

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EM PATOLOGIA

EFEITOS PRECOSES E TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA
NEONATAL SOBRE A MORFOLOGIA DA LARINGE DE RATOS

IRACEMA HERMES PIRES DE MELO

RECIFE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EM PATOLOGIA

EFEITOS PRECOCES E TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA
NEONATAL SOBRE A MORFOLOGIA DA LARINGE DE RATOS

Dissertação apresentada ao Mestrado em Patologia do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE), para obtenção do título de Mestre
em Patologia,
sob orientação da Prof^a Doutora Carol Virgínia Góis
Leandro e co-orientação da Prof^a Doutora Sandra Lopes
Souza e do Prof^o Doutor Hilton Justino da Silva.

IRACEMA HERMES PIRES DE MELO

RECIFE, 2008

Melo, Iracema Hermes Pires de
Efeitos precoces e tardios da desnutrição
protéica neonatal sobre a morfologia da laringe de
ratos / Iracema Hermes Pires de Melo. – Recife: O
Autor, 2008.

103 folhas. il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Patologia, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição neonatal. 2. Morfologia da
laringe. I. Título.

614.95	CDU (2.ed.)	UFPE
612.3	CDD (22.ed.)	CCS2008-041

EFITOS DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL POR DIETA HIPOPROTÉICA NA
MORFOLOGIA DA LARINGE DE RATOS AOS 22 E 60 DIAS DE IDADE

IRACEMA HERMES PIRES DE MELO

Aprovada em: 21/02/2009

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Silvia Regina Arruda de Moraes

Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Dr. Hilton Justino da Silva

Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Às minhas avós, Ana e Iracema, que sempre incentivaram e compreenderam as minhas ausências.

Aos meus pais, Francisco (*in memoriam*) e Magnólia, base de minha vida. Meus guias, exemplos de luta, perseverança e esperança. Ensinarão-me, segundo Paulo R. Gaefke, que “A vida é uma tela com pequenos rabiscos, onde criamos o céu ou o inferno, de acordo com as tintas que usamos.”

Ao meu querido Jayme, meu amor, que esteve comigo em todos os momentos. Não tem como simplificar em palavras para explicar sua importância para a realização desta pesquisa e para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as mãos que juntos esculpimos esta dissertação. A gratidão que tenho pela dedicação de cada pessoa, verdadeiros anjos, que se doaram para a concretização dessa pesquisa, é imensa. E isso é só o começo de uma longa jornada! Como disse Aristóteles: “Em tudo o que fazemos, temos em vista alguma outra coisa”.

Aos meus orientadores que me acolheram gentilmente acreditando em minha capacidade e em nosso estudo, pensando como Voltarie: “O sucesso sempre foi criação da ousadia”. Em especial:

À Prof^a Carol Leandro que me orientou não só para dissertação com sua determinação, esmero e zelo, como sempre esteve ao lado para incentivar e ensinar que como diz Fernando Pessoa: “Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo”.

Ao Prof^o Hilton Justino que colocou a laringe em nosso estudo, estando sempre perto para orientar. Sempre incentivando a fazer a Fonoaudiologia crescer e brilhar.

À Prof^a Sandra Lopes sempre disposta a orientar, nos momentos de finalização deu calma e segurança.

Aos Prof^{os} Roberto Mello e Luciano Montenegro sempre solícitos, dedicados e bem humorados com a análise de nossas lâminas histológicas.

À Prof^a Sílvia Moraes que guiou a pesquisa e possibilitou a sua concretização.

À Prof^a Elizabeth Neves que me recebeu com imenso carinho no estágio de docência e junto a Prof^a Fátima me incentivaram para essa conquista desde a minha graduação.

Ao Dr^o Ediones França que me ensinou todo o cuidado e carinho necessário ao animal. Sempre disposto a ajudar, com ele aprendi a tratar, anestesiá-lo e realizar cirurgia nos queridos animais.

Ao Sr. Paulino pela dedicação no preparo das rações e auxílio no biotério.

À Silvania pela ajuda no preparo do material histológico.

Ao Departamento de Nutrição e grupo Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade - NNI, que com o guia Prof^o Raul Manhães-Castro, me receberam amistosamente e me mostraram a forma de fazer pesquisa e amar pesquisa.

Ao Marcos Fidalgo, Matilde, Wylla, Lícia, Sônia e Antônio amigos do grupo NNI com quem sempre contei em todo o mestrado.

À Flávia Reis e Lívia Luz, acadêmicas de Fonoaudiologia que acreditaram e também se apaixonaram pela nossa pesquisa. Juntas todos os dias da coleta de dados aprendemos bastante sobre a pesquisa e sobre a vida.

Ao Prof^o Fábio Lessa (*in memoriam*) que foi exemplo de perseverança em busca de um ideal e amor a Fonoaudiologia. E se superou em vários momentos seguindo os pensamentos de Fernando Pessoa “Tantas vezes pensamos ter chegado, tantas vezes precisamos ir além”.

Aos professores do mestrado em Patologia por seus ensinamentos.

Aos colegas do Mestrado em Patologia: Ana Karênina, Ully, Francisco, Juliana, George, Fábio, Tâmara, João e os demais com os quais partilhamos nossas alegrias e angústias da tese.

Agradeço, principalmente, a quem me guia pela vida: Deus. Além de me dar vida e vontade de aproveitá-la ao máximo, ele colocou todas essas pessoas em minha vida.

*“Devemos aprender durante toda a vida, sem
imaginar que a sabedoria vem com a velhice”.*

Platão

SUMÁRIO

	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE TABELAS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
	2.1 Anatomia macroscópica da laringe	19
	2.2 Morfologia microscópica da laringe	24
	2.3 Desenvolvimento da laringe	27
	2.4 Programação	31
3	OBJETIVOS	35
	3.1 Objetivo geral	36
	3.2 Objetivos específicos	36
4	HIPÓTESES	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
	5.1 Animais	40
	5.2 Avaliação da evolução ponderal	42
	5.3 Análise macroscópica	44
	5.4 Análise microscópica	47
	5.5 Considerações éticas	51
	5.6 Análise estatística	51
6	RESULTADOS	52
	1ª PARTE – Diagnóstico da desnutrição protéica neonatal	53
	2ª PARTE – Morfologia da laringe	58
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO	73
9	PERSPECTIVAS DE ESTUDO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	ANEXOS	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°	Graus
°C	Graus Celsius
Δ C	Delta de crescimento em percentual
Ci	Camada intermediária
Cl	Células linfáticas
Cp	Camada profunda
Cs	Camada superficial
C ₂₂	Comprimento de uma das dimensões da laringe aos 22 dias de idade
C ₆₀	Comprimento de uma das dimensões da laringe aos 60 dias de idade
DP	Desvio padrão
E	Epitélio
Eep	Epitélio Estratificado Pavimentoso
Eepq	Epitélio Estratificado Pavimentoso Queratinizado
Epsc	Epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado
g	Gramas
%g	Grama em percentual
G	Glândula
%GPC	Ganho de peso corporal em percentual
h	Horas
H/E	Hematoxilina-eosina
i.m.	Intramuscular
Kcal	Kilocaloria
Kg	Kilogramas
P _A	Peso do dia anterior
P _x	Peso de cada dia subsequente
P ₁	Peso ao nascer
P ₂₂	Peso aos 22 dias
mL	Mililitros
mm	Milímetro
μm	Micrometros
Ne	Núcleo do epitélio
TC	Taxa de crescimento
Vs	Vaso Sangüíneo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Visão lateral direita da laringe humana evidenciando as cartilagens	20
Figura 2	Visão posterior da laringe humana evidenciando as cartilagens	21
Figura 3	Músculos intrínsecos da laringe, entre eles o músculo tireoaritenóideo - visão superior	23
Figura 4	Corte mediano através da cabeça e pescoço de um recém-nascido; vista medial	28
Figura 5	Cabeça e pescoço em corte paramediano	29
Figura 6	Acondicionamento dos animais em biotério sob condições padrões de temperatura, luminosidade e alimentação	40
Figura 7	Desenho experimental representando a formação dos diferentes grupos (controle e desnutrido) quanto à manipulação da dieta e o período em que foram sacrificados	42
Figura 8	Pesagem do animal	43
Figura 9	Procedimento para retirada da laringe	45
Figura 10	Mensurações da laringe	46
Figura 11	Mensurações da prega vocal	51
Figura 12	Efeito da desnutrição neonatal sobre o peso corporal de ratos do nascimento aos 21 dias de vida	54
Figura 13	Efeito da desnutrição neonatal sobre o peso corporal de ratos do 22º ao 60º dia de vida	55
Figura 14	Proporção corporal de ratos controle (A) e desnutridos (B) após o desmame (22 dias de vida)	56
Figura 15	Proporção corporal de ratos controle (A) e desnutridos (B) após o desmame (60 dias de vida)	57
Figura 16	Fotomicrografia da supraglote de ratos nutridos (A e C) e desnutridos (B e D) aos 22 (A e B) e 60 dias de idade (C e D)	60
Figura 17	Fotomicrografia do epitélio pavimentoso estratificado queratinizado da supraglote de rato aos 60 dias de idade do grupo desnutrido	61
Figura 18	Fotomicrografia da infraglote de ratos nutridos (A e C) e desnutridos (B e D) aos 22 (A e B) e 60 dias de idade (C e D)	62
Figura 19	Fotomicrografia da prega vocal de ratos nutridos (A e C) e desnutridos (B e D) aos 22 (A e B) e 60 dias de idade (C e D), apresentando redução do diâmetro do núcleo do epitélio, da espessura do epitélio e da camada intermediária nos animais desnutridos aos 60 dias de vida	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da dieta LABINA (Purina Brasil) utilizada na alimentação dos animais controle	41
Tabela 2	Composição de dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína	41
Tabela 3	Composição centesimal de macronutrientes da dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína utilizada na alimentação dos animais durante a lactação	41
Tabela 4	Dimensões macroscópicas da laringe de ratos (mm) submetidos ou não à desnutrição no período neonatal, aos 22 e 60 dias de vida	58
Tabela 5	Análise qualitativa de características histológicas da supraglote da laringe de ratos submetidos à desnutrição neonatal, com 22 e 60 dias de vida	59
Tabela 6	Análise qualitativa de características histológicas da infraglote da laringe de ratos submetidos à desnutrição neonatal, com 22 e 60 dias de vida	61
Tabela 7	Análise qualitativa de características histológicas da glote da laringe de ratos, com 22 e 60 dias de vida	63
Tabela 8	Dimensões microscópicas (μm) das estruturas da prega vocal da laringe de ratos Wistar desnutridos no período neonatal	63

