LUCILENE FERREIRA LUIZ

Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púber e adulta: avaliações estrutural e da expressão do IGF-I e IGF-IR, da insulina e seu receptor

São Paulo

2012

LUCILENE FERREIRA LUIZ

Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púbere e adulta: avaliações estrutural e da expressão do IGF-I e IGF-IR, 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.2540
FMVZ

Luiz, Lucilene Ferreira

Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púbere e adulta: avaliações estrutural e da expressão do IGF-I e IGF-IR, da insulina e seu receptor / Lucilene Ferreira Luiz. -- 2012.
92 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. Renutrição. 3. Mucosa lingual. 4. Insulina. 5. IGF-I. 6. Imunohistoquímica. 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:

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 Patricia 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. Patricia Castelucci
Secretária Suplente CEEa – ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>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</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púbere e adulta: Avaliações Estrutural e da Expressão do IGF-I e IGF-IR, Insulina e seu Receptor", protocolado sob o nº 2322/2011, 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 protein malnutrition pre and postnatal and postnatal renutrition on the lingual mucosa of Wistar rats in the pubescent and adult phases: Structural evaluations and the Expressions of the IGF-I e IGF-IR, Insulin and your Receptor", protocol number 2322/2011, 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: LUIZ, Lucilene Ferreira

Título: **Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púbere e adulta:** avaliações estrutural e da expressão do IGF-I e IGF-IR, 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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Dedico esse trabalho aos meus tão queridos e amados pais, João Ferreira Luiz e Maria Georgete de Faria Luiz, por todos os valores e ensinamentos transmitidos, que foram essenciais na minha formação pessoal e profissional;

Às minhas amadas irmãs Renata Ferreira Remonte e Fernanda Ferreira Rodrigues, pelo amor, apoio, incentivo e proteção!

Ao meu anjinho Silvia de Campos Boldrini (*In memorian*), por me fazer crescer, me ensinar a sempre seguir os caminhos do bem, da sabedoria, da humildade e do amor!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

O meu maior desejo era o de poder agradecer com um abraço forte, com um sorriso radiante diante daquela sala que entrava não só para tirar minhas dúvidas, como para contar boas histórias, dar risada, ou até mesmo lhe contar algo que me afligia, com toda a certeza de que seria aconselhada.

Um exemplo de otimismo, humildade, bondade, continha uma alegria contagiante e um sorriso angelical, o seu jeito de transmitir o amor era como o de uma criança inocente.

Essa foi minha Orientadora da iniciação científica e do mestrado, que me ensinou muito além da pesquisa, muito mais que Anatomia... me ensinou a viver, a ser feliz, a acreditar em mim, a ser menina e mulher!

Como uma dedicada mãe, me criou, mimou, defendeu, cuidou de mim, e todo orgulho que sinto, foi sementinha plantada por ela!

Mas, infelizmente não posso abraçá-la, não posso ver aquele rostinho lindo sorrindo... agora se transformaram em lembranças que guardo em minha memória e em meu coração!

E, sendo tão maravilhosa, me deixou como herança um presente valioso, que cuidou muito bem, a sua alma gêmea, alguém que me ensinou muito, principalmente a ser forte, a ser guerreira, e que hoje se tornou um amigo que está presente em minhas orações.

Considero-me uma pessoa abençoada, por Deus ter colocado em minha vida esses dois Orientadores, de pesquisa e da vida!

Professora Silvia de Campos Boldrini (*In memoriam*) e Professor Edson Aparecido Liberti, muito obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e Nossa Senhora por guiarem meus passos aos caminhos do bem e de luz.

Aos meus amados pais e às minhas irmãs, que com todo carinho e amor me deram força e incentivo em todos os momentos. Muito obrigada pelo exemplo de família, de amizade, respeito, alegria e companheirismo!

Ao meu namorado Rogério Ferreira Maia Costa, pela força, carinho e amor que recebi em todos os momentos.

À minha grande e amada amiga Rafaela Nathalia Costa, que me mostrou que não importa a distância e sim quão forte, verdadeira e eterna é a nossa amizade!

À minha grande e amada amiga, Diana de Oliveira Vono, por essa amizade verdadeira, pelo companheirismo no trabalho e em minha vida, por estar sempre pronta a ajudar e me fazer sorrir.

Às minhas queridas amigas Vanessa Duarte da Silva, Cibele Carla Guimarães de Souza e Aline Karen da Silva, que estão sempre ao meu lado, aconselhando, acompanhando em todas as aventuras, me fazendo sorrir todo o tempo.

Ao meu querido Orientador, Professor Edson Aparecido Liberti, que nesses momentos me ensinou a crescer, ter força e acreditar que existe o amor verdadeiro. Hoje, muito mais que meu Orientador, um grande amigo.

À querida Flávia de Oliveira, que é o exemplo de humildade, inteligência, simpatia, por compartilhar comigo esse momento tão importante em minha vida.

À Professora Dra Mônica Bielavsky, pelo importante ensinamento desde a graduação e pela grande amizade.

Ao querido professor Dr Jefferson Victor Russo, pelos ensinamentos, companheirismo e amizade por todos esses anos.

Ao querido Maicon Barbosa da Silva, que sempre esteve disposto a me ajudar em todos os momentos que precisei.

À Marta Maria da Silva Righetti, pela amizade, carinho, competência e pelos melhores momentos de descontração que tivemos.

À Sônia Regina Yokomizo de Almeida, pelo carinho e pelo cuidado que tem com o trabalho, e por cuidar muito bem dos alunos.

À Cleide Rosana Duarte Prisco, por ser uma pessoa tão humilde, doce, simpática que me conquistou em tão pouco tempo, pelos ensinamentos, carinho, preocupação e cuidado com meu trabalho, e principalmente pelas melhores tardes de conversa.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos Funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial, Renivaldo de Souza e Iracema Caldas, pela dedicação ao trabalho e apoio dado em todo tempo.

Ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À Professora Maria Angélica Miglino, por todo apoio e oportunidade oferecida.

À Elza Faquim, que em todo momento pude contar, sempre prestes a me ajudar.

Ao querido Ricardo Bandeira, pela atenção, carinho e companheirismo que compartilhamos.

À doce Aline Gonçalves, pela amizade, pelos ensinamentos e pelos mais divertidos momentos no laboratório.

Ao amado casal Regina de Souza Bolina Matos e Paulo Henrique de Matos Alves, pelo exemplo de humildade, pela grande amizade, pelo carinho, sempre dispostos a ajudar!

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (**LAFACC**): Flávia de Oliveira, Cristina Bolina, Josemberg da Silva Baptista, Willian Mayer, Dorival Terra Martini, Carlos Eduardo Seyfert, Bruna Cecília Caixeta, Marcelo Arthur Cavalli, Márcio Cristófar, Sofia Bevilàqua, Mariana Pazos, Eduardo Henrique Beber, Valquíria Barboza Mariotti, Thiago Habacuque, Thelma Parada Marsola, Catarina Tivani, Joice Bertaglia, Any Kelly Lima, Jodonai Barbosa, Ricardo Fontes, Aline Rosa e Naiane Clebis, pela convivência, contribuição, aprendizado e confusões que somente nos aproximaram para trilharmos nossos caminhos de forma divertida e responsável.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho cujos nomes, por ventura, foram omitidos, os meus sinceros agradecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Estudos.

Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz
Ó Mestre, Fazei que eu procure mais
Consolar, que ser consolado;
Compreender, que ser compreendido;
Amar, que ser amado.
Pois, é dando que se recebe,
É perdoando que se é perdoado,
E é morrendo que se vive para a vida eterna”

São Francisco de Assis

RESUMO

LUIZ, L. F. Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púbere e adulta: avaliações estrutural e da expressão do IGF-I e IGF-IR, da insulina e seu receptor. [Morphologic repercussions of the protein malnutrition pre and postnatal and postnatal refeeding on the lingual mucosa of Wistar rats in the pubescent and adult phases: structural evaluations and the expressions of the IGF-I e IGF-IR, insulin and your receptor]. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Como a grande maioria dos tecidos e órgãos, a estrutura da mucosa lingual é influenciada por diversos fatores, dentre eles os nutricionais e os metabólicos. Dessa maneira, a subnutrição protéica pré-natal, associada a inúmeras patologias pós-natais, e a atividade da insulina e de IGF-I, representam importantes pontos a serem correlacionados na avaliação morfológica e funcional do tecido. Assim, avaliou-se no presente estudo, os efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal, sobre a taxa de renovação do epitélio, relacionando-a à atividade da insulina e do IGF-I, no intuito de encontrar possível correspondência entre as alterações metabólicas e morfofuncionais, com a atividade desses importantes hormônios sobre o desenvolvimento do epitélio lingual, nas fases púbere e adulta. Para tanto, os grupos experimentais foram formados por animais heterogênicos (n=3) de acordo com a ração oferecida, protéica ou hipoprotéica, e com as respectivas idades, nos grupos N, D (nutridos e desnutridos aos 60 dias de vida, fase na qual o período púbere é finito), R (renutridos a partir de 21 até alcançarem 60 dias de vida), NN (nutridos até 100 dias de vida) e RR (renutridos desde o desmame até alcançarem 100 dias de vida). Após avaliação sob microscopia de luz com técnicas rotineiras de histologia e imunohistoquímicas para a identificação do IGF-I, Insulina e respectivos receptores, verificou-se que as camadas da mucosa lingual não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. As papila filiformes, de forma triangular ao corte nos animais do grupo N, nem sempre foram detectadas nos grupos S e R, sendo que na fase adulta, (grupos NN e RR) apresentaram-se sob a forma de bastonete. Relativamente à tipificação das fibras colágenas, as do tipo I predominaram no grupo S, sendo verificada uma homogeneidade na

distribuição entre as fibras dos tipos I e III nos demais grupos. As densidades de células imunorreativas à Insulina e seu receptor, (IR), bem como IGF-I e seu receptor (IGF-IR) apresentaram-se elevadas nos grupos S e R quando comparadas ao grupo N, e semelhantes nos grupos NN e RR.

Palavras-chave: Subnutrição. Renutrição. Mucosa lingual. Imunohistoquímica. Insulina. IGF-I.

ABSTRACT

LUIZ, L. F. Morphologic repercussions of the protein malnutrition pre and postnatal and postnatal refeeding on the lingual mucosa of Wistar rats in the pubescent and adult phases: structural evaluations and the expressions of the IGF-I e IGF-IR, insulin and your receptor. [Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púbere e adulta: avaliações estrutural e da expressão do IGF-I e IGF-IR, da insulina e seu receptor]. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Similarly to many tissue and organs, the structure of lingual mucosa is influenced by many factors, among nutritional and metabolic factors. This way, the pre-natal protein under nutrition associated to several post-natal pathologies and the activity of IGF-I and insulin, represents important points to be correlated in the morphological and functional tissue evaluation. Thus, the effects of pre and post-natal protein under nutrition and post-natal re-nutrition on the epithelial renewal taxes relating it to insulin and IGF-I activity, in order to find possible association between the morph functional changes with the activity of these important hormones on the development of the lingual epithelium in the puberal and adult phase. For this purpose, the experimental groups were formed by heterogenic animals (n=3) according to diet (protein and hypoprotein), and, with the respective ages in the groups N and S (nourished and under-nourished at 60 days old, when the puberal period is finite), R (re-nourished from 21 up to 60 days old), NN (nourished up to 100 days old) and RR (re-nourished from weaning up to 100 days of age). After observation under light microscopy with routine histological and immunohistochemical techniques for identification of IGF-I, insulin and respective receptors, it has been verified that the layers of lingual mucosa do not present differences among studied groups. The filliform papillae of triangular shape in group N animals not always been detected in the S and R groups, being in the adult phase (NN and RR groups) presented under bastonete form. Related to tipification of collagen fibers, the type I was predominant in S group, being verified homogeneity in the distribution of type I and III fibers in the other groups. The density

of immune reactive cells to insulin and its receptor (IR), as well as IGF-I and its receptor (IGF-IR) were higher in the S and R groups when compared to N group, and were similar in the groups NN and RR.

