DIANA DE OLIVEIRA VONO

Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere: avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR e da insulina e seu receptor

São Paulo

2012

DIANA DE OLIVEIRA VONO

Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere: avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR e da insulina e seu receptor

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo

2012

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

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

6/1/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2538
FMVZ

Vono, Diana de Oliveira

Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púber: avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR e da insulina e seu receptor / Diana de Oliveira Vono. -- 2012.
68 f.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Subnutrição. 2. Mucosa palatina. 3. IGF-I. 4. Insulina. 5. IGF-IR.
6. Receptor de insulina. I. Título.

ERRATA

VONO, D. O. Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere: avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR e da insulina e seu receptor. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Leia-se

Página	Onde se lê
Abstract	Morphological repercussion of the effects of pre and post-natal protein under nutrition and of post-natal re-feeding on the palatine mucosa of wistar rats in puberal phase: morphometric evaluation and of IGF-I and IGF-IR expression and of insulin and its receptor. MSc Dissertation (Master of Science).

VONO, D. O. Morphologic repercussions of the protein malnutrition pre and postnatal and postnatal refeeding on the palatal mucosa of Wistar rats in the pubescent phase: structural evaluations and the expressions of the IGF-I and IGF-IR, Insulin and your receptor. [Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere: avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR e da insulina e seu receptor]. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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:

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.

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

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.029.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 075/06/CEEA datado de 22.06.06, por solicitação da Profa. Dra. SILVIA DE CAMPOS BOLDRINI, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos Mariana Pazos Henrique Sedo, Aline Gonçalves, Lucilene Ferreira Luiz, Diana Alves de Oliveira ao projeto 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"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 04 de junho de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere: Avaliações Morfométricas e da Expressão do IGF-I e IGF-IR e da Insulina e seu Receptor”, protocolado sob o nº 2321/2011, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research “Morphologic repercussions of the effect protein malnutrition pre and postnatal and postnatal renutrition on the palatine mucosa of Wistar rats in the pubescent phase: Morfometrics evaluations and of the IGF-I e IGF-IR, Insulin and your Receptor”, protocol number 2321/2011, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 17 de novembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VONO, Diana de Oliveira

Título: Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere: avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR, insulina e seu receptor.

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.(a)_____

Instituição:_____

Prof.Dr.(a)_____

Instituição:_____

Prof.Dr.(a)_____

Instituição:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nelson e Sílvia, fonte e razão de minha existência. E ao meu príncipe irmão, Adriano que sem sua inspiração e personalidade eu não seria nada. Ao meu marido Cássio, amigo e companheiro. Pela paciência, amor e respeito pelo meu trabalho e vida. Eu te amo! E não menos importante, à Sachis sua amizade incondicional é uma grande fortaleza.

À mulher magnífica, doce, gentil Prof^a. Dra. Silvia de Campos Boldrini, pelo exemplo de bondade e força invencível, mantendo-se simples, boa, pura, séria, temente aos deuses, gentil e apaixonada, vigorosa em todas as suas atitudes. Guerreira para viver como a filosofia gostaria que vivesse, ajudando aos homens de forma honrada e digna. Afirmo com muita honra que foi um prazer conviver e aprender não só anatomia, mas sim, a ser uma pessoa melhor. Ela acreditou em meu potencial. Sinto sua falta, mas tenho certeza, aonde quer que esteja que sua presença sempre estará conosco, nos fortalecendo e acalentando. Muito obrigada pela oportunidade e credibilidade a mim oferecida, saiba que jamais será esquecida, como você mesmo dizia: “simplesmente por ser amor”. (*In memoriam*)

Ao querido e corajoso homem, Prof^o Dr. Edson Aparecido Liberti, a quem tenho profunda estima, exemplo de luta mesmo nos momentos de tormenta, sempre estive à disposição de todos. Sua bravura é admirável, seus conhecimentos são ilimitados, nosso “anatomossauo”! Sempre pude contar com o senhor e conte sempre comigo, além de um grande mestre é um grande amigo. Por sua dedicação, coragem, força, humildade e acolhimento, que Deus sempre o proteja, pois o coração dá vida a tudo que ama, verdadeiro, simples e sincero sendo bastante compatível com a natureza deste homem, muito obrigada! Nós do LAFACC, ou simplesmente, a (**Família Liberti-Boldrini**), pois é assim que nos sentimos em relação a vocês, os nossos pais. Saiba que tem uma grande família ao seu redor e nós o amamos. VQM para sempre!

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Pai, Senhor Deus, sem Você nada disso seria possível.
- Ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- A Prof^a. Dra. Maria Angélica Miglino pela oportunidade oferecida em seu Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, compreensão e sabedoria em um momento bem difícil de nossas vidas. Comandando com braço forte e personalidade marcante, mulher vivaz, muito obrigada.
- Aos professores do Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo, Dra. Carla Roberta de Carvalho Oliveira, Dr. Ângelo Rafael Carpinelli e Dr. Fabio Bessa Lima pelo apoio e orientação.
- À Marta Maria da Silva Righetti, Sônia Regina Yokomizo e Sebastião Aparecido Boleta pelos ensinamentos e momentos agradáveis.
- À Lucilene Ferreira Luiz pela amizade incondicional desde nossa graduação até o presente momento, essa amizade será eterna, obrigada por todos os momentos divertidíssimos que passamos até nos momentos mais complicados conseguimos transcender e não nos abalamos.
- À Cibele Carla Guimarães de Souza pelo enorme carinho e amizade, juntas desde sempre, sem seus conselhos muito deste trabalho teria sido em vão.
- À Aline Gonçalves por sua meiguice, amizade e ensinamentos, momentos de muitas risadas, obrigada!
- À Regina de Souza Bolina Matos e ao Paulo Henrique de Matos Alves pela força e calma transmitidas para o ingresso em meu mestrado, pela solicitude, amabilidade e acima de tudo sinceridade e humildade para ajudar ao próximo sem ver a quem. Tenho certeza de que serão professores a altura do Prof^o Edson e da Prof^a Sílvia, sem a ajuda de vocês isto não seria possível.

- Aos Professores Dra. Mônica Bielavsky e Dr. Jefferson Victor Russo pelas importantes orientações e acima de tudo, pela amizade e atenção com as quais sempre me atenderam.
- Ao querido Prof. Dr. Dorival Terra Martini que, sempre transpareceu interesse pelo trabalho, dedicado e principalmente amigo, um grande talento com o qual tive a oportunidade de trabalhar, conviver e aprender muito no laboratório. Obrigada por tudo!
- Ao meu amigo Ricardo Bandeira, pois sem você, eu não teria conhecido meus mentores: Prof^a. Sílvia e Prof^o. Edson e não teria feito parte desta família. Apesar do período conturbado de nossas vidas, saiba que você é muito especial, um grande amigo, e por isso, obrigada por tudo mesmo.
- Aos colegas do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (**LAFACC-ICB/USP**): Josemberg da Silva Baptista, Willian Mayer, Carlos Eduardo Seyfert, Catarina Tivani, Bruna Cecília Caixeta, Marcelo Arthur Cavalli, Flávia de Oliveira, Mariana Pazos, Eduardo Henrique Beber, Valquíria Barboza Mariotti, Thiago Habacuque, Mamãe Thelma Parada Marsola, Cristina Bolina, Karina do Valle, Any Kelly Lima, Joice Naiara Bertaglia, Jodonai Barbosa, Naiane Clebis e Ricardo Fontes pela convivência, contribuição, aprendizado e confusões que somente nos aproximaram, para trilharmos nossos caminhos de forma divertida e responsável.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Estudos.
- Aos secretários do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP, Maicon e Jaqueline, por terem me ajudado quando mais precisei, ou seja, sempre. E pela amizade, adoro vocês!
- A Sra. Cleide Rosana Duarte Prisco, responsável pelo setor de estatística do ICB/USP, pela análise dos dados e pela dedicação, compreensão, momentos agradáveis. Ensinaamentos que jamais serão esquecidos, principalmente quando se trata de Excel, plantinhas voadoras e cascas de cebolas, esse palato deu trabalho! Obrigada!

- E às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci, 1452-1519)

RESUMO

VONO, D. O. **Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere: avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR e da insulina e seu receptor.** [Morphologic repercussions of the protein malnutrition pre and postnatal and postnatal refeeding on the palatal mucosa of Wistar rats in the pubescent phase: structural evaluations and the expressions of the IGF-I and IGF-IR, Insulin and your receptor]. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Atualmente reagrupou-se sob o nome de subnutrição calórico-protéica uma série de afecções de carência antigamente descritas com diversos nomes e que tinham uma etiologia comum, a insuficiência alimentar, acarretando, ao mesmo tempo um emagrecimento e um esgotamento progressivo do estoque de proteínas do organismo. A partir de alterações na quantidade e qualidades dos alimentos ingeridos, o organismo busca regular seu metabolismo visando atingir a homeostase, na qual os hormônios desempenham papel fundamental. Dessa maneira, a desnutrição protéica e a secreção de insulina foram aqui correlacionados na avaliação morfológica e funcional do epitélio oral, representando, respectivamente, grave alteração nutricional (à semelhança da que acomete a população, especialmente, de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento) e resposta produzida pela alteração do metabolismo energético das células. Os fatores de crescimento insulino-símile tipos 1 e 2 (IGF-I e IGF-II) são os principais fatores endócrinos determinantes do crescimento fetal. A maioria das ações conhecidas do IGF-I é mediada via um receptor tirosina-quinase, conhecido como IGF-IR. Recentemente, a insensibilidade ao IGF-I foi identificada como uma das causas de retardo de crescimento sem recuperação espontânea do desenvolvimento na vida pós-natal. Sendo assim, o presente trabalho tem o objetivo de estudar, através de métodos morfométricos, na mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere submetidos à desnutrição protéica pré e pós-natal e a renutrição pós-natal, o padrão celular e o componente colágeno da lâmina própria, bem como a expressão do IGF-I, do IGF-IR e da insulina e seu receptor, no intuito de