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da desnutrição durante a lactação sobre a morfologia da laringe de ratos aos 22 e 60 dias de idade. **Métodos:** Ratos albinos machos da linhagem Wistar (n=48) foram divididos em dois grupos de acordo com a dieta das mães durante a lactação: controle (caseína 17%) e desnutrido (caseína 8%). Após o desmame, todos os animais receberam dieta padrão do biotério. Metade dos animais de cada grupo foi sacrificada aos 22 dias de vida, e a outra metade aos 60 dias de vida. A desnutrição neonatal foi diagnosticada através do peso corporal avaliado diariamente ao longo do experimento, sendo calculado o ganho de peso corporal e a taxa de crescimento. Após o sacrifício, a laringe foi retirada e suas dimensões registradas com paquímetro digital de acurácia 0,01 mm. Foram avaliados os comprimentos da laringe: epiglote a cricóide (EC), tireóide a cricóide (TC), antero-posterior (AP) e latero-lateral (LL). Para a análise histológica foi utilizada a coloração hematoxilina-eosina. A laringe foi analisada qualitativamente, subdividida em supraglote, glote e infraglote. As pregas vocais também foram analisadas quanto às dimensões do epitélio, o núcleo e suas camadas, através do programa Scion Image, Beta 4.0.2. **Resultados:** Os animais cujas mães foram desnutridas durante a lactação apresentaram redução do peso corporal, diminuição do ganho de peso corporal durante a lactação que aumentou durante a recuperação nutricional ($p<0.05$). A taxa de crescimento reduziu ($p<0.05$) no período neonatal se normalizando na recuperação nutricional comparativamente ao controle. Quanto a macroscopia da laringe, os animais aos 22 dias apresentaram uma diminuição nas dimensões antero-posterior e látero-lateral comparativamente ao controle ($p<0.05$). Aos 60 dias de idade, não houve diferença entre os grupos nas variáveis analisadas. Na análise microscópica houve um aumento da queratinização do epitélio da supraglote, aos 22 e 60 dias de vida nos animais desnutridos. Na prega vocal houve redução do comprimento do epitélio, do diâmetro do seu núcleo e da camada intermediária nos animais desnutridos no período neonatal aos 60 dias de vida. **Conclusão:** A desnutrição neonatal induziu alterações nas micro-estruturas da laringe dos animais desnutridos, mesmo após a recuperação nutricional. A macro estrutura sofre os efeitos imediatos da restrição nutricional diminuindo as dimensões horizontais da laringe com recuperação a longo-prazo. Nossos resultados indicam que a escassez de nutrientes durante o período crítico de desenvolvimento induz alterações na morfologia da laringe a curto e em longo prazo. Estudos que avaliem a função desse órgão são necessários.

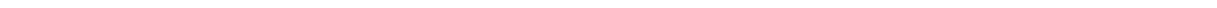
PALAVRAS-CHAVE: Período crítico de desenvolvimento, programação, desnutrição neonatal, órgãos da fonação, prega vocal.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of undernutrition during lactation on the morphology of the larynx in rats aged 22 and 60 days old. **Methods:** Male Wistar rats (n=48) were randomly divided into two groups according to their mother's diet during lactation: control (casein 17%) and undernourished (casein 8%). At weaning, all animals were fed with standardized chow. Half of each group was killed at 22nd day of life, while the other half was killed at 60th day of life. Body weight was daily measured, and gain of body weight and the growth rate were calculated. Larynx was removed and its dimensions were recorded with a digital pachymeter. It was evaluated: epiglottis-cricoid cartilages (EC), thyroid-cricoid cartilages (TC), antero-posterior (AP) and latero-lateral (LL). Histology analyses were performed by hematoxylin-eosin stain. Larynx was qualitatively analyzed by a subdivision into supraglottis, glottis e infraglottis. Vocal cords were also analyzed in terms of dimensions of their epithelium, nucleus, and layers using the Scion Image, Beta 4.0.2 program. **Results:** Animals from undernourished mothers during lactation showed a reduction in the gain of body weight throughout the experiment. There was a decrease in the growth rate during lactation, but not during the recovery of the diet. At 22nd day, undernourished pups showed a lower antero-posterior and latero-lateral dimensions of larynx than control. At 60th days, there was no difference between groups. There was a reduction in the size of epithelium, diameter of the nucleus, and intermediary layers of the vocal cords in animals of 60 days of age. **Conclusion:** Undernutrition during lactation induced changes in the micro-structures of the larynx of the undernourished animals, even after the nutritional recovery. The macro-structure of the larynx showed an immediate reduction in the horizontal dimensions, but there was a long-term recovery. Our results indicate that the restriction of nutrients during the critical period of development induces changes in the morphology of the larynx in a short- and long-term. Studies considering the function of these organs are necessary.

KEY-WORDS: Critical period of development, programming, neonatal undernutrition, organs for phonation, vocal cords

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

Uma alimentação balanceada é essencial para o desenvolvimento e crescimento adequado dos sistemas e manutenção de uma boa condição física, social e mental do indivíduo (FILHO; RISSIN, 2003). De acordo com a particularidade das etapas iniciais do crescimento (gestação, lactação ou primeira infância) e da espécie a ser estudada, a janela crítica do desenvolvimento pode se abrir e a falta ou excesso de nutrientes pode induzir alterações permanentes na estrutura e função de órgãos e sistemas (DOBBING; SANDS, 1985). Essa janela crítica é chamada de “período crítico do desenvolvimento” sendo caracterizado pelo crescimento rápido, maturação de órgãos e sistemas, replicação e diferenciação celular (DOBBING; SANDS, 1985).

Quando um estímulo ou insulto ambiental, como a desnutrição, é aplicado durante o período crítico de desenvolvimento, pode haver alterações do crescimento que terão efeitos subseqüentes na vida adulta (HALES; BARKER, 1992). O termo utilizado para descrever este processo é “programação” (LUCAS, 1991). Vários estudos têm demonstrado que a falta de nutrientes durante a vida fetal e neonatal tem repercussões tardias no filhote (HALES; BARKER, 1992; LAW, 1996; BARKER et al, 2002; BARRETO-MEDEIROS et al, 2004; BARROS et al, 2006). Por exemplo, em ratos, a desnutrição protéica durante a gestação induz hipertensão nos filhotes na fase adulta (LANGLEY; JACKSON, 1994). A desnutrição no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, que é o período de lactação, induz efeitos permanentes sobre o tamanho do cérebro, número de neurônios, comportamento, aprendizagem e memória (DOBBING; HOPEWELL, 1971; SMART, 1981; DOBBING; SANDS, 1985). A desnutrição no período neonatal altera a ontogênese reflexa, o crescimento somático, a resposta ao tratamento com anti-depressivos, o comportamento agressivo e o padrão de atividade locomotora de ratos

adultos (BARRETO-MEDEIROS et al, 2002; BARRETO-MEDEIROS et al, 2004; BARROS et al, 2006).

Em humanos, estudos epidemiológicos têm relatado que a desnutrição no período fetal e na infância predispõe o indivíduo adulto a doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, ou aos fatores de risco associados como a hipertensão, intolerância à glicose e hiperlipidemia (FORSDAHL; WAALER, 1976; BARKER; OSMOND, 1986; BARKER et al, 1989; HALES et al, 1991). Com base nestas observações, foi sugerida a hipótese da influência fenotípica (*Thrifty phenotype hypothesis*), na qual o organismo se adapta a um *milieu intrauterino* adverso otimizando a utilização de nutrientes para assegurar sua sobrevivência (HALES; BARKER, 1992). Se há aumento na disponibilidade de nutrientes após esse período crítico, o organismo pode apresentar alterações metabólicas associadas à obesidade e diabetes tipo II (HALES; BARKER, 1992).

Os exemplos citados indicam que a programação na vida fetal ou pós-natal pode resultar da sinalização endógena ou exógena durante o período crítico de desenvolvimento ou podem também responder às alterações ambientais adversas. De qualquer forma, parece que o organismo disponibiliza mecanismos adaptativos de forma a resistir aos insultos. Estes insultos engatilham mecanismos de programação que podem ecoar adversamente na vida ulterior.

Evidências de possíveis efeitos decorrentes da desnutrição em órgãos da fonação, como a laringe, ainda são pouco conhecidas, porém a laringe é bem estudada (HARRISON, 1995; ZEMLIN, 2000; LE HUCHE; ALLALI, 2005). A laringe é um componente intrínseco do sistema respiratório, funciona como uma válvula, impedindo que o ar escape dos pulmões e que substâncias atípicas a penetrem (ZEMLIN, 2000). Também promove a fixação torácica, facilitando as atividades que exijam pressões abdominais (ZEMLIN, 2000). Outra função é a produção sonora (ZEMLIN, 2000). A laringe é capaz de promover numerosos ajustes em ampla

gama de frequência e intensidade, em rápida velocidade (ZEMPLIN, 2000; LE HUCHE; ALLALI, 2005).