Keywords: Malnutrition. Lingual Mucosa. Refeeding Immunohistochemistry. IGF-I. Insulin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EPI	Equipamento de Proteção Individual
g	Grama
GH	Hormônio do crescimento
Grb2	Receptor de fator de crescimento ligado a proteína 2
HE	Hematoxilina-Eosina
H₂O₂	Água oxigenada
I	Insulina
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IGFBP-I	Proteína ligante do Insulin-like growth factor-I
IGF-I	Insulin-like growth factor
IGF-IR	Receptor do Insulin-like growth factor-I
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substratos do Receptor de Insulina
MAP Kinase	Cascata da proteína quinase ativada por mitógenos
mg	Miligramas
ml	Mililitros
N	Grupo experimental nutrido de 60 dias
NaCl	Cloreto de sódio

NN	Grupo experimental nutrido de 100 dias
PBS	Solução salina Tamponada
PI 3-K	Via fosfatidilinositol 3-quinase
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Grupo experimental renutrido de 60 dias
RNA	Ácido ribonucléico
RR	Grupo experimental renutrido de 100 dias
S	Grupo experimental subnutrido
SNC	Sistema Nervoso Central
USP	Universidade de são Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do receptor de insulina e do receptor de IGF-I	35
Figura 2 - Representação esquemática da obtenção dos grupos de animais	43
Figura 3 - Monitoramento dos animais	45
Figura 4 - Língua do animal após dissecação	47
Figura 5 - Fotomicrografia de cortes histológicos da mucosa lingual de ratos (A e B)	50
Figura 6 - Comprimento dos animais dos grupos N, S e R	52
Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa lingual de ratos dos grupos N (A e B), S (C e D) e R (E e F).	69
Figura 8 - Fotomicrografia da mucosa lingual de ratos dos grupos NN (A e B), RR (C e D)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre o peso corporal de animais acondicionados em gaiolas e em caixas (g) durante o período experimental de 60 dias (Grupos N, S, R)	53
Tabela 2 - Média do peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	54
Tabela 3 - Média da ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	55
Tabela 4 - Média da ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)	57
Tabela 5 - Média da excreção de urina dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)	58
Tabela 6 - Média da excreção de fezes dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	59
Tabela 7 - Média da razão entre a ingestão alimentar e peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	60
Tabela 8 - Média da razão entre a excreção de fezes e ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	61
Tabela 9 - Média da razão entre a excreção de urina e ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)	62

Tabela 10 - Porcentagem da densidade de células epiteliais dos grupos S, N, R, NN e RR	63
--	----

Tabela 11 - Média da porcentagem de células imunorreativas à insulina e ao receptor de insulina dos grupos S, N, R, NN e RR	64
---	----

Tabela 12 - Média da porcentagem de células imunorreativas ao IGF-I e ao IGF-IR dos grupos S, N, R, NN e RR.....	66
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação entre o peso corporal de animais acondicionados em gaiolas e em caixas (g) durante o período experimental de 60 dias (Grupos N, S, R)	53
Gráfico 2 -	Média do peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	54
Gráfico 3 -	Média da ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	56
Gráfico 4 -	Média da ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)	57
Gráfico 5 -	Média da excreção de urina dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)	58
Gráfico 6 -	Média da excreção de fezes dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	59
Gráfico 7 -	Relação entre a ingestão alimentar e peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	60
Gráfico 8 -	Relação entre a excreção de fezes e ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)	61
Gráfico 9 -	Relação entre a excreção de urina e ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)	62
Gráfico 10 -	Média da densidade de células epiteliais dos grupos S, N, R, NN e RR	63
Gráfico 11 -	Porcentagem de células imunorreativas à insulina dos grupos S, N, R, NN e RR	64
Gráfico 12 -	Porcentagem de células imunorreativas ao receptor de insulina dos grupos S, N, R, NN e RR	65
Gráfico 13 -	Porcentagem de células imunorreativas ao IGF-I dos grupos S, N, R, NN e RR	66
Gráfico 14 -	Porcentagem de células imunorreativas ao IGF-IR dos grupos S, N, R, NN e RR	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	A SUBNUTRIÇÃO E SUAS REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS.....	29
2.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA LÍNGUA.....	31
2.3	INSULINA E SEU RECEPTOR (IR).....	33
2.4	IGF-I E SEU RECEPTOR (IGF-IR)	34
3	PROPOSIÇÃO	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	ANIMAIS	40
4.1.1	Obtenção dos grupos de animais relativos às dietas oferecidas.....	40
4.2	ANÁLISE METABÓLICA	44
4.3	OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES	46
4.4	MICROSCOPIA DE LUZ	47
4.4.1	Técnicas rotineiras de histologia	47
4.4.2	Imunohistoquímica para a identificação da Insulina, do IGF-I e respectivos receptores	48
4.5	MÉTODOS QUANTITATIVOS	49
4.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	50
5	RESULTADOS.....	52
5.1	ANÁLISE METABÓLICA	52
5.2	ANÁLISE QUANTITATIVA	63
5.3	ANÁLISE QUALITATIVA	68

6	DISCUSSÃO	73
6.1	ASPECTOS METABÓLICOS	73
6.2	ASPECTOS MORFOLÓGICOS	75
7	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

De acordo com estudos prévios, onde a subnutrição pré e pós-natal e a correção nutricional foram observadas no período púbere e adulto de ratos Wistar, onde a taxa de renovação foi avaliada por intermédio do número de células em mitose, concluiu-se que a renovação epitelial da mucosa lingual foi marcadamente comprometida pela subnutrição até o período púbere, e que a renutrição foi capaz de restabelecê-la. Além disso, também foram avaliados os níveis séricos de insulina, constatando-se sua redução, frente à subnutrição (LUIZ, 2009).

Como a taxa de renovação dos epitélios de revestimento está relacionada à manutenção da sua integridade, e estes são especialmente vulneráveis a fatores nutricionais, mudanças na integridade estrutural da mucosa oral podem indicar a deficiência de inúmeras substâncias, inclusive de proteínas (DREIZEN, 1989). Isto auxilia a interpretação de achados clínicos, como atrofia da mucosa oral e das papilas linguais que, frequentemente, são correlacionados a deficiência protéica (ABREU et al., 2006).

De acordo com Winkler e Nakamoto (1982), a subnutrição protéico-calórica de promove redução do número de células epiteliais na mucosa oral e aumento do tamanho das mesmas; já a subnutrição protéica somente, determina alterações morfológicas no tamanho das papilas conjuntivas da lâmina própria, responsáveis por ancorar o epitélio oral na mucosa palatina (BOLDRINI et al., 1998).

Quanto aos níveis séricos de insulina frente à subnutrição, sabe-se que as células β das ilhotas de Langherhans do pâncreas trabalham sem o padrão bifásico, ou seja, os 50% da insulina secretada no período pós-prandial - ou fase rápida de secreção de insulina – desaparecem, como verificado no diabetes do tipo 2, diminuindo a secreção total de insulina nas ilhotas (FERREIRA, 2002). Tem sido descrito também, em indivíduos submetidos a dietas hipoprotéicas, a ocorrência de albuminemia (LUNN; AUSTIN, 1993; WIKES et al., 1996) e o aumento dos ácidos graxos livres e a redução das proteínas totais no plasma (KUMAR; DEO; RAMALINGASWANI, 1972; CLAYESSENS et al., 1990; LATORRACA et al., 1998). Esses indivíduos apresentam insulinemia reduzida e glicemia mantida, o que indica um possível aumento de sensibilidade à insulina. Em organismos normais, a ação das terminações nervosas junto às células β do pâncreas estimula a secreção de

insulina, determinando a ação dos agonistas muscarínicos sobre essa secreção, que apresenta-se diminuída em animais subnutridos, mesmo na presença de glicose (WOODS; PORTE, 1974; HERMANS; SCHMEER; HENQUIN, 1986; BOSCHERO et al., 1995; BORDIN et al., 1995).

Desta forma, nesse contexto provocado pela subnutrição, a insulina representa um importante hormônio a ser considerado para a compreensão dos mecanismos que envolvem a fisiologia corpórea bem como as suas repercussões morfológicas, por participar da síntese protéica, fornecimento de energia aos tecidos por meio da glicose e do crescimento e diferenciação celular (BUENO, 2010). Além disso, a insulina interfere inclusive na secreção do hormônio do crescimento, apresentando-se como seu antagonista, devido ao fato do mesmo agir no fígado, estimulando a produção de fatores de crescimento semelhantes à insulina (ou IGFs), que por sua vez interferem no crescimento e manutenção de ossos e tecidos (GUYTON, 1998).

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A SUBNUTRIÇÃO E SUAS REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS

Em 1962, a subnutrição foi classificada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) como um quadro de carencia proteico-calórica, apresentando-se sob duas formas graves: o marasmo, decorrente de uma deficiência energética e o Kwashiorkor, da deficiência protéica (NEWSHOLME; LEECH, 1984), que, normalmente aparecem juntas, podendo haver predominância de uma sobre a outra (SHILS; OLSON; SHIKE, 1994). Ainda hoje, a subnutrição é classificada como um dos mais preocupantes problemas de saúde pública, sendo responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro, e considerada como a doença que mais leva ao óbito crianças abaixo de cinco anos (SAWAYA, 2006).

A subnutrição é avaliada como doença decorrente de dieta alimentar inadequada, estando associada a diversos fatores, como fome, pobreza, processos infecciosos e baixa ingestão calórica e protéica, trazendo consequências desastrosas para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das crianças. (MONTE 2000; MONTEIRO, 2003). Nos últimos anos, os efeitos adversos da subnutrição materna sobre o crescimento fetal e neonatal e suas repercussões na vida adulta, têm despertado grande interesse da comunidade científica. Assim, as influências dietéticas durante os estágios iniciais de desenvolvimento do organismo são consideradas fatores de risco para o surgimento de doenças crônicas, uma vez que, no caso da subnutrição, ao se estabelecer na vida fetal ou imediatamente após o nascimento, ela é capaz de alterar permanentemente a estrutura corporal, a fisiologia e o metabolismo, conduzindo a doenças crônicas em períodos tardios da vida (ENGELBREGT et al., 2004).

Na década de 1990, foi considerada a hipótese do “fenótipo econômico”, que pretendia explicar a elevada prevalência de doenças crônicas na vida adulta, sugerindo que o baixo peso ao nascer e no primeiro ano de vida, resultante de deficiência nutricional materna, estaria associado a um maior risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2 e da síndrome metabólica na vida adulta (HALES et al., 1991; HALES; BARKER, 1992; BARKER et al., 1993). Nos últimos

anos, uma gama de estudos sugerem que uma deficiência nutricional durante o período de desenvolvimento acarreta em efeitos duradouros e persistentes ao longo da vida de um indivíduo, levando a um retardo de crescimento generalizado e à redução permanente do tamanho de órgãos e tecidos, incluindo o pâncreas (DESAI et al., 1996).

Em diversos tecidos do organismo, pode-se verificar as repercussões morfológicas determinadas pela subnutrição, como na pele, que apresenta um processo de queratinização pouco acentuado e ausência das camadas granulosa e córnea (NAEYE, 1965; LANSDOWN, 1978); no aparelho locomotor, onde os músculos apresentam alterações estruturais e redução significativa no diâmetro das fibras (ROY et al., 1972; HAJ et al., 1986, OLDSFORDS; SOURANDER, 1986).