encontrar possível correspondência entre as alterações metabólicas e morfofuncionais, decorrentes da depleção protéica. Para tanto, foram formados os seguintes grupos experimentais constituídos por animais heterogênicos ($n=3$) de acordo com a ração oferecida, protéica ou hipoprotéica: nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) com 60 dias de idade, por ser essa a fase do final do período púbere, e renutridos (**R**), formado por animais do grupo D que, a partir do 21º dia (época do desmame) foram submetidos à ração protéica até atingirem 60 dias de idade. Os espécimes foram processados rotineiramente para microscopia de luz (HE, Azo-carmin e Picro-sírius) e para imunohistoquímica (IGF-I, IGF-IR e insulina e seu receptor) e os dados morfoquantitativos analisados estatisticamente. Os resultados demonstraram que os parâmetros metabólicos tais como: alimentar, massa corporal, excreção de fezes, urina e ingestão de água, diferiram em todos os grupos semana após semana ($S1 \neq S2 \neq S3 \neq S4 \neq S5 \neq S6$). A densidade de células epiteliais foi constatada pelo método de coloração H.E. e imunomarcadas com insulina e IGF-I e seus respectivos receptores. A subnutrição determinou um aumento significativo de células reativas a insulina (**I**) e seu receptor (**IR**) em relação ao grupo renutrido e nutrido (**I**: $S \neq R$; $p < 0.05$) e (**IR**: $S \neq N$; $S \neq R$; $p < 0.05$). O grupo R não obteve aumento significativo de células imunomarcadas, assim, diferiu significativamente em relação ao grupo N para os hormônios IGF-I e seu receptor IGF-IR ($R \neq N$; $p < 0.05$). O número de células da mucosa palatina modifica-se pouco na fase púbere e o seu desenvolvimento normal é sensível à depleção protéica, de modo que o tecido não é capaz de responder ao restabelecimento protéico.

Palavras-chave: Subnutrição. Insulina. Palato. IGF-I. Mucosa Oral. Morfometria.

ABSTRACT

Morphological repercussion of the effects of pre and post-natal protein under nutrition and of post-natal re-feeding on the palatine mucosa of wistar rats in puberal phase: morphometric evaluation and of IGF-I and IGF-IR expression and of insulin and its receptor. MSc Dissertation (Master of Science).

VONO, D. O. **Repercussões morfológicas dos efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a mucosa palatina de ratos Wistar na fase púbere:** avaliações morfométricas e da expressão do IGF-I e IGF-IR e da insulina e seu receptor. [Morphologic repercussions of the protein malnutrition pre and postnatal and postnatal re-feeding on the palatal mucosa of Wistar rats in the pubescent phase: structural evaluations and the expressions of the IGF-I and IGF-IR, Insulin and your receptor]. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Currently it has been grouped and named protein-caloric under nutrition a series of deficiency described in the past under several denominations with similar etiology, the food deficiency which leads simultaneously to a weight loss and progressive decrease of protein storage in the body. From the changes in the quantity and quality of ingested food, the organism tries to regulate its metabolism in order to homeostasis, in which the hormones play a fundamental role. This way, the protein under nutrition and the insulin secretion were here correlated in the morphological and functional evaluation of the oral epithelium representing high nutritional change (similarly to one which affect people specially from under developed countries) and response produced by changes in the energetic metabolism of the cells respectively. The grown factors insuline-símile type 1 and 2 (IGF-I and IGF-II) are the principal endocrine factors which determine the fetal growth. Many known actions of the IGF-I are mediated via tyrosine-kinase receptor known as IGF-IR. Recently, the insensibility to IGF-I was identified as one of the reason for the regrowth without abrupt recovery of the development in the post-natal life. Therefore, the present work aims to study, the cellular standard and the collagen of lamina propria, as well as the expression of the IGF-I, of the IGF-IR and the insulin and its receptor, using morphometric methods in the palatine mucosa of wistar rats in the pubertal phase subject to protein under nutrition pre and post natal and post-natal re-feeding with the objective of finding possible association between metabolic and morph functional changes coming from protein depletion. For this purpose, the following experimental groups were formed: heterogenic animals (n=3) according to the diet offered protein or hyperprotein diet: nourished (**N**) and undernourished (**D**) with 60 days of age (finish of pubertal phase), and re-nourished (**R**), formed by animals of D group that, from the 21st day (weaning day) were subject to protein diet up to 60 days of age. The specimens were processed routinely for light microscopy (HE, Azo-carmin and Picro-sírius) and for immunohistochemistry (IGF-I, IGF-IR and insulin and its receptor) and the morph quantitative data statistically analyzed. The results demonstrate that the metabolic parameters such as: food, body mass, feces excretion, urine and

water ingestion differ in all groups weekly ($S1 \neq S2 \neq S3 \neq S4 \neq S5 \neq S6$). The density of epithelial was observed by HE method and immune-marked with insulin and IGF-I and their respective receptors. The under nutrition determined a significant increase of the cells reacting to insulin (**I**) and its receptor (**IR**) in relation to re-nourished and nourished groups (**I**: $S \neq R$; $p < 0.05$) and (**IR**: $S \neq N$; $S \neq R$; $p < 0.05$). No significant increase of immune-marked cells was observed in the R group, thus, differing significantly when comparing to N group for the hormones IGF-I and its receptor IGF-IR ($R \neq N$; $p < 0.05$). The number of palatine mucosal cells has changed little in the pubertal phase and its normal development is sensitive to protein depletion, so the tissue cannot respond to the protein replacement.

Key words: under nutrition. Insulin. Palate. IGF-I. oral mucosa. Morphometry

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ALGs	Ácidos graxos livres
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DP	Desvio padrão
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GH	Growth hormone
g	Grama
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-IR	Insulin-like growth factor receptor
I	Insulina
IR	Receptor de Insulina
LAFACC	Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia
mg	Miligramas
ml	Mililitros
N	Grupo experimental nutrido de 60 dias
PBS	Solução salina Tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Grupo experimental renutrido de 60 dias
S	Grupo experimental subnutrido de 60 dias
S1-S6	Semanas de 1 a 6
TGI	Trato gastrointestinal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Palato duro de rato onde foram realizadas duas secções transversais ao longo do eixo da região representadas pelas linhas tracejadas.....	36
Figura 2 - Dissecção do espécime para microscopia de luz.....	38
Figura 3 - Corte da mucosa palatina corada em HE e sistema teste de pontos para determinação da densidade celular epitelial.....	41
Figura 4 - Grupos N,S e R sob luz polarizada para evidenciação das fibras colágenas coloração pelo método de Azo-carmim.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa corporal (g), grupos N, S e R ao longo de seis semanas (S1-S6).....	44
Tabela 2 – Ingestão alimentar (g), grupos N, S e R ao longo de seis semanas (S1-S6).....	45
Tabela 3 – Ingestão de água (mL), grupos N, S e R ao longo de seis semanas (S1-S6).....	47
Tabela 4 – Excreção de urina (mL), grupos N, S e R ao longo de seis semanas (S1-S6).....	48
Tabela 5 – Excreção de fezes (g), grupos N, S e R ao longo de seis semanas (S1-S6).....	49
Tabela 6 – Porcentagem da insulina e de seu receptor (%).....	50
Tabela 7 – Porcentagem de IGF-I e de seu receptor IGF-IR (%).....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Média e desvio padrão da massa corporal semanal (g).....	45
Gráfico 2 - Média e desvio padrão de ingestão alimentar semanal (g).....	46
Gráfico 3 - Média e desvio padrão de ingestão de água (mL)	47
Gráfico 4 - Média e desvio padrão de excreção de urina semanal (mL)	48
Gráfico 5 - Média e desvio padrão de excreção de fezes semanal (g)	49
Gráfico 6 - Média e desvio padrão de número de células de HE.....	50
Gráfico 7 - Média e desvio padrão da porcentagem de células marcadas por insulina (I)	51
Gráfico 8 - Média e desvio padrão da porcentagem de células marcadas por receptor de insulina (IR).....	51
Gráfico 9 - Média e desvio padrão da porcentagem de células marcadas por IGF-I.....	52
Gráfico 10 - Média e desvio padrão da porcentagem de células marcadas por IGF-IR.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 A SUBNUTRIÇÃO	25
2.1.1 Repercussões morfológicas da subnutrição	27
2.1.2 Metabolismo das proteínas	28
2.1.3 Nível sérico de insulina.....	29
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE GH,IGF-I E INSULINA	29
3 PROPOSIÇÃO	33
3.1 PROPOSIÇÃO GERAL.....	33
3.1.1 Proposição específica.....	33
4 MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.1.2 Análise diária dos parâmetros metabólicos.....	37
4.2 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	38
4.2.1 Colorações histológicas.....	39
4.2.2 Imunohistoquímica para IGF-I, IGF-IR, insulina (I) e receptor de insulina (IR).....	39
4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA	40
4.3.1 Tratamento estatístico	42
5 RESULTADOS.....	44

5.1 ANÁLISE METABÓLICA	44
5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS EPITELIAIS	50
5.3 ANÁLISE QUALITATIVA	53
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O epitélio bucal é classificado como epitélio escamoso estratificado, cuja função principal é a de proteção, formando barreiras contra ações mecânicas, invasões de microorganismos e impedindo a perda de fluídos teciduais, pois apresenta células intimamente aderidas e pequeno espaço intercelular. Quando queratinizado apresenta-se formado por quatro camadas assim classificadas: basal, profunda, (com células cuboidais onde ocorrem mitoses); espinhosa, (espessa, apresentando células poligonais com pontas); granular, (com células achatadas contendo grânulos queratohialinos) e camada queratinizada, a mais superficial, que apresenta células em forma de discos achatados ou escamas, podendo conter ou não os próprios núcleos, caracterizando, respectivamente a paraqueratinização e a ortoqueratinização. Quando não queratinizado, contém apenas as camadas basal e espinhosa (MOSS, 1983).