A laringe humana é semelhante morfológicamente e funcionalmente à de outros mamíferos (HARRISON, 1995; GORTI et al, 1999; RODMAN, et al, 2002; SANTOS et al, 2003; MAIER, 2004; MARCELINO; OLIVEIRA, 2005; DUARTE, et al, 2006), apesar de existirem algumas variações morfológicas adaptadas ao estilo de vida e ao tipo de dieta consumida (HARRISON, 1995; LE HUCHE; ALLALI, 2005). A laringe de rato, por exemplo, é empregada como um modelo experimental para fala, porque sua forma é semelhante à da laringe humana, permitindo algumas comparações de seus comportamentos vocais (DUARTE et al, 2006).

O período, que compreende as fases pré-natal e neonatal, é de intenso crescimento para a laringe e pode ser considerado como um período crítico para o desenvolvimento dessa estrutura (MOORE; PERSAUD, 2000; BEHLAU, 2001). A laringe humana forma-se entre a 4ª e 10ª semana do desenvolvimento embrionário humano, estando totalmente formada no 3º mês gestacional (MOORE; PERSAUD, 2000; ZEMPLIN, 2000; BEHLAU, 2001; LE HUCHE; ALLALI, 2005). No nascimento, a laringe humana encontra-se completa apesar de sofrer modificações morfofuncionais durante toda a vida (ECKEL et al, 2000; ZEMPLIN, 2000; BEHLAU, 2001; LE HUCHE; ALLALI, 2005). Do nascimento a fase adulta a laringe aumenta suas dimensões, aumenta o ângulo da tireóide, tem as pregas vocais alongadas, afiladas e diferenciadas e o músculo vocal cresce em tamanho (YAMASHITA, 1997; ECKEL et al, 1999; ECKEL et al, 2000; ZEMPLIN, 2000; BEHLAU, 2001; HARTNICK; REHBAR; PRASAD, 2005).

A laringe parece ser sensível às adversidades ambientais, e o período neonatal é um período de intenso desenvolvimento. Estudos que evidenciam os efeitos da desnutrição na

estrutura da laringe ainda não são conhecidos. Nery et al (2002) relatam um estudo de caso de desnutrição secundária a anorexia nervosa, na qual, apresentou efeitos funcionais na laringe (qualidade vocal rouca, *loudness* reduzida e ritmo de fala monótono). Assim a desnutrição influencia a função laríngea a curto-prazo.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

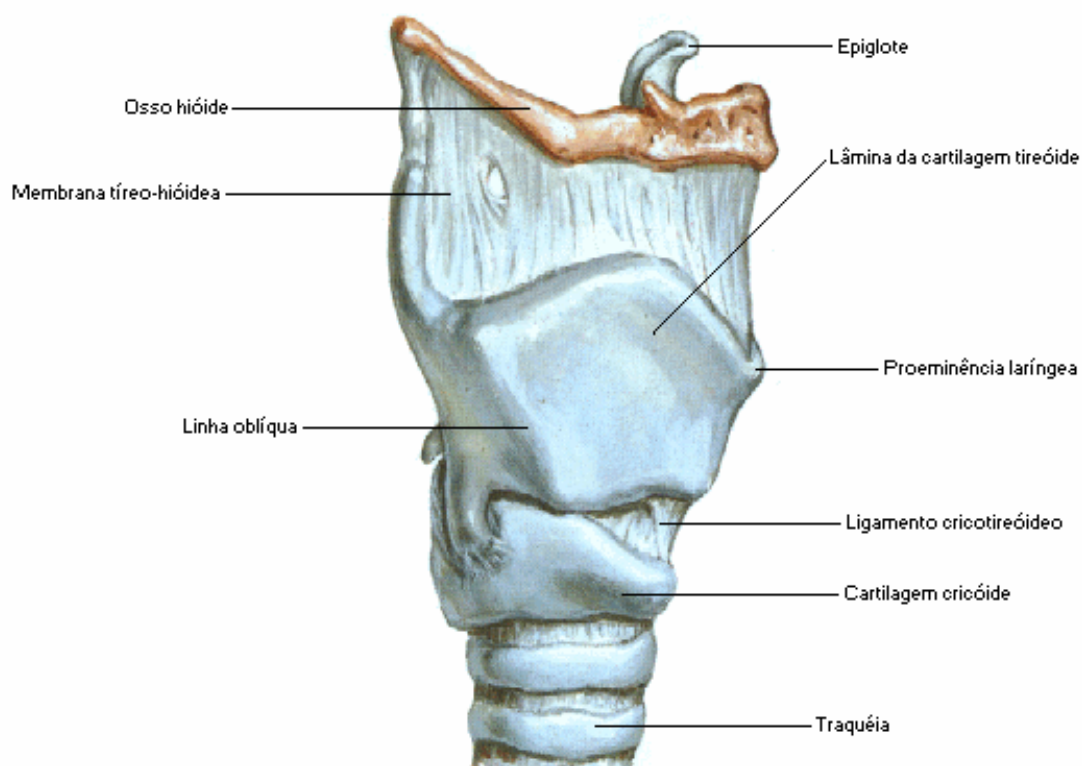
Anatomicamente, a laringe é uma estrutura ímpar, oca, músculo-cartilagínea, localizada na linha mediana, na região anterior do pescoço entre a extremidade superior da traquéia e o osso hióide, entrando em comunicação com a faringe através do adito da laringe (HARRISON, 1995; ZEMLIN, 2000). Em humanos possui localização ao nível da 6ª a 7ª vértebra cervical, variando de acordo com o sexo, idade, posição de cabeça e atividade (ZEMLIN, 2000). Possui as funções de proteção das vias aéreas inferiores contra substâncias atípicas, auxilia na deglutição, promove a fixação torácica necessária as atividades que exijam pressões abdominais e produção sonora (ZEMLIN, 2000; LE HUCHE; ALLALI, 2005).

A laringe humana é semelhante morfológicamente e funcionalmente à de outros mamíferos, sendo a laringe de rato a mais empregada como um modelo experimental para a fala (HARRISON, 1995; GORTI et al, 1999; RODMAN, et al, 2002; SANTOS et al, 2003; MAIER 2004; MARCELINO; OLIVEIRA, 2005; DUARTE, et al, 2006).

2.1 Anatomia macroscópica da laringe

A laringe humana é composta de 5 cartilagens principais, 11 músculos intrínsecos e 16 extrínsecos, 3 lâminas aponeuróticas, 3 ligamentos, submucosa e uma cobertura mucosa (ZEMLIN, 2000; BEHLAU, 2001; LE HUCHE; ALLALI, 2005). É irrigada pelas artérias e veias tireóideas superiores e inferiores e seus ramos laríngeo superior e inferior, e innervada pelos nervos laríngeo superior e inferior (BEHLAU, 2001; LE HUCHE; ALLALI, 2005). Sendo músculo-cartilagínea, a armação estrutural da laringe consiste de cartilagens, membranas e ligamentos (figuras 1 e 2). Três cartilagens são ímpares e grandes: epiglótica, tireóide e cricóide; outras três são pares e menores: aritenóides, corniculadas e cuneiforme (ZEMLIN, 2000;

BEHLAU, 2001). Em animais, essas cartilagens pares variam de tamanho e configuração dependendo da idade e espécie do animal (HARRISON, 1995). Duas outras nem sempre são encontradas: tritíceas e sesamóides (BEHLAU, 2001). Distribuídas pelas porções da laringe, algumas das cartilagens serão abordadas a seguir.




©Houartis

Figura 1: Visão lateral direita da laringe humana evidenciando as cartilagens.
Fonte: NETTER, 1999.

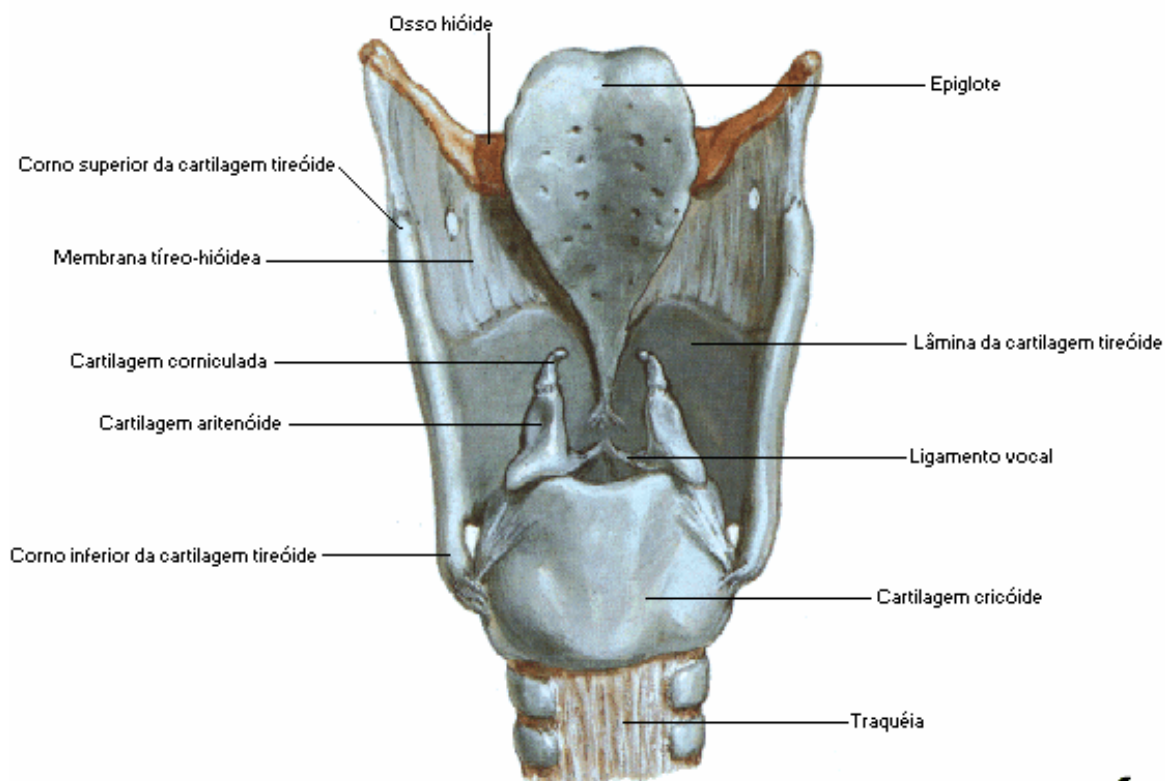


Figura 2: Visão posterior da laringe humana evidenciando as cartilagens.
Fonte: NETTER, 1999.