Em relação aos ossos, pode-se verificar redução no tamanho e atraso no aparecimento dos centros de ossificação em relação à idade gestacional (ADAMS, 1971; SHRADER; ZEMAN, 1973), no crescimento craniofacial, onde suas dimensões são reduzidas, a cartilagem articular do processo condilar e a sincondrose basioccipital apresentam características de atraso do desenvolvimento (BOLDRINI, 2003).

Nos componentes da parte central do SNC, foram verificados no encéfalo, reduções significativas de seu peso (HEDLEY-WHITE; MEUSER, 1971; WATVE; YAJNIK, 2007; ALBRECHT MAY, 2008); Na divisão autônoma do sistema nervoso, a subnutrição promove diminuição do número de lamelas das fibras mielínicas e uma redução no número de neurônios mioentéricos (SCHÄFER; FRIEDE, 1988; SANTER; CONBOY, 1990).

No intestino delgado, seu comprimento apresentou-se diminuído frente à subnutrição, bem como o número de neurônios mioentéricos nesse órgão (GOMES et al., 2006).

Quanto ao pâncreas, verificaram menor tamanho e vascularização das ilhotas, menor taxa de replicação devido às alterações em proteínas envolvidas no ciclo celular, e maior taxa de apoptose (SNOECK et al., 1990; PETRIK et al., 1999; BOUJENDAR et al., 2002).

Garofano (1997), concluiu em seu trabalho que a subnutrição intra-uterina prejudicou o desenvolvimento de células beta em ratos, levando a alterações irreversíveis no desenvolvimento dessas células.

Os efeitos da restrição proteica durante a gestação e a lactação foram avaliados por Latorraca et al. (1998), cujos resultados indicaram comprometimento do crescimento da prole, produzindo alterações bioquímicas e na secreção de insulina; ao promoverem a renutrição proteica, essas alterações foram corrigidas, mas o crescimento, apenas parcialmente.

Em ratos com 21 dias de vida submetidos à restrição protéica, foi observada uma redução nos níveis séricos de IGF-I de aproximadamente 90% em relação ao grupo controle, sendo minimizada com o crescimento do animal (FLIESEN et al., 1989). Animais na fase adulta submetidos à dieta hipoprotéica também apresentam níveis séricos de IGF-I reduzidos (OSTER et al., 1995).

Passos et al. (2002), verificaram um aumento nas concentrações de hormônios tireoideanos ao avaliar filhotes nutridos cujas mães foram subnutridas durante o período de lactação.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA LÍNGUA

A língua é formada por uma massa de tecido muscular estriado esquelético, recoberto por uma membrana mucosa cuja estrutura varia conforme a região. Essa membrana está fortemente aderida à musculatura, já que o tecido conjuntivo da lâmina própria penetra nos espaços entre os feixes musculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Coberta por uma membrana mucosa que consiste em epitélio estratificado pavimentoso, queratinizado em algumas partes. O epitélio possui algumas camadas celulares bem características. A mais profunda repousa sobre a membrana basal, denominada camada basal ou germinativa, onde ocorrem as mitoses, com células em formas cilíndricas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; ROSS, 2008). À medida que estas células migram para as camadas superficiais, ocorre uma condensação dos tonofilamentos e assim as células tendem a possuir pequenas projeções, constituindo as interdigitações. Logo após essa camada, superficialmente, as células tornam-se achatadas e sintetizam a queratohialina em forma de grânulos, sendo então denominada de camada granulosa. Se o epitélio for do tipo não queratinizado, ocorrerá a descamação, porém, se for do tipo queratinizado aparecerá mais uma

camada, denominada de estrato córneo, formado pela superposição de várias células achatadas, caracterizado pelo desaparecimento dos núcleos das células e uma forte adesão intercelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Mais profundo a essa camada epitelial, encontra-se a lâmina própria - uma camada de tecido conjuntivo frouxo - e músculo estriado voluntário, dispostos em três planos que se entrelaçam, com cada um deles disposto em ângulo reto em relação aos outros dois, sendo peculiar à língua, facilitando assim sua identificação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005, ROSS, 2008).

A sua superfície dorsal, objeto do presente estudo, é irregular e recoberta por um grande número de papilas linguais, elevações do epitélio oral e de sua lâmina própria que assumem variadas formas e funções, apresentando variações em diferentes espécies (FISH; MALONE, 1944; BANKS, 1992; GEORGE; ALVES; CASTRO, 1998; DU TOIT, 2003).

As papilas filiformes possuem um formato cônico alongado, sendo as mais numerosas, estando presente ao longo de toda superfície dorsal e não possuem calículos gustatórios; as fungiformes possuem uma base estreita e uma ápice dilatada e lisa assemelhando-se a cogumelos, com poucos calículos. As papilas foliadas, por sua vez, são separadas por sulcos na superfície dorsolateral, com presença de muitos calículos e as papilas circunvaladas são maiores e se estendem acima das outras papilas, apresentando numerosos calículos gustatórios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Muitos autores têm considerado a papila do tecido conjuntivo como uma estrutura adaptativa, uma vez que amplia a interface epitélio-tecido conjuntivo em condições para alcançar uma larga ancoragem para o epitélio, objetivando o provimento de uma ampla superfície de troca de nutrientes (KARRING, 1973; MAKIYAMA, 1999). Além do mais, as características do epitélio escamoso estratificado da cavidade oral resultam da ação de indutores ainda desconhecidos provenientes do tecido conjuntivo dessa lâmina, influenciados por diversos fatores, extrínsecos e/ou intrínsecos, que podem incidir sobre o epitélio (KARRING; LANG; LÖE, 1975; KATAIYAMA, 2003).

2.3 INSULINA E SEU RECEPTOR (IR)

A Insulina é um hormônio polipeptídico que possui atividade anabólica, promovendo o aumento da síntese de DNA e RNA, ácidos nucléicos e proteínas nos tecidos alvo (MANCHESTER, 1972). Secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas, é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular (CARVALHEIRA et al., 2002). Em recentes estudos, Laron (2008) a descreve como um “hormônio de crescimento”, quando define seu alto grau de homologia com o IGF-I, e tendo suas ações biológicas interligadas às do GH e do IGF-I.

A sua estrutura consiste de duas cadeias peptídicas retas, chamadas A e B que são ligadas, conectadas por duas pontes dissulfídicas (BERNE, 2004).

É através da ligação ao receptor de membrana plasmática específico, o IR, que ocorre a ação da insulina. Presente em quase todos os tecidos dos mamíferos, sendo em maior concentração no fígado e no tecido adiposo (HABER et al., 2001).

Esse receptor glicoproteico é um tetrâmero composto por duas subunidades α , que são extracelulares, onde se encontra o sítio de ligação com a insulina, e duas subunidades β , proteína transmembrana, que é responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase (KASUGA, 1982). Essas subunidades são ligadas entre si por pontes dissulfeto, formando um complexo heterotetramérico $\alpha_2\beta_2$ (OBBERGHEN, 1994).

A transdução do sinal inicial ocorre na subunidade β do receptor via atividade tirosina quinase. Enquanto não há ocupação de insulina na subunidade α extracelular do receptor, a quinase é mantida inativa. Quando uma única molécula de insulina se liga à subunidade α , esta quinase é ativada (BERNE, 2004), promovendo uma autofosforilação do receptor, dessa maneira, aumentando a capacidade de fosforilação dos substratos protéicos intracelulares, que são conhecidos como substratos do receptor de insulina homólogos e específicos (IRS).

A fosforilação desses substratos promove uma série de eventos regulatórios dos efeitos metabólicos e de crescimento celular (WHITE, 1997), como a ativação de diversas vias de sinalização intracelular: a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-K), a cascata Cbl/CAP e a cascata da proteína quinase ativada por mitógenos (MAP Kinase), responsáveis pela coordenação e integração do metabolismo intermediário

celular, transportes de glicose, síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas e do crescimento e diferenciação celular, respectivamente (BOURA-HALFON; ZICK, 2009).

Sendo assim, a insulina desempenha um importante papel nesse contexto, por suas atividades de estimulação do crescimento através de seus próprios receptores, também pelos receptores de IGF-I ou por ambos os receptores (LARON, 2008).

2.4 IGF-I E SEU RECEPTOR

IGF-I são peptídeos que desempenham importante função para o crescimento e desenvolvimento, sendo mediadores das atividades anabólicas e mitogênicas do GH. (LARON, 2001).

Salmon e Daughaday (1957), os identificaram e os denominaram como fator de sulfatação por mediar o efeito do GH no processo de sulfatação da cartilagem e no processo de crescimento longitudinal do osso.

Em 1971, Dulak e Temin investigando esses fatores de crescimento presentes no soro, identificaram um que apresentava atividade estimulatória múltipla, semelhante ao papel da insulina.

Esses fatores em seguida receberam o nome de um fator que não tinha sua atividade suprimida pelo anticorpo anti-insulina (NSILA), e um tempo depois tiveram o termo substituído por somatomedinas.

Posteriormente, demonstrou-se a semelhança estrutural entre a cadeia β desses fatores às da insulina, passando então a receber a denominação de fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) (RUSSO et al., 2005).

Com grande homologia à insulina, o IGF-I possui cadeias A e B que são conectadas por pontes dissulfídicas (Figura 1).

Em 2001, Obberghen et al. demonstram em seu trabalho pequenas diferenças encontradas entre os receptores de Insulina e de IGF-I. Sendo assim, o IGF-I também possui receptores compostos por duas cadeias α extracelulares, onde ocorrem as ligações específicas, e de duas cadeias β , glicoproteína transmembrana com atividade tirosina quinase (CHESICK, 2007).

Da mesma maneira que ocorre com insulina, quando inicia essa atividade tirosina quinase, o receptor de IGF-I sofre autofosforilação (KATO, 1994), e, quando ativado, o IGF-IR é capaz de fosforilar substratos, inclusive os substratos do receptor de insulina homólogos e específicos (IRS), tal como a IRS-1, iniciando a ativação de uma série de cascatas, como a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-K), Grb2 (receptor de fator de crescimento ligado a proteína 2), a cascata da proteína quinase ativada por mitógenos (MAP Kinase) (LARON, 2001).

E essa semelhança estrutural à insulina que explica a capacidade de o IGF-I também se ligar aos receptores de insulina, porém com afinidades baixas (BERNE, 2004).

O GH é considerado o mais importante dos hormônios para o crescimento normal. E a produção de IGF-I é feita através da ação desse hormônio. Sabe-se que a ingestão proteica deficiente causa alterações na produção desse hormônio, aumentando a sua secreção, comprometendo assim, o eixo GH-IGF (COSTANZO, 2004).

Fonte: (LAMOTHE et al., 1998).

Figura 1 – Estrutura do receptor de insulina e do receptor de IGF-I

Desta maneira, sendo a subnutrição um fator de alteração geral que causa efeitos prejudiciais à saúde e, em alguns casos irreversíveis, o presente trabalho intenta avaliar as Repercussões morfológicas da subnutrição e o papel da renutrição, visando contribuir para um melhor entendimento dos efeitos inerentes a essa doença que ainda se classifica como um dos mais preocupantes problemas de saúde pública, correlacionando aos benefícios associados à renutrição, visto em diversas pesquisas.