Segundo Kutuzov e Sicher(1952, 1953), a superfície do palato de ratos Wistar e camundongos se divide em 4 partes: região átrio oral, que se estende dos incisivos até a papila incisiva; região antemolar, situada entre papila incisiva e molares e contém três rugas antemolares transversas; região intermolar, compreendida medialmente aos molares e apresenta cinco rugas intermolares e região pós-rugal, que se estende da metade do terceiro molar até o limite posterior do palato duro.

Histologicamente o palato mole é composto por cinco camadas: o epitélio oral, do tipo escamoso estratificado; lâmina própria composta por tecido conjuntivo; camada glandular apresentando tecido glandular; aponeurose palatina contínua com o músculo tensor do véu palatino e epitélio nasal do tipo colunar ciliado pseudoestratificado. O epitélio oral da transição entre o palato duro e o mole se apresenta de formas diferentes, que variam de acordo com a região que se encontra. Na zona central exibe semelhanças às papilas fungiformes da língua, contendo calículos gustatórios e interdigitações irregular; na zona intermediária, se apresenta regularmente e com poucos calículos e na zona lateral, que se continua com os epitélios bucal e faríngeo, possui

superfície relativamente lisa, interdigitações regulares e ausência de calículos gustatórios. O tecido glandular, contendo ácinos separados por septos de tecido conjuntivo delgado, constitui cerca de 70% da mucosa, e compõe a camada mais espessa do palato mole. A lâmina própria da mucosa do palato mole é mais espessa na zona lateral e mais delgada na zona central, e contém fibras elásticas, e feixes de fibras colágenas, orientados paralelamente à superfície. Após estudos de transplantes, Karring et al. (1975) sugerem que as características do epitélio escamoso estratificado da cavidade bucal resultam da ação de indutores desconhecidos provenientes do tecido conjuntivo da lâmina própria, que influenciada por diversos fatores extrínsecos ou intrínsecos, está sujeita a alterações que podem incidir sobre o epitélio.

Dentre esses fatores, a subnutrição, principalmente aquela que ocorre durante a gestação e que incide no crescimento de qualquer órgão ou tecido na fase de intensa proliferação celular, deve ser levada em consideração, uma vez que os tecidos encontram-se muito sensíveis a agressões e, dependendo do momento em que ocorre, sua duração e intensidade, pode causar efeitos nocivos, algumas vezes irreversíveis.

A subnutrição representa um problema universal de Saúde Pública. É uma patologia multifatorial, podendo ser desencadeada por baixa ingestão alimentar associada à pobreza e/ou a infecções, podendo aparecer sob duas formas: o Marasmo (decorrente de uma deficiência energética) e o Kwashiorkor (deficiência protéica) (NEWSHOLME; LEECH, 1984). Geralmente aparecem juntas, podendo haver predominância de uma sobre a outra (SHILS; OLSON; SHIKES, 1994). Existem vários tipos de subnutrição, nesse trabalho tratamos da subnutrição protéica. O metabolismo das proteínas é bastante complexo, estas não são substâncias inertes, estão em perpétua modificação; os aminoácidos unem-se entre si, de maneira constante, sob ação de incontáveis enzimas, numa certa ordem, para formarem as inúmeras proteínas de nosso organismo. É por essa razão que devemos consumir diariamente, sob forma de proteínas, os aminoácidos necessários à manutenção de nosso estoque, pois elas representam uma parte importante na constituição de todos os tecidos. Os epitélios de revestimento têm a taxa de renovação relacionada à manutenção da sua integridade bem como aquela dos tecidos subjacentes. Esses epitélios

são especialmente vulneráveis a fatores nutricionais, de maneira que mudanças na integridade estrutural da mucosa oral podem indicar a deficiência de inúmeras substâncias, inclusive de proteína (DREIZEN, 1989).

Analisando a subnutrição protéico-calórica pré-natal, Winkler e Nakamoto (1982), demonstram uma série de alterações histológicas na mucosa oral de ratos recém-nascidos, tais como redução do número de células e aumento do tamanho das mesmas. Já a subnutrição pré-natal protéica somente, também foi capaz de promover alterações no tamanho das papilas conjuntivas da lâmina própria, responsáveis por ancorar o epitélio oral na mucosa palatina (BOLDRINI et al., 1998). Em estudo recente (ABREU et al., 2006), demonstraram que a deficiência protéico-calórica em ratos adultos de 90 dias, durante um período de 45 dias, não foi capaz de alterar a estrutura da mucosa lingual na região anterior, apesar de inferir que a má nutrição estaria relacionada às glossites, e que um estudo de situações crônicas e induzidas em espécimes em desenvolvimento, inclusive no período pré-natal seriam importantes para o esclarecimento desses pontos, visto já ter sido afirmado por Engelberg et al. (2004) que a subnutrição bem como outras influências adversas, quando aparecem na vida fetal ou imediatamente após o nascimento, alteram permanentemente a estrutura corporal, a fisiologia e o metabolismo, sendo capazes de conduzir a doenças crônicas em períodos tardios da vida.

A subnutrição é um potente estimulador de estresse e causa aumento nos níveis e na ação catabólica do cortisol. Além disso, a deficiência alimentar diminui a ação anabólica de síntese de tecidos dependente de insulina. Esse balanço hormonal leva à diminuição do hormônio responsável pelo crescimento, fator de crescimento insulina símile tipo 1 (IGF-I). Estudos em animais de laboratório têm mostrado que essas alterações hormonais causam alterações vasculares (diminuição da elasticidade dos vasos) e renais (diminuição do número de néfrons). A razão cortisol-insulina alta e IGF-I baixo também diminui o ganho de massa muscular e o crescimento linear (SAMAYA et al., 2003).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A SUBNUTRIÇÃO

O quadro de subnutrição é um estado fisiológico que aparece quando as necessidades orgânicas de proteína e energia, ou ambas, não são satisfeitas pela dieta, ocasionando amplas manifestações, como perda de peso e atraso no crescimento, primeiras alterações detectáveis em crianças e em animais durante a fase de vida pré-amadurecimento sexual. Além disso, a associação do déficit calórico-protéico com menor ingestão de nutrientes específicos induz quadro de imunocompetência, com aumento significativo das doenças infecciosas (HOFFER, 1994).

Para Chandra (1992), a subnutrição é uma síndrome complexa, onde diversas deficiências ocorrem simultaneamente. Os indivíduos subnutridos manifestam sinais clínicos provenientes da inadequação quantitativa (energia) e qualitativa (nutrientes) da dieta ou decorrentes de doenças que determinem o mau aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos (MONTEIRO, 1995).

Em termos populacionais, a desnutrição protéico-calórica pode afetar todos os grupos etários, mas sua ocorrência é maior e mais facilmente detectável em crianças e jovens. Nestas populações a ocorrência de desnutrição está associada à dificuldade de obtenção de alimento por seus próprios meios, associada com pouca higiene, o que aumenta a incidência de diarreia e outras infecções. Em função dos altos custos relacionados ao tratamento das infecções secundárias ao quadro de desnutrição, existe, por parte de pesquisadores dos países desenvolvidos, grande interesse em se desenvolver fórmulas nutricionais baratas, acessíveis e eficientes para se reduzir a desnutrição (CAMPANA, 1985).

Admite-se que a subnutrição intra-uterina e no primeiro ano de vida produzem mudanças morfológicas e funcionais em vários tecidos e órgãos. As anormalidades metabólicas e funcionais observadas na vida adulta como

intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemias, resistência à insulina, dependem da fase da vida em que a subnutrição ocorre, do tipo e da intensidade da carência nutricional. Presume-se que a restrição protéica imposta durante a vida intra-uterina é capaz de produzir danos morfológicos e funcionais irreversíveis nas células beta pancreáticas, nos hepatócitos e nos tecidos muscular e adiposo.

Em modelos animais, Widdowson e McCance (1975) demonstraram que durante a vida fetal existem “períodos críticos” de rápida divisão celular. Esses “períodos críticos” diferem entre vários tecidos, por exemplo, o rim e o pâncreas que o crescimento depende do suprimento de oxigênio e de nutrientes e o feto adapta-se à sua redução diminuindo a taxa de divisão celular, imediatamente à semana anterior ao nascimento.

A taxa de divisão celular é reduzida tanto pelo efeito direto da subnutrição sobre as células quanto pela alteração da concentração de hormônios e fatores de crescimento, sendo a insulina, o hormônio do crescimento (GH: growth hormone), entre outros particularmente importantes. Períodos curtos de subnutrição reduzem irreversivelmente o número de células, esse é um dos mecanismos pelos quais incluem mudanças nas distribuições celulares, modificando ou programando o organismo, na estrutura dos órgãos, no feedback hormonal e na atividade metabólica (LUCAS, 1991).

Os primeiros relatos de “síndromes” associadas à desnutrição protéico-calórica datam da década de 30, quando foi descrita a Kwashiorkor, uma forma edematosa da doença mais freqüente depois de 18 meses de idade, uma vez que até então só se conhecia a forma marasmática da desnutrição (CAMPANA, 1985).