A epiglote é uma estrutura flexível por ser formada por cartilagem elástica. Tem a forma de folha, onde sua porção superior é ampla, arredondada e delgada, a porção inferior é estreita e pediculada, chamada de pecíolo. A epiglote humana auxilia no processo de deglutição impedindo que o alimento penetre nas vias aéreas inferiores (ZEMPLIN, 2000; BEHLAU, 2001). Além dessa função nos mamíferos, a epiglote é bem desenvolvida e tem forma esférica projetando-se dentro da nasofaringe permitindo a respiração, evidenciando o olfato, durante a alimentação (HARRISON, 1995).

A cartilagem tireóide é ímpar e a maior da laringe. É formada por duas lâminas com prolongamentos um superior e outro inferior (cornos superiores e inferiores) que se unem na

linha mediana formando o ângulo da tireóide (ZEMPLIN, 2000). Une-se a cartilagem cricóide através dos ligamentos cricótireóideo mediano e os dois cricótireóideo lateral (ZEMPLIN, 2000).

A cartilagem cricóide é ímpar e situa-se acima do primeiro anel traqueal. Tem a forma de um anel de sinete, com um arco anterior e uma lâmina posterior quadrada (ZEMPLIN, 2000). Em cada lado do arco existem facetas articulares ovais para a articulação diartrodial com os cornos inferiores da cartilagem tireóide (ZEMPLIN, 2000). Liga-se a traquéia através do ligamento cricotraqueal (ZEMPLIN, 2000).

As cartilagens aritenóides são pares, e situam-se na margem inclinada do anel da cartilagem cricóide. As aritenóides assemelham-se a uma pirâmide com uma base, um ápice e três faces (ZEMPLIN, 2000). Possuem dois ângulos principais, dos quais um gera o processo vocal local de inserção da prega vocal, outro o processo muscular onde se insere os músculos cricoaritenóideo lateral e cricoaritenóideo posterior (ZEMPLIN, 2000).

A musculatura laríngea, formada por fibras musculares esqueléticas, é dividida regionalmente em músculos intrínsecos e extrínsecos (ZEMPLIN, 2000). Os músculos intrínsecos possuem origem e inserção na laringe, enquanto os extrínsecos possuem apenas a origem ou a inserção na laringe (figura 3) (BEHLAU, 2001). O músculo que compõe as pregas vocais de humanos e roedores é intrínseco, o tireoaritenóideo, acompanhado de um ligamento vocal que é contínuo com o cone elástico (ZEMPLIN, 2000; DUARTE et al, 2006).

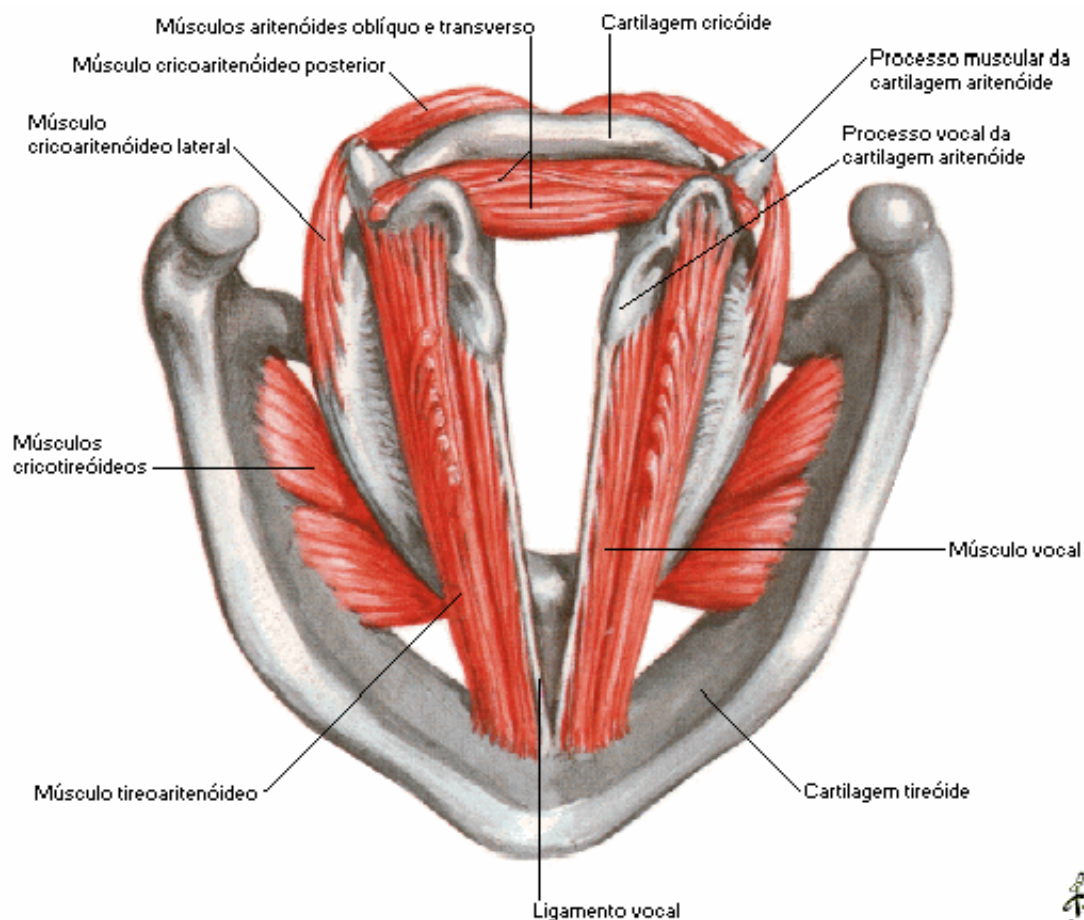


Figura 3: Músculos intrínsecos da laringe, entre eles o músculo tireoaritenóideo - visão superior.
Fonte: NETTER, 1999.

Tendo por referência as pregas vocais e a direção súpero-inferior, a laringe dos mamíferos é dividida metodologicamente em três cavidades: supraglote (acima das pregas vocais), infraglote (estruturas abaixo das pregas vocais até a margem inferior da cartilagem cricóide ou até o primeiro anel traqueal) e glote (limitada pelas pregas vocais) (ZEMPLIN, 2000).

A região supraglótica, em humanos, é subdividida em duas outras partes: vestíbulo da laringe (porção entre as pregas vestibulares e o adito da laringe) e ventrículo (porção entre as pregas vestibulares e vocais) (ZEMPLIN, 2000). A diferença dessa região dos humanos para os roedores é que estes não possuem o ventrículo laríngeo (DUARTE et al, 2006). A região subglótica ou infraglote da laringe em corte frontal parece mais estreita no nível das pregas

vocais e mais larga para baixo, dando uma forma de cone (KUTTA; STEVEN; PAULSEN, 2006). Na glote encontram-se as pregas vocais, projetadas como prateleiras na cavidade laríngea. As pregas vocais são faixas longas, lisas e arredondadas de tecido muscular que podem ser alongadas, encurtadas, tensionadas ou relaxadas e abduzidas ou aduzidas (FRIEDRICH; KAINZ; FREIDL, 1993; ZEMLIN, 2000).

As pregas vocais situam-se abaixo das pregas vestibulares (ZEMLIN, 2000), estas se encontram ausentes nos roedores (DUARTE et al, 2006). Originam-se na cartilagem tireóide, perto do ângulo e abaixo da incisura tireóidea convergindo para a comissura posterior se fixando na face antero-lateral das cartilagens aritenóides, sendo as margens mediais livres (ZEMLIN, 2000). As pregas vocais diferem entre os sexos em comprimento e largura, tendo também seu comprimento uma relação positiva com a altura do indivíduo (XIMENES FILHO et al, 2003).

2.2 Morfologia microscópica da laringe

Toda a cavidade laríngea é revestida por mucosa (ZEMLIN, 2000). Em humanos, a mucosa da laringe é constituída por epitélio cilíndrico ciliado pseudo-estratificado, o epitélio pavimentoso e estratificado, e o epitélio malpighiano formado por células que sofre diferenciação progressiva das camadas profundas para as superficiais (LE HUCHE; ALLALI, 2005). As zonas de fortes pressões físicas como a mucosa da face anterior e superior da face posterior da epiglote, a porção superior das pregas ariepiglóticas e a face medial das pregas ventriculares e das pregas vocais são revestidas por epitélio escamoso estratificado não queratinizado (SANTOS et al, 2003). O restante da laringe é revestida por epitélio cilíndrico ciliado, cujos cílios ajudam a remover os acúmulos de muco e material estranho da parte inferior do trato respiratório em movimentos na direção das pregas vocais (ZEMLIN, 2000; LE HUCHE; ALLALI, 2005).

A prega vocal é composta de mucosa e músculo (RAMOS et al, 2005). A mucosa é dividida em epitélio e lâmina própria (RAMOS et al, 2005). A lâmina própria é subdividida em três camadas (superficial, intermediária, e profunda), com aumento crescente em rigidez: superficial, média e profunda (YAMASHITA, 1997; RAMOS et al, 2005). Esta estrutura estratificada é para facilitar a fonação (YAMASHITA, 1997). Cada camada tem as propriedades físicas baseadas no alinhamento e na distribuição do colágeno e das fibras elásticas (HARTNICK; REHBAR; PRASAD, 2005). A camada superficial é uma camada solta e flexível, sendo a que mais se desloca e vibra durante a fonação (RAMOS et al, 2005). A camada intermediária da lâmina própria fica abaixo da superficial é mais densa, composta de fibras elásticas (RAMOS et al, 2005). A camada profunda é mais rígida, sendo formada por fibras colágenas contendo vasos sanguíneos e tecido linfático difuso (RAMOS et al, 2005).

