho, pessoalmente ou como referência: Sabrina Caixeta de Oliveira, Thiago Habacuque, Márcio Cristófar, Ricardo Fontes, Paulo Henrique Matos, Regina Bolina Matos, Vanessa Lima, Luis Felipe Picosse, Fernando José Dias, Fábio França Luiz, Thelma Parada, Sofia Beviláqua, Renivaldo de Souza, Lucilene Ferreira Luiz, Diana Vono de Oliveira, Catarina Tivane, Dorival Terra Trentin, Eduardo Seyfert, Willian Mayer, Caio Biasi, Joice Bertaglia, Jodonai Barbosa Any Kelly Lima, Naiane Klebis.

Ao amigo Josemberg Baptista que, demonstrou ser uma pessoa interessada e competente. Ajudou-me muito, direta e indiretamente, tanto na Iniciação Científica, como no Mestrado.

À amiga Aline Gonçalves que, através do seu jeito delicado de ser, mostrou-se uma grande pessoa, inteligente e determinada, sempre pronta para discussões filosóficas.

Ao amigo Ricardo Bandeira, companheiro de experimentos e conversas.

Ao amigo Ricardo Eustáquio por compartilhar as suas experiências em Anatomia, sempre transparecendo o seu equilíbrio rotineiro.

Ao Eduardo Henrique Beber, por, em um período de tempo partilhar das mesmas experiências, como um parceiro.

À Bruna Cecília Caixeta de Oliveira pela amizade de anos e por sempre estar disposta a ajudar.

Agradeço aos irmãos e amigos Paulo Eduardo Del Nero e Leonardo Almeida.

À Anely Oliveira Lopes, por sempre estar disposta a me ouvir e me ajudar, ao meu lado.

Aos amigos Gil César Asano e Silva, Paulo Vitor Nuernberger de Freitas, Thiago Jum Takeda, Bill Okuma de Oliveira, Sérgio Barbosa Filho e ao inesquecível amigo Douglas Aparecido Ferreira. Está é, sem dúvida, uma família.

A todos os que me auxiliaram neste trabalho cujos nomes, por ventura, foram omitidos, os meus sinceros agradecimentos.

Às entidades que forneceram apoio a este trabalho: FAPESP (Bolsa de Iniciação Científica) e CAPES (Bolsa de Mestrado).

“Nada, absolutamente nada resiste ao trabalho”

Euryclides de Jesus Zerbini, 1912 - 1993

RESUMO

CAVALLI, M. A. **Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição protéica no processo condilar da mandíbula de ratos wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina.** [Morphoquantitative evaluation of the effects of protein deprivation and refeeding in the mandibular condyle of wistar rats: an expression correlation of the insulin receptor. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A cartilagem do processo condilar (PC) da mandíbula de ratos wistar é secundária e atua como sítio do crescimento mandibular. O fenômeno depende da ingestão adequada de proteínas e da ação de hormônios, entre eles a insulina. Objetivou-se correlacionar as alterações morfológicas provenientes da subnutrição protéica pré e pós-natal, da renutrição pós-natal com a detecção imunohistoquímica e a quantificação do receptor de insulina (IR) na cartilagem do PC de ratos wistar. Os grupos experimentais formaram-se animais heterogêneos (n=3) de acordo com a ração oferecida, protéica ou hipoprotéica, e com as respectivas idades, nos grupos N e S (nutridos e subnutridos com 60 dias de vida), R (renutridos do desmame até 60 dias), NN (nutridos até 100 dias) e RR (renutridos do desmame até 100 dias). Após a eutanásia, os espécimes foram processados para análise sob microscopia de luz. Cortes sagitais foram submetidos a colorações que permitiram observar o padrão celular, a matriz cartilaginosa e o componente colágeno das camadas da cartilagem do PC. Cortes também foram submetidos à imunomarcagem do receptor de insulina. Para se observar alteração na arquitetura tecidual do PC, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que o PC contém praticamente o mesmo número de células em proliferação na fase púbere e no adulto maduro (N=NN; $p \geq 0,05$). A subnutrição determinou a diminuição significativa do número de células da camada proliferativa do PC (N≠S; $p < 0,05$) e o restabelecimento nutricional mantido até a idade adulta não normaliza este parâmetro, de modo que o número de células permanece menor (NN≠RR; $p < 0,05$). A densidade celular aos 100 dias é maior no grupo RR (NN≠RR; $p < 0,05$). Quanto ao período púbere, a avaliação do colágeno demonstrou que a renutrição é capaz de prover novas áreas de desenvolvimento do componente fibroso do complexo osteocartilagíneo e aumento de espessura da camada condroblástica. Quanto à imunomarcagem, todos os grupos

apresentaram reatividade bastante heterogênea ao receptor de insulina, com predomínio nas camadas condroblástica e hipertrófica. O número de células imunorreativas foi menor e se equivalem estatisticamente nos grupos S e RR, enquanto que os grupos N, NN e R exibiram maior número, sendo $N=R$ e $R=NN$; $p<0,05$. A densidade dessas células foi menor em S, N e R quando comparados ao grupo NN e não houve diferença estatística entre S, N, R e RR. O número de células do PC modifica-se pouco no período púbere, e o seu desenvolvimento normal é sensível à depleção protéica, de modo que o tecido não é capaz de responder ao restabelecimento protéico mesmo quando mantido até a idade adulta, apresentando também drástica diminuição da produção de matriz extracelular. A insulina funciona como hormônio de crescimento no PC, e o quadro apresentado em estados de subnutrição, é muito semelhante àquela condição observada no diabetes do tipo II, na qual as células se tornam resistentes à insulina.

Palavras-chave: Ratos wistar. Subnutrição. Renutrição. Processo condilar da mandíbula. Morfometria. Imunohistoquímica. Microscopia Eletrônica de Varredura.

ABSTRACT

CAVALLI, M. A. **Morphoquantitative evaluation of the effects of protein deprivation and refeeding in the mandibular condyle of wistar rats: an expression correlation of the insulin receptor.** [Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição protéica no processo condilar da mandíbula de ratos wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina]. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In the mandible of wistar rats the cartilage of the condylar process (CP) is secondary and acts as a site of mandibular growth. The phenomenon depends on adequate protein intake and action of hormones, like insulina. In the present study, the morphological changes from protein malnutrition pre- and post-natal and post-natal re-nourishment were evaluated with immunohistochemical detection and quantification of insulin receptor (IR) in the cartilage of CP rats. The experimental groups were formed by heterogeneous animals ($n = 3$) according to the diet (protein or low protein) and age (60 or 100 days of life). Thus, the CP from animals of groups N and S (nourished and malnourished - 60 days old), R (renourished from weaning to 60 days), NN (fed up to 100 days) and RR (renourished from weaning until 100 days) were processed under light microscopy techniques. Semi-seriate sagittal sections were stained to observe the standard cellular cartilage matrix and collagen component of CP cartilage layers. Some sections were also immunolabelled with insulin receptor. The three-dimensional architecture of the CP was evaluated under electron microscopy (SEM). The CP exhibits the same number of proliferating cells at puberty (60 days) and mature phase (100 days) ($N = NN$; $> p 0, 05$). The undernutrition determine a significant decrease in the number cells present in the proliferative layers of CP ($N \neq S$ $p < 0.05$). The nutritional recovery until adult phase does not normalize this parameter, with the cell number remaining lower ($NN \neq RR$, $p < 0.05$). In the adult phase, the cell density is higher in the RR ($NN \neq RR$, $p < 0.05$). When the collagen component was evaluated at puberty it was observed that re-nourishment was able to provide areas of development in the fibrous component present in the osteocartilaginous complex. The re-nourishment also increased the thickness of chondroblastic layer. All groups showed highly heterogeneous reactivity for insulin receptor, predominantly in the chondroblastic and hypertrophic layers. The

number of immunoreactive cells is small and statistically equivalent in S and RR groups, while the groups N, R and NN have a great number of these cells (N = NN = R and R). The density of immunoreactive cells was lower in S, N and R than in NN. There were no statistical differences among S, N, R and RR. The number of cells in the CP is slightly altered during puberty and the normal development of CP is sensitive to protein depletion. This condition indicates that the tissues are not able to respond to the restoration of protein retained, even when maintained until the adult phase also showing a drastic decrease in the extracellular matrix production. The insulin acts like a growth hormone in the CP, and the roll of malnutrition states is very similar to that condition observed in type II diabetes, in which cells become resistant to insulin.

Key words: Wistar rats. Malnutrition. Re-nourishment. Mandibular condyle. Morphometry. Immunohistochemistry. Scanning Eletron Microscopy

LISTA DE ABREVIATURAS

a	Camada articular da cartilagem do processo condilar
ANOVA	Análise de variância
c	Camada condroblástica da cartilagem do processo condilar
CF	Células em fila
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAPI	Fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol
DP	Desvio padrão
ECPC	Espessura das camadas do processo condilar
EPI	Equipamento de Proteção Individual
g	Grama
GAG	Glicosaminoglicana
h	Camada hipertrófica da cartilagem do processo condilar
IGF	Insulin-like growth factor
IR	Receptor de Insulina
IRβ	Subunidade beta do receptor de insulina
M	Gaiola metabólica
MC	Matriz cartilágnea
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligramas
ml	Mililitros
N	Grupo experimental nutrido de 60 dias
NaCl	Cloreto de sódio

NN	Grupo experimental nutrido de 100 dias
p	Camada pré-condroblástica da cartilagem do processo condilar
PBS	Solução salina Tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
PC	Processo condilar
R	Grupo experimental renutrido de 60 dias
RNA	Ácido ribonucléico
RR	Grupo experimental renutrido de 100 dias
S	Grupo experimental subnutrido
TGI	Trato gastrointestinal
TRK	Tirosina kinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do receptor de insulina em humano	33
Figura 2 -	Representação esquemática da formação dos grupos experimentais	40
Figura 3 -	Gaiolas metabólicas	43
Figura 4 -	Etapas para a obtenção do processo condilar da mandíbula	47
Figura 5 -	Corte sagital de PC. Área da cartilagem do PC delimitada (Azo-Carmin). Objetiva de 5x	51
Figura 6 -	Cortes sagitais evidenciando as camadas constituintes do PC. A: Espessura das camadas articular e pré-condroblástica; B: Espessura das camadas condroblástica e hipertrófica (Azo-carmin)	52
Figura 7 -	Corte sagital do PC. Demarcação dos componentes celulares da camada condroblástica do PC (Azo-carmin). Objetiva de 20x.	53
Figura 8 -	Sistema-teste sobre a imagem das camadas condroblástica e hipertrófica do PC, corada pelo método da Safranina-O	54
Figura 9 -	Área da cartilagem do PC. Número de células sensibilizadas aferido na região (imunohistoquímica - IR)	55
Figura 10 -	Área do osso subcondral do PC. O número de células sensibilizadas foi aferido na região do (imunohistoquímica - IR)	56
Figura 11 -	Microscopia de luz. Coloração pelo método de Azo-carmim. A – Grupo N com a representação das camadas do PC: articular (a), pré-condroblástica (p), condroblástica (c) e hipertrófica (h); B – Grupo S; C – Grupo R; D – Grupo NN; E – Grupo RR	78
Figura 12 -	Microscopia de luz. Coloração do método do Picrosirius sob luz polarizada. Detecção de fibras colágenas do tipo I (amarelo, laranja e vermelho) e III (verde). A - Camadas articular (a), pré-condroblástica (p), condroblástica (c) e hipertrófica (h) do PC. B a F – Distribuição das fibras colágenas tipos I e III na matriz da cartilagem fibrosa do PC nos grupos N, S, R, NN e RR, respectivamente	80
Figura 13 -	Microscopia de luz. Coloração pelo método de Safranina – O. Representação da distribuição da matriz cartilaginosa (*) nos grupos N, S e RR	81

- Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do PC de ratos wistar dos grupos N, S, R e NN. Objetivas de 500X (A - D); 700X (E-H); 1200X (I-L) 84
- Figura 15 - Imunohistoquímica do receptor de Insulina (IR).
D, E, F – Imunofluorescência do IR. As setas demonstram as células sensibilizadas ao IR (imunomarcadas) e as cabeças de seta apontam para as células não sensibilizadas 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros metabólicos dos grupos N, S e R. Média ($\pm$ DP) dos valores da última semana de monitoramento na gaiola metabólica	60
Tabela 2 -	Média ($\pm$ DP) do número de células da camada condroblástica, área da cartilagem e densidade celular do PC	63
Tabela 3 -	Camada articular (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)	65
Tabela 4 -	Camada Pré-condroblástica (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)	66
Tabela 5 -	Camada condroblástica (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)	67
Tabela 6 -	Camada Hipertrófica (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)	68
Tabela 7 -	Média ($\pm$ DP) da porcentagem do conteúdo cartilágneo das camadas do PC avaliadas em cortes submetidos à coloração por Safranina – O	70
Tabela 8 -	Média ($\pm$ DP) do número de células imunorreativas ao receptor de insulina (IR); da área da cartilagem do PC e da densidade celular nos diferentes grupos	71
Tabela 9 -	Imunomarcção do receptor de insulina (IR) no osso subcondral (média $\pm$ DP)	74

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Relação entre ingestão alimentar e massa corpórea dos grupos N, S e R. Período metabólico, entre a 1ª e a 6ª semana..... 61
- Gráfico 2 - Média ($\pm$ DP) do número de células da camada condroblástica (A); área da cartilagem do PC (B) e densidade celular (C) 64
- Gráfico 3 - A – Número de células em fila (CF) das camadas da cartilagem do PC; B – Espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC); C – Relação CF/ECPC nas camadas da cartilagem do PC (média $\pm$ DP) 69
- Gráfico 4 - A – Número de células imunorreativas da cartilagem do PC; B – Área da cartilagem do PC; C – Densidade de células imunorreativas da cartilagem do PC (média $\pm$ DP)..... 72
- Gráfico 5 - A – Número de células imunorreativas ao IR da região subcondral do PC; B – Área da região subcondral do PC; C – densidade de células da região subcondral do PC, imunorreativas ao IR 75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	ANATOMIA DA ATM	28
2.1.1	No Homem	28
2.1.2	Em Ratos	30
2.2	A SUBNUTRIÇÃO E SEUS EFEITOS.....	31
2.3	MECANISMOS DE CRESCIMENTO RELACIONADOS À INSULINA	32
3	PROPOSIÇÃO	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
4.2	ANÁLISE METABÓLICA	41
4.2.1	Protocolo de Análise Metabólica	44
4.3	OBTENÇÃO DOS PROCESSOS CONDILARES DA MANDÍBULA (PC)...	44
4.4	MICROSCOPIA DE LUZ	48
4.4.1	Azo-carmim	48
4.4.2	Picrosirius	48
4.4.3	Safranina-O	49
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O RECEPTOR DE INSULINA (IR).....	49
4.6	ESTUDO QUANTITATIVO	50
4.6.1	Área da Cartilagem do PC	51
4.6.2	Espessura das Camadas Cartilagíneas do PC (ECPC)	52
4.6.3	Número e Densidade de Células da Camada Condroblástica do PC	53

4.6.4	Relação de Número de Células em Fila (CF) por Espessura das Camadas do PC (CF/ECPC)	53
4.6.5	Safranina-O	54
4.6.6	Área da Cartilagem do PC (IR)	55
4.6.7	Número e Densidade de Células IR na Cartilagem do PC	55
4.6.8	Área do Osso Subcondral (IR)	56
4.6.9	Número e Densidade de Células IR no Osso Subcondral	57
4.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA – IR	57
4.8	ESTUDO TRIDIMENSIONAL – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	57
4.9	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	58
5	RESULTADOS	59
5.1	ANÁLISE METABÓLICA	59
5.2	ANÁLISE QUANTITATIVA	62
5.2.1	Área da camada Condroblástica	62
5.2.2	Número de Células da Camada Condroblástica	62
5.2.3	Densidade Celular	63
5.2.4	Espessura das Camadas do PC (ECPC), Número de Células em Fila (CF) e a Relação CF/ ECPC	65
5.2.5	Quantidade de Matriz Cartilagínea (MC) – Safranina – O	70
5.2.6	Número de Células Imunorreativas ao Receptor de Insulina (IR) na Cartilagem do PC	70
5.2.7	Área da Cartilagem do PC	71
5.2.8	Densidade de Células Imunorreativas ao Receptor de Insulina (IR) da Cartilagem do PC	71
5.2.9	Número de Células Imunorreativas ao Receptor de Insulina (IR) na Região Subcondral do PC	73
5.2.10	Área da Região Subcondral	73
5.2.11	Densidade de células imunorreativas ao receptor de insulina da Região Subcondral	73

5.3	ANÁLISE QUALITATIVA.....	76
5.3.1	Microscopia de Luz	76
5.3.2	Estudo Tridimensional – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	82
5.3.3	Imunohistoquímica – Receptor de Insulina (IR)	85
6	DISCUSSÃO	86
6.1	ANÁLISE METABÓLICA	87
6.2	ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA.....	90
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e o desenvolvimento craniofacial decorrem de um constante processo de remodelação e aposição sutural (ENLOW, 1968; ENLOW, 1975; SCHUMACHER, 1999), regidos por fatores intrínsecos (genético e hormonal) e extrínsecos (MOYERS, 1991); estes, mecânicos, nutricionais e físicos (NEWMAN et al., 1982).