3 PROPOSIÇÃO

Correlacionar as alterações metabólicas e morfofuncionais sobre o tecido epitelial da mucosa lingual de ratos Wistar, submetidos à subnutrição e a renutrição nas fases púbere e adulta, avaliando os seguintes parâmetros quantitativos:

1. Densidade de células reativas ao IGF1 e ao seu receptor;
2. Densidade de células reativas à Insulina e ao seu receptor.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os grupos experimentais foram formados por animais não isogênicos (n=3) de acordo com a ração oferecida, protéica ou hipoprotéica, e com as respectivas idades, nos grupos N, S (nutridos e subnutridos aos 60 dias de vida), R (renutridos a partir de 21 dias até alcançarem 60 dias de vida), NN (nutridos até 100 dias de vida) e RR (renutridos desde 21 dias até alcançarem 100 dias de vida).

4.1.1 Obtenção dos grupos de animais relativos às dietas oferecidas

Foram utilizados ratos jovens, machos e fêmeas, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso entre 280 e 320 gramas. Durante o acasalamento, 1 macho foi mantido com 2 fêmeas durante um período de 7 a 10 dias, no qual foi oferecida sem restrições, a ração para roedores AIN-93G, que segue as especificações do protocolo preconizado pelo “American Institute of Nutrition” (REEVES et al., 1993). A ração foi preparada em laboratório especializado¹. Alguns animais receberam ração denominada **normoprotéica** contendo 20% de caseína e outros, ração **hipoprotéica**, com apenas 5% de caseína. Após o acasalamento, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais de acordo com as rações oferecidas formando os grupos de animais nutridos (**N**) e subnutridos (**S**), e mantidas com as respectivas dietas durante a gestação e a amamentação, junto com os filhotes, até que estes atingissem 21 dias de vida, época determinada para o desmame. Após esse período, **os filhotes nutridos subnutridos foram** mantidos com suas respectivas dietas até que completassem 60 dias de vida, constituindo assim os grupos **N** e **S**. Para a formação do grupo renutrido (**R**) foram utilizados animais subnutridos que, a partir do 22º dia, passaram a receber a ração normoprotéica, até que atingissem 60

¹ Rhoster indústria e comércio LTDA, Araçoiaba da Serra, S.P, Brasil

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, em uma sala com controle de temperatura por meio de aparelho de ventilação com fotoperíodo de 12 horas para mensuração de peso, ingestão de ração e de água, e excreção de fezes e urina. Os dados foram coletados diariamente até os 60 dias de vida, sendo documentados em protocolo experimental com o intuito de se controlar possíveis variações.

A fim de se observar se as alterações estruturais decorrentes principalmente dos processos de subnutrição e conseqüente renutrição se instalam de forma permanente, foi criado um grupo de animais renutrídos até 100 dias de vida (**RR**) e seu respectivo controle, o grupo **NN**, mantidos com a ração normoprotéica até esse período, correspondente à fase adulta do animal (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática da obtenção dos grupos de animais

4.2 ANÁLISE METABÓLICA

A análise metabólica se deu através do uso de um protocolo que contou com acompanhamento diário de todos os parâmetros metabólicos, em sala exclusiva para o experimento.

As gaiolas metabólicas² utilizadas no experimento possuem espaço destinado ao animal de acordo com os princípios da Comissão de Ética do ICB.

Cada gaiola apresenta uma marcação para a identificação do animal, comedouro que contém um compartimento de desperdício de ração, bebedouro acompanhado de um tubo coletor de desperdício de água, tubo coletor de fezes e tubo coletor de urina.

Os parâmetros de pesagem foram feitos através de uma balança de precisão³ e, para a obtenção do peso do animal, foi utilizado um recipiente que teve o seu peso excluído.

Também foi realizada a pesagem do comedouro, com valores obtidos da ingestão de ração em gramas (g). Para a ingestão de água, somou-se o volume do bebedouro com o tubo coletor de desperdício de água, graduado em mililitros (ml).

Para a coleta das excretas, um funil de escoamento da urina e direcionamento das fezes na parte inferior da gaiola os levava aos seus devidos tubos coletores, onde, com o peso do tubo descartado, foram obtidos os dados de excreção de fezes em gramas (g), e os da urina, analisados através da graduação contida no tubo, em mililitros (ml).

Os dados foram registrados em uma ficha, com todos os parâmetros metabólicos de cada animal, sendo observadas qualquer alteração ou mudança comportamental do animal, pelo período de 60 dias.

Quando os animais atingiram os 60 dias de vida, os grupos S, R e N foram retirados da gaiola e eutanasiados. Devido ao tamanho e, conseqüentemente, à limitação de movimento no interior da gaiola metabólica, os animais com 100 dias (grupos NN e RR), foram transferidos para caixas retangulares e mantidos em uma sala de controle anexa (Figura 3).

² TECNIPLAST® - modelo 3700M081, Buguggiate, Va, Itália

³ Marte – modelo AS1000C

Figura 3 – Monitoramento dos animais – (A) gaiola metabólica, (B) Estante vertical com 12 gaiolas metabólicas, (C) Caixas plásticas retangulares, e estante de acondicionamento tradicional. Bebedouro (**seta azul**), comedouro com compartimento de desperdício de ração (**seta verde**), tubo coletor de água desperdiçada (**seta roxa**), tubo coletor de fezes (**seta branca**) e tubo coletor de urina (**seta rosa**)

4.3 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

Após a eutanásia em câmara de dióxido de carbono⁴ (CO₂), os animais tiveram a língua dissecada. Resumidamente, o animal foi colocado em decúbito dorsal e teve a mandíbula aberta, a fim de se expor o órgão. A seguir, o ápice da língua foi tracionado para fora da cavidade bucal evidenciando-se o freio da língua, que foi seccionado com o auxílio de uma tesoura, o que permitiu estirar a língua, a fim de se evidenciar a sua raiz. Com o auxílio de um bisturi, praticou-se na parte mais posterior do órgão, uma incisão transversal ao seu longo eixo, obtendo-se assim, a língua com as suas partes anatômicas constituintes, ou seja, a raiz e o dorso. Identificando-se o limite entre ambas, o forame cego, promoveu-se a uma nova incisão transversal nessa região, que permitiu separar as duas partes constituintes do órgão. Todo o trabalho foi realizado no dorso da língua (Figura 4).

Os espécimes de todos os grupos foram fixados em Bouin (STEFANINI et al., 1967) por 8 horas e processados pelas técnicas de rotina para a desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

Posteriormente, secções histológicas semi-seriadas de 5µm de espessura foram realizadas transversalmente ao longo eixo do órgão, em micrótomo⁵, com navalha de aço e colhidas em lâminas, contendo 5 cortes cada. Após desparafinização em estufa a 60°C durante o período noturno, os cortes foram processados nas etapas de diafanização e rehidratação em série decrescente de etanol (desde o absoluto até 50° - 2 min. cada)⁶ e as lâminas foram reservadas e destinadas às devidas técnicas de microscopia de luz.

⁴ Biotério do Departamento de Anatomia da ICB/USP

⁵ Micrótomo – modelo Leica SM 2000R

⁶ Processamento histológico realizado no Laboratório Multiusuário de Histologia do Departamento de Anatomia do ICB/USP

Figura 4 – Língua do animal após dissecação. A **seta vermelha** indica o forame cego, onde foi feita a incisão para limitação da parte dorsal, indicada através da **chave azul**

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ

4.4.1 Técnicas rotineiras de histologia

Para a evidenciação dos componentes estruturais da língua, os cortes foram submetidos às colorações pelos métodos da Hematoxilina-eosina (BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976), do Azo-carmin (ROMEIS, 1968) e do Picro-sirius (MONTES; JUNQUEIRA, 1991) para tipificação das fibras colágenas e analisado sob luz polarizada⁷.

⁷ Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioshop 40 - Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e Cirurgia - LAFACC

4.4.2 Imunohistoquímica para a identificação da Insulina, do IGF-I e respectivos receptores

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 a 3% de H₂O₂ 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)⁸ e anti-insulin R β (H-70)⁸, 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 os anticorpos anti-IGF-I (H-70)⁸ e anti-IGF-IR (H-60)⁸, respectivamente, na diluição 1:250, também a mais adequada, por prévia 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°, na proporção de 1:200, diluído em PBS. Em seguida, foram lavados com Triton X à 0,01% diluído em PBS. Com um preparo de 30 minutos de antecedência, os cortes foram incubados com Vectastain ABC⁹, também diluído em PBS, na proporção de 1:100, por 30 minutos. Após lavagem com PBS por 5 minutos e reagidos com DAB⁹ por 8 minutos, à temperatura ambiente, os cortes foram lavados com água destilada por 5 minutos, desidratados em série crescente de álcoois (70%, 95% e 100% - 2x cada), diafanizados em Xilol e montados com resina¹⁰ entre lâmina e lamínula.

Todas as reações foram acompanhadas por uma ou mais lâminas controle, submetidas a todas as etapas do procedimento suprimindo-se, entretanto, a aplicação do anticorpo primário.

⁸ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

⁹ Vector Laboratories

¹⁰ Entellan (MERCK)

4.5 MÉTODOS QUANTITATIVOS

A quantificação foi realizada por meio um sistema de imagem¹¹ devidamente calibrado e com câmera¹² acoplada a um microscópio de luz¹³ 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 porcentagem de células do epitélio lingual que apresentaram imunomarcção, foi utilizado um sistema-teste com pontos fixos e sistematicamente equidistantes (total de 475 pontos) elaborado em uma folha de acetato transparente, conforme preconizado por Mandarin-de-Lacerda (1995).

Desta forma, em 10 cortes de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, e corados pelos métodos da HE e imunohistoquímicos (insulina, receptor de insulina, IGF-I, receptor de IGF-I) foram fotografados 3 campos (com objetiva de 100x, sob imersão), perfazendo um total de 30 campos por grupo (N, S, R, NN, RR), 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 5, A e B).

¹¹ Axiovision (Carl Zeiss)

¹² Axiocam (Carl Zeiss)

¹³ Axioskop (Carl Zeiss)

Figura 5 – Fotomicrografia de cortes histológicos da mucosa lingual de ratos (A e B). A-Corte da mucosa lingual corado com HE, onde se identifica a camada epitelial e a lâmina própria. Sobre a imagem, um exemplo de sistema teste de pontos, a fim de se determinar a densidade de células epiteliais. B-Corte da mucosa lingual evidenciando células imunorreativas ao anticorpo (setas azuis**), destacando-se daquelas não reativas (**setas vermelhas**)**

4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos na quantificação das células imunorreagidas da camada basal do epitélio, foram submetidos a uma análise da variância com 1 fator (grupo), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, com nível de significância $p < 0.05$ (ZAR, 1984).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE METABÓLICA

No que se refere ao comprimento dos animais, o grupo R assemelhou-se ao grupo N, enquanto os animais do grupo S apresentaram-se bem menores. Quanto ao peso corporal, o grupo R não conseguiu alcançar o grupo controle (N), e o peso do (S) subnutrido ficou muito abaixo do verificado para os outros dois grupos. (Figura 6).

Figura 6 – Comprimento dos animais dos grupos N, S e R

Na tabela 1 e gráfico 1 estão expressos, para fins comparativos, os dados relativos à média do peso corporal dos animais dos grupos N, S e R mantidos em caixas e em gaiolas metabólicas.

Tabela 1 – Comparação entre o peso corporal de animais acondicionados em gaiolas e em caixas (g) durante o período experimental de 60 dias (Grupos N, S, R)

	Caixa	Metabólica
S	48,81 ± 10,96	61,10 ± 19,51
N	281,35 ± 32,28	283,43 ± 15,73
R	204,09 ± 19,37	210,28 ± 24,15

S≠N, S≠R e R≠N independente de serem animais da caixa ou da metabólica, ANOVA, $p < 0.05$

Gráfico 1 – Comparação entre o peso corporal de animais acondicionados em gaiolas e em caixas (g) durante o período experimental de 60 dias (Grupos N, S, R)

Os dados permitiram verificar, que existem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (N, S e R); todavia, em um mesmo grupo, não foram detectadas diferenças na massa corporal entre os animais mantidos nas caixas e em gaiolas metabólicas.