As camadas intermediária e profunda não definem entre si esse limite, sendo chamado então, de ligamento vocal, possuindo um decréscimo de fibras elásticas e um crescimento de fibras colágenas em direção ao músculo vocal (RAMOS et al, 2005). Porém, quando utiliza-se a imunohistoquímica se observa quantidade semelhante de fibras elásticas nas camadas, pois esse procedimento é capaz de identificar todas as formas de fibras elásticas (RAMOS et al, 2005). A distribuição dessas fibras é longitudinal e paralela a borda livre da prega vocal. Assim como os capilares sanguíneos da borda livre (RAMOS et al, 2005). A lamina própria da prega vocal é importante na produção da voz. As fibras elásticas concentram-se principalmente na camada intermediária da prega vocal. A camada superficial contém inúmeras fibras elásticas pequenas, imaturas, compostas predominantemente de *elaunin* e *oxytalan*. Por não se distenderem e por serem mais resistentes ao estresse mecânico, as fibras *oxytalan* seriam mais abundantes na camada superficial (HAMMOND et al, 1997). Enquanto as fibras de *elaunin* concentram-se principalmente na camada intermediária da prega vocal (HAMMOND et al, 1997).

Em roedores, o epitélio da laringe é bastante discutido, por existirem vários tipos. A supraglote de roedores possui epitélio colunar pseudo-estratificado ciliar (GORTI et al, 1999), com glândulas seromucosas no tecido conjuntivo na supraglote (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005), glândulas tubuloacinosas e células globosas (GORTI et al, 1999), vasos sanguíneos (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005) e células linfáticas na supraglote (GORTI et al, 1999; MARCELINO; OLIVEIRA, 2005).

A infraglote de roedores apresenta epitélio colunar pseudo-estratificado ciliar (GORTI et al, 1999; MARCELINO; OLIVEIRA, 2005) e paredes divididas em três ou quatro camadas, que incluem fibras colágenas e elásticas em que as glândulas seromucosas são encaixadas (KUTTA; STEVEN; PAULSEN, 2006) e o plexo capilar subepitelial (KUTTA; STEVEN; PAULSEN, 2006).

O epitélio da glote de roedores é diversificado, identificando a transição entre os tecidos (DUARTE et al, 2006). O epitélio da porção ventral da glote é pseudoestratificado ciliado, perto da extremidade livre das pregas vocais o epitélio é colunar estratificado pequeno, na porção mediana das pregas vocais o epitélio é escamoso estratificado e na porção dorsal da glote o epitélio é estratificado que pode ser prismático ou escamoso dependendo da área examinada (DUARTE et al, 2006). Para outros autores o epitélio encontrado na porção mais superficial da prega vocal da região glótica dos mamíferos (ratos e porquinho da índia) é escamoso estratificado não queratinizado (GORTI et al, 1999; SANTOS et al, 2003; MARCELINO; OLIVEIRA, 2005; DUARTE et al, 2006).

As pregas vocais dos roedores, assim como as dos humanos, possuem camadas. As camadas recebem denominações de acordo com a sua localização (DUARTE et al, 2006). Mais internamente ao epitélio encontra-se o tecido conectivo frouxo com fibroblastos e células colágenas, infiltrado linfático dentre elas macrófagos e vasos sanguíneos com eosinófilos

(GORTI et al, 1999; SANTOS et al, 2003; MARCELINO; OLIVEIRA, 2005; DUARTE et al, 2006).

2.3 Desenvolvimento e crescimento da laringe

A laringe humana forma-se entre a 4ª e 10ª semana do desenvolvimento embrionário humano, estando totalmente formada no 3º mês gestacional (MOORE; PERSAUD, 2000; ZEMLIN, 2000; BEHLAU, 2001; LE HUCHE; ALLALI, 2005). A origem da laringe é mista, endodérmica e mesodérmica. Sua mucosa tem origem endodérmica, sendo derivada do intestino cefálico. As cartilagens e músculos tem origem do mesênquima (MOORE; PERSAUD, 2000; ZEMLIN, 2000; BEHLAU, 2001).

No nascimento, a laringe humana encontra-se completa apesar de sofrer modificações morfofuncionais durante toda a vida (ZEMLIN, 2000; BEHLAU, 2001; LE HUCHE; ALLALI, 2005). Existem diferenças anatômicas em aspectos selecionados do trato vocal na infância (figura 4) e na idade adulta (figura 5). Ao nascimento a posição da laringe é alta, a epiglote atinge a rinofaringe permitindo a simultaneidade da respiração com a deglutição (LE HUCHE; ALLALI, 2005). Na infância o trato vocal é pobre para a fonação, é curto e em funil, a epiglote é ereta e em omega, a laringe tem posição alta no pescoço (altura da vértebra C3), a luz em forma de “T”, suas cartilagens de tecido conjuntivo, encontram-se mais próximas, o ângulo da cartilagem tireóide apresenta 110° nos meninos e 120° nas meninas, a cricóideia tem forma circular, o processo vocal da cartilagem aritenóideia está anteriorizado, as pregas vocais são curtas e grossas (2,5 a 3mm no nascimento, atingindo 5 mm no primeiro ano de vida e 8 mm aos seis anos) (LE HUCHE; ALLALI, 2005). A proporção entre glote membranosa e cartilágnea é 1:1 e o músculo vocal possui fibras finas (ZEMLIN, 2000; BEHLAU, 2002). A mucosa das pregas vocais é espessa na infância, as camadas são pouco diferenciadas e ligamento vocal imaturo (diferencia-se até os 4

anos de vida), porém com o desenvolvimento, sua estrutura interna amadurece e o epitélio apresenta-se mais delgado durante a puberdade (ECKEL et al, 1999; ECKEL et al, 2000).

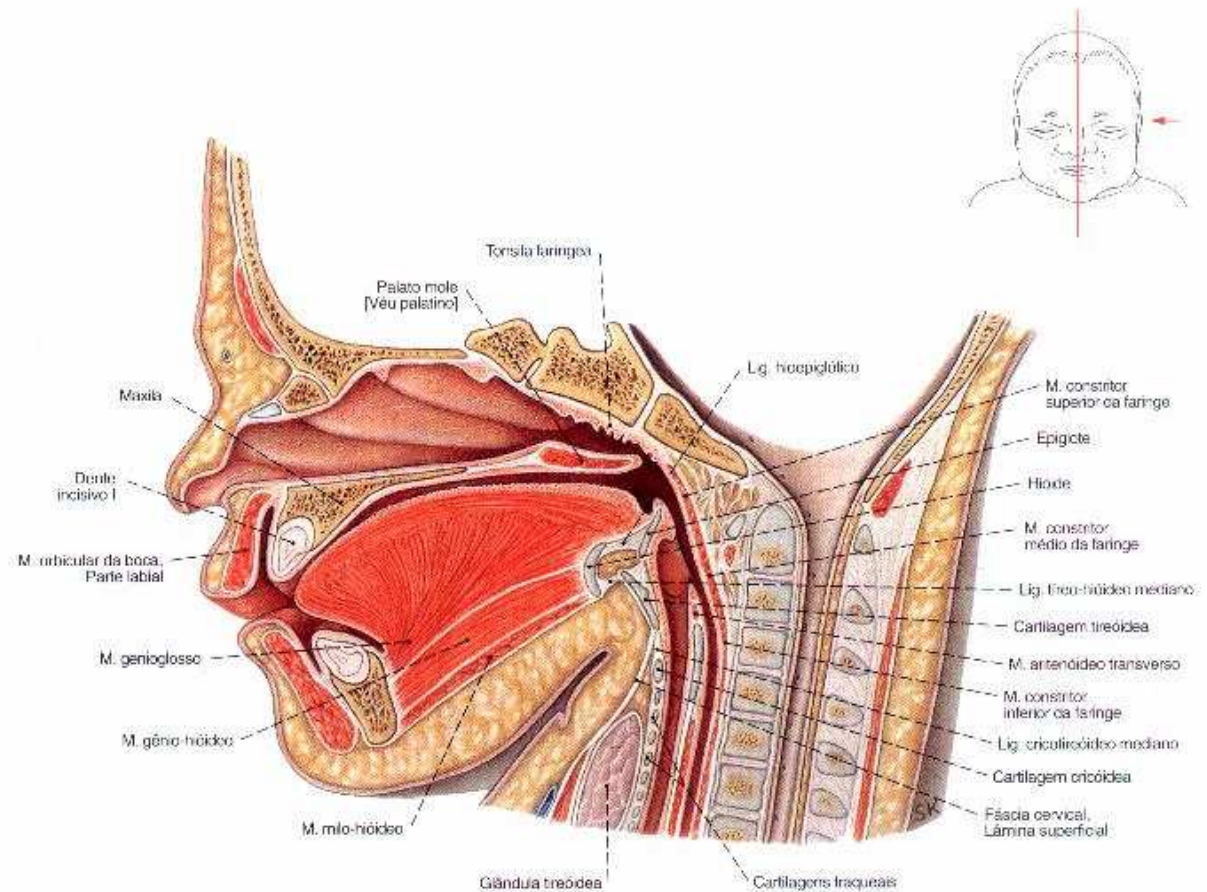


Figura 4: Corte mediano através da cabeça e pescoço de um recém-nascido; vista medial.
Fonte: SOBOTTA, 2000.