O processo condilar da mandíbula (PC) representa o fenômeno do crescimento craniofacial, sendo ontogeneticamente proveniente da justaposição de uma cartilagem primária central com uma cartilagem secundária periférica, que configura um revestimento de tecido conjuntivo fibroso (MIZOGUCHI et al., 1990).

A cartilagem do PC desempenha um papel importante tanto na determinação da morfologia facial, como em funções orofaciais complexas como a mastigação e a fala (BAE et al., 2003). Mais especificamente, o PC é um dos principais sítios de crescimento mandibular em comprimento e altura (FUENTES et al., 2002). Este tipo de cartilagem presume crescimento de adaptação regional, o crescimento ósseo endocondral. Esta cartilagem é referida como secundária e aparece mais tarde no desenvolvimento embrionário, de maneira independente do condroesqueleto. Situa-se nas margens dos ossos membranosos durante a fase pré-natal e início do desenvolvimento pós-natal, e é geralmente de natureza transitória. Em contrapartida, a cartilagem secundária do PC se desenvolve na cartilagem articular permanente. Histologicamente, a cartilagem secundária contém não só o colágeno tipo II, que é característica de todas as cartilagens, também o colágeno tipo I, que está ausente em cartilagens primárias (DELATTE, 2004).

Existem várias zonas histológicas que definem a região do PC. Desta forma, subjacente à superfície articular, que apresenta resquício intramembranoso, localiza-se a zona précondroblástica (p), que é indiferenciada e contém células potencialmente cartilagíneas. Abaixo, situa-se a zona condroblástica (c), onde há secreção de matriz extracelular. Seguida desta, encontra-se a camada celular interna, que constitui a zona mais baixa, hipertrófica (h), onde o osso subcondral é formado (CARLSON et al., 1980; FUENTES et al., 2002).

Para que este complexo processo de crescimento do PC ocorra normalmente, o consumo equilibrado de proteínas é essencial. A carência protéica pode resultar

de uma variedade de fatores (DE OLIVEIRA et al., 2010), sendo o mais evidente, a restrição do consumo de alimentos protéicos (SHRADER; ZEMAN, 1973).

Dentre os nutrientes osteotróficos, as proteínas desempenham importante papel no desenvolvimento do tecido ósseo, que é particularmente responsável pela ingestão protéica durante os anos que precedem o início da puberdade (BONJOUR et al., 2001). Conseqüentemente, a subnutrição protéica, durante o desenvolvimento dos tecidos e órgãos, pode aumentar o risco de osteoporose e de fraturas tardias ao longo da vida (RIZZOLI; BONJOUR, 1999; HARVEY; COOPER, 2004), além de alterar permanentemente a estrutura corporal, a fisiologia e o metabolismo, sendo capaz de conduzir a doenças crônicas em períodos tardios da vida (ENGELBREG et al., 2004).

Desta forma, a subnutrição protéica (PUCCIARELLI; OYHENART, 1987) representa um dos fatores epigenéticos, o nutricional (MOYERS, 1991), que atua determinando o comprometimento do crescimento. Durante o período gestacional Nakamoto, Porter e Winkler (1983) observaram que a subnutrição protéica altera de maneira diferente as ossificações endocondral e intramembranosa, e que a partir do desmame, as proporções mandibulares são severamente alteradas, chegando a apresentar certa deformação (ALIPPI et al., 1984).

Estruturas cartilagíneas, como os discos epifisiais e a cartilagem do PC, atuam diretamente sobre o crescimento ósseo em fases precoces do desenvolvimento. Quando submetidas aos efeitos da subnutrição, as mesmas mostram-se incapazes de retomar um padrão normal de crescimento, devido às alterações permanentes que ocorrem na sua estrutura (ALIPPI et al., 1984). Porém, quando a injúria ocorre no período prévio ao desmame, as repercussões nesse tecido mostram-se mais severas do que as que se verifica após esse período. Diferentes regiões do esqueleto respondem também de forma diversa aos períodos em que se aplica a subnutrição (BRETON, 2009; COUPÉ, 2009).

Entretanto, são incertas as informações sobre as condições que podem promover uma retomada eficaz, para que o tecido cartilagíneo de uma determinada estrutura atinja o completo desenvolvimento, fator este que está na dependência tanto do momento em que se instala a subnutrição como do estágio de multiplicação celular da cartilagem (HUGUES, 1982).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, através do levantamento bibliográfico, os itens a seguir abordam os assuntos envolvidos na presente pesquisa.

2.1 ANATOMIA DA ATM

A seguir, os aspectos anatômicos da ATM humana e do rato.

2.1.1 No Homem

O estudo da anatomia e da microanatomia da articulação temporomandibular (ATM), mais especificamente do processo condilar da mandíbula de humanos, tem sido foco de muitos estudos.

A ATM é uma articulação altamente especializada, distinguindo-se das demais por ser revestida por tecido fibroso avascular, denominando-se fibrocartilagem. Além disso, é caracterizada por apresentar nos dois complexos ósseos articulares os dentes, cuja forma e posição têm influência decisiva nos movimentos articulares. É uma articulação bilateral, de modo que ambas são conjugadas sendo portanto, funcionalmente, uma única articulação. Além disso, há um disco articular que se interpõe entre a mandíbula e o osso temporal, dividindo o espaço articular em compartimentos superior e inferior.

O processo condilar (PC) humano tem de 15 a 20 mm de largura e 8 a 10 mm de diâmetro ântero-posterior e é formado pela cabeça e o colo da mandíbula, o colo da mandíbula. Seu longo eixo está em ângulo reto com o plano do ramo mandibular. A superfície articular lisa do PC está voltada anterior e superiormente. O pólo lateral projeta-se apenas um pouco além da superfície externa do ramo, e é rugoso porque dá inserção ao disco e parte do ligamento temporomandibular. O pólo medial

sobressai consideravelmente além da face interna do ramo da mandíbula, e nele inserem-se o disco e as fibras mediais da cápsula.

A face articular do osso temporal está situada adiante da parte timpânica do mesmo, na parte escamosa do osso temporal. Esta superfície compreende a vertente posterior e a eminência articular do temporal, a área pré-glenóidea, achatada anteriormente e lateralmente, e a fossa mandibular. O tubérculo articular é uma pequena saliência óssea lateral da raiz do arco zigomático, que serve para inserção de feixes especiais do ligamento temporomandibular. A parte posterior da fossa mandibular eleva-se sob a forma de uma crista, a crista ou lábio articular posterior. Esta crista aumenta em altura lateralmente para formar uma saliência espessa, cônica, denominada apófise pós-glenóidea, logo adiante do meato acústico externo.

Toda a superfície articular do osso temporal é recoberta por uma camada de tecido fibroso, que é mais espessa na vertente posterior e no ápice do côndilo temporal. O fato de o tecido fibroso que reveste o teto da fossa mandibular ter maior espessura que o periósteo, é mais uma evidência de que esta fossa apresenta a função de suporte de forças da articulação temporomandibular (ATM).

As camadas fibrosas que recobrem as superfícies mandibular e temporal são avasculares, bem como estão ausentes os vasos sanguíneos na área central do disco articular. A ausência dos vasos sanguíneos demonstra bem que há uma pressão considerável nesta articulação.

O disco articular é uma lâmina fibrosa, de formato oval, de grande firmeza. Sua parte central é sempre mais delgada que a periferia, e seu bordo posterior é razoavelmente espesso. O disco varia diretamente de espessura de acordo com a saliência do côndilo temporal. Posteriormente o disco continua com a camada espessa de tecido conjuntivo frouxo e vascular, atingindo a parede posterior da cápsula articular e com ela se fundindo, constituindo o coxim retro-articular.

A cápsula fibrosa da ATM é relativamente delgada. A face lateral da cápsula fibrosa é bastante reforçada pelo ligamento temporomandibular, o qual é separado em uma parte lateral ou superficial, larga, e uma parte medial ou feixe profundo, em forma de leque. O ligamento é também parte de um sistema de “freio” que limita os movimentos da articulação. A cápsula fibrosa está fixada na margem da superfície articular do temporal e no colo da mandíbula. Há os ligamentos esfenomandibular e

estilomandibular, descritos como acessórios da ATM (SICHER, 1977; WARWICH, 1979; FEHRENBACH, 1998).

2.1.2 Em Ratos

Segundo Mavropoulos, Bresin e Kiliaridis (2004), a mandíbula de ratos é um excelente modelo para o estudo dos efeitos da carga e da dieta sobre o crescimento e remodelação ósseas. Isto se deve ao fato de cada hemi-mandíbula do rato consistir, conjuntamente com os seus processos coronóide, condilar e angular, em diferentes unidades funcionais que servem com ancoragem para alguns músculos da mastigação e, estes por sua vez, fornecem estímulo mecânico para a formação óssea. Estes mesmos autores relatam ainda, que o PC de ratos que recebem dieta sólida apresentou-se maior em relação àqueles que dispuseram de alimento mais macio.

Em estudo descritivo morfológico e histológico que comparou os componentes da ATM humana com a de ratos da linhagem wistar, Porto et al. (2010) evidenciaram que há grande similaridade entre a ATM das duas espécies. Tal como no homem, há uma espessa camada de cartilagem recobrendo o PC. As superfícies articulares dos ossos temporais são semelhantes, exceto pelo menor número de camadas de condrócitos, e pela maior espessura da camada fibrosa. O formato do disco também é semelhante, já que o disco do rato é bicôncavo e é constituído por fibras do tecido conjuntivo, como no humano. Ainda, a ATM do rato também contém uma membrana sinovial, como verificado no humano. A principal diferença entre as articulações baseia-se no fato de na ATM do rato haver eminência articular no osso temporal, e esse por sua vez, apresentar a fossa mandibular em forma de calha. Isto promove maior liberdade no movimento de protrusão do rato. Corroborando, estudos precoces (WEIJS, 1975) sobre a mastigação de ratos albinos, evidenciaram que, tanto o lado de trabalho quanto o de balanceio, são sobrecarregados durante a mastigação do animal.

2.2 A SUBNUTRIÇÃO E SEUS EFEITOS

A subnutrição é causada por dieta inadequada, hipocalórica (marasmo) ou hipoprotéica (kwashiorkor), também podendo ser determinada por má-absorção de nutrientes ou anorexia. A doença tem sido o foco de muitos estudos, inclusive em ratos (ANTHONY; EDOZIEN, 1975), por se tratar de um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade (WORLD HEALTH FORUM, 1993).

Os efeitos das formas de subnutrição a que são submetidas várias espécies de animais são verificados nos diversos tecidos, órgãos e sistemas. Assim, podem ser citados como exemplos os ossos de animais mantidos com uma dieta hipoprotéica, onde se observou um retardo no surgimento dos centros de ossificação e uma redução no crescimento em comprimento e largura (SHRADER; ZEMAN, 1973); e as articulações de animais submetidos a uma restrição alimentar parcial, onde se verificou uma redução da síntese da matriz de colágeno da cartilagem articular (SPANHEIMER et al., 1991).

Especificamente nas estruturas cefálicas, Moss e Vilmann (1978) relacionaram a subnutrição como um fator ambiental que pode ser facilmente estudado em crânios de ratos em desenvolvimento, concluindo que a ortocefalização desses animais representa um modelo apropriado para a avaliação dos ajustes relativos aos processos de crescimento craniofacial.

Desta maneira, Nakamoto et al. (1983) avaliaram os efeitos da subnutrição protéica no crescimento endocondral (ossos longos) e intramembranoso (mandíbula) de ratos, concluindo que os mesmos são afetados de maneira diferente durante a gestação.

Apilli et al. (1984) observaram em mandíbulas de ratos que sofreram durante 21 dias, subnutrição protéica a partir da época do desmame, a ocorrência de alterações nas proporções ósseas mandibulares, que determinam uma certa deformação óssea.

Em seu trabalho sobre crescimento craniofacial de ratos, Pucciarelli (1978) descreveu que as variações na forma, tamanho e posição das estruturas craniofaciais podem ser detectadas nesses animais durante o desenvolvimento pós-natal. Definiu que, dentre as mudanças mais importantes, estão o relativo aumento

região facial, uma progressiva tendência à ortocefalização e rotações da lâmina cribiforme do osso etmóide e do complexo occipital.

Pucciarelli e Oyhenart (1987) avaliaram os efeitos da subnutrição sobre o crescimento craniofacial em ratos durante a amamentação e consideraram as carências nutricionais como fatores não-genéticos importantes, uma vez que elas determinam desvios nos padrões normais de crescimento. Segundo esses autores, o ortocefalização é devida principalmente a dois sistemas de desenvolvimento do esqueleto dos mamíferos. O primeiro é o sistema do neurocrânio, que possui crescimento inicial e de curta duração, e o segundo é o sistema do esplancnocrânio, que também apresenta crescimento inicial, porém, sustentado e de longa duração.

De fato, com relação aos efeitos nutricionais, Moyers (1991) já havia descrito a nutrição como uma variável que afeta o crescimento craniofacial, e mais especificamente a má nutrição, que considerou um fator desorganizador determinante dentre aqueles que controlam o crescimento craniofacial. Todavia, ressaltou a carência de informações específicas disponíveis sobre o assunto.

2.3 MECANISMOS DE CRESCIMENTO RELACIONADOS À INSULINA

A insulina é uma proteína pequena, sintetizada nas células beta pancreáticas e liberada na corrente sanguínea (GUYTON, 2006), agindo nas células como hormônio anabólico que promove o metabolismo próprio, balanço energético e manutenção da massa corpórea (BOURA-HALFON; ZICK, 2009). Historicamente, a insulina é associada ao “açúcar no sangue”, mas, na verdade, ela apresenta efeitos profundos no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas.

Para começar a exercer seus efeitos sobre as células-alvo, a insulina em primeiro lugar se liga e ativa um receptor protéico de membrana. É o receptor ativado, e não a insulina, que causa os efeitos subsequentes. O receptor de insulina (IR) é uma combinação de quatro subunidades que se mantêm unidas por ligações de dissulfeto: duas subunidades alfa (α), que se situam inteiramente do lado externo da membrana celular e duas subunidades beta (β) que penetram através da membrana, projetando-se no citoplasma celular (DE MEYTS, 2004; GUYTON; HALL, 2006) (Figura 1). A ligação da insulina com a subunidade α de seu receptor, e esta

ligada à subunidade β , promove a autofosforilação da subunidades β do receptor de insulina, a qual ativa uma tirosina quinase local que, por sua vez, causa fosforilação de diversas outras enzimas intracelulares, incluindo um grupo chamado de substratos do receptor de insulina (IRS). Estes últimos têm o efeito global de ativação e desativação de diferentes enzimas. Pode-se definir, desta forma, três vias de sinalização que se propagam a partir da ativação da tirosina quinase do receptor de insulina, são elas: 1) Cascata MAP Kinase, que, em última análise é responsável pelo crescimento celular; 2) Cascata Cbl/CAP, a qual media o transporte de glicose e 3) Cascata PI3K, ativada pelos substratos do receptor de insulina (IRS) e desempenha funções metabólicas (BOURA-HALFON; ZICK, 2009).

Deste modo, a insulina dirige a maquinaria metabólica intracelular, de modo a produzir os efeitos desejados sobre o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas.