O desenvolvimento gradual do quadro de subnutrição pode ocorrer em semanas ou meses, período no qual ocorrem ajustes metabólicos e comportamentais que resultam numa adequação do metabolismo basal à nova demanda energética. Estas alterações incluem ajustes na secreção de hormônios, assim como na fisiologia celular (LONGSTREET; KEYS, 1950; YOUNG ; SCRIMSHAW, 1971; HOFFER, 2001).

2.1.1 Repercussões morfológicas da subnutrição

As alterações morfológicas determinadas pela subnutrição nos filhotes de vários espécimes podem ser verificadas em diversas partes do corpo. Na pele, além da espessura reduzida, o processo de queratinização é pouco acentuado e as camadas granulosa e córnea estão ausentes (NAEYE, 1965; LANSDOWN, 1978).

No aparelho locomotor, principalmente os ossos, verifica-se uma redução em seu tamanho e um atraso no aparecimento dos centros de ossificação, em relação à idade gestacional (ADAMS, 1997; SHRADER; ZEMAN, 1973). Os Músculos caracterizam-se por apresentar alterações estruturais, bem como uma redução significativa no diâmetro das fibras (ROY et al., 1972; HAJ et al., 1986).

Os ossos são submetidos a uma constante remodelação funcional. As diversas possibilidades de desenvolvimento relacionadas aos ossos são representadas em vários níveis, onde se incluem as mudanças estruturais ocorridas durante o crescimento. Esses níveis são representados pelo controle genético e hormonal do crescimento ósseo, incluindo principalmente fatores metabólicos, como os efeitos nutricionais.

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

2.1.2 Metabolismo de proteínas

Os aminoácidos liberados diariamente pela proteólise do músculo, o principal repositório endógeno, uma grande parte cicla de volta na síntese protéica. No entanto, até 50g são irreversivelmente degradados. Portanto, a ingestão diária na dieta de 50g de proteína originalmente é suficiente para repor o que é perdido. Todas as proteínas são compostas dos mesmos 20 aminoácidos, sendo esses necessários para a síntese protéica normal, portanto, uma deficiência de até mesmo um único aminoácido essencial perturba esse processo.

Durante a primeira e segunda infâncias, aproximadamente 40% da ingestão protéica devem consistir de aminoácidos essenciais, de modo a manter o crescimento. A deficiência de proteínas pode ocorrer em vários contextos, variando desde países pobres até hospitais e casas geriátricas. No primeiro caso, o suprimento disponível de proteína é muito baixo ou caro demais. No último caso, uma atenção insuficiente foi prestada às considerações nutricionais durante um período de alimentação assistida ou artificial. A taxa de síntese protéica corporal total diminuída quando a dieta é severamente deficiente em energia, em proteínas totais ou em um dos aminoácidos essenciais. Em tais situações, a taxa de degradação das proteínas geralmente também diminui, mas não na mesma extensão que a velocidade da síntese, de modo que resulta em perda de proteína corporal.

2.1.3 Nível sérico de insulina

Quanto aos níveis séricos de insulina frente à desnutrição, sabe-se que as células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, trabalham sem o padrão bifásico, ou seja, 50% da insulina secretada no período pós-prandial, ou fase rápida de secreção de insulina, desaparecem como o que ocorre no diabetes do tipo 2 (FERREIRA, 2002), fazendo da secreção total de insulina nas ilhotas, diminuída frente à desnutrição. Também se sabe que em indivíduos submetidos a dietas hipoprotéicas ocorre albuminemia (LUNN; AUSTIN, 1993; WIKES et al., 1996), aumento dos ácidos graxos livres e redução das proteínas totais no plasma (KUMAR; DEO; RAMALINGASWANI, 1972; CLAYESSENS et al., 1990; LATORRACA et al., 1998). Esses indivíduos apresentaram insulinemia reduzida e glicemia mantida, que indica um possível aumento de sensibilidade dos hipoprotéicos à insulina. Em organismos normais se sabe que a ação das terminações nervosas, junto às células β do pâncreas estimulam a secreção de insulina e ocorre que a ação dos agonistas muscarínicos sobre a mesma secreção, nos ratos desnutridos, provoca a sua diminuição mesmo na presença de glicose (WOODS; PORTE, 1974; HERMANS; SCHMEER; HENQUIN, 1986; BOSQUERO et al., BORDIN et al., 1995).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE GH, IGF-I E INSULINA

A primeira demonstração de que a ação do hormônio de crescimento (GH) sobre o crescimento esquelético seria uma ação indireta mediada por um outro fator (teoria da somatomedina) data de 1957, quando SALMON; DAUGHADAY observaram que a sulfatação da cartilagem era estimulada por

soro de animais normais, mas não por soro de animais com hipopituitarismo; e que esta propriedade era recuperada após o tratamento destes animais com hormônio do crescimento, mas não pela simples adição de GH ao meio de cultura. Esse fator inicialmente denominado *sulfatation factor activity*, foi posteriormente renomeado somatomedina e finalmente IGF (*Insulin-like Growth Factor*) ou fator de crescimento insulina similar. Assim, o eixo do GH passou a ter uma configuração semelhante à maioria dos demais eixos hormonais, onde o hormônio secretado pela hipófise estimularia a produção periférica de outros hormônios que seriam responsáveis pela sua ação final. As duas formas de IGF, IGF-I e IGF-II, guardam grande homologia estrutural com a molécula de insulina, o que permite aos IGFs, além de exercerem suas ações via receptores específicos (receptor tipo 1 e tipo 2), ligarem-se também aos receptores de insulina, que apresentam estrutura semelhante ao receptor tipo 1 dos IGFs, ou ainda a receptores híbridos compostos por um hemi-receptor tipo 1 e um hemi-receptor de insulina (MARTINELLI et al., 2002). Os IGFs são produzidos na maioria dos órgãos e tecidos, sendo o fígado a principal fonte dos IGFs circulantes. Suas ações autócrinas, parácrinas e endócrinas são observadas na maioria dos tecidos do organismo. Diversos fatores estão envolvidos na regulação da síntese dos IGFs. O GH é um dos principais promotores da produção de IGF-I, cuja síntese é também estimulada pelos hormônios tireoideanos, esteróides sexuais, insulina e influenciada pelo estado nutricional.

Esta complexa interação do eixo GH-sistema IGF com diversos outros eixos endócrinos e sistemas do organismo faz com que modificações do crescimento sejam manifestações precoces de diversas doenças em indivíduos que ainda não completaram a maturação óssea.

As ilhotas do pâncreas secretam dois grandes hormônios, insulina e glucagon. Estes hormônios são reguladores rápidos e poderosos do metabolismo. Juntos eles coordenam o fluxo e o destino metabólico da glicose endógena, dos ácidos graxos livres (ALGs), aminoácidos e outros substratos que garantem que as necessidades energéticas sejam preenchidas no estado basal e durante o exercício. Além disso, eles coordenam a distribuição eficiente dos nutrientes adquiridos através das refeições. Eles realizam estas funções primariamente por ações no fígado, na massa muscular e no tecido adiposo.

Glucagon e Insulina são liberados em resposta ao fluxo de nutrientes do intestino e em resposta secretagogos intestinais. As células endócrinas das ilhotas surgem de ancestrais endotérmicos comuns, originalmente na porção duodenal do intestino e mais tarde localizadas nos dutos pancreáticos.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Correlacionar a renovação epitelial da mucosa oral que reveste o palato mole de ratos Wistar, frente à subnutrição e a renutrição, na fase púbere.

3.1.1 Proposição específica

- Estimar na mucosa oral, a densidade de células sensibilizadas com o IGF-I, IGF-IR, insulina e seu receptor na mucosa palatina;
- Avaliar, qualitativamente, o componente colágeno relacionado à estrutura do palato mole.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos e fêmeas jovens não isogênicos (n=3), da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 60 dias de vida e com peso variando entre 280 e 320 gramas para os machos, e 200 e 250 gramas para as fêmeas. O acasalamento foi realizado mantendo-se um macho com duas fêmeas durante um período de 7 a 10 dias, quando foi oferecida sem restrições, uma ração para roedores AIN-93G, que segue as especificações do protocolo preconizado pelo “American Institute of Nutrition” (REEVES et al., 1993), e preparada em laboratório especializado (Rhoster). Durante o período de acasalamento, alguns animais receberam uma ração denominada **protéica** (contendo 20%) de caseína e outros, uma ração **hipoprotéica** (com 5% de caseína). Após o acasalamento, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais de acordo com as rações oferecidas formando, respectivamente, os grupos de animais nutridos (**N**) e subnutridos (**S**). Desta forma, foram mantidas com as respectivas dietas durante a gestação e a amamentação, junto aos filhotes, até que estes atingissem 21 dias de vida, época determinada para o desmame. A partir do 22º dia, os filhotes de ambos os grupos foram mantidos com suas respectivas dietas até que completassem 60 dias de vida, constituindo assim os grupos experimentais **N** e **S**. Para a formação do grupo renutrido (**R**) foram utilizados animais desnutridos que, a partir do 22º dia, passaram a receber a ração protéica, até que atingissem 60 dias de vida. O período de 60 dias foi estabelecido por corresponder, segundo Viau et al. (2005), à fase púbere do rato.

A partir do 22º dia, os animais dos grupos (**N**, **S** e **R**) foram acondicionados em gaiolas metabólicas com as respectivas dietas, para mensuração de peso, ingestão de ração e água, excreção de fezes e de urina, e possíveis alterações nutricionais. A sala das gaiolas foi mantida com controle

de temperatura média 24° C, por meio de aparelho de ventilação com fotoperíodo de 12 horas.