A seguir, os dados metabólicos obtidos através da mensuração diária dos parâmetros, permitiu a comparação do peso corporal entre os grupos, analisados por 6 semanas, equivalente ao período em que permaneceram em gaiolas metabólicas (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 2 – Média do peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (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

S1: S=R, S≠N, R≠N

ANOVA, $p < 0.05$

S2, S3, S4, S5 e S6: S≠N, S≠R e R≠N

Gráfico 2 – Média do peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)

Através desses dados, 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 semanas todos diferiram ($p < 0.05$). Semana após semana, os grupos **N** e **R** apresentaram diferença significativa, ambos predominando sobre **S**.

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 3; Figura 3).

Tabela 3 – Média da ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (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

S1, S2, S3, S4 e S5: S≠N, S≠R e R≠N
S6: S≠N, S≠R, R=N

ANOVA, $p < 0.05$

Gráfico 3 – Média da ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)

Referente à ingestão de água semanal, os dados expressos na tabela 4 e figura 4 permitem verificar que 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.

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 4 – Média da ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (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

S1, S2, S3, S4, S5 e S6: S≠N, S≠R e R≠N

ANOVA, p<0.05

Gráfico 4 – Média da ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)

Quando se analisou o parâmetro excreção de urina (Tabela 5; Gráfico 5), 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 5 – Média da excreção de urina dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (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

S1, S2, S3, S4, S5 e S6: S≠N, S≠R e R≠N

ANOVA, p<0.05

Gráfico 5 – Média da excreção de urina dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)

Em relação à excreção de fezes, 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 6 e gráfico 6).

Tabela 6 – Média da excreção de fezes dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (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

S1: S=N, e R≠N

ANOVA, p<0.05

S3: S≠N, S=R e R≠N

S4, S5 e S6: S≠N, S≠R e R≠N

Gráfico 6 – Média da excreção de fezes dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)

Para estabelecer comparações funcionais dos grupos diante dos resultados metabólicos, estão expressas nas tabelas 7, 8 e 9 e gráficos 7, 8 e 9, a relação entre esses parâmetros analisados nos diferentes grupos:

Tabela 7 – Média da razão entre a ingestão alimentar e peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)

	N	S	R
S1	0.146 ± 0.013	0.188 ± 0.034	0.201 ± 0.022
S2	0.121 ± 0.006	0.254 ± 0.059	0.179 ± 0.021
S3	0.102 ± 0.006	0.251 ± 0.091	0.145 ± 0.019
S4	0.093 ± 0.008	0.222 ± 0.047	0.122 ± 0.016
S5	0.075 ± 0.006	0.169 ± 0.054	0.100 ± 0.013
S6	0.068 ± 0.005	0.141 ± 0.051	0.087 ± 0.014

S1: S=R, e S≠N, R≠N

ANOVA, p<0.05

S2, S3, S4, S5 e S6: S≠N, S≠R e R≠N

Gráfico 7 – Relação entre a ingestão alimentar e peso corporal dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)

Ao avaliar a razão entre a ingestão alimentar e peso corporal, observou-se que os animais do grupo S exibiram uma porcentagem elevada, diferindo dos demais grupos (N, R). Apenas na primeira semana não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos S e R. Ao longo das 6 semanas, os animais do grupo R apresentaram diminuição da razão.

Tabela 8 – Média da razão entre a excreção de fezes e ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)

	N	S	R
S1	0.073 ± 0.015	0.111 ± 0.042	0.064 ± 0.200
S2	0.118 ± 0.018	0.132 ± 0.033	0.100 ± 0.022
S3	0.116 ± 0.013	0.154 ± 0.054	0.111 ± 0.016
S4	0.129 ± 0.024	0.139 ± 0.038	0.126 ± 0.026
S5	0.149 ± 0.023	0.133 ± 0.025	0.129 ± 0.034
S6	0.147 ± 0.020	0.110 ± 0.022	0.140 ± 0.030

S1, S2 e S3: S≠R
S1, S3 e S6: S≠N

ANOVA, $p < 0.05$

Gráfico 8 – Relação entre a excreção de fezes e ingestão alimentar dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (g)

Quando analisada a razão entre excreção de fezes e ingestão alimentar, pode-se observar que na primeira semana o grupo S diferiu entre os grupos N e R, que não apresentaram diferenças entre si. Durante as demais semanas, até a 6ª semana, pode-se observar diminuição da razão dos animais do grupo S, enquanto que os demais grupos apresentaram um aumento da razão.

Tabela 9 – Média da razão entre a excreção de urina e ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)

	N	S	R
S1	0.561 ± 0.073	0.374 ± 0.2651	0.405 ± 0.123
S2	0.575 ± 0.149	0.369 ± 0.2225	0.620 ± 0.128
S3	0.599 ± 0.088	0.486 ± 0.1615	0.603 ± 0.098
S4	0.626 ± 0.091	0.513 ± 0.1436	0.629 ± 0.112
S5	0.637 ± 0.078	0.586 ± 0.1711	0.649 ± 0.091
S6	0.703 ± 0.127	0.584 ± 0.1663	0.711 ± 0.154

S1: S=R

ANOVA, $p < 0.05$

S2, S3, S4, S5 e S6: S≠N, S≠R e R≠N

Gráfico 9 – Relação entre a excreção de urina e ingestão de água dos grupos N, S e R durante o período experimental de 6 semanas (ml)

Referente à razão entre excreção de urina e ingestão de água, observou-se que os animais dos grupos S e R apresentaram-se semelhantes na 1ª semana, diferindo-se do grupo N. Nas demais semanas, o grupo S apresenta razão diminuída em relação aos grupos N e R, que apresentam-se semelhantes estatisticamente.

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

Na tabela 10 e gráfico 10, estão expressos os dados relativos à média ($\pm$ Desvio Padrão), da densidade de células epiteliais evidenciadas pela técnica da HE, para os diferentes grupos (N, S, R, NN e RR).

Tabela 10 – Porcentagem da densidade de células epiteliais dos grupos S, N, R, NN e RR

	S	N	R	NN	RR
HE	159,95 $\pm$ 30,71	172,28 $\pm$ 24,25	150,06 $\pm$ 3,46	195,47 $\pm$ 21,02	176,89 $\pm$ 11,04

ANOVA, $p < 0.05$

Gráfico 10 – Média da densidade de células epiteliais dos grupos S, N, R, NN e RR

A análise estatística permitiu verificar que, entre os diferentes grupos, não foram verificadas diferenças significantes.

Relativamente às células imunomarcadas para **Insulina** e **Receptor de insulina**, as percentagens celulares estão evidenciadas na tabela 11 e gráficos 11 e 12.

Tabela 11 – Média da percentagem de células imunorreativas à insulina e ao receptor de insulina dos grupos S, N, R, NN e RR

	%I	%IR
S	38,60 ± 5,38	39,50 ± 5,52
N	28,31 ± 5,16	26,60 ± 7,42
R	44,96 ± 1,85	39,00 ± 3,71
NN	32,66 ± 3,55	23,53 ± 6,23
RR	38,40 ± 3,08	34,10 ± 2,45

%I: R≠N; R≠NN
%IR: S≠NN; R≠NN

ANOVA, $p < 0.05$

Gráfico 11 – Percentagem de células imunorreativas à insulina dos grupos S, N, R, NN e RR

Gráfico 12 – Porcentagem de células imunorreativas ao receptor de insulina dos grupos S, N, R, NN e RR

Quanto à média da porcentagem de células imunomarcadas pela **insulina**, estatisticamente, muito embora não tenham sido observadas diferenças entre o grupo S e seu respectivo controle (N), há uma tendência de o grupo subnutrido apresentar uma densidade celular elevada. Ao se comparar o grupo R com os grupos N e NN, evidenciou-se um aumento estatisticamente significativo de células epiteliais imunomarcadas nos animais renutridos.

A média da porcentagem de células imunomarcadas pelo **receptor de insulina** foi estatisticamente maior no grupo S em relação ao grupo NN, e entre o grupo R e o grupo NN. As demais interações, não foram estatisticamente significantes entre si.

Na tabela 12 e gráficos 13 e 14, estão expressas as médias das porcentagens das células imunomarcadas para o **IGF-I** e o seu respectivo receptor, o **IGF-IR**.

Tabela 12 – Média da porcentagem de células imunorreativas ao IGF-I e ao IGF-IR dos grupos S, N, R, NN e RR

	%IGF-I	%IGF-IR
S	50,65 ± 11,25	42,29 ± 8,57
N	29,17 ± 3,40	24,72 ± 3,27
R	45,54 ± 3,25	38,23 ± 2,96
NN	25,41 ± 2,60	27,83 ± 4,22
RR	29,85 ± 1,77	24,28 ± 3,47

%IGF-I: S e R ≠ N, NN e RR;

ANOVA, $p < 0.05$

%IGF-IR: S≠N, NN e RR; R≠N e RR

Gráfico 13 – Porcentagem de células imunorreativas ao IGF-I dos grupos S, N, R, NN e RR

Gráfico 14 – Porcentagem de células imunorreativas ao IGF-IR dos grupos S, N, R, NN e RR

Quanto ao **IGF-I**, os animais do grupo S exibiram uma porcentagem de células estatisticamente maior do que a verificada para os grupos N, NN e RR. Para esse hormônio, os animais do grupo R apresentaram uma porcentagem de células estatisticamente maior, quando comparados com os grupos N, NN e RR.

Em relação à média da porcentagem de células imunomarcadas pelo **IGF-IR**, o grupo S apresentou maior média de porcentagem de células, em comparação com os grupos N, NN e RR, que não exibiram diferenças estatísticas entre si. O mesmo foi observado para o grupo R, relativamente aos grupos N e NN.

5.3 ANÁLISE QUALITATIVA

Ao se avaliar os cortes corados pelo método do Azo-carmim verificou-se, nos animais dos grupos de 60 dias (N, S e R) a mucosa lingual preservada em suas camadas características. Desta forma, desde a lâmina própria profundamente situada, até a superfície queratinizada, o padrão estrutural foi o mesmo para todos os grupos. Aparentemente, a espessura da camada epitelial manteve-se em todos os grupos; todavia, foi nítida a diferença entre os grupos, quando se avaliou a forma das papilas filiformes. Estas, mostraram-se triangulares ao corte, ou seja, com ampla base e ápice afilado nos animais do grupo N, enquanto que nos demais grupos (S e R), nem sempre esse aspecto foi observado (Figuras 7 A, C, E).

Relativamente ao método do picro-sírius avaliado sob luz polarizada, nos animais dos grupos N e R ocorreu uma proporcionalidade no padrão de distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III, quando se analisou a região da lâmina própria. Já nos animais do grupo S, foi nítido o predomínio das fibras colágenas do tipo I (Figuras 7 B, D, F).

Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa lingual de ratos dos grupos N (A e B), S (C e D) e R (E e F). 7

A e B (**Grupo N**) Setas amarelas demonstrando o ápice das papilas filiformes afiados, a estrela branca indicando a camada epitelial bem definida, e os asteriscos identificando a lâmina própria, bem situada. Sob luz polarizada, predominância de ambas fibras colágenas, do tipo I (vermelhas, laranjas e amarelas) e tipo III (verde). Figura 7 C e D (**Grupo S**) **Asterisco identificando a lâmina própria**, setas amarelas identificando as papilas filiformes e estrela branca indicando a camada epitelial. Sob luz polarizada predominância de fibras colágenas do tipo I (vermelho, laranja e amarelo). Figura 7 E e F (**Grupo R**) Seta amarela indicando as papilas filiformes em aspecto diferente ao grupo controle. Asterisco indicando a lâmina própria bem caracterizada e a estrela branca, o epitélio recuperado. Equilíbrio na distribuição de fibras colágenas dos tipos I e III

Nos animais de 100 dias (NN e RR), através dos cortes corados pelo método do Azo-carmin, repetiram-se os mesmos aspectos estruturais observados para os correspondentes de 60 dias (grupos N e R). Da mesma forma, não foi possível se detectar diferenças aparentes quanto à espessura das camadas; todavia, em ambos os grupos, as papilas filiformes exibiram aspecto em bastonete, com pontas arredondadas, diferentemente do observado para o grupo N (Figuras 8 A, C).

Pelo método do picro-sírius, foi possível observar que, em ambos os grupos (NN e RR) o padrão de distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III foi proporcional, não havendo diferenças significativas (Figuras 8 B, D).

Figura 8 – Fotomicrografia da mucosa lingual de ratos dos grupos NN (A e B) e RR (C e D). 8 A e B (**Grupo NN**) Setas amarelas demonstrando o ápice das papilas filiformes arredondados, a estrela branca indicando a camada epitelial bem definida, e o asterisco identificando a lâmina própria, bem situada. Sob luz polarizada, predominância de ambas fibras colágenas, do tipo I (vermelhas, laranjas e amarelas) e tipo III (verde). (**Grupo RR**) Seta amarela indicando as papilas filiformes. Asterisco indicando a lâmina própria bem caracterizada e a estrela branca, o epitélio recuperado. Equilíbrio na distribuição de fibras colágenas dos tipos I e III

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS METABÓLICOS

Os resultados referentes ao peso corporal ao nascimento, peso corporal ao desmame e ganho de peso corporal indicam que a alimentação das ratas, do período de gestação até o desmame, com a dieta de 5% de proteína foi eficaz em causar um quadro de subnutrição nos filhotes. Torun e Chew (1994), relatam que a diminuição do peso corporal é uma medida clínica utilizada para caracterizar a subnutrição protéico-energética, sendo este parâmetro significativamente menor nos animais alimentados com dieta de baixo valor nutritivo em relação aos animais alimentados com dieta contendo valores e quantidades adequadas de nutrientes, principalmente proteína.

Ao destinar os animais aos seus devidos grupos, no período de desmame, observou-se diminuição significativa do tamanho e do peso corporal de animais cujas mães se alimentaram com ração hipoprotéica. Durante todo período experimental (60 dias), os animais do grupo **S** continuaram a demonstrar tamanho e peso corporal abaixo do ideal para sua idade. Estudos comprovam esses resultados, onde os principais sinais da restrição proteica são os relacionados ao crescimento e peso corporal (WATERLOW, 1997; NUNES, 2002; ROMANI; LIRA, 2004). Além disso, essas observações corroboram com estudo feito por Engelbregt (2004), que afirma que a subnutrição no período gestacional ou imediatamente após o nascimento, é capaz de alterar a estrutura corporal bem como a fisiologia e o metabolismo.

Quanto ao aspecto corporal, os animais que foram renutridos (grupo **R**) assemelhavam-se aos animais controle (grupo **N**) e, muito embora o peso corporal tenha aumentado, em nenhuma semana apresentou equivalência ao observado para os animais do grupo **N** (mínimo de 44% na 1ª semana, e máximo de 75% na 6ª semana). Esses dados podem ser observados em pesquisa feita por Sawaya (2006), que analisou a recuperação nutricional em crianças subnutridas, verificando que o ganho de peso é mais lento, enquanto que o crescimento ocorre rapidamente ao renutri-las.

Ao avaliar a razão da ingestão de ração com o peso do animal, verificou-se que os animais subnutridos (grupo S) ingeriram, proporcionalmente, muito mais ração, indicando uma necessidade maior em se alimentar, com o intuito de suprir sua carência protéica. Assim, segundo Savino et al. (2007), deve-se considerar as ações da leptina, que é produzida e liberada diretamente proporcional à massa de tecido adiposo no organismo, sinalizando ao hipotálamo a quantidade de energia armazenada, bem como a regulação da ingestão alimentar e da temperatura, e o hormônio intestinal grelina, responsável pelo aumento do apetite (que quando estimulada pela fome, segundo Kojima [2001] determina liberação de enzimas gástricas e hormônio do crescimento, estimulando o hipotálamo a intensificar os mecanismos para aquisição de energia (KRSEK et al., 2003; WERNETTE, 2011). Além desses, o hormônio de crescimento (GH) deve ser considerado pois, segundo Pimstone et al. (1968), a restrição protéica causa um aumento nos níveis séricos do mesmo, realizando então a lipólise, fornecendo a manutenção do corpo junto com os corticóides, por meio dos ácidos graxos. Desta forma, a secreção de leptina diminui no tecido adiposo, diminuindo também o processo de retroalimentação de ingestão de alimento no hipotálamo, fazendo o animal ingerir alimento em excesso, sem sacia-lo (BAPTISTA, 2008).

No que diz respeito à razão excreção de fezes/ingestão de ração, a excreção de uma porcentagem menor em relação ao que foi ingerido de ração pelos animais do grupo S demonstra uma possível necessidade de suprir a carência protéica através da maior absorção de ração, uma vez que uma das principais funções do trato gastrointestinal é a de transformar a energia dos alimentos ingeridos em combustível a ser utilizado pelo organismo (SEVÁ-PEREIRA, 1994).

A partir dos dados obtidos pela razão entre a excreção de urina/ingestão de água, também foram notadas alterações relativas aos animais do grupo S, que eliminou pouca urina em relação à ingestão de água, permitindo inferir uma maior retenção de água nos tecidos, provavelmente pelo baixo nível de proteínas plasmáticas.

Os animais renutridos (grupo R), exceto pelo peso corporal, em todos os outros parâmetros analisados (ingestão de ração e de água, excreção de urina e fezes, razão entre ingestão de ração/peso corporal, excreção de fezes/ingestão de ração e excreção de urina/ingestão de água) restabeleceram suas atividades

metabólicas, apresentando dados semelhantes aos dos animais controle (grupo N) ao longo das semanas em que foram submetidos à dieta normoprotéica.

Finalizando, os resultados obtidos na presente pesquisa permitem inferir que a subnutrição leva à um comprometimento no metabolismo corpóreo, e que a intervenção nutricional desses animais mostra-se efetiva através da renutrição.

6.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

A análise dos espécimes corados pelo método do Azo-carmim, permitiu evidenciar as características das camadas da mucosa lingual tanto na fase púbere quanto na adulta, com o padrão estrutural mantido também nos grupos que foram submetidos à subnutrição. Esses resultados podem ser correlacionados aos de Abreu et al. (2006) que, ao estudar a mucosa lingual de ratos Wistar adultos de 90 dias de vida submetidos à subnutrição protéico-calórica por um período de 45 dias, não encontraram alterações histológicas e ultra-estruturais significantes.

Todavia, ao se avaliar a morfologia das papilas filiformes, verificou-se diferenças entre os grupos, onde a forma triangular ao corte predominou nos animais nutridos de 60 dias, tomando, nos animais mais velhos (NN e RR), a forma em bastonete. Esses aspectos corroboram com Iwasaki et al. (1997), que, ao caracterizarem a morfogênese das papilas linguais de ratos, observaram que alterações ocorrem de acordo com o envelhecimento. Tal fator (idade) não se aplica, quando se tenta explicar o fato de a camada queratinizada dos grupos S e R apresentarem um aspecto diverso daquele do grupo N. Desta forma, o mais provável é que a deficiência protéica influencia no aspecto das papilas e que, portanto, a renutrição na fase púbere ainda não é suficiente para restaurar-lhes a morfologia, diferentemente do que se verifica na fase adulta, onde suas características estão restabelecidas e compatíveis com o grupo NN. Reforça essa teoria o trabalho de Iwasaki et al. (2007) em língua de ratos, ao aventar a possibilidade de que o fator de crescimento epidermal (EGF) pode afetar a expressão de queratina no epitélio lingual, através de interações epitélio-mesenquima.

Os resultados para a tipificação de colágeno na mucosa lingual, através da análise do Picro-sirius sob luz polarizada, permitiu observar que os animais subnutridos (S) apresentaram apenas predomínio de fibras maduras, ou seja, do tipo I, indicando a ausência de deposição de novas fibras, no caso, as do tipo III. Essa característica chama a atenção, pelo fato de ser muito semelhante à ação do processo de envelhecimento em diferentes órgãos e tecidos, como a cápsula ganglionar do plexo mioentérico do intestino grosso humano, onde a deposição de colágeno do tipo I foi associada a uma perda neuronal no interior dos gânglios (GOMES et al., 2006). Como não se obteve animais subnutridos de 100 dias (SS), com o estágio atual da presente pesquisa não foi possível estabelecer-se uma correlação entre esses achados.

A renutrição, já no período púbere (grupo R), foi capaz de retomar o padrão de normalidade quanto a esse aspecto, apresentando uma homogeneidade na distribuição das fibras do tipo I e das fibras do tipo III como encontrado no grupo controle (N), o que foi mantido até a fase adulta, nos grupos NN e RR. Dados como esses foram observados em estudos feitos por Xu et al. (1993) que, ao avaliarem a distribuição de fibras colágenas dos tipos I e III na mucosa oral de ratos e suas eventuais alterações relacionadas a idade, descreveram sua distribuição equitativa ao longo da mucosa oral de ratos durante o desenvolvimento pós-natal. Esses resultados permitem afirmar que a privação proteica efetivamente altera o padrão dessa distribuição da mucosa lingual, e que a correção nutricional induz à retomada dos parâmetros de normalidade, uma vez que, como assegurado por Iwasaki et al. (2008), o desenvolvimento da língua durante o período embrionário e pós-natal, está diretamente envolvido com a presença e alterações em vários níveis de proteína no epitélio e tecidos conjuntivo e muscular.

Quando analisada a densidade das células sensibilizadas com anticorpo de insulina, observou-se que os animais submetidos à subnutrição apresentaram uma densidade celular elevada, e que a renutrição até a fase púbere não demonstrou-se efetiva, uma vez que essa densidade chegou a uma porcentagem muito próxima do que foi visto em animais subnutridos, ficando os dois grupos, S e R, distantes dos parâmetros de normalidade, quando comparados ao grupo controle (N). Em relação à fase adulta, notou-se que o grupo RR aproxima-se dos parâmetros de normalidade quando comparado ao seu grupo controle (NN). Esse mesmo resultado foi encontrado ao sensibilizar as células com o receptor de insulina, resultado este já

esperado, uma vez que a ação da insulina inicia-se somente quando há a ligação com o seu receptor (HABER, 2001).

Tem sido demonstrado que a Insulina desempenha um importante papel no crescimento, promovendo uma cascata intracelular após a ligação com seu receptor, podendo ser definida em três vias de sinalização, onde a primeira media o transporte de glicose, a segunda desempenha funções metabólicas e a terceira, é a responsável pelo crescimento celular (BOURA-HALFON; ZICK, 2009). Desta maneira, pode-se afirmar que a insulina participa ativamente em eventos celulares que regulam os efeitos metabólicos e do crescimento, sendo considerada, em revisão promovida por Laron (2008), um hormônio do crescimento.