Figura 1 – Estrutura do receptor de insulina em humano. Nota-se que o receptor possui duas subunidades, uma α , extracelular, e outra β , a qual atravessa a membrana plasmática celular. A partir da ligação da insulina ao seu receptor, há o início da sinalização intracelular (GUYTON; HALL, 2006)

Relativamente aos mecanismos envolvidos com o processo de crescimento, pode-se ressaltar as ações ligadas à insulina, de um importante hormônio, anabólico

de ação pleiotrópica, que participa da captação de glicose pelas células. Esse hormônio tem ação comprometida no diabetes, sendo o quadro apresentado em estados de subnutrição, muito semelhante àquela condição observada no diabetes do tipo II, no qual as células se tornam resistentes à insulina (NIETO-VAZQUEZ et al., 2008). A sua ação depende da própria ligação com os respectivos receptores, que se trata de um complexo heterodimérico, com duas subunidades, a α , extracelular ligada ao segmento transmembrana e a β , intracelular. Tendo sido este hormônio, considerado um “hormônio de crescimento” por Laron (2008), ele é capaz de promover o aumento da síntese de DNA e RNA e proteínas nos tecidos alvo. Nas cartilagens, bem como os fatores de crescimento semelhantes à insulina, ou insulin like growth factors (IGFs) (DELATTE et al., 2004), atua conjuntamente na cartilagem do PC e rege, portanto, o crescimento da mandíbula (LIVNE; LAUFER; BLUMENFELD, 1997; MOLTENI et al., 1999). Entretanto, a síntese de alguns fatores de crescimento (TAJIMA et al., 1998; VISNAPUU et al., 2002) e a expressão de seus receptores, são diferentes entre as cartilagens primárias e secundárias (VISNAPUU et al., 2001). A mandíbula tem um crescimento pronunciado durante os períodos pré-púbere e púbere (BJORK; SKILLER; MCNAMARA, 1976), que são sincronizados com o crescimento linear em ambos os sexos (BOJRK; HELM, 1967), certificando que a influência hormonal está presente. Os estudos também sugerem que os mecanismos de proliferação da cartilagem constituinte do PC podem ter muito em comum com aqueles que regulam a proliferação nas suturas cranianas, como também nos discos epifisiais (FUENTES et al., 2002), por tratarem-se de cartilagem mista.

Com relação aos receptores de IGF-I, somatomedina semelhante à insulina, foram verificados na cartilagem do PC de ratos, IGF-IR, tendo sido identificados por imunorreatividade. Na camada articular, a falta de imunorreatividade demonstrou não haver receptores na região. Já na camada pré-condroblástica, os condrócitos da parte mais inferior foram predominantes, juntamente àqueles da parte mais superior da camada condroblástica. Na parte inferior da camada condroblástica, e superior da hipertrófica, uma fraca imunorreatividade demonstrou a presença de poucos receptores. No local estudado, foi observado também um aumento na expressão gênica do IGF-I na transição entre os períodos pré-púbere (31 dias) e púbere (42 dias), evidenciando que a proliferação da cartilagem do PC pode ser regulada em parte por IGF-I, e que a expressão destes genes muda consideravelmente durante a

puberdade (FUENTES et al., 2002). Porém, no período compreendido entre o nascimento e 21 dias, os receptores de IGF-I foram detectados na superfície articular do côndilo e nas camadas pré-condroblástica e parte superior da hipertrófica da cartilagem do PC. É importante ressaltar que nenhum receptor de GH foi encontrado na cartilagem do PC de ratos de 1-21 dias de idade (VISNAPUU et al., 2001).

O mecanismo de regulação do crescimento da cartilagem secundária do PC ainda não está totalmente elucidado, de maneira que não há referência da presença de insulina nem de seus receptores nesse tecido, em situações de estado nutricional modificado, como na carência protéica, ou diante da sua correção. Entretanto, sabe-se que a carência protéica promove decréscimo na produção de insulina, e compromete os fatores de crescimento semelhantes à insulina [insulin-like growth factors (IGF-I e II)] (JOUSSE et al., 1998), que são produzidos na maioria dos tecidos do corpo e atuam como importantes reguladores da homeostase e do crescimento ósseo, regulando parácrina e autocrinamente o metabolismo celular dos tecidos (GIUSTINA; MAZZIOTTI; CANALIS, 2008).

Desse modo, como as alterações no metabolismo da glicose e da insulina frente à subnutrição são bem conhecidas, bem como a importância e os limites da recuperação nutricional adequada sobre o crescimento (SAWAYA, 2006), no PC, pesquisas têm sua importância calcada no fato deste estar submetido às influências hormonais e nutricionais, e pelo efeito da insulina no tecido de espécimes subnutridos não ser bem conhecido. Dessa forma, a subnutrição apenas protéica, cujo protocolo foi desenvolvido no presente estudo (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), foi aplicada para o estudo do receptor de insulina, sobre o PC, principal sítio responsável pelo crescimento mandibular. Autores como Pimstone et al. (1968) demonstraram que, sob condições graves de subnutrição protéica, a ingestão de quantidades adequadas de calorias isoladamente não foi capaz de corrigir o excesso de produção de GH, sendo necessária a renutrição protéica para que este nível fosse regularizado. Desta maneira, a renutrição protéica também foi providenciada, com o objetivo de observar o possível reequilíbrio também da atividade do receptor de insulina. Tais alterações metabólicas sobre o crescimento do PC não são bem elucidadas, nem mesmo correlacionadas, considerando que a estrutura apresenta influências hormonais e nutricionais.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Buscou-se na presente pesquisa, avaliar em ratos wistar, qualitativa e quantitativamente, nas fases púbere (60 dias) e adulta (100 dias), as repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal, sobre o crescimento do processo condilar (PC). E, por meio da correlação das alterações observadas no PC, através de marcação imunohistoquímica do receptor de insulina, investigou-se também:

- A presença do receptor de insulina na cartilagem do PC;
- A ocorrência de variações na expressão dos receptores de insulina nos diferentes períodos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a formação dos grupos experimentais, foram acasalados, pelo período de 7 a 10 dias, ratos wistar (*Rattus norvegicus*) jovens com aproximadamente 60 dias de vida e com peso variando entre 280 e 320 gramas para os machos e entre 200 e 250g para as fêmeas. Ao longo de todo o experimento os animais foram mantidos, sem restrição, com ração para roedores AIN-93G, de acordo com a “American Institute of Nutrition” (REEVES; NIELSEN; NIELSEN, 1993), preparada em laboratório especializado (Rhoster®). Também foram observados os ciclos claro e escuro de 12 horas, e a temperatura ambiente controlada a 23 °C. Para a viabilização do acasalamento, previamente à acomodação dos animais em caixas individuais contendo um macho para duas fêmeas, estes passaram por um período adaptação, com o intuito de que não houvesse a rejeição do macho pelas fêmeas. Assim, durante sete dias, antes do início do processo, as fêmeas e os machos eram alternados entre as próprias caixas. Após este período, as fêmeas e o macho eram colocados numa só caixa, iniciando-se, assim, o período do acasalamento. As rações oferecidas continham dois diferentes teores protéicos, de acordo com os quais os grupos foram definidos: a ração normoprotéica, com 20% de caseína e a hipoprotéica, com apenas 5%. Findo este período, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais e continuaram recebendo as respectivas rações, até o nascimento da prole. Logo após o nascimento, as ninhadas foram reduzidas a seis animais, procurando-se manter o maior número de machos, gênero eleito com o objetivo de se evitar a variável sexual dimórfica. Ao atingirem 21 dias de vida, época do desmame, os espécimes passaram a ser monitorados em gaiolas metabólicas individuais, até atingirem a idade de 60 dias de vida, constituindo-se, assim, os grupos nutrido (N), animais que receberam a ração normoprotéica e subnutrido (S),

aqueles que receberam a ração hipoprotéica. Para a formação do grupo de animais renutridos (R), animais mantidos com a ração hipoprotéica até o 21º dia, passaram a receber, a partir do 22º dia, a ração normoprotéica até que atingissem 60 dias de vida. Tal período foi estabelecido por corresponder ao final da fase púbere do rato, segundo Viau et al. (2005). Conforme já descrito, o monitoramento dos grupos N, S e R foi realizado em gaiolas metabólicas¹ com o intuito de se mensurar parâmetros como a ingestão e a excreção, líquidas e sólidas (Figura 2). Para observar se as características morfológicas teciduais decorrentes dos processos de subnutrição e renutrição se instalam de forma permanente, animais dos grupos R e N foram mantidos com as respectivas dietas até 100 dias de vida, constituindo-se assim, os grupos RR e NN.

---

¹ Tecniplast®

Figura 2 – Representação esquemática da formação dos grupos experimentais

4.2 ANÁLISE METABÓLICA

Os espécimes foram obtidos de um “pool” de animais utilizados em diferentes pesquisas no Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC). Vinte e quatro gaiolas metabólicas foram utilizadas para o desenvolvimento dessa análise dos animais dos grupos N, S e R (Figura 3). Através do protocolo estabelecido no item a seguir (4.2.1), os animais dos grupos (N, S e R), a partir do 22º dia, tiveram monitorados os seguintes parâmetros: massa corporal, ingestões sólida e líquida, excreções sólida e líquida.

Assim, ninhadas subsequentes foram analisadas de tal forma que, nessa primeira fase, foram monitorados um total de 3 animais do grupo N, 3 do grupo S e 3 do grupo R.

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

Controle Diário
Série de Amostragem

Controle Diário
Série de Amostragem

Die do experimento	Data	Hora	Massa corporal (g)	Coágulo antes (g)	Coágulo depois (g)	Agua antes (ml)	Agua depois (ml)	Voluma de urina (ml)	Observações
1	13/06	11:50	13,06	44,05	43,32	200	205		União e 2.ª
2	14/06	12:00	24,90	44,32	44,07	187	209		União e 2.ª
3	15/07	12:00	16,45	49,70	45,60	177	164	2,2 ml	
4	16/07	12:00	17,23	49,43	45,20	160		2	
5	17/07	12:00	18,32	49,42					

07.11.2007

4.2.1 Protocolo de Análise Metabólica

As rações utilizadas eram armazenadas em freezer (-5°C), de modo que dois quilos de cada tipo (normo ou hipoprotéica) permanecessem em geladeira (6°C), em frascos individuais, para o consumo diário.

As gaiolas metabólicas permaneceram em sala exclusiva, sendo a entrada diária restrita a dois tratadores, devidamente paramentados com Equipamento de Proteção Individual (EPI - gorro, máscara, luvas, avental e óculos de proteção), no período compreendido entre 12:00h e 14:00h. Observou-se o devido cuidado para a manutenção de um ambiente tranquilo com o mínimo de ruídos foi tomado.

Para o início da tomada diária de parâmetros, a interrupção da ingestão através da colocação da divisória metálica na entrada do túnel de acesso à ração e à água, era realizada. Os parâmetros mensurados foram os seguintes:

- Ingestão sólida (ração) em miligramas (mg), quando a pesagem do recipiente foi feita nos momentos anterior e posterior ao acréscimo da ração;
- Excreção sólida (fezes) em miligramas (mg);
- Massa corporal. Após a retirada cuidadosa dos animais das respectivas gaiolas metabólicas, foram pesados com o auxílio de um frasco plástico, o qual tinha o seu peso subtraído;
- Excreção líquida (urina) em mililitros (ml), de acordo com a graduação presente no frasco no qual era armazenada;
- Ingestão líquida (água) em mililitros (ml) a partir da observação do “menisco” com relação à graduação do reservatório (bebedouro).

A data e a hora de início dos procedimentos para a tomada de parâmetros foram devidamente registradas em ficha específica com o intuito de se detectar possíveis alterações ou mudanças comportamentais. Todos os pesos de massa foram obtidos por meio de balança de precisão².

Desta forma, todos os animais do estudo, possuíam ficha individual contendo um histórico diário, organizadas com base em um código de registro que indicava a ninhada à qual pertenceu e a gaiola metabólica individual na qual residiu até a

---

² Marte – modelo AS1000C

eutanásia. Este código de registro foi estabelecido ao nascimento e observado até o final de estudo, como ilustra o esquema abaixo.

Os animais utilizados no presente estudo foram em geral provenientes das ninhadas A, B e C, e quando necessário eram tomados das ninhadas D e E, como no caso de suprimento das perdas.

A manutenção e limpeza das gaiolas metabólicas eram realizadas semanalmente ou quinzenalmente de acordo com a necessidade. Os funis de escoamento de urina e de direcionamento das fezes aos recipientes específicos eram desacoplados, esfregados com esponja macia, enxaguados e enxugados com panos limpos secos para imediata reposição, duas vezes por semana. O bebedouro e o coletor de água também eram lavados com a mesma frequência. A grade e os túneis metálicos bem como o material plástico das paredes da gaiola, eram limpos com uma gaze embebida em álcool 70° duas vezes por semana e a limpeza geral da sala, era realizada quinzenalmente.

4.3 OBTENÇÃO DOS PROCESSOS CONDILARES DA MANDÍBULA (PC)

Seis animais de cada um dos grupos monitorados em gaiolas metabólicas (N, S e R) e seis dos grupos NN e RR, foram submetidos à eutanásia em câmara de dióxido de carbono (CO₂) e tiveram removidos os PCs, como segue. A dissecação teve início com incisão pré-auricular seguida de divulsão da pele para a exposição

do arco zigomático, que foi rebatido trazendo consigo os feixes do músculo masséter. Após a divulsão dos feixes do músculo temporal, a cápsula articular da articulação temporomandibular (ATM) foi totalmente evidenciada, removendo-se, então, um bloco contendo o PC da mandíbula e o músculo pterigóideo lateral (Figura 4).

Após cuidadosa dissecação do m. pterigoideo lateral, os PCs foram fixados em Bouin por 8 horas, e descalcificados em solução de Morse contendo ácido fórmico (50%) e citrato de sódio (20%), trocada em intervalos de 48 horas, durante 30 dias. O teste de descalcificação para avaliar o conteúdo mineral do espécime foi realizado, adicionando-se à solução descalcificadora, uma solução de oxalato de amônio a 5%, na proporção de 5:1. Após lavagem em água destilada, os espécimes foram desidratados em série crescente de alcoóis (70° ao absoluto), diafanizados em xilol e incluídos rotineiramente em parafina. Cortes semi-seriados de 5 µm, no plano sagital, foram obtidos em micrótomo (Leica SM 200R), montados em lâminas histológicas e mantidos em estufa a 37°C, para desparafinação.

Os cortes assim obtidos foram utilizados as técnicas descritas a seguir.

Figura 4 – Etapas para a obtenção do processo condilar da mandíbula (PC) em animais do grupo N. **A:** Mesa cirúrgica; **B:** Vista dorsal do animal eutanasiado; **C:** Abertura pré-auricular com exposição dos mm. temporal (**a**) e masseter (**b**) e do arco zigomático (seta); **D:** Evidenciação da cápsula da articulação temporomandibular (seta) após o rebatimento do arco zigomático e mm. temporal (**a**) e masseter (**b**); **E:** Abertura da cápsula articular e consequente exposição do PC; **F:** PC em vista lateral, após removido

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ

Em cortes do PC de três animais de cada grupo, foram realizadas as seguintes colorações: azo-carmim, picrosírius e safranina-O.

4.4.1 Azo-carmim

Para essa coloração, de cada animal de todos os grupos (N, S, R, NN e RR), foram utilizadas 4 lâminas contendo 5 cortes cada, num total de 60 cortes por grupo.

Com este método (ROMEIS, 1968) objetivou-se evidenciar os componentes celulares das camadas da cartilagem do PC. Assim, os espécimes permaneceram 20 minutos em corante³ e em água destilada, por 10 minutos. Após lavados, em seguir, os cortes foram imersos em solução de ácido fosfotungstístico a 5 %, imersos por 10 minutos em azul de anilina a 1 % e desidratados em série crescente de álcoois (70° ao absoluto), diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com meio apropriado⁴.

4.4.2 Picrosirius

Essa metodologia, desenvolvida por Junqueira et al. (1979), foi empregada para a tipificação, sob luz polarizada, das fibras colágenas do PC. Para tanto, foram utilizadas 3 lâminas contendo 5 cortes de cada animal dos grupos N, S, R, NN e RR, ou seja, 15 cortes por grupo.