Aos 60 dias de vida, os animais de todos os grupos (**N**, **S** e **R**) foram submetidos à eutanásia em câmara de gás (CO₂), e tiveram a região palatina dissecada em bloco e com os dentes superiores, através de um corte transversal passando imediatamente acima do assoalho da cavidade nasal. Em seguida, os blocos foram imediatamente imersos em solução fixadora de formaldeído a 4 % tamponada, onde permaneceram por um período de 48 horas. Após lavagem em água corrente durante 24 horas, praticou-se no palato, duas seções transversais ao longo eixo da região, conforme ilustra a figura 1.

Figura 1- palato duro do rato onde foram realizadas duas secções transversais ao longo eixo da região, representadas pelas linhas tracejadas. A parte utilizada para estudo foi a delimitada pelas linhas

4.1.2 Análises diárias dos parâmetros metabólicos

Através de um protocolo que contou com análises diárias de todos os parâmetros metabólicos, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa: estante com 12 gaiolas metabólicas, contendo tubo coletor de fezes e urina separadamente, bem como bebedouro e comedouro. A gaiola possui espaço destinado ao animal de acordo com os princípios da Comissão de Ética do ICB; todas as gaiolas continham marcação para cada animal; os comedouros e bebedouros continham coletor de desperdício, bem como os coletores individuais de fezes e urina.

Balança em ajuste com recipiente que foi utilizado na pesagem do animal, para então considerá-lo, assim como ocorreu a 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). O bebedouro é graduado em mililitros com coletor de desperdício da ingestão de água coletada. A soma nos dá a informação de quanta água o animal ingeriu durante o dia do experimento.

Na parte inferior da gaiola, ficam os recipientes separados para a coleta de excreção, tanto sólida como líquida durante o dia do experimento. Como o líquido excretado em pequenas quantidades se mantinha pela propriedade da tensão superficial preso as paredes do funil presentes no compartimento inferior da gaiola, podendo ser 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.

Todas as marcações dos dados foram registradas em pasta de controle, tomados diariamente através das gaiolas metabólicas, até atingirem os 60 dias de vida para posteriormente serem eutanasiados em câmara de gás (CO₂) e processados para a microscopia de luz.

4.2 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os espécimes assim obtidos foram preparados rotineiramente, conforme figura 2, para histologia como descrito a seguir. Inicialmente, foram imersos em solução de EDTA a 10% para descalcificação, onde permaneceram por um período de 30 dias, sendo a solução trocada em intervalos de 48 horas. Para avaliar o processo de descalcificação, a cada período de troca, os espécimes eram colocados em solução de Oxalato de Amônio a 5%, na proporção de 5:1. Comprovada a desmineralização, os espécimes foram lavados em água destilada, desidratados em série crescente de alcoóis (70° ao absoluto), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes transversais semi-seriados de 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo (LEICA SM 2000R), montados em lâminas apropriadas e, após desparafinados (duas semanas em estufa a 60°C), foram submetidos às diferentes técnicas de coloração em histologia, e de imunohistoquímica.

Figura 2- Dissecção do espécime para a microscopia de luz

4.2.1 Colorações histológicas

Foram empregadas as técnicas de HE (BEHMER; TOLOSA; FREITAS NETO, 1975); do Azo-carmin (ROMEIS, 1968) e do Picro-sírius (JUNQUEIRA et al., 1979) para tipificação das fibras colágenas, analisado sob luz polarizada. Para cada coloração, Uma lâmina (contendo 10 cortes) de cada animal de todos os grupos, foi utilizada para cada coloração. As lâminas foram então montadas entre lâmina e lamínula com resina apropriada (Enthelan®).

4.2.2 Imunohistoquímica para IGF-I, IGF-IR, insulina (I) e receptor de insulina (IR)

Após desparafinização em estufa a 60°C durante o período noturno, os cortes foram processados nas seguintes etapas: diafanização em xilol, rehidratação em série decrescente de álcoois (desde o absoluto até 50° - 2 min. cada) e em seguida, lavagem em água destilada por 5 minutos. Após a lavagem, os cortes foram expostos à H₂O₂ (3%, diluída em Metanol 100%) por 30 minutos, e novamente lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), por 5 minutos. A incubação foi realizada em soro normal de cabra, na proporção 1:5 em solução salina tamponada com fosfato (PBS), a 37° C por 30 minutos. Para a incubação com o anticorpo primário, a fim de realizar a marcação da insulina e de seu receptor, foram usados os anticorpos anti-insulin (H-86)¹ e anti-insulin R β (H-70)¹, respectivamente, na diluição 1:250, que por prévia titulação foi considerada a mais adequada. Para a marcação do IGF-I e IGF-IR foram usados, respectivamente, os anticorpos anti-IGF-I (H-70)¹ e anti-IGF-IR (H-60)¹ na diluição 1:250, também a mais adequada, por prévia

¹Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

titulação. Findo o período de incubação de duas horas em câmara úmida, os cortes foram lavados em PBS (4x 10 min) e incubados em anticorpo secundário de cabra anti-mouse IgG biotinilado durante 30 minutos a 37° C, na proporção de 1:200, diluído em PBS. Em seguida, foram lavados com Triton X a 0,01%

diluído em PBS. Com um preparo de 30 minutos de antecedência, os cortes foram incubados com Vectastain ABC¹, também diluído em PBS, na proporção de 1:100, por 30 minutos. Após lavagem com PBS por 5 minutos e reagidos com DAB² por 8 minutos, à temperatura ambiente, os cortes foram lavados com água destilada por 5 minutos, desidratados em séries crescentes de alcoóis (70%, 95% e 100% - 2x cada), diafanizados em Xilol e montados com Enthelan® entre lâmina e lamínula.

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

A determinação da densidade de células epiteliais foi realizada por meio um sistema de imagem² devidamente calibrado e com câmera³ acoplada a um microscópio de luz⁴ do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC) do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Para a avaliação da densidade de células do epitélio da mucosa palatina, foi utilizado um sistema-teste medindo 10x10cm, com 100 pontos fixos e sistematicamente equidistantes, elaborado em uma folha de acetado transparente, conforme preconizado por Mandarin de Lacerda (1995).

Desta forma, em 5 cortes de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, e corados pelos métodos da HE e imunohistoquímicos (insulina, receptor de

¹ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

² Axiovision (Carl Zeiss)

³ AxioCam (Carl Zeiss)

⁴ Axioskop (Carl Zeiss)

insulina, IGF-I, receptor de IGF-I) foram fotografados 3 campos (com objetiva de 40x), perfazendo um total de 15 campos por grupo (**N**, **S** e **R**), relativo a cada marcação.

Sobrepondo-se o sistema-teste à imagem projetada na tela do computador, inicialmente foram contados os pontos que incidiam sobre as células epiteliais evidenciadas pela técnica da HE, que representaram, assim, a densidade normal dessas células para cada grupo. Em seguida, foi aplicada a mesma metodologia sobre as imagens das imunomarcações, cuja densidade celular foi expressa como porcentagem relativa às células contadas nas imagens de HE (Figura 3).

Figura 3- **A**-Corte da mucosa palatina corado com HE, onde se identifica a camada queratinizada (**CQ**), a camada epitelial (**CE**), a papila epitelial (**PE**) e a lâmina própria (**LP**). Sobre a imagem, um exemplo de sistema teste de pontos, a fim de se determinar a densidade de células epiteliais. **B**-Corte da mucosa palatina evidenciando células imunorreativas à insulina (**setas azuis**), destacando-se daquelas não reativas (**setas vermelhas**). (Barra de calibração= 10µm)

4.3.1 Tratamento estatístico

Os dados relativos à análise metabólica foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com dois fatores: grupo e semana como medidas repetidas seguida por comparações múltiplas pelo método de Bonferroni. Os dados relativos às densidades celulares foram submetidos à ANOVA com 1 fator (grupo), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, com nível de significância $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os espécimes aqui utilizados representam parte de uma amostra, obtida de um “pool” de animais utilizados em diferentes pesquisas desenvolvidas no LAFACC. Os parâmetros metabólicos relativos à massa corporal, ingestão de ração, ingestão de água e excreta de fezes e urina descritos a seguir, foram determinados e comparados entre os grupos **N**, **S** e **R**.

5.1 ANÁLISE METABÓLICA

Os animais do grupo **N** foram tomados como referência, ou controle. Ao se avaliar a tabela 1 e o gráfico 1 relativos à massa corporal verificou-se que, na primeira semana, os grupos **S** e **R** não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si, apresentando um peso bem menor do que o verificado para o grupo **N** ($p < 0.05$). Nas demais semana todos diferiram ($p < 0.05$). Semana após semana, **N** e **R** apresentaram diferença significativa, ambos predominando sobre **S**.