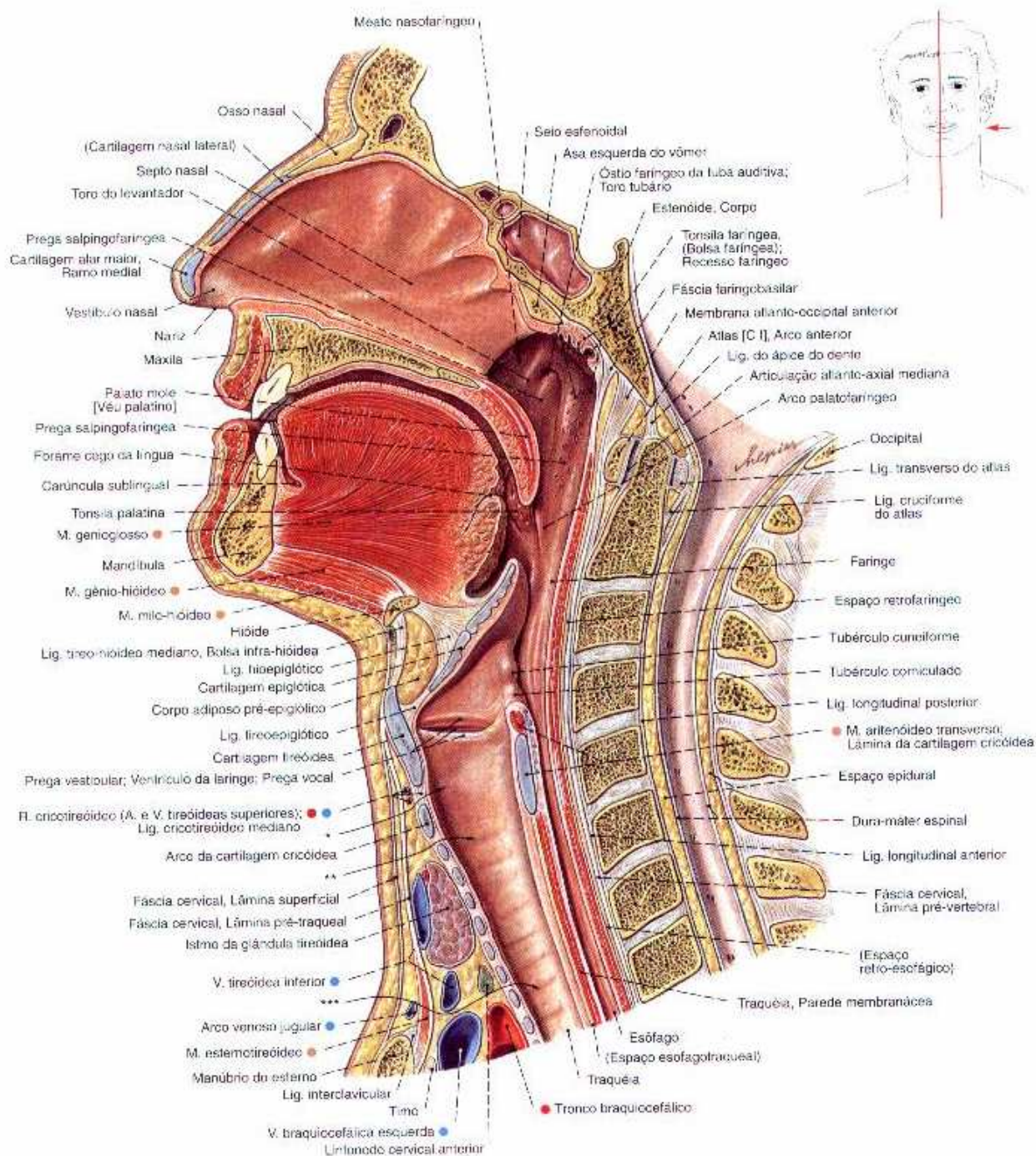


Figura 5: Cabeça e pescoço em corte sagital mediano da cabeça e pescoço.
Fonte: SOBOTTA, 2000.

No período neonatal e na infância a lâmina própria da prega vocal se desenvolve, diferenciando suas camadas aos sete anos de vida em humanos (HARTNICK; REHBAR;

PRASAD, 2005). Aos dois meses de idade iniciam os primeiros sinais de diferenciação bilaminar das lâminas própria (HARTNICK; REHBAR; PRASAD, 2005). Entre os 11 meses e 5 anos, observa-se uma estrutura bilaminar e uma região com poucas células próximo ao músculo vocal. Aos 7 anos de idade é possível se observar as diferenças de densidade celular entre as camadas. A composição diferencial entre as fibras elásticas e colágenas não completa até os treze anos, sendo amadurecida durante a adolescência (HARTNICK; REHBAR; PRASAD, 2005). Aos 17 anos, a diferenciação das camadas é mais evidente (YAMASHITA, 1997).

Na idade adulta o trato vocal encontra-se desenvolvido sendo adequado a fonação. O trato vocal é largo e em trapézio, a epiglote é alargada, encontrando-se deitada sobre a língua, a laringe tem posição mais baixa no pescoço (altura da vértebra C7), a luz em forma de círculo, suas cartilagens, calcificadas, encontram-se mais difusas, o ângulo da cartilagem tireóide apresenta 90° nos meninos e 110° nas mulheres, a cricóide tem forma circular nas mulheres e oval nos homens, o processo vocal da cartilagem aritenóidea está posteriorizado, as pregas vocais são longas e afiladas, a estrutura da mucosa é menos espessa, arquitetura histológica definida, ligamento vocal maduro, fibras com distribuição paralela, a proporção entre glote membranosa e cartilágnea é 1:2, o músculo vocal possui fibras desenvolvidas (ZEMPLIN, 2000; BEHLAU, 2002; LE HUCHE; ALLALI, 2005).

Durante o desenvolvimento e o crescimento dos sistemas fisiológicos, que envolve as fases fetal, neonatal e primeira infância, uma alimentação balanceada é essencial (FILHO; RISSIN, 2003). A ocorrência de distúrbios nutricionais durante estas fases, então chamadas de “críticas do desenvolvimento” (DOBBING, 1970), pode induzir danos que permanecem durante toda a vida, sendo esse fenômeno denominado “programação” (LUCAS, 1991).

2.4 Programação

O termo “programação” é utilizado para descrever o processo pelo qual um estímulo ou insulto, quando aplicado no período crítico do desenvolvimento, tem efeitos permanentes sobre a estrutura e funções do organismo (LUCAS, 1991). A programação é um fenômeno biológico já bem conhecido. Por exemplo, o consumo de álcool por ratas gestantes causa redução de peso ao nascer e menor taxa de crescimento dos filhotes (PONNAPPA; RUBIN, 2000). A administração crônica de citalopran, um anti-depressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina, reduziu o comportamento agressivo de ratos adultos (MANHAES-DE-CASTRO et al, 2001). O uso de outro anti-depressivo, a fluoxetina, durante a lactação, reduziu o comportamento depressivo de ratos adultos (MENDES-DA-SILVA et al, 2002). O tratamento neonatal com naloxane, um opióide endógeno, durante o período crítico de desenvolvimento dos testículos, aumenta a população das células de Sertoli e a produção de espermatozoides em ratos adultos (DA SILVA, VIEIRA et al, 2006).

Estudos epidemiológicos demonstram que a falta ou escassez de nutrientes durante a gestação causa baixo peso ao nascer (BARKER; OSMOND, 1986; BARKER, OSMOND et al, 1989; HALES; BARKER, 1992; LAW, 1996; CHUKWUMA; TUOMILEHTO, 1998). Foi igualmente observado que crianças com baixo peso ao nascer tinham mais chances de desenvolver, quando adultos, intolerância à glicose e diabetes mellitus tipo 2 e o dobro de chances de desenvolver doenças coronarianas, como, hipertensão e hiperlipidemia (HALES; BARKER, 1992; LAW, 1996; HALES, 1997). Com base nessas observações surgiu a “hipótese do fenótipo poupador” (*Thrifty phenotype hypothesis*), ou hipótese fenotípica, numa tentativa de expandir a teoria do período crítico do desenvolvimento (HALES; BARKER, 1992). A Hipótese fenotípica sugere que o organismo se adapta a um *milieu intrauterino* adverso otimizando a utilização de nutrientes para assegurar sua sobrevivência (HALES; BARKER, 1992). Assim,

parece que há forte associação entre o estado nutricional durante os períodos críticos de crescimento e desenvolvimento de sistemas fisiológicos e o aparecimento de disfunções metabólicas no período adulto.

As repercussões nos sistemas fisiológicos vão depender do período, gestação ou lactação, em que ocorreu o déficit nutricional. A escassez de nutrientes durante a lactação provoca a diminuição no crescimento corporal e altera a estrutura craniofacial entre o final da primeira e o início da segunda semana de vida de ratos (SILVA, 2006), assim como a taxa de crescimento de ratos (WIDDOWSON; MCCANCE, 1975). O ganho de peso durante a infância é menor em indivíduos que sofreram restrição nutricional durante a lactação (PETRY, OZANNE, HALES, 2001). Contudo, se o aporte energético melhora, há uma aceleração do ganho de peso durante a adolescência e a fase adulta de forma a compensar esse déficit de crescimento (HALES; BARKER, 1992). Tal fenômeno é chamado de *catch-up* de crescimento, e a sobrecarga metabólica pode alterar a funcionalidade de alguns órgãos, a exemplo do pâncreas (HALES; BARKER, 1992; OZANNE; HALES, 2002).