---

³ Azocarmin B

⁴ Enthelan, Merck

Resumidamente, os cortes permaneceram 25 minutos em corante⁵ e, após lavados em água destilada, foram desidratados, diafanizados e montados de acordo com o descrito no item anterior (4.4.1).

4.4.3 Safranina-O

Para que se procedesse à análise qualitativa da matriz cartilaginosa do PC, empregou-se o método da Safranina – O, descrito por Luna (1968), em 3 lâminas contendo 5 cortes cada de cada animal, de todos os grupos (N, S, R, NN e RR), perfazendo um total de 15 cortes por grupo.

A técnica constituiu da rehidratação dos cortes em duas passagens por 7 minutos em xilol e, em seguida, em duas passagens de 2 minutos em etanol a 100% e a 95%. Após lavagem em água destilada, os cortes foram imersos, durante 10 minutos, na seguinte solução desafranin – O (Sigma): 0,1% de safranin em tampão acetato de sódio (0,1M; pH 4,6).

A desidratação foi realizada por duas passagens de 2 minutos cada em etanol a 95% e a 100%, seguidas pela imersão por duas vezes, em xilol (7 minutos cada). A montagem foi realizada conforme descrito no item 4.4.1.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O RECEPTOR DE INSULINA (IR)

Para essa metodologia, foram obtidas 4 lâminas (contendo 5 cortes cada) do PC de três animais de cada grupo (N, S, R, NN e RR), num total de 60 cortes por grupo.

Desta forma, os cortes foram submetidos à passagem em série decrescente de alcoóis (absoluto até 50° - 2 minutos cada) e, em seguida, lavados em água destilada (5 minutos). Os cortes foram expostos por 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol a 100%, lavados com em solução

---

⁵ Sirius Red

salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 minutos e incubados em soro normal de cabra, na proporção 1:5 em PBS à temperatura ambiente, por 30 minutos.

Para a marcação receptor de insulina foi usado o anticorpo anti-insulin R β ⁶. Determinada por prévia titulação, a diluição considerada a mais adequada para o receptor foi a de 1:25.

Assim, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho por 2 horas em câmara úmida, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas em PBS (4×10 min) e incubadas com anticorpo secundário de cabra anti mouse IgG biotilado, diluído em PBS (1:200), por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente lavadas com Triton a 0,01% diluído em PBS, seguiu-se à incubação com Vectain ABC (preparada com 30 minutos de antecedência, sob refrigeração até o momento do uso), diluído em PBS (1:100) por 30 minutos. A seguir, após nova lavagem com PBS por 5 minutos, os cortes foram reagidos com cromógeno DAB⁷, por 8 minutos à temperatura ambiente, para a revelação dos cortes. A seguir, os cortes foram lavados em água destilada por 5 minutos, desidratados em série crescente de alcoóis (70° ao absoluto - 2 minutos cada) e diafanizados em xilol (2 passagens por 7 minutos) para a montagem, realizada conforme descrito no item 4.4.1.

As reações foram acompanhadas por uma lâmina controle, submetida a todas as etapas do procedimento, suprimindo-se a aplicação do anticorpo primário.

4.6 ESTUDO QUANTITATIVO

Foram utilizadas as lâminas coradas pelos métodos do **azo-carmin** para a avaliação dos itens 4.6.1 a 4.6.4; **safranina-O** avaliadas no item 4.6.5 e de **imunohistoquímica – IR** para avaliação dos itens 4.6.6 a 4.6.9. As imagens, obtidas de um microscópio binocular⁸, foram projetadas através de uma câmera de alta

---

⁶ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

⁷ Vector Laboratories

⁸ Carl Zeiss, Axioskop

resolução⁹, em um monitor de 17 polegadas, de modo que pudessem ser avaliados por meio de software especializado¹⁰, os parâmetros seguir.

4.6.1 Área da Cartilagem do PC

Com objetiva de 5x foi possível observar no corte, toda a extensão do PC que teve a sua área cartilaginosa mensurada em μm^2 , reunindo as camadas articular (a), pré-condroblástica (p), condroblástica (c) e hipertrófica (h), como ilustra a figura 5.

Figura 5 – Corte sagital de PC. Área da cartilagem do PC delimitada (Azo-Carmin).
Objetiva de 5x

⁹ Carl Zeiss, Axiocam

¹⁰ Carl Zeiss, Axiovision

4.6.2 Espessura das Camadas Cartilagueínas do PC (ECPC)

A seguir, com objetiva de 40x, determinou-se em μm , a espessura das camadas **a** e **p** e com objetiva de 20x, a espessura das camadas **c** e **h**. Para esse procedimento, cada corte foi inicialmente dividido nas regiões anterior, média e posterior. Em seguida, em cada uma das regiões, determinou-se 5 espessuras para cada camada (a, p, c, h), como ilustra a figura 6.

Figura 6 – Cortes sagitais evidenciando as camadas constituintes do PC. A: Espessura das camadas articular e pré-condroblástica; B: Espessura das camadas condroblástica e hipertrófica (Azo-carmin)

4.6.3 Número e Densidade de Células da Camada Condroblástica do PC

Com objetiva de 20x, toda a extensão de 20x, toda a extensão de cada corte foi varrida, de modo a se contar todas as células da camada condroblástica (c). A densidade foi determinada relacionando-se o número de células com a área do PC obtida conforme descrito no item 4.5.1 (Figura 7).

Figura 7 – Corte sagital do PC. Demarcação dos componentes celulares da camada condroblástica do PC (Azo-carmin). Objetiva de 20x

4.6.4 Relação de Número de Células em Fila (CF) por Espessura das Camadas do PC (CF/ECPC)

A partir das mensurações de espessura realizadas, conforme item 4.5.1, o número de células enfileiradas presente em cada uma destas espessuras foi

registrado para a definição de uma relação entre as diferentes grandezas. Assim, a relação CF/ECPC foi obtida para todas as camadas (articular, pré-condroblástica, condroblástica e hipertrófica) para todos os grupos estudados (N, S, R, NN e RR).

4.6.5 Safranina-O

Nas lâminas coradas por esse método (item 4.4.3) foram fotografadas, com objetiva de 20x, as regiões centrais de 8 cortes, escolhidos alternadamente dentre os 15 cortes existentes para cada um dos grupos estudados (N, S, R, NN e RR). A seguir, com um sistema-teste de 200 pontos posicionado sobre as imagens das camadas condroblástica e hipertrófica, foi estimada a porcentagem de matriz cartilaginosa dessas regiões do PC, conforme ilustra a figura 8.

Figura 8 – Sistema-teste sobre a imagem das camadas condroblástica e hipertrófica do PC, corada pelo método da Safranina-O

4.6.6 Área da Cartilagem do PC (IR)

Com objetiva de 5x foi possível evidenciar no corte toda a extensão da cartilagem do PC, que teve a sua área cartilaginosa mensurada em μm^2 , conforme descrito no item 4.5.1 (Figura 9).

Figura 9 – Área da cartilagem do PC. Número de células sensibilizadas aferido na região (imunohistoquímica - IR)

4.6.7 Número e Densidade de Células IR na Cartilagem do PC

Com objetiva de 20x, toda a extensão do corte foi varrida, como descrito no item 4.5.3, de modo que todas as células sensibilizadas ao IR na cartilagem do PC fossem contadas. A densidade foi determinada relacionando-se o número de células

imunorreativas na cartilagem com a área do PC, obtida conforme descrito no item 4.5.1.

4.6.8 Área do Osso Subcondral (IR)

Com objetiva de 5x foi possível evidenciar no corte, em μm^2 , toda a extensão considerada osso subcondral do PC, aquela que compreende a região subjacente à camada hipertrófica (h) e a área situada entre os limites ósseos corticais e a região dos vasos do osso do PC (Figura 10).

Figura 10 – Área do osso subcondral do PC. O número de células sensibilizadas foi aferido na região do (imunohistoquímica - IR)

4.6.9 Número e Densidade de Células IR no Osso Subcondral

Com objetiva de 20x, toda a extensão do corte foi varrida, como descrito no item 3.5.3, de modo que todas as células sensibilizadas ao receptor de insulina (IR) no osso subcondral do PC fossem contadas. A densidade foi determinada relacionando-se o número de células imunorreativas com a área da região.

4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA - IR

Foi utilizada 1 lâmina contendo 5 cortes para cada um dos grupos estudados (N, S, R, NN e RR). Objetivou-se obter resultados qualitativos a respeito da reação imunohistoquímica com o anticorpo para receptor de insulina. A reação seguiu o protocolo descrito no item 3.5.1, diferindo apenas na incubação com fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)¹¹, o qual é evidenciado através da sua ligação com o anticorpo secundário de cabra anti mouse IgG biotinilado, previamente incubado. A partir desta etapa, retomaram-se os procedimentos convencionais do protocolo em questão até se obter as lâminas histológicas. A partir daí, as mesmas foram analisadas, a partir de câmera de alta resolução¹² em software especializado¹³.

4.8 ESTUDO TRIDIMENSIONAL – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Um PC de cada grupo foi observado através da MEV com o intuito de melhor compreender de forma tridimensional a organização espacial das camadas do PC. Após os animais terem sido anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital

---

¹¹Santa Cruz Biotechnology, Inc.

¹²Zeiss, AxioCam

¹³Zeiss, Axiovision

sódico na dose letal (Hypnol 3%¹⁴), na proporção de 30mg/kg, os mesmos foram perfundidos através de injeção intraventricular esquerda com solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2% em tampão fosfato de sódio a 0,1M; pH 7,3), precedida de solução salina (NaCl a 9%) para a remoção do sangue do sistema cardiovascular. Após a excisão dos PCs, como previamente descrito no item 3.3, os mesmos foram montados em bases apropriadas, congelados e cortados sagitalmente em criostato¹⁵, até que as suas camadas constituintes fossem evidenciadas. O remanescente dos espécimes foi imerso novamente em solução de Karnovsky modificada por 8 horas à temperatura de 4°C, lavado em água destilada por 12 horas a 4°C, e pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, à mesma temperatura. Em seguida, os espécimes foram lavados e desidratados em série crescente de álcoois (70° ao absoluto), secos com CO₂ em aparelho ponto crítico¹⁶ e montados em bases metálicas. Após cobertos com ouro, os mesmos foram avaliados em microscópio eletrônico de varredura¹⁷.

4.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos nos itens referentes à quantificação foram submetidos a uma análise da variância com 1 fator (grupo), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, com nível de significância $p < 0.05$.

---

¹⁴ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brazil

¹⁵ Leica CM 1850

¹⁶ Balzers CPD 030

¹⁷ LEO 480i

5 RESULTADOS

Conforme descrito no item 4.2 do capítulo Materiais e Métodos, os espécimes deste estudo foram parte de uma amostra proveniente de um “pool” de animais utilizados em diferentes pesquisas de um grupo em comum. Desta forma, os resultados sobre a análise metabólica descritos a seguir (item 5.1) referem-se a este “pool” de animais nos quais estão compreendidos os aqui utilizados. As análises quantitativa e qualitativa (respectivamente nos itens 5.2 e 5.3) são pertinentes somente aos resultados obtidos com os animais da presente pesquisa.

5.1 ANÁLISE METABÓLICA

A mensuração diária dos parâmetros metabólicos (massa corporal, ingestão de ração, ingestão de água, eliminação de fezes e eliminação de urina), permitiu compará-los entre os grupos estudados (N, S e R) (Tabela 1).

Desta forma, tomando-se como referência os animais do grupo N, observou-se que os animais do grupo S têm o correspondente a 22% da sua massa corpórea. Entretanto, a ingestão de água desses animais foi de 41,7% e a ingestão de ração, 92,3% do seu equivalente nutrido (N). Já as eliminações de urina e de fezes representaram, respectivamente 33,2% e 32,8%, comparativamente ao controle. Assim, através dos parâmetros avaliados, foi possível constatar que os animais subnutridos (S), apesar de terem apenas um quarto da massa corpórea que seria adequada para a sua idade, ingeriram, proporcionalmente aos animais nutridos (N), somente 8% a menos de ração. Quando se analisou os parâmetros eliminação de fezes e de urina, verificou-se que os animais do grupo N eliminaram de fezes o correspondente a 14,2% da ingestão de ração e 64,5% da ingestão de água. Já para os animais do grupo S, esses dados foram, respectivamente, 5% e 51%.

Também com os valores para o grupo N sendo utilizados como referência, os animais renutridos (R) apresentaram 73,5% da massa corpórea. A ingestão de ração e água desses animais foi de, respectivamente 45,5% e 79% do seu equivalente nutrido. A eliminação de fezes dos animais deste grupo foi de 74,3%, enquanto a de urina foi de 75,3% daquilo que o grupo N elimina. A análise dos parâmetros de eliminação de fezes e urina do grupo R demonstrou que esses animais eliminam 23% da ração e 61% da água que ingerem. Esses últimos dados demonstram certa proporcionalidade do grupo R comparativamente às porcentagens de eliminação de fezes e urina dos animais do grupo N, ou seja, 14,2 e 64,5, respectivamente (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1 - Parâmetros metabólicos dos grupos N, S e R. Média ($\pm$ DP) dos valores da última semana de monitoramento na gaiola metabólica

Parâmetros	N	S	R
Massa corporal (g)	263,68 $\pm$ 26,28 S $\neq$ N; S $\neq$ R; R $\neq$ N *	58,15 $\pm$ 27,99	193,90 $\pm$ 17,30
Ingestão de ração (g)	17,82 $\pm$ 2,19 S $\neq$ R; R $\neq$ N *	16,57 $\pm$ 3,50	8,11 $\pm$ 2,54
Ingestão de água (ml)	38,19 $\pm$ 9,67 S $\neq$ N; S $\neq$ R *	15,94 $\pm$ 7,10	30,16 $\pm$ 6,70
Eliminação de fezes (g)	2,53 $\pm$ 1,88 S $\neq$ N; S $\neq$ R *	0,83 $\pm$ 2,53	1,88 $\pm$ 0,49
Eliminação de urina (ml)	24,65 $\pm$ 8,76 S $\neq$ N; S $\neq$ R *	8,18 $\pm$ 3,70	18,55 $\pm$ 4,87
ANOVA* p<0,05			

Gráfico 1 – Relação entre ingestão alimentar e massa corpórea dos grupos N, S e R. Período metabólico, entre a 1ª e a 6ª semana

Os valores absolutos obtidos para os parâmetros metabólicos nos mostraram que a massa corporal dos animais dos grupos N, S e R diferem significativamente entre si, enquanto a ingestão de água e a eliminação de urina e fezes são significativamente menores para os animais do grupo S. No que diz respeito à ingestão de ração, não teve diferenças estatísticas entre os grupos N e S, somente entre S e R e R e N.

A análise diária dos parâmetros metabólicos dos animais possibilitou a constatação de alguns sinais fisiológicos importantes. Os animais do Grupo S demonstraram intensa sudorese, observada por meio das tampas superiores das gaiolas metabólicas, o que não foi verificado para os animais N e R. Outro aspecto relevante observado foi a qualidade das fezes, que se apresentaram pastosas (aderindo às paredes do coletor) para os animais do grupo R, desde o início da renutrição, permanecendo por todo o período de 60 dias. Pode-se inferir, deste modo, que ocorreram alterações na adaptação do trato gastrointestinal dos animais à nova condição na qual a ingestão protéica foi bruscamente estabelecida, visto que as fezes dos animais dos grupos N e S apresentavam consistência normal. Vale ressaltar que os animais nutridos

adultos maduros (grupo NN), ao completarem 100 dias e serem eutanasiados, apresentaram litíase renal, indicativo de excesso de proteína ingerida.

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

Nos itens a seguir, são descritos os resultados estatísticos relativos aos parâmetros abordados, como área das camadas do PC e número de células, de acordo com as metodologias de evidência celular propostos na presente pesquisa.

5.2.1 Área da Camada Condroblástica

Para o padrão de 60 dias a subnutrição (S) determinou uma área bem diminuída; a renutrição (R) apresentou-se eficiente para restabelecer este parâmetro. Aos 100 dias a área dos animais do grupo RR não alcançou o padrão exibido pelo grupo NN, representando somente 33,3% daquela verificada para os animais nutridos com 100 dias (Tabela 2 e Gráfico 2A).