Tabela 1 - massa corporal (g)

	N	S	R
S1	68,54 ± 6,14	23,84 ± 2,83	30,71 ± 5,46
S2	110,60 ± 10,29	29,04 ± 5,55	58,69 ± 10,57
S3	150,78 ± 14,41	37,17 ± 8,75	90,69 ± 16,17
S4	188,95 ± 17,29	43,85 ± 10,77	123,77 ± 20,12
S5	230,90 ± 21,70	50,77 ± 13,73	160,04 ± 26,74
S6	263,68 ± 26,28	58,15 ± 17,30	193,90 ± 27,99

Tabela 1- Média (± Desvio Padrão) da massa Corporal (g) dos animais dos grupos Nutrido (N), Subnutrido (S) e Renutrido (R), ao longo de seis semanas (S1-S6)

Gráfico 1 - Média e desvio padrão do massa corporal (g) semanal

Quando analisado os parâmetros da ingestão alimentar, todos os grupos (**N**, **S** e **R**) diferiram, entretanto, na sexta semana **R** não diferiu de **N**. No grupo **S** após a segunda semana, não se observou aumento da ingestão alimentar. A ingestão aumentou até a terceira semana no grupo **N** sendo que, após a quarta semana, não a ingesta estabilizou-se. No grupo **R** ocorreu diferença significativa até a quarta semana; a quinta semana não diferiu da sexta semana, indicando uma diminuição na ingestão alimentar, a partir de S4 (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 2 - Ingestão Alimentar (g)

	N	S	R
S1	9,94 ± 1,12	4,49 ± 0,93	6,22 ± 1,23
S2	13,29 ± 1,44	7,39 ± 2,05	10,34 ± 1,97
S3	15,42 ± 1,52	9,20 ± 3,48	12,83 ± 1,71
S4	17,51 ± 2,30	9,33 ± 1,67	14,72 ± 1,89
S5	17,36 ± 2,00	8,31 ± 2,69	15,71 ± 2,34
S6	17,82 ± 2,19	8,11 ± 3,50	16,57 ± 2,54

Média (± Desvio Padrão) da ingestão alimentar (g) dos animais dos grupos Nutrido (N), Subnutrido (S) e Renutrido (R), ao longo de seis semanas (S1-S6)

Gráfico 2 - Média e desvio padrão da ingestão alimentar (g) semanal

Referente à ingestão de água semanal, houve diferença entre os 3 grupos (**N,S,R**) em todas as semanas. No grupo **S**, a primeira semana diferiu das demais semanas (S2-S6), e S2 e S3 diferiram de S5 e S6 sendo que, a partir de S4 não se observa diferença significativa entre as semanas.

Os dados expresso na tabela 3 e gráfico 3 permitem verificar que o grupo **N** obteve um aumento na ingestão de água da primeira semana até a quarta semana; a partir da quinta semana, a ingestão estabilizou-se (S4=S5=S6). Relativamente ao grupo **R**, ocorreu diferença significativa na ingestão de água em todas as semanas, exceto na quinta e na sexta semanas, que não apresentaram diferenças significantes.

Tabela 3 - Ingestão de Água (mL)

	N	S	R
S1	15,77 ± 3,40	4,75 ± 2,10	9,80 ± 2,49
S2	21,92 ± 5,97	10,14 ± 3,30	15,02 ± 3,60
S3	26,09 ± 6,51	10,10 ± 2,92	20,31 ± 0,71
S4	34,40 ± 7,31	12,81 ± 4,72	26,17 ± 5,81
S5	37,05 ± 9,36	13,93 ± 4,53	30,32 ± 5,09
S6	38,19 ± 9,67	15,94 ± 7,10	30,16 ± 6,70

Média (± Desvio Padrão) da ingestão de água (mL) dos animais dos grupos Nutrido (N), Subnutrido (S) e Renutrido (R), ao longo de seis semanas (S1-S6).

Gráfico 3 - Média e desvio padrão da ingestão de água (ml) semanal

Quando se analisou o parâmetro excreção de urina (Tabela 4 e Gráfico 4), verificou-se diferenças significantes entre os 3 grupos, em todas as semanas. O grupo S apresentou diferença significativa somente a partir de S3 sendo que a partir de S4 não foram detectadas diferenças significantes (S4=S5=S6).

No grupo N há diferença significativa na excreção de urina semanalmente até S4, que difere somente de S6; no grupo R foi detectada diferença significativa entre todas as semanas, exceto entre S5 e S6.

Tabela 4 - Excreção de urina (ml)

	N	S	R
S1	8,30 ± 2,58	1,67 ± 1,09	4,09 ± 2,0
S2	11,18 ± 4,62	3,27 ± 2,42	8,27 ± 2,55
S3	14,81 ± 5,09	4,16 ± 2,72	10,39 ± 2,85
S4	20,30 ± 6,11	6,81 ± 4,41	15,06 ± 4,03
S5	22,80 ± 8,00	7,62 ± 3,76	18,38 ± 4,70
S6	24,65 ± 8,76	8,18 ± 3,70	19,55 ± 4,87

Média (± Desvio Padrão) da excreção de urina (mL), dos animais dos grupos Nutrido (N), Subnutrido (S) e Renutrido (R), ao longo de seis semanas (S1-S6).

Gráfico 4 - Média e desvio padrão da excreção de urina (ml) semanal

Na primeira semana, apenas **R** e **N** apresentaram diferenças. Na terceira semana, também ocorreu diferença entre **S** e **N**. Já na quarta semana todos os grupos apresentaram diferenças entre si.

O grupo **S** aumentou sua excreta semanalmente, estagnando a partir da quinta semana, tendo apenas significância entre a terceira e sexta semanas. No grupo **N** houve diferença significativa entre as semanas, exceto na quinta e sexta

semanas. Da primeira semana até a quarta apresentou aumento significativo, logo após não houve diferenças significativas. Tabela 5 e gráfico 5.

Tabela 5 - Excreção de fezes (g)

	N	S	R
S1	0,78 ± 0,20	0,48 ± 0,17	0,40 ± 0,20
S2	1,51 ± 0,20	0,91 ± 0,30	0,91 ± 0,36
S3	1,77 ± 0,28	1,26 ± 0,56	1,30 ± 0,32
S4	2,17 ± 0,43	1,19 ± 0,33	1,65 ± 0,38
S5	2,53 ± 0,50	1,04 ± 0,35	1,68 ± 0,42
S6	2,53 ± 0,45	0,83 ± 0,37	1,88 ± 0,49

Média (± Desvio Padrão) da excreção de fezes (g), dos animais dos grupos Nutrido (N), Subnutrido (S) e Renutrido (R), ao longo de seis semanas (S1-S6)

Gráfico 5 - Média e desvio padrão da excreção de fezes (g) semanal

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS EPITELIAIS

Na tabela 6 e gráficos 6-8 estão expressos os dados relativos à média ($\pm$ desvio padrão) da densidade de células epiteliais evidenciadas pela técnica de coloração H.E., e imunorreação com insulina e seu receptor, para os diferentes grupos (**N**, **S** e **R**).

Tabela 6 - Porcentagem de insulina e do receptor (%)

	HE	I	IR
S	99,33 $\pm$ 2,08	50,63 $\pm$ 8,27 ^b	56,70 $\pm$ 6,81 ^{ab}
N	121,33 $\pm$ 39,93	33,83 $\pm$ 10,36	40,27 $\pm$ 3,38 ^a
R	91,67 $\pm$ 7,37	28,54 $\pm$ 3,30 ^b	29,02 $\pm$ 6,45 ^b

% I: S $\neq$ R (ANOVA, $p < 0.05$) % IR: S $\neq$ N; S $\neq$ R (ANOVA, $p < 0.05$)

Gráfico 6 - Média e desvio padrão do número de células HE

Gráfico 7- Média e desvio padrão da porcentagem de células marcadas por insulina

Gráfico 8 - Média e desvio padrão da porcentagem de células com receptor de insulina (IR)

A densidade celular de células imunoreativas, tanto para a insulina como para seu receptor foi maior no grupo **S**, quando comparada aos grupos **R** e **N**; entre esses grupos, a densidade maior foi observada para o grupo **N**, relativamente ao insulina-receptor.

Na tabela 7 e figuras 9 e 10, estão demonstradas as médias ($\pm$ desvio padrão) das porcentagens das células imunomarcadas para o **IGF-I** e o seu receptor, o **IGF-IR**.

Tabela 7- Porcentagem de IGF-I e do receptor de IGF-I

	IGF-I	IGF-IR
S	59,34 ± 3,30	56,76 ± 4,10
N	75,36 ± 19,47 ^a	78,68 ± 22,0 ^a
R	38,72 ± 6,76 ^a	34,73 ± 9,56 ^a

%IGF-I e %IGF-IR: R≠N (ANOVA, p<0.05)

Gráfico 9 - Média e desvio padrão da porcentagem de células IGF-I

Gráfico10 - Média e desvio padrão da porcentagem de células IGF-IR

Relativo ao **IGF-I**, o grupo **S** exibiu uma porcentagem de células estatisticamente maior em relação ao grupo **R**. Para esse hormônio, muito embora tenha sido observada uma tendência ao aumento da porcentagem de células imunomarcadas, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, quando comparado aos grupos **S** e **N**. As mesmas observações foram feitas, ao se analisar o receptor IGF-IR.

5.3 ANÁLISE QUALITATIVA

Ao se avaliar, pelo método Azo-Carmim, os cortes da mucosa palatina do grupo **N**, observaram-se elevações papilares pontiagudas, e o tecido epitelial escamoso queratinizado espessado, com suas camadas epiteliais bem definidas. As papilas da superfície de interface epitélio-tecido conjuntivo apresentaram-se com formas regulares, apresentando o tecido conjuntivo subjacente, fibroblastos densamente dispostos. Observa-se elevações. Sob luz polarizada, evidenciou-se a presença de uma trama densa de fibras colágenas

do tipo I (vermelho, amarelo e laranja) e do tipo III (verde), com aparente predomínios das primeiras (Figura 4 A e D).

Comparativamente ao grupo controle (**N**), a espessura da camada queratinizada apresentou-se mais delgada no grupo **S**, sendo as camadas basal, espinhosa e granular frouxamente arranjadas, e com núcleos mais globosos. Sob luz polarizada, detectou-se o predomínio de fibras colágenas do tipo I na lâmina própria, e do tipo III nas papilas conjuntivas (Figura 4 B e E).

O epitélio presente no grupo **R** apresentou-se desorganizado, no que se refere às suas camadas, distinguindo-se espaços circulares ou ovalados, onde não foram detectadas células constituintes do epitélio. A camada queratinizada estava delgada ou ausente em determinados trechos, e, relativamente às fibras colágenas, houve um equilíbrio na distribuição das fibras do tipo I e do tipo III na sua lâmina própria (Figura 4 C e F).