Alterações nutricionais no período crítico do desenvolvimento ocasionam uma redistribuição da fonte metabólica de modo que haja uma proteção ao cérebro com relação aos outros órgãos (OZANNE; HALES, 2002; LUMBERS; YU; GIBSON, 2001) como fígado, pâncreas e músculo (OZANNE; HALES, 2002). O sistema nervoso, mesmo sendo poupado, é afetado pela desnutrição (OZANNE; HALES, 2002). Em humanos, estudos prospectivos observam que a população pediátrica submetida à desnutrição em estágios vulneráveis de desenvolvimento podem desenvolver seqüelas neurológicas a longo prazo (DOBBING, 1970), como atraso no desenvolvimento da linguagem que mesmo após intervenção apresentam recuperação modesta (GRANTHAM-MCGREGOR; SCHOFIELD; POWELL, 1987).

Pesquisas com animais confirmam as observações no sistema nervoso em humanos. A desnutrição durante a gestação e no período neonatal programa o nível da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, aumenta os níveis de glicocorticóides na circulação sanguínea, durante toda a vida do indivíduo (PHILLIPS, 2001), alterações na organização e mielinização do nervo óptico (ALMEIDA et al, 2005), retardo do desenvolvimento normal das “vias auditivas do tronco encefálico”, diminuindo a transmissão do impulso do nervo auditivo (ROCINHOLI et al, 2001a) e diminuição da transdução auditiva no órgão de Corti (ROCINHOLI et al, 2001b; WAITZBERG et al, 1989), alterações duradouras na função da neurotransmissão serotoninérgica (MEDEIROS; SILVA; SOUGEY et al, 2001), menor dispersão neuronal e maior densidade de neurônios por mm² (ZANIN et al, 2003), anormalidades no desenvolvimento do sistema dopaminérgico e função hipocampal (CHEN et al, 1995). Também se notou dificuldade em testes de aprendizagem, devido à baixa ingestão protéica, que se propagam por gerações de ratos mesmo após a recuperação nutricional (STEWART et al, 1980).

No sistema muscular a desnutrição também causa diversas alterações. Constantemente os músculos remodelam para adequarem-se às suas funções. As alterações acontecem nos seus diâmetros, comprimento, força, e até mesmo os tipos de fibras musculares são ligeiramente alterados (GUYTON; HALL, 2002). Utilizando o rato como modelo experimental, observou-se que a desnutrição neonatal acarreta deficiência na atividade locomotora, comportamento exploratório e no desenvolvimento sensório-motor (BARROS, 1999), diminuição da força muscular, alterações irreversíveis no desenvolvimento do tecido muscular (BARROS et al, 2004), alterações morfológicas no coração aos 30 e 71 dias de vida (TOSCANO, 2004), diminuição o perímetro das camadas musculares do esôfago em ratas mesmo após a recuperação nutricional (SILVA, 2006).

A laringe pode sofrer alterações decorrentes das adversidades ambientais, como a desnutrição, tanto em sua função, como em sua estrutura macroscópica e microscópica. Pois, o tecido muscular sob influência da desnutrição apresenta alterações irreversíveis no desenvolvimento do tecido muscular de diversos órgãos como a diminuição da força muscular (BARROS, 1999; TOSCANO, 2004; SILVA, 2006). Em relato de caso de desnutrição secundária a anorexia nervosa observou-se redução da loudness, qualidade vocal rouca e ritmo de fala monótono (NERY et al, 2002). Animais cujas mães sofreram déficit de vitamina A durante a gestação apresentaram má-formação das cartilagens da laringe e traquéia, e fistula laringoesofágica (TETLEYA et al, 2007).

Os estudos relacionados à desnutrição durante o período crítico do desenvolvimento têm contribuído para o entendimento das alterações de diversos órgãos. Contudo ainda não se tem relatado na literatura as repercussões precoces ou tardias da desnutrição em órgãos da fonação, como a laringe.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis efeitos da desnutrição neonatal por dieta hipoprotéica na morfologia da laringe de ratos aos 22 e 60 dias de idade.

3.2 Objetivos específicos

- Mensurar as dimensões supero-inferior, latero-lateral e ântero-posterior da laringe de ratos aos 22 e 60 dias de idade que foram submetidos à desnutrição neonatal
- Analisar qualitativamente as estruturas microscópicas presentes na supraglote, glote e infraglote
- Mensurar:
 - A espessura do epitélio da prega vocal
 - O diâmetro do núcleo das células do epitélio da prega vocal
 - A espessura das camadas superficial, média e profunda da prega vocal

HIPÓTESES

4 HIPÓTESES

- A desnutrição neonatal influencia o crescimento das estruturas macro e microscópicas da laringe do rato a curto e a longo prazo.
 - Diminui as dimensões horizontais da laringe, em curto prazo
 - Modifica o epitélio da supraglote a longo prazo.
 - Reduz o diâmetro do núcleo das células do epitélio a longo prazo.
 - Reduz a espessura do epitélio e da camada intermediária da prega vocal a longo prazo.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12h (luz das 6 às 18h) e livre acesso à alimentação e água (figura 6).



Figura 6: Acondicionamento dos animais em biotério sob condições padrões de temperatura, luminosidade e alimentação.

Para obtenção de neonatos, foram acasalados animais machos e fêmeas (proporção 1:2), com idade entre 90 e 120 dias. As gestantes foram acomodadas individualmente em gaiolas e foram rotineiramente observadas para registro do dia de nascimento dos filhotes. Um dia após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes (machos), pesando entre 6 a 8 g cada. Este dia foi considerado como o primeiro dia de vida dos filhotes. Em seguida, as mães receberam dieta a base de caseína para formação dos diferentes grupos experimentais (tabela 1). Após o período de lactação, os animais foram transferidos para gaiolas (6 animais por gaiola) e

alimentados com dieta padrão do biotério (52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos - LABINA) até a idade adulta (tabelas 2 e 3).

Tabela 1: Composição da dieta LABINA (Purina Brasil) utilizada na alimentação dos animais controle.

Ingredientes*	Quantidade (g)	Calorias (Kcal)
Proteína	23	92
Carboidratos	74,5	288
Gordura	2,5	22,5
Total	100	402,5

*Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato de bicálcico, sal, pré-mix.

Fonte: Purina Brasil

Tabela 2: Composição de dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína.

Ingredientes	Quantidade*	
	8 %	17%
Caseína	79,3 g	179,3 g
Mix Vitamínico	10 g	10 g
Mix Mineral	35 g	35 g
Celulose	50 g	50 g
Bitartarato de Colina	2,5 g	2,5 g
DL-Metionina	3,0 g	3,0 g
Óleo de Soja	70 ml	70 ml
Amido de Milho	750,2 g	650,2 g

*Quantidade para 1 kg de dieta.

Fonte: REEVES, 1997.

Tabela 3: Composição centesimal de macronutrientes da dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína utilizada na alimentação dos animais durante a lactação.

Macronutrientes	% Proteína	
	8 %	17%
%g	100.00	100.00
Proteínas	8.10	17.30
Carboidratos	66.87	58.11
Lipídeos	7.00	7.00
Fibras	1.25	5.00
Vitaminas	3.50	1.25
Minerais	5.00	3.50
Kcal	362.48	363.44

Fonte: FREITAS-SILVA, 2007.

Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram compostos por dois grupos (controle e desnutrido) descritos a seguir:

Controle (C): formado por animais ($n = 24$) submetidos, durante a lactação, à dieta normoprotéica (caseína a 17%).

Desnutrido (D): formado por animais ($n = 24$) submetidos, durante 21 dias pós-natal (período de lactação), à dieta isocalórica deficiente em proteína (caseína a 8%).

Após a lactação, os animais de ambos os grupos receberam dieta padrão do biotério (LABINA).

Desenho Experimental

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados aos 22 ou 60 dias de idade para a realização dos estudos morfológicos e histológicos da laringe (Figura 7).

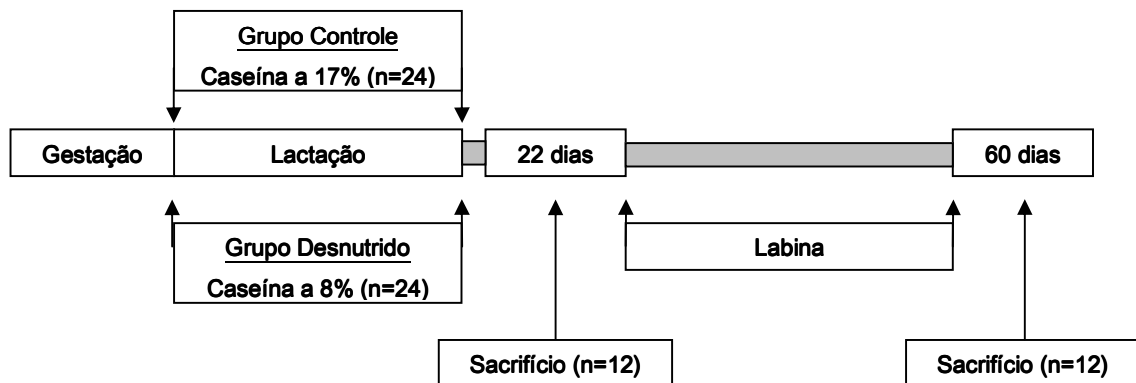


Figura 7: Desenho experimental representando a formação dos diferentes grupos (controle e desnutrido) quanto à manipulação da dieta e o período em que foram sacrificados. O número de animais sacrificados em cada idade ($n=12$) foi o mesmo para os diferentes grupos experimentais.

5.2 Avaliação da evolução ponderal

Os filhotes foram diariamente pesados individualmente durante todo o período de experimento (figura 8). O peso corporal dos animais foi registrado através de balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000, com capacidade de 4kg e sensibilidade de 0,1g.



Figura 8: Pesagem do animal.