5.2.2 Número de Células da Camada Condroblástica

A subnutrição provocou a diminuição do número estimado de células no período púbere (60 dias). Todavia, o número de células se mostrou estatisticamente semelhante nos animais nutridos (N) e renutridos (R). Os animais do grupo RR exibiram diferença estatística quando comparados ao grupo NN. Desta forma, observou-se uma tendência de restabelecimento deste parâmetro somente no grupo adulto jovem (R) (Tabela 2 e Gráfico 2B).

5.2.3 Densidade Celular

A densidade celular foi menor no grupo R comparando-se os diferentes grupos do período púbere (60 dias). Muito embora tenha ocorrido uma tendência natural do aumento da densidade celular nos grupos N e NN, esta densidade aumentou sensivelmente no grupo RR, em decorrência da diminuição da área da camada condroblástica (Tabela 2 e Gráfico 2C).

Tabela 2 - Média ($\pm$ DP) do número de células da camada condroblástica, área da cartilagem e densidade celular do PC

Parâmetros	N	S	R	NN	RR
Nº células	416,4±79,9 S≠N; S≠NN; RR≠NN *	188,8±26,3	325,4±73,0	430,1±94,1	234,9±40,0
Área (mm²)	0,7±0,1 S≠N; S≠R; RR≠N; RR≠NN; RR≠R *	0,3±0,05	0,7±0,09	0,6±0,1	0,2±0,04
Densidade	531±12,3 S≠NN; S≠RR; R≠NN; R≠RR; RR≠N; RR≠NN *	481±15,9	430±14,3	697±22,0	925±84,3
					ANOVA* p<0,05

Gráfico 2 – Média ($\pm$ DP) do número de células da camada condrolástica (A); área da cartilagem do PC (B) e densidade celular (C)

5.2.4 Espessura das camadas do PC (ECPC), Número de Células em Fila (CF) e a Relação CF/ ECPC

Esses dados foram avaliados nas camadas articular (a); pré-condroblástica (p); condroblástica (c) e hipertrófica (h):

CAMADA ARTICULAR

Na fase de 60 dias, o grupo subnutrido exibiu um número menor de células; neste parâmetro, a renutrição aos 60 dias mostrou-se eficiente. Tal fato não comprovou-se para o grupo RR, uma vez que o número de células em fila foi muito menor (61%) comparativamente ao grupo NN.

A ECPC dos grupos S e R apresentou-se menor do que a verificada para o grupo N, representando, respectivamente 28% e 54% dos animais normais, ou seja, a renutrição foi capaz de restabelecer somente a metade desse parâmetro na fase adulto jovem. Esse dado é ainda mais marcante ao se comparar os grupos de 100 dias (adulto maduro), uma vez que a ECPC do grupo RR correspondeu a apenas 40% daquela obtida para o grupo NN (Tabela 3 e Gráfico 3).

Tabela 3 - Camada articular (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)

Parâmetros	N	S	R	NN	RR
Nº células fila	3,0 $\pm$ 0,3 S $\neq$ N; S $\neq$ NN; RR $\neq$ N; RR $\neq$ NN *	2,1 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,6
Espessura (μ m)	40,8 $\pm$ 2,5 S $\neq$ N; RR $\neq$ N *	11,5 $\pm$ 2,8	22,3 $\pm$ 10,1	25,7 $\pm$ 13,6	10,3 $\pm$ 1,5
Nº células fila/ espessura (N/E)	0,08 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,06	0,1 $\pm$ 0,12	0,2 $\pm$ 0,05
ANOVA* p<0,05					

CAMADA PRÉ-CONDROBLÁSTICA

Relativamente ao número de CF, muito embora tenha sido notada uma tendência à diminuição nos grupos S e RR, a análise estatística permitiu verificar que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos, nos dois períodos abordados (60 e 100 dias).

A espessura dessa camada apresentou-se estatisticamente semelhante em todos os grupos estudados. Todavia, foi nítida a tendência de os grupos S e RR apresentarem menor espessura. Não houve diferenças significativas entre os grupos quando o parâmetro CF/ECPC foi avaliado (Tabela 4 e Gráfico 3).

Tabela 4 - Camada Pré-condroblástica (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)

Parâmetros	N	S	R	NN	RR
Nº células fila	3,3 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1
	S $\neq$ R *				
Espessura (μ m)	42,2 $\pm$ 21,4	16,3 $\pm$ 6,1	27,1 $\pm$ 9,9	26,1 $\pm$ 4,8	18,4 $\pm$ 0,4
Nº células fila/ espessura (N/E)	0,1 $\pm$ 0,06	0,1 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,05	0,1 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01
ANOVA* p<0,05					

CAMADA CONDRÓBLÁSTICA

Em relação ao número de CF nessa camada, o grupo S apresentou número menor do que os grupos N e R, que exibiram o mesmo número de células. Nos animais de 100 dias, verificou-se que o número de CF foi menor

no grupo RR, comparativamente ao grupo NN. Os dados demonstraram ser a renutrição, aos 60 dias, eficiente; porém a mesma aos 100 dias demonstrou-se ineficiente.

Ao se avaliar a espessura da camada condroblástica, notou-se que entre os grupos de 60 dias, o de animais subnutridos (S) tendeu a uma diminuição, muito embora estatisticamente não tenham sido detectadas diferenças significativas. Tal fato também foi observado no grupo de 100 dias.

Quanto à relação CF/ECPC, não houve diferenças significantes entre os diversos grupos (N, S, R, NN e RR) (Tabela 5 e Gráfico 3).

Tabela 5 - Camada condroblástica (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)

Parâmetros	N	S	R	NN	RR
Nº células fila	3,9 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,1
	S $\neq$ NN; RR $\neq$ NN *				
Espessura (μ m)	60,2 $\pm$ 27,38	29,5 $\pm$ 7,5	42,02 $\pm$ 8,5	40,1 $\pm$ 14,03	25,1 $\pm$ 4,9
Nº células fila/ espessura (N/E)	0,08 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,04	0,1 $\pm$ 0,02
ANOVA* p<0,05					

CAMADA HIPERTRÓFICA

No grupo controle (N) há uma diminuição do número de CF, frente aos animais subnutridos aos 60 dias de vida. A renutrição aos 60 dias de vida mostrou-se eficiente (S $\neq$ R), com aumento do número de suas células, equiparando-se ao grupo controle. A renutrição aos 100 dias não foi eficiente, uma vez que ocorreu a diminuição do número de CF, quando comparado ao grupo NN.

Em relação à espessura desta camada, não ocorreu variação estatisticamente significativa; porém, há evidência de que a renutrição aos 60 dias é eficiente, o que não se verificou no grupo de 100 dias.

A CF/ECPC não apresentou variações estatísticas significativas entre todos os grupos abordados (Tabela 6 e Gráfico 3).

Tabela 6 - Camada Hipertrófica (média $\pm$ DP). Número de células em fila (CF), espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC) e a relação número de células em fila/espessura (CF/ECPC)

Parâmetros	N	S	R	NN	RR
Nº células fila	4,7 $\pm$ 0,1 S $\neq$ N; S $\neq$ NN; S $\neq$ R; RR $\neq$ N; RR $\neq$ NN; RR $\neq$ R *	3,8 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,1
Espessura (μ m)	122,95 $\pm$ 18,85 RR $\neq$ R *	74,84 $\pm$ 32,75	142,97 $\pm$ 37,79	102,23 $\pm$ 11,0	71,28 $\pm$ 18,27
Nº células fila/ espessura	0,04 $\pm$ 0,004	0,06 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
ANOVA* p<0,05					

Gráfico 3 - **A** – Número de células em fila (CF) das camadas da cartilagem do PC; **B** – Espessura das camadas da cartilagem do PC (ECPC); **C** – Relação CF/ECPC nas camadas da cartilagem do PC (média±DP)

5.2.5 Quantidade de Matriz Cartilagínea (MC) – Safranina – O

O estado de subnutrição aos 60 dias promoveu no grupo S, uma diminuição estatisticamente significativa da quantidade de matriz cartilagínea, em comparação com o grupo nutrido (N). Este parâmetro foi restabelecido no grupo R e, no grupo de animais maduros (RR) houve aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo adulto maduro controle (NN). Este último, apesar de apresentar diminuição na porcentagem do conteúdo cartilagíneo, manteve semelhança estatística com grupo N. (Tabela 7).

Tabela 7 - Média ($\pm$ DP) da porcentagem do conteúdo cartilagíneo das camadas do PC avaliadas em cortes submetidos à coloração por Safranina – O

Parâmetro	N	S	R	NN	RR
Matriz Cartilaginéa (%)	62,15±6,9	39,3±6,4	55,9±13,7	45,7±5,8	76±12,5
	S≠N; S≠R; S≠RR; R≠NN; R≠RR; RR≠N; RR≠NN *				
	ANOVA* p<0,05				

5.2.6 Número de Células Imunorreativas ao Receptor de Insulina (IR) na Cartilagem do PC

O número de células imuno-marcadas com o anticorpo para o receptor de insulina diminuiu nos animais subnutridos com 60 dias (grupo S). A renutrição, neste período, mostrou-se eficiente para restabelecer este padrão, de modo a não serem detectadas diferenças significativas entre os grupos N e R. Entretanto, a renutrição quando prolongada até a fase de adulto maduro (RR), não recuperou esse parâmetro quando se comparou com o respectivo controle (NN) (Tabela 8 e Gráfico 4A).

5.2.7 Área da Cartilagem do PC

A subnutrição (grupo S) diminuiu a área da cartilagem, em relação ao grupo padrão adulto jovem (N). A renutrição até os 60 dias de vida, por sua vez, foi capaz de restabelecer a área da cartilagem, equivalendo-se ao grupo N. Entretanto, o fato de o grupo renutrido aos 100 dias (RR) ser diferente significativamente do grupo padrão correspondente (NN), mostra que a renutrição estabelecida, no longo prazo não foi eficiente (Tabela 8 e Gráfico 4B).

5.2.8 Densidade de células imunorreativas ao receptor de insulina (IR) da cartilagem do PC

Quanto a esse fator, verificou-se que foi mantida uma equivalência entre todos os grupos da fase púbere (N, S e R); ou seja, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. A densidade dessas células também foi proporcional entre os grupos NN e RR que, por sua vez, apresentaram tal parâmetro bem maior do que os correspondentes da fase púbere (N e R) (Tabela 8 e Gráfico 4C).

Tabela 8 - Média ($\pm$ DP) do número de células imunorreativas ao receptor de insulina (IR); da área da cartilagem do PC e da densidade celular nos diferentes grupos

Parâmetros	N	S	R	NN	RR
Nº células	219,2 $\pm$ 53,2 S $\neq$ N; S $\neq$ R; S $\neq$ NN; RR $\neq$ N; RR $\neq$ NN; RR $\neq$ R; N $\neq$ NN *	96,1 $\pm$ 28,4	260,3 $\pm$ 38,1	355,8 $\pm$ 63,1	72,8 $\pm$ 1,3
Área (mm ²)	0,6 $\pm$ 0,1 S $\neq$ N; S $\neq$ R; R $\neq$ NN; RR $\neq$ N; RR $\neq$ R; RR $\neq$ NN *	0,3 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,08	0,1 $\pm$ 0,01
Densidade	361,5 $\pm$ 29,1 S $\neq$ NN; R $\neq$ NN; N $\neq$ NN *	312,5 $\pm$ 39,6	363,4 $\pm$ 75,8	677,1 $\pm$ 140,8	480,9 $\pm$ 35,2
ANOVA* p<0,05					

Gráfico 4 - **A** – Número de células imunorreativas da cartilagem do PC; **B** – Área da cartilagem do PC; **C** – Densidade de células imunorreativas da cartilagem do PC (média ± DP)

5.2.9 Número de Células Imunorreativas ao Receptor de Insulina (IR) na Região Subcondral do PC

Os animais do grupo subnutrido (S) apresentaram menor número de células imuno-marcadas ao IR no osso subcondral, quando comparados ao grupo padrão (N). A renutrição restabeleceu parcialmente o número de células imunorreativas, uma vez que aos 60 dias esse parâmetro apresentou-se estatisticamente maior do que aquele verificado para o grupo subnutrido e, ao mesmo tempo, estatisticamente menor do averiguado para o controle de 60 dias (N). Os grupos adultos maduros (NN e RR) apresentaram semelhança estatística no número de células imuno-marcadas (Tabela 9 e Gráfico 5A).

5.2.10 Área da Região Subcondral

A área desta região nos animais do grupo S apresentou-se diminuída quando comparada com o grupo padrão jovem (N). Entretanto, a renutrição aos 60 dias de vida (grupo R) foi eficaz no restabelecimento deste parâmetro. Quando se comparou os grupos com idades mais avançadas (NN e RR), notou-se que a renutrição não foi capaz de manter correspondência entre as áreas dos grupos nutrido e renutrido (Tabela 9 e Gráfico 5B).

5.2.11 Densidade de Células Imunorreativas ao Receptor de Insulina da Região Subcondral

Esta densidade celular teve aumento acentuado no grupo renutrido de 100 dias (RR), de modo a ser significativamente maior em relação ao grupo

padrão de mesma idade (NN). Os grupos N, S e R não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (Tabela 9 e Gráfico 5C).

Tabela 9 - Imunomarcção do receptor de insulina (IR) no osso subcondral (média $\pm$ DP)

Parâmetros	N	S	R	NN	RR
Nº células	250,4 $\pm$ 21,2 S $\neq$ N; S $\neq$ R; R $\neq$ N; R $\neq$ NN; RR $\neq$ N; RR $\neq$ R; NN $\neq$ N *	121,1 $\pm$ 6,3	171,0 $\pm$ 22,2	108,7 $\pm$ 7,3	122,6 $\pm$ 7,1
Área (mm ²)	1,4 $\pm$ 0,06 S $\neq$ N; S $\neq$ NN; S $\neq$ R; S $\neq$ RR; RR $\neq$ N; RR $\neq$ NN; RR $\neq$ R *	0,4 $\pm$ 0,49	1,0 $\pm$ 0,26	1,04 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,05
Densidade	177,8 $\pm$ 12,5 S $\neq$ NN; S $\neq$ RR; RR $\neq$ NN; RR $\neq$ R *	279,6 $\pm$ 48,8	186,4 $\pm$ 61,7	109,1 $\pm$ 10,1	623,8 $\pm$ 180,3
ANOVA* p<0,05					

Gráfico 5 - **A** – Número de células imunorreativas ao IR da região subcondral do PC; **B** – Área da região subcondral do PC; **C** – Densidade de células da região subcondral do PC, imunorreativas ao IR

5.3 ANÁLISE QUALITATIVA

A seguir, serão avaliados os aspectos estruturais e ultra-estruturais da região do PC, obtidos por métodos de microscopia de luz, eletrônica de varredura e imunohistoquímicos.

5.3.1 Microscopia de Luz

Ao se avaliar as secções coradas pelo método do Azo-carmim, verificou-se que, de modo geral, as espessuras das camadas do PC diminuíram dos 60 aos 100 dias, sendo a camada hipertrófica a que menos apresentou redução desta espessura, em todos os grupos estudados. Dentre os grupos de 60 dias os animais submetidos à subnutrição (grupo S) foram os que exibiram maior diminuição da espessura de todas as camadas do PC. Neste grupo, em alguns momentos, foi difícil a distinção entre as camadas, particularmente a pré-condroblástica.

Relativamente à renutrição, (grupo R), verificou-se que a camada articular exibiu espessura compatível com o seu controle (grupo N). Todavia, a camada pré-condroblástica foi mais alterada, uma vez que exibiu uma espessura de aproximadamente um terço da sua correspondente, no grupo N. Nesta fase, o trabeculado do osso subcondral do grupo S, apresentou-se mais amplo do que aqueles dos grupos N e R.

Na fase de 100 dias, exceto em relação às camadas condroblástica e hipertrófica, os animais dos grupos NN e RR tiveram reduzidas as demais camadas, quando comparadas aos seus correspondentes de 60 dias, ou seja, os grupos N e R. Neste período, em ambos os grupos NN e RR, o trabeculado do osso subcondral é mais denso (Figura 11).