Figura 4 - A e D (**Grupo N**) Setas pretas demonstrando as papilas pontiagudas, asterisco nas camadas epiteliais bem definidas e setas brancas identificando as papilas da lâmina própria. Sob Luz polarizada predominância de fibras colágenas do tipo I (vermelhas, laranjas e amarelas). Figura 4 B e E (**Grupo S**) Asterisco demonstrando as camadas espinhosa, granular e lâmina própria frouxamente arranjadas. Setas brancas identificando as papilas conjuntivas. Sob luz polarizada predominância de fibras colágenas do tipo I (vermelho, laranja e amarelo) na lâmina própria, e no epitélio, fibras colágenas do tipo III (verde). Figura 4 C e F (**Grupo R**) Seta preta indicando trecho com ausência de camada queratinizada. Asterisco indicando espaços ovalados e circulares sem detecção das células do epitélio. Equilíbrio na distribuição de fibras colágenas dos tipos I e III

6 DISCUSSÃO

Quando se avalia de forma sucinta os aspectos da desnutrição, verifica-se que ainda são necessários maiores esclarecimentos relativos à subnutrição severa e, tendo em vista tratar-se de uma síndrome sistêmica e complexa, compreende-se que o modelo nutricional utilizado nesta pesquisa reflete a situação apresentada em países em desenvolvimento. Tal modelo, utilizando a subnutrição protéica severa é apropriado, por ser o principal tipo de subnutrição nos países em desenvolvimento, dada a oferta de alimentos altamente ricos em carboidratos (MONTEIRO, 1995; MONTE, 2000), padecendo a fisiologia do organismo com a perda de aminoácidos estruturais indispensáveis (SLOBODIANIK et al., 1989). Os diferentes processos de subnutrição descritos na literatura promoveram alterações morfofuncionais importantes, tornando os modelos experimentais apropriados para o esclarecimento de algumas questões (PICHARD, 1997; BAPTISTA, 2008). Sendo assim, o retardo de crescimento e baixo peso, que são os primeiros parâmetros observados quando se promove a subnutrição, foram confirmados com o modelo experimental aqui utilizado, permitindo considerá-lo viável para a observação de possíveis alterações estruturais que a ausência da caseína possa promover, nos diferentes tecidos.

Desta forma, na tentativa de esclarecer algumas questões, observou-se, em primeiro lugar, que o período de 60 dias foi o suficiente para promover alterações importantes no desenvolvimento corpóreo dos animais dos grupos **S** e **R**, corroborando com trabalhos que se utilizaram de protocolos com subnutrição protéica, onde foram verificadas diferenças estruturais significantes nos animais nutridos e renutridos (CASTELUCCI et al., 2002; GOMES et al., 2006; OLIVEIRA, 2006; MISAWA, 2007).

Essas observações vão ao encontro dos dados da pesquisa Sawaya (2006) que, após análise da recuperação nutricional de crianças subnutridas,

verificou um ganho no comprimento, mas um retardo no ganho de massa corpórea, juntamente com a densidade mineral óssea, evidenciando que a carência protéica determinou alterações relevantes, o que foi confirmado no tecido alvo da presente pesquisa, ou seja, a mucosa palatina.

Relativamente à renutrição, também se pode concordar com Dickerson et al. (1972) que, estudando os efeitos de uma dieta hipoprotéica após o desmame e Dickerson e Hughes, (1972), que avaliando a recuperação de ratos que foram subnutridos durante a gestação e amamentação, relataram que alguns ossos não recuperavam seu tamanho. De fato, ao se avaliar os efeitos da renutrição na mucosa palatina foi possível evidenciar-se que os filhotes que até os 21 dias de vida eram subnutridos, ao serem renutridos (grupo **R**), não ganharam peso suficiente em relação ao grupo **N** e nem retomaram parâmetros da normalidade quanto aos demais fatores analisados. Assim, não se descarta que a subnutrição protéica, em determinado período, seja responsável, por alterações que podem tornar-se irrecuperáveis, mesmo com o restabelecimento da nutrição.

Os dados histológicos demonstraram que a mucosa palatina possui, em ambos os grupos, um revestimento epitelial queratinizado, com diferenças quanto à sua espessura. A região correspondente ao palato mole é revestida por uma camada epitelial relativamente delgada tanto em animais nutridos como em subnutridos, apresentando em sua superfície, células queratinizadas, não observado em algumas regiões do palato dos animais renutridos. Desta forma, em linhas gerais, detectou-se que a subnutrição influencia alguns aspectos morfológicos dos diversos tecidos, contudo sem alterar, de maneira irreversível a sua estrutura, como verificado por Boldrini et al. (1995), na mucosa palatina de ratos Wistar.

Em relação às papilas conjuntivas da lâmina própria, que são estruturas que servem para aumentar a união entre a interface do epitélio-tecido conjuntivo e promover troca de substâncias entre essas estruturas (HORSTMANN, 1954; KARRING, 1973; KOBAYASHI et al., 1987; NAKANO, 1992; MARTINEZ et al., 1995) a presença de fibras colágenas do tipo III nos

animais do grupo **S**, caracterizam um atraso no desenvolvimento, como descrito por (WATANABE, 1995), em macacos.

Os aspectos quantitativos, analisados pela detecção de células imunologicamente marcadas pelo **IGF-I** e seu receptor (**IGFI-R**), e a insulina (**I**) e seu receptor (**IR**), demonstraram que a densidade celular, tanto para a insulina como para seu receptor foi maior no grupo **S**, quando comparada aos grupos **R** e **N**; entre esses grupos, a densidade maior foi observada para o grupo **N**. Relativamente ao **IGF-I** e seu receptor, o grupo **S** exibiu uma porcentagem de células estatisticamente maior em relação ao grupo **R**. Isto permite inferir que quanto às alterações dietéticas, o organismo dos animais do grupo **S** respondeu com uma maior capacidade de adaptação, modificando os mecanismos metabólicos para alcançar um melhor aproveitamento das energias disponíveis, com a finalidade de garantir a manutenção de sua vida. Com a subnutrição, é provável que ocorra um padrão que provoca uma mensagem confusa no hipotálamo levando a manutenção de níveis mais elevados de insulina, **IGF-I** e seus respectivos receptores, ativando processos anabólicos para a finalidade de preservar a massa muscular e tecido adiposo desses animais, demonstrando que os animais subnutridos tentam se recuperar em relação aos grupos **N** e **R**.

O grupo **R**, para o hormônio insulina (**I**) exibiu uma densidade de células menor que o grupo **S**. Também apresentou diferenças quanto ao receptor (**IR**) ao ser comparado ao grupo de subnutrido (**S**) e o grupo controle nutrido (**N**), que demonstraram maior porcentagem de células reativas. Em relação ao **IGF-I** e seu receptor **IGF-IR**, observa-se novamente que o grupo renutrido (**R**) diferiu estatisticamente do grupo controle (**N**) e o grupo subnutrido (**S**) que se apresentou com maior densidade, constatando a dificuldade de se restabelecer a densidade celular com a renutrição, pelo menos na fase aqui estudada. Considerando-se que, por ser uma região onde a atividade mitótica é elevada, o epitélio deveria conter um maior número de células imunorreativas para todos os hormônios, com influência da insulina e do **IGF-I** com seus respectivos receptores (LARON, 2008), promovendo uma cascata intracelular que sinaliza funções metabólicas e de crescimento celular (BOURA-HALFON;

ZICK, 2009), evidencia-se que a retomada do teor protéico na alimentação na fase púbere, não foi capaz de reestruturar certas regiões do tecido, quanto tamanho e composição celular. Uma das justificativas possíveis do ocorrido com o grupo **R** é relativa aos aspectos fisiológicos, que se deve à absorção retardada e pobre por atrofia da mucosa do trato gastrointestinal (**TGI**), evidenciada indiretamente, após análise metabólica, pela consistência de suas fezes que se tornaram pastosas, e intensa sudorese, o que pode inferir um estado de hipoglicemia severa, que é um sinal de baixa insulinemia com deficiência endócrina do pâncreas, devido à falta da mesma (SAWAYA et al., 2006). Morfologicamente, alguns achados após a dissecação desses espécimes reforçam a teoria de alterações metabólicas, uma vez que cálculos renais foram uma constante, seguramente devido ao excesso de proteína fornecido quando do processo de recuperação protéica.