Tendo a Insulina e o IGF-I papéis homólogos, promovendo suas ações no crescimento através de seus próprios receptores, ou através de receptores híbridos (receptores de Insulina e IGF-I) resultados semelhantes aos obtidos para a insulina e seu receptor foram notados em relação ao hormônio IGF-I e seu receptor, ou seja, foi detectada uma elevada porcentagem de células sensibilizadas pelo IGF-I no grupo S, não sendo retomado os padrões de normalidade nos animais do grupo R.

Assim como para a insulina e seu receptor, no caso do IGF-I e receptor, comprovou-se os efeitos positivos da renutrição se continuada até a fase adulta (grupo RR), pois esse grupo demonstrou uma porcentagem de células sensibilizadas, tanto de IGF-I quanto de seu receptor, semelhantes ao dos animais nutridos (NN).

Como se sabe, a Insulina e o IGF-I participam ativamente do crescimento e diferenciação celular em conjunto com seus receptores, devido suas homologias estruturais, permitindo relacionar os resultados obtidos aos descritos na literatura.

Assim, estudo feito em língua de ratos durante o desenvolvimento embrionário e neonatal, demonstrou que o RNAm do IGF-I e de seu receptor foram altamente expressos na camada epitelial adjacente à camada muscular, o que permitiu a Luiz (2009), ao avaliar a taxa de renovação epitelial através da quantificação do número de células em mitose na mucosa lingual de ratos subnutridos, elucidar que a subnutrição causa um comprometimento no crescimento, fato este confirmado na presente pesquisa, uma vez que houve um aumento na densidade das células imunomarcadas com os hormônios ligados ao crescimento estudados.

Informações adicionais podem corroborar com esses resultados, como o demonstrado em estudos feitos por Pimstone et al. (1968), onde os níveis de GH aparecem elevados no plasma de pacientes subnutridos, sugerindo que a depleção protéica, nessas condições, pode ter agido como estímulo para secreção do hormônio de crescimento. Sabe-se que a principal função do GH é a de promover o crescimento longitudinal mediado pela produção de IGF-I, podendo atuar de maneira autócrina/parácrina, atuando no local onde foi secretado, ou nas células-alvo adjacentes, mediante a produção de IGF-I local, ou de maneira endócrina, ou seja, as células secretoras liberam o hormônio na corrente sanguínea para atuar em todas as células-alvo do corpo. Sendo assim, quando há alterações nos níveis de GH produzido, a liberação do IGF-I também é afetada (DONAHUE et al., 1993; MELMED; KLEINBERG, 2002).

Como descrito por Castro e Guerra-Júnior (2005), o IGF-I apresenta suas concentrações sistematicamente aumentadas, em paralelo com o crescimento pós-natal e puberal, declinando após a interrupção do crescimento e voltando a aumentar na velhice. Esta é uma importante característica que deve ser relacionada aos resultados aqui apresentados, uma vez que os animais nutridos, tanto na fase púbere quanto adulta, e os renutridos até a fase adulta, demonstraram uma quantidade mais baixa de células com a expressão de insulina, IGF-I e seus respectivos receptores, permitindo afirmar que houve um retardo de crescimento em animais que se alimentaram com dieta hipoprotéica

Em diversos estudos avaliando as concentrações séricas de insulina e de IGF-I, foram descritos que esses parâmetros demonstram-se inferiores nos animais que sofreram restrição proteica (MAITER et al., 1988; DAHARI et al., 1991; WOODS, 1996; MUAKU, 1997; DAS et al., 1998; LATORRACA, 1998; SOLIMAN et al., 2000; YANG, 2001; ALMEIDA; MELLO, 2004). Esses resultados, em contraste com os aqui obtidos no tecido da mucosa lingual, evidenciam um padrão de retroalimentação negativa, onde, enquanto o IGF-I e a Insulina sistêmica estão reduzidos, há uma compensação nos hormônios deste tecido, apresentando-se em porcentagens elevadas. Sendo assim, correlacionando essas informações, enquanto o nível sérico de Insulina e de IGF-I apresentam-se elevados em animais nutridos e baixo em subnutridos, os encontrados neste trabalho demonstraram o padrão contrário.

Apenas no caso dos animais renutridos até a fase púbere que esse padrão não se estabelece, porém, pode ser explicado por um provável processo de turnover

celular, ou seja, embora em resultados anteriores, pelo método de BrDU, Luiz (2009) tenha verificado um aumento de células em processo de mitose, isso não foi confirmado nos experimentos histológicos pela coloração de HE o que, em suma, pode indicar as ações mitogênicas da Insulina e do IGF induzindo a mitose celular, que ainda não se pode esclarecer de maneira satisfatória, com a metodologia aqui empregada.

Para reforçar essas informações, Laron et al. (2007) demonstraram a complexa interrelação entre os hormônios aqui estudados, indicando que: o GH estimula a secreção de insulina; o IGF-I estimula a somatostatina, que diminui a secreção de insulina; o IGF-I diminui a secreção de insulina, enquanto que este estimula a produção de IGF-I e, por fim, ambos (insulina e IGF-I) causam a diminuição da proteína ligante, IGFBP-I (causando um aumento de IGF-I livre, biologicamente ativo).

Finalizando, a partir dos resultados obtidos na presente pesquisa, foi evidenciado que a subnutrição, especificamente na mucosa lingual, foi um fator que promoveu alterações que comprometeram o tecido, e a renutrição na fase púbere não demonstrou-se totalmente efetiva, como evidenciado na fase adulta.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com as proposições estabelecidas, e tendo em vista metodologia aplicada, os resultados permitiram concluir que:

1. Os animais subnutridos (S) apresentaram tamanho e peso corporal menor;
2. Os animais renutridos (R) retomaram o tamanho, mas não o peso corporal;
3. A subnutrição, proporcionalmente, promoveu a maior razão de ingestão/peso corporal, porém a menor entre excreção de fezes/ingestão de ração e excreção de urina/ingestão de água;
4. Na maioria dos parâmetros metabólicos avaliados, os animais do grupo R demonstraram inicialmente um comportamento semelhante aos dos animais subnutridos (S), e, ao longo das semanas, seu comportamento se assemelhou ao dos animais nutridos (N);
5. Todos os grupos estudados não apresentaram diferenças relativas às camadas da mucosa lingual;
6. No período púbere, as papilas filiformes do grupo N apresentaram forma triangular ao corte, sendo que nos grupos S e R, nem sempre esse aspecto foi detectado;
7. Na fase adulta, as papilas filiformes dos grupos NN e RR assumiram a forma em bastonete, provavelmente devido à atrição;
8. Os animais subnutridos (S) apresentaram apenas predomínio de fibras colágenas maduras do tipo I, semelhante ao verificado no processo de envelhecimento em diferentes órgãos e tecidos;
9. Com a renutrição (grupo R) verificou-se, já no período púbere, uma homogeneidade na distribuição das fibras dos tipos I e III, semelhante ao observado nos animais controle (grupo N), o que foi mantido até a fase adulta, nos grupos NN e RR;
10. As densidades de células imunorreativas à Insulina e seu receptor, (IR), bem como IGF-I e seu receptor (IGF-IR) apresentaram-se elevadas no grupo subnutrido (S);
11. Na fase púbere, com a renutrição (grupo R), as porcentagens de células com imunomarcção **dos** hormônios de Insulina e IGF-I e seus respectivos

receptores (IR e IGF-IR) apresentaram-se elevadas, quando comparadas ao grupo nutrido (N);

12. Animais renutridos até a fase adulta (RR) demonstraram densidade de células imunomarcadas pelos hormônios de Insulina, IGF-I e seus receptores semelhantes aos do grupo nutrido (NN).

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. 523-527, 2006.
- ADAMS, P. H. Intra-uterine growth retardation in the pig. II. Development of the skeleton. **Biology of the Neonate**, v. 19, p. 341-353, 1971.
- ALBRECHT MAY, C. Comparative Anatomy of the Optic Nerve Head and Inner Retina in Non-Primate Animal Models Used for Glaucoma Research. **The Open Ophthalmology Journal**, v. 2, p. 94-101, 2008.
- ALMEIDA, P. B. L.; MELLO, M. A. R. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v.18, n.1, p.17-30, 2004.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. Barueri: Manole, 1992.
- 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.
- BARKER, D. J.; HALES, C. N.; FALL, C. H.; OSMOND, C.; PHIPPS, K.; CLARK, P. M. Type 2 (non-insulindependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, p. 62–67, 1993.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart-Edusp, 1976. 225 p.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- 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. 68 f. 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 of Membrane Biology**, v. 148, p. 177-184, 1995.

BOSCHERO, A. C.; SZPAK-GLASMAN, M.; CARNEIRO, E. M.; BORDIN, S.; PAUL, I.; ROJAS, E.; ATWATER, I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin from rat pancreatic islets by oxotremorine-m involves M3 muscarinic cholinergic receptor. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. E336-E342, 1995.

BOUJENDAR, S.; REUSENS, B.; MERZAK, S.; AHN, M. T.; ARANY, E.; HILL, D.; REMACLE, C. Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. **Diabetologia**, v. 45, p. 856-866, 2002.

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.

BUENO, M. P. **Modelo experimental de restrição de crescimento intrauterino em ratas prenhes e suas repercussões em receptores celulares de insulina**. 2010. 140 f. Tese (Doutor em Tocoginecologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p.419-425, 2002.

CASTRO, A. M. S.; GUERRA-JÚNIOR, G. GH/IGF e Neoplasia: o que há de novo nesta associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 833-842, 2005.

CHESIK, D.; DE KEYSER, J.; WILCZAK, N. Insulin-like growth factor-binding protein-2 as regulator of IGF actions in CNS: Implications in multiple sclerosis. **Cytokine & Growth Factors Reviews**, v. 18, p. 267-278, 2007.

CLAYENSSSENS, 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, p. 676-681, 1990.

CONSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DAHARI, S.; SNOECK, A.; REUSENS, B.; REMACLE, C.; HOET, J. J. Islet function in offspring of mothers on lowprotein diet during gestation. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 115-120, 1991.

DAS, B. K.; RAMESCH, J.; AGARWAL, J. K.; MISHRA, O. P.; BHATT, R. P. Blood sugar and serum insulin response in protein-energy malnutrition. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 44, p. 139-141, 1998.

DESAI, M.; CROWTHER, N. J.; LUCAS A, HALE, C. N. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 591-603, 1996.

Diabetologia, v. 45, p. 856-866, 2002.

DONAHUE, L. R.; WATSON, G.; BEAMER, W. G. Regulation of metabolic water and protein compartments by insuline-like growth factor-I and testosterone in growth hormone – deficient lit/lit mice. **Journal of Endocrinology**, v. 139, p. 431-439, 1993.

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, 1993.

DU TOIT, D. F. The tongue: structure and the function relevant to disease and oral health. **South-African Association Dentistry Journal**, v. 58, p. 375-383, 2003.

DULAK, N. C.; TEMIN, H. M. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplicationstimulating activity for embryo fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v. 81, p. 153–160, 1973.

during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. **Biology of the Neonate**, v. 57, p. 107-118, 1990.

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.

FERREIRA, F. **Modulação colinérgica da secreção de insulina em ilhotas de ratos alimentados com dieta hipoprotéica**. 2002. 98 f. Dissertação (Mestre em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FISH, H. S.; MALONE, P. D.; RICHTER, C. P. The anatomy of the tongue of the domestic Norway rat. **The Anatomical Record**, v. 89, p. 429-440, 1944.