Figura 11 – Microscopia de luz. Coloração pelo método de Azo-carmim. **A** – Grupo N com a representação das camadas do PC: articular (a), pré-condroblástica (p), condroblástica (c) e hipertrófica (h); **B** – Grupo S; **C** – Grupo R; **D** – Grupo NN; **E** – Grupo RR

Nos cortes corados com picro-sirius, analisados sob luz polarizada, foi possível verificar a malha de tecido colágeno constituinte das diferentes camadas do PC (Figura 12A). Desta forma, quando se comparou os grupos quanto a esse aspecto, verificou-se que, na camada articular dos grupos N e NN ocorreu o predomínio das fibras colágenas do tipo I (vermelho, laranja e amarelo). Diferentemente, nesta camada do PC dos animais dos grupos S, R e RR, predominaram as fibras colágenas do tipo III (verde).

Ao se avaliar a camada pré-condroblástica, verificou-se um ligeiro predomínio das fibras colágenas do tipo I nos grupos N, S e R, e um equilíbrio entre as fibras dos tipos I e II, nos grupos NN e RR.

As camadas condroblástica e hipertrófica analisadas em conjunto, exibiram, em proporções equitativas, fibras dos tipos I e III nos animais dos grupos N, S, R e NN; já no grupo RR, predominaram as fibras colágenas do tipo III (Figura 12).

Figura 12 – Microscopia de luz .Coloração do método do Picrosirius sob luz polarizada. Detecção de fibras colágenas do tipo I (amarelo, laranja e vermelho) e III (verde). **A** - Camadas articular (a), pré-condroblástica (p), condroblástica (c) e hipertrófica (h) do PC. **B a F** – Distribuição das fibras colágenas tipos I e III na matriz da cartilagem fibrosa do PC nos grupos N, S, R, NN e RR, respectivamente

Figura 13 (A-C) – Microscopia de luz. Coloração pelo método de Safranina – O. Representação da distribuição da matriz cartilaginosa (*) nos grupos N, S e RR

5.3.2 Estudo Tridimensional – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir do estudo tridimensional sob MEV, confirmou-se que a organização das camadas cartilagíneas de animais adultos maduros é diferente daquela em animais adultos jovens; ou seja, nestes últimos (grupo N), as mesmas apresentaram-se bem delimitadas, tornando fácil a diferenciação das camadas articular (a), pré-condroblástica (p), condroblástica e hipertrófica (h) (Figura 14 A,E,I). No grupo subnutrido (S), muito embora as camadas também tenham sido bem identificadas, a principal diferença foi notada relativamente à espessura das mesmas (Figura 14 B,F,J). Em R observou-se a recuperação da espessura total da cartilagem do PC, com ênfase para as camadas condroblástica e hipertrófica (Figura 14 C,G,K). O grupo NN apresentou menor espessura quando comparado ao grupo N, ressaltando-se a camada condroblástica, que não apresentou as células em fila (Figura 14 D,H,L).

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do PC de ratos wistar dos grupos N, S, R e NN. Objetivas de 500X (A - D); 700X (E-H); 1200X (I-L)

N

S

R

NN

5.3.3 Imunohistoquímica – Receptor de Insulina (IR)

Células sensibilizadas (imunomarcadas) pelo IR foram observadas em todas as camadas do PC nos diversos grupos estudados (N, S, R, NN e RR), tanto com a reação do cromógeno, quanto na imunofluorescência.

Desta forma, foi possível verificar que, de acordo com a camada e o grupo de animais, um número variável dessas células destacava-se dentre aquelas que não exibiram nenhuma reatividade (Figura 15).

Figura 15 - **A, B, C** – Imunohistoquímica do receptor de Insulina (IR). **D, E, F** – Imunofluorescência do IR. As setas demonstram as células sensibilizadas ao IR (imunomarcadas) e as cabeças de seta apontam para as células não sensibilizadas

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A subnutrição, representada pela carência protéica (kwashiorkor) e/ou calórica (marasmo), atinge grande parte da população mundial e, por isso, tornou-se um problema global e persistente ao longo dos anos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2004), o número de crianças subnutridas no mundo passa de 500 milhões e acarreta em mais da metade das mortes de crianças em todo o mundo. As outras principais causas de morte são a malária, infecções respiratórias agudas, diarreia, tuberculose e HIV/AIDS, porém todas essas doenças são frequentemente complicadas pelos diferentes graus de subnutrição (NEUMANN; GEWA; BWIBO, 2004).

A gravidez de mães subnutridas possibilita um alto risco desta mãe prover uma criança com baixo peso, resultado de um retardo no crescimento intra-uterino. Esta criança, por sua vez, apresenta alto risco de ter deficiências cognitivas, aumento da susceptibilidade a infecções graves e de nunca alcançar o seu crescimento pós-natal completo. Crianças nascidas de mães subnutridas frequentemente apresentam baixos estoques de ferro, zinco, vitamina A e vitamina B₁₂. Crências maternas de ferro, zinco e iodo contribuem para o retardo do crescimento fetal, e desenvolvimento do sistema nervoso central (INSTITUTE OF MEDICINE, 1990). O retardo no crescimento intra-uterino de crianças aumenta o risco de desenvolver diabetes do tipo II, obesidade, doenças cardiovasculares e hipertensão na fase adulta (NEUMANN; GEWA; BWIBO, 2004).

Ainda é prematuro se concluir que a subnutrição não constitui um problema em muitas partes do mundo, visto que, como já mencionado, o número de crianças subnutridas no mundo passa de 500 milhões e que em países afetados por guerras e/ou dificuldade no desenvolvimento econômico, tiveram, entre outros fatores, dificuldades no abastecimento alimentar, acarretando no aumento da quantidade de crianças subnutridas nestes locais. Entretanto, nos últimos 40 anos o número de crianças subnutridas na Ásia e América Latina diminuiu acentuadamente. Isto se deve a melhoras nos sistemas de saúde, educação e na introdução de sistemas de alimentação que

promovem o abastecimento alimentar protéico-energético por parte da população. Em países desenvolvidos, a subnutrição protéica decresceu, entretanto, a subnutrição por micronutrientes (ferro, vitamina A, iodo, zinco, cálcio) obteve aumento considerável nos últimos anos. Isto se deve à diminuição da quantidade de ingestão de alimentos com base animal e, segundo os parâmetros indicados pela Nutrition Collaborative Research Support Program (CRSP), à piora da qualidade do alimento. Popkin, 1994 relata uma “transição nutricional”, a qual se deve ao aumento do acesso a comida, à diminuição de práticas físicas e ao consumo de dietas ocidentais. Estes fatores estão diretamente relacionados com a urbanização contínua existente atualmente. A consequência do estado carencial acarreta em crescimento inicial ao nascimento com nanificação, resultados negativos na lactação e problemas cognitivos, além de maior risco de hipertensão, diabetes, ganho de peso e obesidade. Claramente, é necessária a implantação de novas políticas alimentares, uma vez que enquanto há países subdesenvolvidos com inadequado suprimento alimentar, em países desenvolvidos os sistemas de alimentação ainda são subdesenvolvidos e associados com baixa ingestão protéico-energética. (KIM; SYMONS; POPKIN, 2004; NEUMANN; GEWA; BWIBO, 2004).

6.1 ANÁLISE METABÓLICA

A partir do monitoramento metabólico desenvolvido pelo grupo de pesquisa, através do “pool” de animais obtidos dos grupos N, S e R, observou-se que os animais do grupo S, comparativamente aos do grupo N, tiveram massa corporal equivalente a 22% e ingeriram muito mais ração (92,3%). A partir disso, pode-se dizer que o organismo do animal subnutrido parece “perceber” que está sofrendo com a carência protéica da ração e, assim, tem o instinto de suprir as suas necessidades metabólicas ingerindo mais ração; ou seja, mesmo a ração sendo disponibilizada sem restrições a todos os grupos experimentais, os animais subnutridos mostraram apetite acentuado, com o

ímpeto de suprimir a carência protéica. Em contrapartida à sua ingestão, estes animais tiveram pouco volume de fezes eliminado; ou seja, a grande quantidade de ração ingerida foi absorvida, também com o mesmo objetivo.

Como a leptina e a grelina são proteínas envolvidas no mecanismo do apetite, deve-se aqui proceder a uma análise a cerca de suas funções. A grelina atua no trato gastrointestinal e é uma das responsáveis pelo desencadeamento do apetite. Uma vez estimulada pela fome, através dela é que ocorre a liberação de enzimas gástricas e hormônio de crescimento, estimulando o hipotálamo a intensificar os mecanismos para a aquisição de energia (WERNETTE; WHITE; ZIZZA, 2011). A quantidade de leptina produzida e liberada, é diretamente proporcional à massa de tecido adiposo do organismo, sinalizando ao hipotálamo a quantidade de energia armazenada, assim como a regulação da ingestão de alimento e da temperatura (SAVINO et al., 2007; WERNETTE; WHITE; ZIZZA, 2011). O que ocorre neste protocolo experimental de subnutrição protéica é que, como descrito por Pimstone et al. (1968), este tipo de restrição causa aumento dos níveis séricos do hormônio do crescimento, realizando desta maneira, a lipólise, mantendo o corpo por meio dos ácidos graxos. Assim, a secreção de leptina diminui no tecido adiposo, diminuindo o processo de retroalimentação de ingestão de alimento no hipotálamo, fazendo com que ocorra ingestão de alimento em excesso pelo animal, sem saciá-lo.

Estudos revelam que a restrição materna de nutrientes, semelhante ao avaliado neste estudo, resulta em crescimento intra-uterino restrito da prole. Esses filhotes, apesar de dieta normal pós-desmame, desenvolve uma síndrome metabólica que ocasiona aumento do apetite, e induz o animal a desenvolver a obesidade na idade adulta (DESAI; BABU; ROSS, 2007).

Corroborando, há estudos epidemiológicos que sugerem que a subnutrição materna predispõe a prole ao desenvolvimento de patologias que influenciam no equilíbrio do metabolismo energético na vida adulta (BRETON, 2009; COUPÉ, 2009). Além disso, Coupé et al. (2009), demonstraram uma relação direta com o baixo peso ao nascer, causado principalmente pela restrição protéica materna durante o desenvolvimento intra-uterino.

A qualidade das fezes desses animais apresentou-se normal, indicando a adaptação desses à dieta estabelecida. Além disso, os animais subnutridos apresentaram menor eliminação de urina, comparativamente ao que ingeriram de água. Estes últimos dados levam a crer que esses animais apresentam algum tipo de distúrbio no seu metabolismo, e são as análises metabólicas adquiridas diariamente que diárias que corroboram com essa observação, uma vez que os animais do grupo S demonstraram intensa sudorese, diferentemente do que apresentaram os animais dos demais grupos.

Os animais renutridos de 60 dias (grupo R) apresentaram 73,5% da massa corpórea, com apenas 45,5% de ingestão de ração e 79% da ingestão de água, comparativamente ao animal nutrido de mesma idade (grupo N). A diminuição da ingestão de ração observada nesses animais, associada ao fato de apresentarem eliminação de fezes pastosas, pode ser justificada pela possível deficiência de adaptação do trato gastrointestinal (TGI) desses animais frente à mudança brusca de concentração de proteína na ração (5% - 20%), aos 21 dias de vida. Vale ressaltar, ainda, que desde o desmame até a eutanásia (60 dias), não houve adaptação desses animais à dieta imposta aos 21 dias, evidenciado pela persistência da excreção pastosa.

Há pesquisadores que estudaram a retenção de proteína de acordo com a sua concentração e com a idade do animal. Sanz Sanz-Sampelayo, Fenolla e Extremera (1991), relataram que a retenção de proteína é maior para os animais com dieta constituída por 20% desta macromolécula, e que não há a necessidade de se utilizar ração contendo proteína acima de 17,5% para se obter o crescimento ideal dos animais. Partindo-se do pressuposto que o crescimento dos animais objetos dessa pesquisa acontece até 60 dias (FUENTES et al., 2002), tais informações corroboram com as encontradas no presente estudo, uma vez que no momento da dissecação dos animais nutridos adultos maduros (grupo NN), por vezes, foram encontrados cálculos renais, o que não ocorreu nos demais grupos. Estas informações permitem afirmar que esses animais receberam excesso de proteína. Deste modo, a partir do momento que é findo o crescimento do animal, há a necessidade de diminuir a concentração de proteína na ração do animal adulto. Assim, a ração normoprotéica estabelecida neste estudo (20% de caseína) pode ser

importante para o crescimento e desenvolvimento do animal durante as fases infantil e púbere, até o início da fase adulta; porém, a mesma concentração protéica na idade adulta não tem papel fundamental no crescimento, podendo ser considerada hiperprotéica e, desta forma, gerar a retenção da proteína sobressalente.

6.2 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA

O animal subnutrido (S) apresentou tamanho e massa corporal inferiores ao animal nutrido de mesma idade. Do mesmo modo, os PCs destes animais apresentaram menor tamanho, evidenciado também pela análise tridimensional (MEV). Em relação ao número de células na camada condroblástica, região da cartilagem na qual há predomínio da secreção de matriz extracelular, o grupo S também apresentou diminuição em relação ao seu correspondente etário nutrido (grupo N). A densidade celular desses animais manteve-se proporcionalmente, tanto ao número de células quanto à área, uma vez que ambas também diminuíram. Tais dados mostram que a subnutrição pré-natal prolongada até o final da fase púbere (60 dias), causa diminuição tecidual como um todo, sugestivo de atraso no crescimento do animal. Essas informações são compartilhadas por Nunes et al. (2002) e Romani e Lira (2004), os quais confirmam que o baixo peso e o retardo no crescimento são os primeiros dados informados quando da promoção de qualquer tipo de subnutrição.

Entretanto, a proporção mantida dessa densidade demonstra que o animal está de certa forma, adaptado à condição protéica imposta, visto que o tecido sofreu como um todo. A partir disto, pode-se dizer, também, que a concentração baixa de proteína sem dúvidas colabora para que o animal seja prejudicado de maneira geral.

Em relação à espessura (ECPC) e número de células em fila (CF) das camadas constituintes da cartilagem do PC, o grupo S apresentou diminuição significativa apenas nas camadas articular e hipertrófica, comparativamente ao grupo N. Sendo assim, mesmo os animais tendo diminuído como um todo em

relação ao seu tamanho, número de células totais da camada condroblástica e à área total da cartilagem, quando se observou os parâmetros de espessura das camadas da cartilagem (ECPC) e número de células em fila (CF), notou-se que há aparente prioridade à preservação das camadas intermediárias, pré-condroblástica (p) e condroblástica (c), em detrimento das demais, articular (a) e hipertrófica (h). Tal fato indica que, apesar de o tecido ter sido afetado como um todo, nesta fase, ainda há a tentativa de retomada do seu desenvolvimento, uma vez que a região na qual predomina a multiplicação celular (camada pré-condroblástica), e a região responsável pela secreção de matriz cartilágnea (camada condroblástica), foram priorizadas quanto à preservação tecidual. Além disso, a avaliação da organização das camadas da cartilagem do PC dos animais do grupo S é mantida, indicando, mais uma vez, que há desenvolvimento tecidual priorizando o crescimento e a formação ósseas, o que é esperado nos animais sadios na fase púbere.

Ao observar-se os animais renutrídos adultos jovens (grupo R) verificou-se que os parâmetros de área da cartilagem e número de células na camada condroblástica, quando comparados com os animais nutridos de mesma idade (grupo N), foram recuperados, não havendo diferenças significantes entre os dois grupos, o que indica a retomada do crescimento, a partir da renutrição desde o 21º até o 60º dia de vida do animal. Desta forma, evidencia-se que a retomada do teor protéico na alimentação na fase púbere, é capaz de reestruturar o tecido, nos aspectos tanto de tamanho como da composição celular. Sob o aspecto qualitativo, notou-se que a organização tecidual das camadas do PC dos animais do grupo R foi retomada, uma vez que em nada diferia do que apresentou o grupo N. De fato, ao se analisar sob o aspecto quantitativo, evidenciou-se que os animais do grupo R apresentaram manutenção das espessuras de todas as camadas da cartilagem do PC (ECPC), bem como do número de células em fila (CF), compatível com o que foi verificado para o grupo N.

Os resultados da tipificação de colágeno na cartilagem do PC, analisados sob luz polarizada exibiram diferenças na quantidade de fibras colágenas dos tipos I e III entre os grupos nutridos (N e NN), e aqueles que sofreram com a subnutrição (S, R e RR). Assim, ocorreu o predomínio de

colágeno tipo III nos que foram subnutridos em alguma fase da vida, diferentemente do observado nos animais nutridos, onde predominou o colágeno do tipo I. No grupo S, principalmente na camada articular, e associando-se a isto a diminuição da sua espessura, o predomínio das fibras colágenas do tipo III sugere a ocorrência de atraso na maturação desta região frente à carência protéica; ou seja, a camada articular, resquício membranoso, onde o tecido é fibroso, com menor número de células, não é priorizada no desenvolvimento da cartilagem como um todo.