Pelo até aqui exposto, observa-se que algum componente tecidual foi marcadamente comprometido antes da renutrição aos 21 dias de vida. Assim, considerando-se o elevado metabolismo apresentado na fase púbere, se as avaliações terminassem nesse estágio da vida do animal, seria interpretado que a renutrição não foi capaz de restabelecer o crescimento em determinadas regiões da mucosa palatina, o que torna lícito afirmar que esse estado carencial nos renutridos, compromete o desenvolvimento tecidual, sobretudo na fase púbere, podendo promover alterações mais severas em estágios mais avançados da vida do animal.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia proposta, e os resultados obtidos na presente pesquisa na mucosa palatina de ratos Wistar de 60 dias de vida, é lícito concluir-se que:

1. A camada queratinizada é mais delgada em todas as regiões da mucosa palatina dos animais do grupo subnutrido (**S**);
2. Os animais do grupo subnutrido (**S**) apresentaram maior densidade de células imunorreativas para IGF-I, insulina e aos seus respectivos receptores;
3. O grupo renutrido (**R**) apresentou, em certas regiões, células epiteliais dispersas quanto ao arranjo e formas ovaladas e circulares;
4. A renutrição, desde o 21º até 60º dia, não restabeleceu o padrão epitelial da mucosa palatina em determinadas regiões, que se apresentou desorganizada quanto às suas camadas;
5. No grupo subnutrido (**S**), detectou-se o predomínio de fibras colágenas do tipo I na lâmina própria e do tipo III nas papilas conjuntivas;
6. Evidenciou-se no grupo renutrido (**R**) sinais de alterações fisiológicas significantes no que concerne à dieta proposta;
7. A densidade de células imunorreativas ao IGF-I e IGF-IR, Insulina e seu receptor, no grupo renutrido (**R**), foi menor em relação aos grupos **S** e **N**.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. A. M. M.; WECKX, L. L. M.; HIRATA, C. H. W. Histological and ultrastructural aspects of the tongue in undernourished rats. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.72, n.4, p. 523-5277, 2006.
- ADAMS, P. H. Intra-uterine growth retardation in the pig. II. Development of the Skeleton. **Biological Neonatal**, v. 19, p. 341-353, 1997.
- 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.
- BEHMER, O. A.; DE TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: EDART, 1975.
- 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 ultraestrutural**. 2003. 68f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- BOLDRINI, S. C.; WATANABE, I.; KÖNIG JÚNIOR B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation on rat's hard palatine mucosae: a scanning electron microscopic study of connective tissue papillae. **Annals of Anatomy**, v.180, p. 445-448, 1998.
- BORDIN, S.; BOSCHERO, A.; CARNEIRO, E. M.; ATWATER, I. Ionic mechanisms involved in regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. **Journal Membrane Biology**, v. 148, p. 177-184, 1995.
- 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.
- CAMPANA, A. P. **Características antropométricas de escolares e suas relações com o status sócio-econômico e nível intelectual**.1985. 102 f. Tese (Livre Docência), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1985.
- CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; ANGELIS, R. C.; FURNES, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Review**, v. 310, p. 1-7, 2002.

- CHANDRA, R. K. Protein- energy malnutrition and immunological responses. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 597-600, 1992.
- CLAYENSSES, S.; LAVOINNE, A.; FRESL-RAGOT, M.; BOIS-JOYEUX, B.; CHANEZ, M.; PERET, J. Metabolic changes in rats fed a low protein diet during post-weaning growth. **Metabolism**, v. 39, n. 7, p. 676-681, 1990.
- DE OLIVEIRA, B. C. C.; DE OLIVEIRA, F.; MARTINI, D. T.; PRISCO, C. R.; RIGHETTI, M. M.; LIBERTI, E. A.; BOLDRINI, S. C. The relative effects of severe burn injury and pre and postnatal protein deprivation on mandibular condyle morphology. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 45-54, 2006.
- DICKERSON, J. W. T.; HUGHES, P. C. R.; McNULTY, P. A. The growth and development of rats given a low protein diet. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 15, p. 567-576, 1972.
- DREIZEN, S. Despite the massive elevation of plasma insulin strongly suggests that insulin does not have a substantial role in the control of gastrointestinal epithelial cell renewal. **Experimental Physiology**, v. 78, p. 697-705, 1989.
- ENGELBERG, 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 n. 1 p. 180-186, 2004.
- FERREIRA, F.; FILIPUTTI, E.; ARANTES V. C.; STOPPIGLIA, L. F.; ARAÚJO, E. P.; DELGHINGARO – AUGUSTO, V.; LATORRACA, M. Q.; TOYAMA, M. H.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase C α expression. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 695-699, 2002.
- GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; DE VASCONCELOS FONTES, R. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of small intestine: a quantitative morphological study. **Autonomic Neuroscience**, v. 126-127, p. 277-284, 2006.
- HAIJ, A. J.; LEWIS, S. E.; GOLDSPINK, D. F.; MERRY, B. J.; HOLEHAN, A. M. The effects of chronic and acute dietary restriction on the growth and protein turnover of fast and slow types of rats skeletal muscle. **Compilation of Biochemistry and physiology**, v. 85, n. 2, p. 281-287, 1986.
- HERMANS, M. P.; SCHMEER, W.; HENQUIN, J. C. Why is acetylcholine a potentiator and not an initiator of insulin release? **Diabetologia**, v. 29 p. 548-549, 1986.
- HOFFER, L. J. Clinical Nutrition 1: protein-energy malnutrition in the inpatient. **Canadian Medical Association Journal**, v. 165, n. 10, p. 1345-1349, 2001.

- HORSTMANN, E. Morphologie und morphogenese des papillarkorspers der schleimhaute in der mundhohle des menschen. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 39, p. 479-514, 1954.
- HUGHES, P. C. Morphometric studies of catch-up growth in the rat. **Program Clinic Biology Resarche**, v. 101, p.433-446, 1972.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy: A specific method for collagen detectionin tissues sections. **Journal Histochemistry**, v. 11, p. 447-445, 1979.
- KARRING, T.; LANG, N. P.; LOE, H. The role of gingival connective tissue in determinating epithelial differentiation. **Journal Periodontristry Review**, v. 10, p. 1-11, 1975.
- KOBAYASHI, K.; MIYATA, K.; IINO, T. Three-dimensional structures of the connective tissue papillae of the tongue in newborn dogs. **Archive of Histology Japanese**, v. 50, p. 347-357, 1987.
- KUMAR, V.; DEO, M.G.; RAMALINGASWANI, V. Mechanism of fatty liver in protein deficiency. **Gastroenterology**, v. 62, p. 445-451, 1972.
- KUTUZOV, H.; SICHER, H. Anatomy and function of the palate in the white rat. **Anatomy Recovery**, v. 114, p. 67-84, 1952.
- KUTUZOV, H.; SICHER, H. Comparative anatomy of the mucosa of the tongue and palate of the laboratory mouse. **Anatomy Recovery**, v. 116, p. 409-425, 1953.
- LANDSDOWN, A. B. Epidermal differentiation in normal and growth-retarded infants: studies in two animals models and human babies. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 99, p. 139-146, 1978.
- LARON, P.; Insulin – a growth hormone. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 114, p. 11-16, 2008.
- LATORRACA, M. Q.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; MELLO, M. A. R. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but icreases the sensitivity to insulin in weaned rats. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 80, p. 291-297, 1998.
- LONGSTREET, H.; KEYS, A. Adaptation to caloric restriction. **Science**, v. 112, n. 25, p. 215-218, 1950.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50, 1991.
- LUNN, P. G.; AUSTIN, S. Differences in nitrogen metabolism between protein and energy deficient rats with similary restricted growth rats. **Annals of Nutritional and Metabolic**, v. 27 p. 242-252, 1933.

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

MARTINEZ, M.; WATANABE, I. S.; MARTINEZ, F. E.; LOPES, R. A. Ultrastructural study of the palatine mucosa of the opossum. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 12, n. 2, p. 115-120, 1995.

MISAWA, R. **Estudo morfoquantitativo de neurônios entéricos do íleo imunorreativos ao receptor P2X2, a calbindina, a calretinina, a colina acetiltransferase e ao óxido nítrico de animais submetidos à desnutrição e renutrição protéica**. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MONTE, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **Jornal de Pedatria**, v. 76, n. 3, p. 285-297, 2000.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 9, p. 1207-1995, 1995.

NAEYE, R. L. Cardiovascular abnormalities in infants malnourished before birth. **Biologic Neonate**, v. 8, p. 104-113, 1965.

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, 1982.

NAKANO, T. NaOH cell maceration/scanning electron microscopic studies on the architecture of lamina própria of the mouse palate. **Auris Nasus Larynx**, v. 19, p. 133-142, 1992.

NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. In **Biochemistry for the medical sciences**. USA [Ed: John W.] 1984, p. 952.

PICHARD, C. From protein-energy malnutrition to refeeding: more basic research is needed. **Clinical Nutrition**, v. 16, p. 1, 1997

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.

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

ROMEIS, B. **Mikroskopische technik**. 6. ed. Oldenbourg: Munchen, 1968.

ROY, S.; NAUNIHAL, S.; DEO, M. G.; RAMALINGASWANI, V. Ultrastructure of skeletal muscle and peripheral nerve and experimental protein deficiency and

it's correlation with nerve conduction studies. **Journal Neurologic Science**, v. 17, p. 399, 1972.

SALMON JR, W. D.; DAUGHDAY, W. H. A hormonally controlled serum factor wich stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **Journal of laboratory clinical and medical**, v. 49, n. 6, p. 825-836, 1957.

SAWAYA, A. L. Malnutrition longterm consequences and nutrition recovery effects. **Estudos Avançados**, v. 20, p. 147-158, 2003.

SHILS, M. E., OLSON, J. A., SHIKE, M. In: **Modern nutrition in health and disease**. [Ed: Lea & Febiger]. Philadelphia: USA, p. 923, 1994.

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.

SLOBODIANIK, N. H.; PALLARO, A. N.; ROUX, M. E.; RIO, M. E. Effects of low-quality dietary protein on the thymus of growing rats. **Nutrition**, v. 5, n. 6, p. 417-418, 1989.

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

WATANABE, I, S.; TETSUO, I.; MASAO, H.; YAMADA, E. Three dimensional organization of the epithelium-connective tissue interface of the tongue and soft palate in the macaca fuscata: a SEM study. **Acta Microscopica**, v. 4, p. 59-73, 1995.

WIDDOWSON, E. M.; McCANCE, R. A. Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 105-111, 1975.

WIKES, L. J., FIOROTTO, M., BURRIN, D. G., DEL ROSARIO, M., FRAZER, M. E., POND, W. G., JAHOO, F. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. **Journal of Nutrition**, v. 126 p.1481-1488, 1996.

WOODS, S.C., PORTE, D. Neural control of the endocrine pancreas. **Physiological Review**, v. 54, p. 595-599, 1974.

YOUNG, V. R.; SCRIMSHAW, N. S. Physiology of starvation. **Scientific American**, v. 225, n. 4, p. 14-21, 1971.