FLIESEN, T.; MAITER, D.; GERARD, G.; UNDERWOOD, L. E.; MAES, M.; KETELSLEGERS, J. M. Reduction of serum insulin-like growth factor-I by dietary protein restriction is age dependent. **Pediatric Research**, v. 26, p. 415-419, 1989.

GAROFANO, A.; CZERNICHOW, P.; BRÉANT, B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. **Diabetologia**, v. 40, p. 1231-1234, 1997.

GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; VASCONCELOS FONTES, R. B. de; LIBERTI, E. A. Effets of pre and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study. **Autonomic Neuroscience**, v 126-127, p. 277-284, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HABER, E. P.; CURI, C.; CARVALHO, C. R.; CARPINELLI, A. R. Secreção de insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica**, v. 45, p. 219-227, 2001.

HAJ, 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 rat skeletal muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85, p. 281-287-287, 1986.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595-601, 1992.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P.; CLARK, P. M. S.; COX, L. J.; FALL, C.; OSMOND, C.; WINTER, P. D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **British Medical Journal**, v. 303, p. 1019-1022, 1991.

HEDLEY-WHITE, E. T.; MEUSER, C. S. The effect of undernutrition on myelination of the rat sciatic nerve. **Laboratory Investigation**, v. 24, p. 156-161, 1971.

HERMANS, M. P.; SCHMEER, W.; HENQUIN, J. C. Why is acetylcholine a potentiator and not an initiator of insulin release? **Diabetologia**, v. 29, p. 548A-549A, 1986.

IWASAKI, S.; AOYAGI, H.; YOSHIZAWA, H. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the lingual mucosa of rats during the morphogenesis of filiform papillae. **Acta Histochemica**, v.37, p. 37-44, 2007.

IWASAKI, S.; ASAMI, T.; WANICHANON, C.; YOSHIZAWA, H.; AOYAGI, H. Immunohistochemical analysis of type III collagen expression in the lingual mucosa of rats during organogenesis of the tongue. **Odontology**, v. 96, p. 12-20, 2008.

IWASAKI, S.; YOSHIZAWA, H.; KAWAHARA, I. Study by scanning electron microscopy of the morphogenesis of three types of lingual papilla in the rat. **The Anatomical Record**, v. 247, p. 528-541, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, E. J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005.

KARRING, T. Mitotic activity in the oral epithelium. **Journal of Periodontology Research**, v. 13, p. 1-47, 1973. Supplemetum.

KARRING, T.; LANG, N. P.; LÖE, H. The role of gengival connective tissue in determining epithelial differentiation. **Journal of Periodontology Research**, v. 10, p.1-11, 1975.

KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, p. 185-187, 1982.

KATAIYAMA, E. **Estudo da interface epitélio-tecido conjuntivo da mucosa palatina de camundongos, empregando os métodos de microscopia de luz e eletrônica de varredura convencional e varredura de alta resolução**. 2003. 123 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth-hormone secretagogue receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 12, p. 118-122, 2001.

KRSEK, M.; ROSICKÁ, M.; PAPEZOVÁ, H.; KRÍZOVÁ, J.; KOTRLÍKOVÁ, E.; HALUZ'K, M.; JUSTOVÁ, V.; LACINOVÁ, Z.; JARKOVSKÁ, Z. Plasma ghrelin levels and malnutrition: a comparison of two etiologies. **Eating and Weight Disorders**, v. 8, p. 207-211, 2003.

KUMAR, V.; DEO, M. G.; RAMALINGASWANI, V. Mechanism of fatty liver in protein deficiency. **Gastroenterology**, v. 62, p. 445-451, 1972.

LAMOTHE, B.; BAUDRY, A.; DESBOIS, P.; LAMOTTE, L.; BUCCHINI, D.; DE MEYTS, P.; JOSHI, R. L. Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. **Biochemical Journal**, v. 335, 193-204, 1998.

LANSDOWN, A. B. Epidermal differentiation in normal and growth-retarded infants: studies in two animal models and human babies. **British Journal of Dermatology**, v. 8, p. 139-146, 1978.

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

LARON, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-I) a growth hormone. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 54, p. 311-316, 2001.

LARON, Z.; BIDLINGMAIER, M.; STRASBURGER, C. J. Indications, limitations and pitfalls in the determination of human growth hormone, IGF-I and their binding proteins. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 5, p. 555-569, 2007.

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 increases the sensitivity to insulin in weaned rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, n. 3, p. 291-297, 1998.

LOPEZ-PEDROSA, J. M.; TORRES, M. I.; FERNANDEZ, M. I.; RIOS, A.; GIL, A. Severe malnutrition alters lipid composition and fatty acid profile of small intestine in Newborn Piglets. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 2, p. 224-233, 1998.

LUIZ, L. F. **Efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a taxa de renovação epitelial da mucosa lingual e o nível sérico de insulina**. 2009. 36 f. Iniciação científica (Processo FAPESP 08/52442-9 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LUNN, P. G.; AUSTIN, S. Differences in nitrogen metabolism between protein and energy deficient rats with similary restricted growth rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 27, p. 242-252, 1983.

MAITER, D.; MAES, M.; UNDERWOOD, L. E.; FLIESEN, T.; GERARD, G.; KETELSLEGERS, J. M. Early changes in serum concentrations of somatomedin-C induced by dietary protein deprivation in rats: contributions of growth hormone receptor and post-receptor defects. **The Journal of Endocrinology**, v. 118, p. 113-120, 1988.

MAKIYAMA, M. C. K. **Comparação entre a camada epitelial da mucosa dorsal de ratos normais e desnutridos: estudo ao microscópio de luz e microscópios eletrônicos de varredura e transmissão**. 1999. [120] f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MANCHESTER, K. I. Effect of insulin on protein synthesis. **Diabetes**, v. 21, p. 447-452, 1972.

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

MELMED, S.; KLEINBERG, D. Anterior pituitary. In: LARSEN, P. R.; KRONENBERG, H. R.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, p. 177-179, 2002.

MONTE, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **Journal of Pediatrics**, v. 76, p. 285-297, 2000.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição do Brasil. **Estudos Avançados**, v. 9, p. 1995-1207, 1995.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 1-11, 1991.

MUAKU, S. M.; THISSEN, J. P.; GERARD, G.; KETELSLEGERS, J. M.; MAITER, D. Postnatal catch-up growth induced by growth hormone and insulin-like growth factor-I in rats with intrauterine growth retardation caused by maternal protein malnutrition. **Pediatric Research**, v. 42, p. 370-377, 1997.

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

nesta associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 833-842, 2005.

NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. In Biochemistry for the medical sciences. Chichester: John W., 1984. 952 p.

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

OBBERGHEN, E. V. Signalling through the insulin receptor and insulin-like growth factor-I receptor. **Diabetologia**, v. 37, p. S125-S134, 1994.

OBBERGHEN, E. V.; BARON, V.; DELAHAYDE, L.; MANUELLI, B.; FILIPPA, N.; GIORGETTI-PERALDI, S.; LEBRUN, P.; MOTHE-SATNEY, I.; PERALDI, P.; ROCCHI, S.; SAWKA-VERHELLE, D.; TARTARE-DECKERT, S.; GIUDICELLI, J. Surfing the insulin signaling web. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, p. 966-977, 2001.

of oral tissue in neonatal rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 26, p. 248-253. 1982.

OLDSFORDS, A.; SOURANDER, P. Nutritional rehabilitation of skeletal muscle in protein-deprived young rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v.75, p. 173-179, 1986.

OSTER, M. H.; FIELDER, P. J.; LEVIN, N.; CRONIN, M. J. Adaptation of the Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I Axis to Chronic and Severe Calorie or Protein malnutrition. **Journal Clinical Investigation**, v. 95, p. 2258-2265, 1995.

PASSOS, M. C. F.; DA FONTE RAMOS, C.; DUTRA, S. C.; MOUÇO, T.; MOURA, E. G. Long term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, p. 40-43, 2002.

PETRIK, J.; REUSENS, B.; ARANY, E.; REMACLE, C.; COELHO, C.; HOET, J. J.; HILL, D. J. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. **Endocrinology**, v. 140, p. 4861-4873, 1999.

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

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

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.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia texto e atlas** – em correlação com biologia celular e molecular. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROY, S.; NAUNIHAL, S.; DEO, M. G.; RAMALINGASWANI, V. Ultrastructure of skeletal muscle and peripheral nerve in experimental protein deficiency and it's correlation with nerve conduction studies. **Journal of the Neurological Science**, v. 17, p. 399, 1972.

RUSO, V. C.; GLUCKMAN, P. D.; FELDMAN, E. L.; WHERTHER, G. A. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 916-943, 2005.

SALMON, W. D.; DAUGHADAY, W. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 49, p. 825-836, 1957.

SANTER, R. M.; CONBOY, V. B. Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. **Journal of Anatomy**, v. 168, p. 57-62, 1990.

SAVINO, W.; DARDENNE, N.; VELOSO, L. A.; SILVA-BARBOSA, S. D. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 11-16, 2007.

SAWAYA, A. L. Malnutrition: longterm consequences and nutritional recovery effects. **Estudos Avançados**, v. 20, p. 147-158, 2006.

SCHÄFER, K.; FRIEDE, R. L. The onset and rate myelination in six peripheral and autonomic nerves of the rat. **Journal of Anatomy**, v. 159, p. 181-195, 1988.

SEVÁ-PEREIRA, A.; MAGALHÃES, A. F. N. Digestão e Absorção de Proteínas - Fisiologia e Fisiopatologia. In: CASTRO, L. P.; ROCHA, P. R. S.; CUNHA-MELO, J. R. **Tópicos em Gastroenterologia** 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1994. cap 11, p. 163-185, 1994.

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

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.

SNOECK, A.; REMACLE, C.; REUSENS, B.; HOET, J. J. Effect of a low protein diet

SOLIMAN, A.T.; ELZALABANY, M. M.; SALAMA, M.; ANSARI, B. M. Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 49, p. 819-825, 2000.

STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v. 216, p. 173-174, 1967.

TORUN, B.; CHEW, F. Protein energy malnutrition. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p. 950-976.

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.

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

- WATVE, M. G.; YAJNIK, C. S. Evolutionary origins of insulin resistance: a behavioral switch hypothesis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 61-73, 2007.
- 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.
- WHITE, M. F. The insulin signaling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, v. 40, p. 2-17, 1997.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO Expert Committee on nutrition. 6th ed. [Geneva]: WHO, 1962. (Rep.Ser. n. 45).
- WIKES, L. J.; FIOROTTO, M.; BURRIN, D. G.; DEL ROSARIO, M.; FRAZER, M. E.; POND, W. G.; JAHOOOR, 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.
- WINKLER, M. M.; NAKAMOTO, T. Effects of prenatal malnutrition on development of oral tissue in neonatal rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 26, p. 248-253, 1982.
- WOODS, K. A.; CAMACHO-HÜBNER, C.; SAVAGE, M. O.; CLARK, A. J. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1363-1367, 1996.
- WOODS, S. C.; PORTE, D. Neural control of the endocrine pancreas. **Physiological Reviews**, v. 54, p. 595-599, 1974.
- XU, L. X.; OHSAKI, Y.; NAGATA, K.; KURISU, K. Immunohistochemical studies on the distributions and age-related changes of types I and III collagen in the oral mucosa of mice. **Journal of Dental Research**, v. 72, p. 1336-1343, 1993.
- YANG, F.; YAO, Y.; LI, W.; CHEN, Y.; TANG, J.; ZENG, Y.; BAI, B. Studies on insulin-like growth factor I receptor in fetal rats with intrauterine growth retardation. **Journal of West China**, v. 32, p. 402-404, 2001.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, p. 191-195, 1984.