Sabe-se que elementos fibrosos compostos por colágeno tipo I são necessários para resistir cargas multidirecionais (MIZOGUCHI et al., 1990). Como o PC é uma estrutura que recebe constantemente cargas provenientes da mastigação, pode-se dizer que o PC dos animais subnutridos, por apresentar diminuição da composição de fibras colágenas do tipo I e deter de trabeculado ósseo subcondral mais amplo do que os demais grupos estudados, está mais susceptível a fraturas, o que é partilhado por Borrelli (2010).

A correção nutricional, que englobou o surto de crescimento púbere, avaliada no grupo R, foi capaz de promover a retomada da área, do número de células e da espessura de todas as camadas (ECPC), com o predomínio de colágeno tipo I em p, c, h. Houve, ainda, nesses animais, uma elevada deposição de fibras colágenas do tipo III. Tais dados sugerem uma evidente tendência à recuperação estrutural do PC, porém, ainda com algum atraso. De fato, a retomada em tamanho observada também sob MEV, a organização e as informações qualitativas a respeito do componente colágeno no grupo R, evidenciaram que a cartilagem deste grupo ainda é imatura para a sua idade, indicando dificuldades em se restabelecer a sua estruturação através do arcabouço conjuntivo.

Nos animais do grupo controle de 100 dias (NN) a área total da cartilagem, o número de células da camada condroblástica e a densidade celular foram semelhantes ao verificado para os animais nutridos de 60 dias. De maneira geral, as espessuras das camadas (ECPC) diminuíram dos 60 aos 100 dias, com menor diminuição na camada hipertrófica, que traduz a substituição do tecido cartilágneo pelo ósseo; ou seja, o tecido ainda encontra-se em desenvolvimento, mesmo na fase adulta. O número de células em fila

(CF) em cada uma das camadas no grupo NN foi semelhante ao grupo N, evidenciando que o tecido na fase adulta madura não apresenta crescimento. Isto deve-se ao fato de se estabelecer um padrão organizacional já no final da fase púbere, com preservação das camadas da cartilagem. Todavia, a diminuição da espessura total da cartilagem do PC e a desorganização das células em fila (CF) da camada condroblástica, caracterizam uma adaptação, agora funcional, para suportar pressões, e não mais para que se promova o crescimento. Tais informações corroboram com Silbermann et al. (1987) e Takahashi et al. (1996), ao relatarem que, durante o crescimento, a cartilagem do PC manifesta características tanto como placa de crescimento como cartilagem articular, funcionando apenas como uma cartilagem articular, no final do crescimento. Tiilikainen, Raustia e Pirttiniemi (2011) também relataram que, em ratos há a tendência de diminuição da espessura da cartilagem do PC com o avançar da idade. Além disso, ao se avaliar a estruturação do arcabouço conjuntivo, visualizado sob luz polarizada, foi nítido o predomínio de fibras colágenas do tipo I, próprio do tecido maduro. O grupo adulto maduro renutrido (RR) apresentou diversos parâmetros como tamanho do PC, área, número de células da camada condroblástica menores ao seu equivalente etário nutrido (NN). Entretanto, a densidade celular dos animais do grupo RR foi muito maior do que a dos animais do grupo NN, em virtude da drástica redução da área da cartilagem do PC. Ou seja, na cartilagem desses animais, ocorreu o predomínio de componentes celulares, indicando, ainda nessa fase, um potencial para o crescimento. Os dados referentes à espessura das camadas (ECPC) e número de células em fila (CF) também mostraram-se inferiores, evidenciando que, ao contrário do que foi visto no grupo R, a renutrição em longo prazo (grupo RR) não restabelece o que foi perdido na fase pré-púbere, ou seja, não é eficiente, muito embora, como já comentado, ainda persista o potencial para crescimento. É como se algum componente tecidual tivesse sido comprometido marcadamente, previamente à renutrição estabelecida aos 21 dias de vida. Assim, se fossem considerados somente os dados sobre a renutrição, associados ao elevado metabolismo existente na fase púbere, ou seja, se as avaliações terminassem neste estágio da vida do animal, seria interpretado que a renutrição seria capaz de restabelecer o crescimento em

qualquer fase, o que não se comprovou no grupo RR. A partir do esperado para a fase adulta, quando ocorre, naturalmente, a diminuição do metabolismo e há predomínio de colágeno tipo I na cartilagem do PC, indicando maturação tecidual, previsível para a idade, são evidentes os efeitos deletéreos causados pela renutrição a longo prazo (grupo RR). Prova disto é a composição colágena de todas as camadas da cartilagem do PC destes animais, as quais apresentam predomínio de colágeno tipo III, como tentativa, insuficiente, de restabelecer o padrão tecidual. Essas características mostram, mais uma vez, que o desenvolvimento do tecido está atrasado em relação à sua idade; porém nessa fase sabe-se que a retomada não pode ser atingida, mesmo que mantida a ração normoprotéica por tempo indeterminado.

As avaliações pelo método de Safranina – O, determinando-se a porcentagem de matriz cartilágnea (MC) nas camadas condroblástica (a) e hipertrófica (h), ou seja, do conteúdo de proteínas estruturais, proteínas adesivas, glicosaminoglicanas (GAG), proteoglicanas, entre outros; permitiram verificar que houve diminuição deste componente nos animais do grupo subnutrido (S). Isto mostra que a produção diminuída de MC pode estar associada ao menor número de células que estes animais apresentaram na camada condroblástica, uma vez que esta região é a maior responsável pela secreção de MC. A quantidade diminuída de MC resulta na dificuldade do tecido cartilágneo de suportar as células componentes das camadas de cartilagem do PC, podendo dificultar a proliferação e a migração celular entre as camadas para, em última instância, ocorrer a mineralização dos tabiques de matriz cartilágnea, e posterior deposição de matriz óssea. Além disso, a diminuição da matriz cartilágnea e, conseqüentemente de proteoglicanas, diminui a capacidade da cartilagem de resistir às forças de compressão, bem como a de atrair cátions e moléculas de água, conferindo hidratação e promovendo volume ao tecido (RAMIREZ-YANEZ, 2004). Essas informações corroboram com a diminuição do tamanho e da área dos PCs dos animais subnutridos, encontrados na presente pesquisa.

A renutrição até a fase de adulto jovem (grupo R) conseguiu restabelecer a quantidade, em porcentagem, de MC comparativamente ao seu correspondente etário nutrido (N). Isto deve-se ao fato de neste grupo renutrido

ter aumentado o número de células na camada condroblástica do PC em relação aos subnutridos, igualando-se estatisticamente ao grupo N. Assim, por consequência deste aumento, houve uma maior produção e secreção de MC na camada condroblástica (c). Esta matriz secretada foi capaz de dar suporte para o tecido subjacente, a camada hipertrófica (h), promovendo a sua manutenção.

O grupo adulto maturo (NN) apresentou diminuição da matriz cartilágnea, porém sem apresentar diferenças estatísticas significativas em comparação com o grupo N. Esse dado, associado à tendência de diminuição do número de células em fila (CF) das camadas condroblástica (c) e hipertrófica (h) nos animais do grupo NN, indicam que o metabolismo do tecido na fase de adulto maduro é diminuído, promovendo, assim, a capacidade de produção de matriz cartilágnea e da sua mineralização. Essas observações estão de acordo com as descrições de Tiilikainen, Raustia e Pirttiniemi (2011) ao relatarem que, em ratos, há a diminuição da matriz cartilágnea do PC, avaliada pela diminuição da expressão de matriz metaloproteinase, com o avançar da idade.

Os resultados referentes à quantidade de matriz cartilágnea nos animais do grupo RR, evidenciaram um considerável aumento da porcentagem de MC nos mesmos. A existência de maior quantidade de MC nos animais do grupo RR, demonstra uma predileção pela manutenção da matriz cartilágnea, com o intuito do tecido tentar conseguir manter o suporte para a displasia celular que ocorre na camada hipertrófica e, como consequência promover a mineralização dos tabiques de MC. Ou seja, a intenção é a de manter o crescimento do tecido, que nessa fase, ainda encontra-se em atraso.

Sabendo-se que a mandíbula tem crescimento pronunciado durante os períodos pré-púbere e púbere (BJORK; SKILLER, 1976), que são sincronizados com o crescimento linear em ambos os sexos (BJORK; HELM, 1967), é lícito admitir-se que a influência hormonal está presente neste local. A partir disso, foi considerada importante, no PC, a investigação do IR, um complexo heterodimérico, uma vez que este está submetido às influências hormonais e nutricionais (SAWAYA, 2006). Some-se a isto o fato do efeito da insulina no tecido de espécimes subnutridos não ser bem conhecido.

A presença do IR na cartilagem do PC foi bastante heterogênea, com muitas células não sensibilizadas. A camada articular da cartilagem demonstrou poucas células que contêm o IR transmembrana celular, local onde está localizado o receptor em questão. Isto condiz com a característica da camada, uma vez que contém fibroblastos e colágeno do tipo I, maduro; ou seja, é uma camada mais estável, que se modificou no grupo S, apenas com ligeira diferença na sua espessura. As camadas pré-condroblástica e condroblástica foram as que exibiram maior imunomarcção ao IR. Essa informação é plausível, uma vez a camada pré-condroblástica contém inúmeras células indiferenciadas e potencialmente diferenciáveis em fibroblastos ou condrócitos (RAMIREZ-YANEZ, 2004). Também como afirmam Hinton e Carlson (2005), os condrócitos em divisão da camada pré-condroblástica do PC apresentam potencial fenotípico duplo, podendo adquirir fenótipo condrogênico ou osteogênico, dependendo dos aspectos ambientais e funcionais da articulação. Assim, é essa região que contém um número maior de células que expressam o IR, haja vista que são as células desta camada potencialmente mitóticas e, por isso, vão receber influência de hormônios que determinam o crescimento do tecido, entre eles o Insulin-like growth factor (IGF) e a Insulina, também considerada um hormônio do crescimento (LARON, 2008). A camada condroblástica foi outra região do PC onde a imunomarcção ao IR foi considerável, comparativamente às demais camadas. Isto se deve à capacidade da Insulina promover o aumento da síntese de ácidos nucléicos e proteínas nas células desta camada, determinando a proliferação dos condrócitos (DELATTE et al., 2004), regendo, conjuntamente com demais hormônios, o crescimento da mandíbula. Vale ressaltar que o receptor avaliado (IR) promove, após a ligação com a Insulina, uma cascata intracelular que pode ser definida em três vias de sinalização: a primeira media o transporte de glicose; a segunda desempenha funções metabólicas e a terceira é responsável pelo crescimento celular (BOURA-HALFON; ZICK, 2009). Deste modo, a insulina dirige a maquinaria metabólica intracelular, de modo a produzir os efeitos desejados sobre o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas.

Segundo relato na literatura, os receptores de IGF também estão localizados com mais intensidade na camada pré-condroblástica e na camada condroblástica de ratos (MAOR; HOCHBERG; SILBERMANN, 1993) e, tanto os receptores de insulina como os receptores de IGF-1, ambos transmembrana, possuem a subunidade α , extracelular, que pode fazer ligação cruzada entre essas duas macromoléculas, uma vez que ambas possuem a tirosina kinase (TRK) como domínio. Esse mecanismo fornece bases estruturais para afirmar, que existe a cooperação negativa na ligação entre as duas moléculas no receptor de insulina e no receptor de IGF-1 (DE MEYTS, 2004). A partir disso, há a possibilidade dos receptores de insulina evidenciados no presente trabalho terem sido expressos pela insulina ou pelo IGF-1, de modo a serem necessários mais estudos para a diferenciação entre as ligações das duas moléculas.

Entretanto, é clara a observação de que a insulina participa como hormônio de crescimento na cartilagem do PC, juntamente com o IGF-1, uma vez que este último promoveu alteração da atividade proliferativa da cartilagem do PC (MOLTENI et al., 1999) participam diretamente do eixo GH-IGF-1 (GIUSTINA; MAZZIOTTI; CANALIS, 2008).

A partir da reação imunohistoquímica para o receptor de insulina, na cartilagem do PC foi observada a diminuição do número de células imunorreativas para este anticorpo no grupo subnutrido (S). Isto pode estar associado à diminuição do número de células no tecido, o que foi detectado através da mensuração pelo método de Azo-carmim, como descrito anteriormente. Nesta linha de raciocínio, admite-se a ocorrência da retomada no número das células imunorreativas ao IR no grupo renutrido de 60 dias (R), e a diminuição deste número no grupo renutrido de 100 dias, em comparação com o grupo NN. Isso evidencia que a expressão do receptor de insulina está diretamente relacionada com a maior ou menor quantidade de células na cartilagem do PC, e a quantidade de células, como foi observado, é drasticamente diminuída nos casos de subnutrição.

Sabe-se que a região óssea subcondral do PC apresenta metabolismo intenso, e participa do processo de crescimento da mandíbula. Desta forma, após reação imunohistoquímica ao IR nesta região, observou-se que os

animais subnutridos tiveram diminuição tanto do número de células sensibilizadas, como da área, demonstrando que a carência protéica influencia marcadamente no desenvolvimento desta região. A renutrição aos 60 dias (grupo R) apontou para um restabelecimento parcial quanto ao número de células imunorreativas, enquanto que a área dessa região foi restabelecida, estatisticamente, com a renutrição. Quando os grupos adultos maduros (NN e RR) foram confrontados, verificou-se a manutenção do número de células imunorreativas; porém com a diminuição da área do grupo RR, comparativamente ao grupo NN. Assim, mesmo com a área comprometida, o intenso metabolismo na região subcondral exibiu intensa atividade hormonal, própria de um tecido que, mesmo em uma idade avançada, procura se desenvolver. Tais informações corroboram com a análise qualitativa, quando se verificou que o trabeculado ósseo da região subcondral do PC é mais denso.

Como se sabe, a cartilagem do PC é uma cartilagem secundária, e um dos principais sítios de crescimento em comprimento e altura da mandíbula (FUENTES et al., 2002). A carga da força mastigatória e dos dentes em oclusão, é normalmente aplicada ao PC e varia em magnitude e direção (HONGO et al., 1989; BREUL, 2007). Considerando-se que a diminuição da densidade óssea e o predomínio de fibras colágenas do tipo III na cartilagem do PC de animais subnutridos, são fatores relacionados à subnutrição protéica imposta no presente estudo, pode-se inferir que, a partir da evidência de atraso no crescimento e desenvolvimento tecidual, o PC dos animais que sofreram com a subnutrição (S, R, RR), comparativamente com os animais nutridos (N, NN), são mais susceptíveis a fraturas.

A partir dos resultados constatados na presente pesquisa, a respeito das consequências oriundas da subnutrição, especificamente no PC e, segundo estudos existentes a respeito dessa doença, é lícito afirmar que esse estado carencial crônico compromete o desenvolvimento tecidual, sobretudo o infantil, e leva a problemas graves nos estágios mais avançados da vida.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Conforme o proposto na pesquisa, em adição à metodologia utilizada, os resultados proporcionaram fundamentadas proposições, permitindo concluir que:

1. Os animais subnutridos (S) apresentam apetite acentuado, ingerindo muito mais ração, comparativamente aos animais do grupo controle (N);
2. A subnutrição causou diminuição da área do PC; do número de células da camada condroblástica do PC, da densidade celular e da ECPC e CF das camadas do PC;
3. A porcentagem de matriz cartilaginosa (MC) com a subnutrição, diminuiu nas camadas condroblástica e hipertrófica da cartilagem do PC;
4. Com a subnutrição (grupo S) e a renutrição (grupos R e RR) ocorreu predominância de fibras colágenas do tipo III, comparativamente aos grupos nutridos (N e NN), que mostraram predomínio de fibras colágenas do tipo I;
5. Os parâmetros morfométricos e a porcentagem de MC na cartilagem do PC foram restabelecidos com a renutrição desde o 21º até o 60º dia;
6. O grupo NN apresentou aumento da densidade celular, tendência à diminuição da espessura da cartilagem do PC e desorganização das células da camada condroblástica;
7. O grupo renutrido de 100 dias (RR) apresentou os parâmetros morfométricos como área, número de células da camada condroblástica, ECPC e CF diminuídos;
8. A densidade celular do grupo RR aumentou significativamente em virtude da drástica diminuição da área da cartilagem do PC;

9. A renutrição desde o 21º até o 100º dia não restabeleceu a área do PC, o número de células e a ECPC e CF das camadas da cartilagem do PC;
10. O número de células totais imunorreativas ao IR na cartilagem do PC, bem como a área da cartilagem, diminuíram no grupo S, comparativamente ao grupo N; a densidade celular não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos;
11. O grupo RR, em comparação com o grupo NN, apresentou diminuição estatisticamente significativa em relação à área e número de células totais imunorreativas ao IR na cartilagem do PC;
12. A região subcondral do PC do grupo S apresentou área diminuída em relação ao grupo N;
13. Os grupos de 60 dias (N, S e R) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si em relação à densidade de células imunorreativas ao IR;
14. A densidade de células imunorreativas ao IR na região subcondral do PC do grupo RR aumentou acentuadamente em relação ao seu correspondente etário nutrido (grupo NN).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALIPPI, R. M.; BARCELO, A. C.; BARDI, M.; FRIEDMAN, S. M.; RIO, M. E.; BOZZINI, C. E. Effect of protein-free diet on growth of the skeletal units of the rat mandible. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 1, p. 9-13, 1984.

ANTHONY, L. E.; EDOZIEN, J. C. Experimental protein and energy deficiencies in the rat. **Journal of Nutrition**, v. 105, p. 631-648, 1975.

BAE, J. W.; TAKAHASHI, I.; SASANO, Y.; ONODERA, K.; MITANI, H.; KAGAYAMA, M.; MITANI, H. Age-related changes in gene expression patterns of matrix metalloproteinases and their collagenous substrates in mandibular condylar cartilage in rats. **Journal of Anatomy**, v. 203, p. 235–241, 2003.

BAPTISTA, J. S. **Repercussões morfológicas no timo de ratos jovens submetidos à desnutrição protéica e à renutrição precocemente corrigida**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BJORK, A.; SKILLER, V. Postnatal growth and development of the maxillary complex In: MCNAMARA JR., J. A. (Ed.). **Factors affecting the growth of the midface**. Michigan: University of Michigan, Center for Human Growth and Development, 1976. p. 61-101.

BJORK, A.; HELM, S. Prediction of the age of maximum pubertal growth in body height. **Angle Orthodontics**, v. 37, p. 134-143, 1967.

BOLDRINI, S. C. **Efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o crescimento craniofacial de ratos wistar: análise craniométrica, morfoquantitativa e ultra-estrutural**. 2003. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

BONJOUR, J. P.; AMMANN, P.; CHEVALLEY, T.; RIZZOLI, R. Protein intake and bone growth. **Canada Journal of Applied Physiology**, v. 26, p.153-66, 2001.

BORRELLI, J. JR.; ZAEGEL, M. A.; MARTINEZ, M. D.; SILVA, M. J. J. Diminished cartilage creep properties and increased trabecular bone density following a single, sub-fracture impact of the rabbit femoral condyle. **Journal of Orthopaedics Research**, v. 28, p. 1307-1314, 2010.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 296, p. 581–591, 2009.

BOUVIER, M. Effects of age on the ability of the rat temporomandibular joint to respond to changing functional demands. **Journal of Dentistry Research**, v. 67, p. 1206-1212, 1988.

BRESIN, A.; KILIARIDIS, S.; STRID, K. G. Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. **European Journal of Oral Science**, v. 107, p. 35-44, 1999.

BRETON, C.; LUKASZEWSKI, M. A.; RISOLD, P. Y.; ENACHE, M.; GUILLEMOT, J.; RIVIÈRE, G.; DELAHAYE, F.; LESAGE, J.; DUTRIEZ-CASTELOOT, I.; LABORIE, C.; VIEAU, D. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 296, p. 462-472, 2009.

BREUL, R. Biomechanical analysis of stress distribution in the temporomandibular joint. **Annals of Anatomy**, v. 189, p. 329-335, 2007.

CARLSON, D. S.; GRABER, L. A. W.; HOFFMAN, D. L. Experimental studies of growth and adaptation of TMJ. In: MCNAMARA, J. A. JR. (ED.). **Current advances in oral surgery**. Michigan: University of Michigan. 1st ed. p. 28-77, 1980.

CORNISH, R. J.; WILSON, D. F.; LOGAN, R. M.; WIEBKIN, O. W. Trabecular structure of the condyle of the jaw joint in young and mature sheep: a comparative histomorphometric reference. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p. 29-36, 2006.

COUPÉ, B.; GRIT, I.; DARMAUN, D.; PARNET P. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. **American Journal of Physiology – Regulatory and Integrative Comparative Physiology**, v. 297, p. 813-824, 2009.

DE ANGELIS, R. C. **Fisiologia da nutrição**. Editora Nobel, 1999. v. 2.

DELATTE, M.; VON DEN HOFF, J. W.; VAN RHEDEN, R. E.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: the femoral head and the mandibular condyle. **European Journal of Oral Science**, v.112, p. 156-162, 2004.

DE MEYTS, P.; PALSGAARD, J.; SAJID, W.; THEEDE, A. M.; ALADDIN, H. Structural biology of insulin and IGF-1 receptors. **Novartis Foundation Symposium**, v. 262, p. 160-171, 2004.

DE OLIVEIRA, B. C.; DE OLIVEIRA, F.; MARTINI, D. T.; PRISCO, C. R.; DA SILVA RIGUETTI, M. M.; LIBERTI, E. A.; DE CAMPOS BOLDRINI, S. 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.

DESAI, M.; BABU, J.; ROSS, M. G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. **American Journal of Physiology – Regulatory and Integrative Comparative Physiology**, v. 293, p. 306-314, 2007.

ENDO, Y.; MIZUTANI, H.; YASUE, K.; SENG, K.; UEDA, M. Influence of food consistency and dental extractions on the rat mandibular condyle: a morphological, histological and immunohistochemical study. **European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 26, p. 185-190, 1998.

ENGELBREGT, M. J.; VAN WEISSENBRUCH, M. M.; LIPS, P.; VAN LINGEN, A.; ROOS, J. C.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. **Bone**, v. 34, p. 180-186, 2004.

ENLOW, D. H. Mandibular reactions during growth. In: MCNAMARA, J. A. JR. (Ed.). **Determinants of mandibular form and growth**. Michigan: University of Michigan, Centre of Human Growth and Development, 1975.

ENLOW, D. H. **The human face**: an account of the postnatal growth and development of the craniofacial skeleton. New York: Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1968. p. 303.

FEHRENBACH, M. J.; HERRING, S. W. **Anatomia ilustrada da cabeça e do pescoço**. 1. ed. Editora Manole, 1998.

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, p. 643-654, 2002.

GIUSTINA, A.; MAZZIOTTI, G.; CANALIS, E. Growth hormone, insulin-like growth factors and the skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 535-559, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia médica**, 11. ed. Editora Elsevier, 2006.

HARVEY, N.; COOPER, C. The developmental origins of osteoporotic fracture. **Journal of the British Menopause Society**, v. 10, p. 14-15, 2004.

HINTON, R. J.; CARLSON, D. S. Regulation of mandibular condylar cartilage growth. **Seminars in Orthodontics**, v. 11, p. 205-219, 2005.

HONGO, T.; YOTSUYA, H.; SHIBUYA, K.; KAWASE, M.; IDE, Y. Quantitative and morphological studies on the trabecular bones in the condylar processes of the Japanese mandibles. Comparisons between dentulous and edentulous specimens. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 30, p. 67-76, 1989.

HUGHES, P. C. Morphometric studies of catch-up growth in the rat. **Program of Clinical Biology Research**, v. 101, p. 433-46, 1982.

KIM, S.; SYMONS, M.; POPKIN, B. M. Contrasting socioeconomic profiles related to healthier lifestyles in China and the United States. **American Journal of Epidemiology**, v. 15, p. 184-191, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE. Nutrition during pregnancy. Washington, DC: **National Academies Press**, 1990.

JOUSSE, C.; BRUHAT, A.; FERRARA, M.; FAFOURNOUX, P. Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like-growthfactor-binding protein 1 expression. **Biochemistry Journal**, v. 334, p. 147-153, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, E. J. **Histologia básica**. 35. ed. Ed. Guanabara, 1979.

- KUBOYAMA, N.; MORIYA, Y. Influence of diet composition and malocclusion on masticatory organs in rats. **Journal of Nihon University School of Dentistry**, v. 37, p. 9- 96, 1995.
- LARON, P. Insulin - a growth hormone. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, p. 11-16, 2008.
- LIVNE, E.; LAUFER, D.; BLUMENFELD, I. Osteoarthritis in the temporo-mandibular joint (TMJ) of aged mice and in vitro effect of TGF- β 1 on cell proliferation, matrix synthesis and alkaline phosphatase activity. **Microscopic Research and Technique**, v. 37, p. 314-323, 1997.
- LUNA, L. G. **Histologic staining methods of the Armed Forces**. Institute of Pathology, 3. ed. 1968. p. 62.
- 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 Endocrinology**, v. 128, p. 56-64, 1993.
- MAVROPOULOS, A.; BRESIN, A.; KILIARIDIS, S. Morphometric analysis of the mandible in growing rats with different masticatory functional demands: adaptation to an upper posterior bite block. **European Journal of Oral Science**, v. 112, p. 259–266, 2004.
- MIZOGUCHI, I.; NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, I.; KAGAYAMA, M.; MITANO, H. An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. **Histochemistry**, v. 93, p. 593–599, 1990.
- MOLTENI, A.; MODROWSKI, D.; HOTT, M.; MARIE, P. J. Alterations of matrix and cell-associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria. **Cell Tissue Research**, v. 295, p. 523-536, 1999.
- MOSS, M. L.; VILMANN, H. Studies on orthocephalization of the rat head. 1. A model system for the study of adjustive cranial skeletal growth process. **Gegenbaurs morphology Jahr**, v. 124, p. 559-579, 1978.
- MOYERS, R. E. **Ortodontia**. 4. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1991. p. 44-63.

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

NEWMAN, J. J.; STROME, D. R.; GOODWIN, C. W.; MASON, A. D.; PRUITT, B. A. Altered muscle metabolism in rats after thermal injury. **Metabolism**, v. 31, p. 1229-1233, 1982.

NEUMANN, C. G.; GEWA, C.; BWIBO, N. O. Child nutrition in developing countries. **Pediatric Annals**, v. 33, p. 658-674, 2004.

NIETO-VAZQUEZ, I.; FERNÁNDEZ-VELETO, S.; KRÄMER, D. K.; VILA-BEDMAR, R.; GARCIA-GUERRA, L.; LORENZO, M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, p. 183-194, 2008.

NUNES, M. L.; BATISTA, B. B.; MICHELI, F.; BATISTELA, F. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. **Journal of Pediatria**, v. 78, p. 39-44, 2002.

PIMSTONE, B. L.; BARBEZAT, G.; HANSEN, J. D.; MURRAY, P. Studies on growth hormone secretion in protein-calorie malnutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 21, p. 482-487, 1968.

POPKIN, B. M. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. **Nutrition Review**, v. 52, p. 285-98, 1994.

PORTO, G. G.; VASCONCELOS, B. C. E.; ANDRADE, E. S. S.; SILVA-JÚNIOR, V. A. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, p. 3-6, 2010.

PUCCIARELLI, H. M. Craniofacial development of the rat with respect to vestibular orientation. **Acta Anatomy**, v. 100, p. 101-110, 1978.

PUCCIARELLI, H. M.; OYHENART, E. E. Effects of maternal food restriction during lactation on craniofacial growth in weanling rats. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 72, p. 67-75, 1987.

RAMIREZ-YANEZ, G. O. The mandibular condylar cartilage: a review. **Revista Internacional de Ortopedia Funcional**, v. 1, p. 85-94, 2004.

- 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, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- RIZZOLI, R.; BONJOUR, J. P. Malnutrition and osteoporosis. **Zeitschrift fur Gerontologie und Geriatrie**, v. 32, p. 131-7, 1999.
- ROMANI, S. A. M; LIRA, P. I. C. Fatores determinantes do crescimento infantil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n. 1, p. 15-23, 2004.
- ROMEIS, B. **Mikroskopische Technick**. 6. ed. Oldenbourg: München, 1968.
- RYAN, J.; CORNISH, A. B.; DAVID, F.; WILSON, A. B.; RICHARD, M.; LOGAN, A.; OLE, W. Trabecular structure of the condyle of the jaw joint in young and mature sheep: a comparative histomorphometric reference. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p. 29-36, 2006.
- SANZ-SAMPELAYO, M. R.; FENOLLA, J.; EXTREMERA, F. G. Factors affecting the food intake, growth and protein utilization in the *Helix aspersa* snail. Protein content of the diet and animal age. **Laboratory Animals**, v. 25, p. 291-298, 1991.
- SAWAYA, A. L. Malnutrition: longterm consequences and nutritional recovery effects. **Estudos Avançados**, v. 20, p. 147-158, 2006.
- SAVINO, W.; DARDENNE, M.; VELLOSO, L. A.; SILVA-BARBOSA, S. D. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **Britishi Journal Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 11-16, 2007.
- SCHUMACHER, G. H. Regulative and adaptative factors in craniofacial growth. **Annals of Anatomy**, v. 181, p. 9-13, 1999.
- SHRADER, R. E.; ZEMAN, F. J. Skeletal development in rats as affected by maternal protein deprivation and postnatal food supply. **Journal of Nutrition**, v. 103, p. 792-801, 1973.
- SICHER, H.; LLOYD DUBRUL, E. **Anatomia bucal**. 6. Ed. Guanabara Koogan, 1977.

SILBERMANN, M.; REDDI, A. H.; HAND, A. R.; LEAPMAN, R. D.; VON DER MARK, K.; FRANZEN, A. Further characterization of the extracellular matrix in the mandibular condyle in neonatal mice. **Journal of Anatomy**, v. 151, p. 169–188, 1987.

SPANHEIMEIR, R.; ZLATEV, T.; UMPIERREZ, G.; Di GIROLAMO, M. Collagen productin in fasted and food-restricted rats: response to duration and severity of food deprivation. **Journal of Nutrition**, v. 121, p. 518-524, 1991.

TAKAHASHI, I.; MIZOGUCHI, I.; SASANO, Y.; SAITOH, S.; ISHIDA, M.; KAGAYAMA, M. Age-related changes in the localization of glycosaminoglycans in condylar cartilage of the mandible in rats. **Anatomy and Embryology**, v. 194, p. 489–500, 1996.

TAJIMA, Y.; KAWASAKI, M.; KURIHARA, K.; UEHA, T.; YOKOSE, S. Immunohistochemical profile of basic fibroblast growth factor and heparin sulphate in adult rat mandibular condylar cartilage. **Archives of Oral Biology**, v. 43, p. 873-877, 1998.

TIILIKAINEN, P.; RAUSTIA, A.; PIRTTINIEMI, P. Effect of diet hardness on mandibular condylar cartilage metabolism. **Journal of Orofacial Pain**, v. 25, p. 68-74, 2011.

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

VISNAPUU, V.; PELTOMÄKI, T.; RÖNNING, O.; SYRJANEN, S. Distribution of insulin-like growth factor-I mRNA in the mandibular condyle and rib cartilage of the rat during growth. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 791-798, 2002.

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

WARWICK, R.; WILLIAMS, P. L. **Gray anatomy** 35. ed. Editora Guanabara Koogan, 1979.

WEIJES, W. A. Mandibular movements of the albino rat during feeding. **Journal of Morphology**, v. 145, p. 107-124, 1975.

WERNETTE, C. M.; WHITE, B. D.; ZIZZA, C. A. Signaling proteins that influence energy intake may affect unintentional weight loss in elderly persons. **Journal of American Diet Association**, v. 111, p. 864-873, 2011.

WORLD HEALTH FORUM. **Health for all: how it looks now.**[S.l.], v. 4, n. 4, p. 333-344, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Nutrition for Health and Development. WHO Global Database on Child Growth and Malnutrition, 2004. Disponível em: <<http://who.int.nutgrowthdb>>. Acesso em: 15/07/2011.