Ganho de peso corporal

Até os 22 dias de idade, o ganho de peso corporal (GPC) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ GPC} = (P_x \times 100 / P_1) - 100$$

Onde:

% GPC = ganho de peso corporal em percentual

P_x = Peso de cada dia subsequente

P_1 = Peso ao nascer

Dos 22 até os 60 dias de idade, o ganho de peso corporal (GPC) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ GPC} = (P_x \times 100 / P_{22}) - 100$$

Onde:

% GPC = Ganho de peso corporal em percentual

P_x = Peso de cada dia subsequente

P_{22} = Peso aos 22 dias

Taxa de crescimento

Baseado no peso absoluto a taxa de crescimento foi calculada a partir da fórmula:

$$TC = P_x - P_A$$

Onde:

TC = Taxa de crescimento (em gramas)

P_A = Peso do dia anterior

P_x = Peso de cada dia subsequente

5.3 Análise macroscópica da laringe

Procedimento para retirada dos órgãos

Aos 22 ou 60 dias de vida, os animais foram anestesiados com Ketamina (0,25 ml/100g de peso corporal do animal) e Xilazina (0,25 ml/100g de peso corporal do animal) *i.m.*, para a retirada da laringe (figura 9). Inicialmente foi realizada incisão na pele na região torácica alta e levantamento do retalho cutâneo tóraco-cervical para a retirada da laringe em bloco com a língua

e parte da traquéia. Em secção posterior sobre o osso hióide e no nível do quarto anel traqueal, a laringe foi isolada dos demais órgãos (XIMENES FILHO et al, 2003). Em seguida, foi inspecionada para analisar a integridade de mucosa e cartilagens (CRUZ et al, 2003). A região da laringe foi cuidadosamente dissecada (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005).

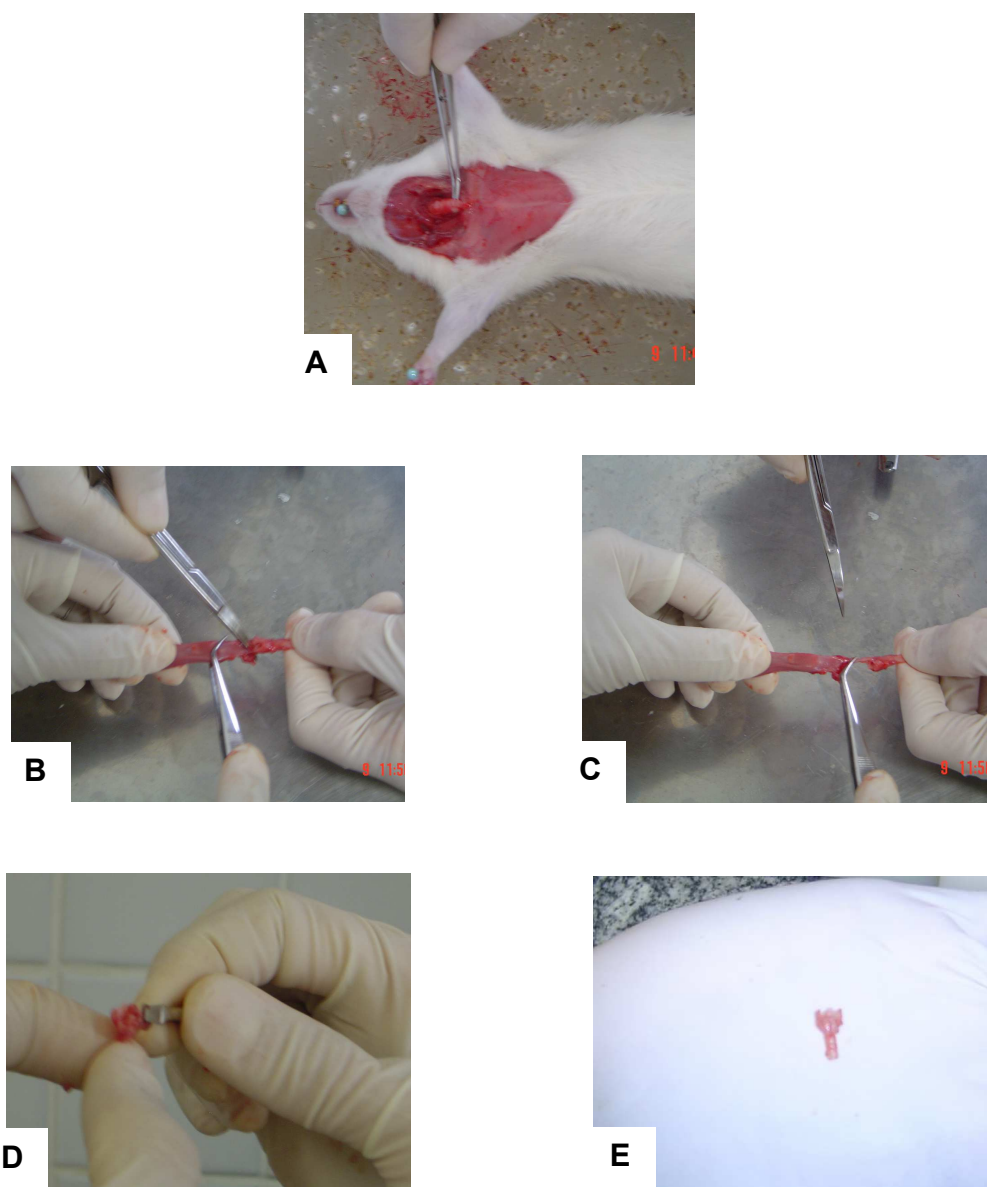


Figura 9: Procedimento para retirada dos órgãos. A - Visualização da laringe com a traquéia do rato após incisão B - Remoção da laringe com a língua em bloco, C - Separação da laringe e traquéia da língua e hióide, D - Dissecção da laringe, E - Laringe dissecada.

Análise Morfométrica

A mensuração da laringe foi realizada com paquímetro digital (BTS digital caliper) de acurácia 0,01 mm, através das hastes para mensuração de superfícies externas (PAES, 2002; SILVA et al, 2005), seguindo as recomendações para o uso do paquímetro (SILVA; CUNHA, 2003). Para maior uniformidade nas respostas, pontos anatômicos foram definidos para a mensuração dos comprimentos (figura 10):

Da epiglote a cricóide: distância entre a margem superior da cartilagem epiglótica e a margem inferior da cartilagem cricóidea.

Da tireóide a cricóide: distância entre a margem superior da cartilagem tireóidea e a margem inferior da cartilagem cricóidea (PAES, 2002).

Látero-lateral: distância entre as margem superiores dos cornos superiores da cartilagem tireóidea.

Ântero-posterior: distância entre o ponto anterior e posterior da margem inferior da cartilagem cricóidea.

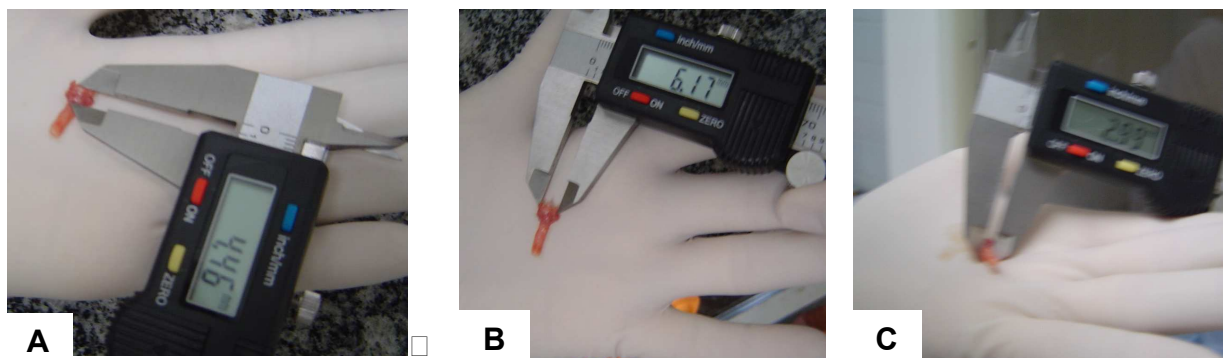


Figura 10: Mensurações da laringe, A- Comprimento da tireóide a cricóide, B- Comprimento látero-lateral, C- Comprimento Antero-posterior.

Após a definição das dimensões calculou-se o percentual de crescimento das dimensões mensuradas da laringe.

Variação do crescimento (Δ)

Baseado das dimensões dos comprimentos da epiglote a cricóide, tireóide a cricóide, látero-lateral e antero-posterior, obtidas aos 22 e 60 dias de idade. A variação do crescimento (Δ) em percentual foi calculada a partir da fórmula:

$$\Delta C = (C_{60} \times 100 / C_{22}) - 100$$

Onde:

ΔC = Δ crescimento em percentual

C_{22} = Comprimento de uma das dimensões da laringe aos 22 dias de idade, em mm

C_{60} = Comprimento de uma das dimensões da laringe aos 60 dias de idade, em mm

5.4 Análise microscópica

Preparação do tecido

O material foi lavado com soro fisiológico e posteriormente fixado em formolaldeído a 10% por 12 horas (PADOVANI-JUNIOR et al, 2006). Após esta etapa, ocorreu desidratação em bateria crescente de alcoóis (70°, 80 °, 90 ° e 100°), diafanização em xilol, imersão e inclusão em parafina. Os banhos, em cada uma destas substâncias duraram 15 minutos exceto o da parafina que foi de 30 minutos (PAZ et al, 2001). De acordo com o método empregado, a fim de otimizar o tempo de processamento dos tecidos, os órgãos foram desidratados sob temperatura de 56° C, para isto foi utilizada estufa Fanem, 315 SE. Em seguida, a laringe foi incluída em blocos de

parafina e submetida à microtomia em cortes coronais a laringe de 5 µm de espessura (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005) obtidos em micrótomo Leica, RM 2125RT. A laringe vocal sofreu cortes coronais, perpendiculares a prega vocal (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005). Posteriormente, cada lâmina foi corada com hematoxilina-eosina (H/E), conforme rotina histológica e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan-Merck) (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005; RAMOS et al, 2005; PADOVANI JUNIOR et al, 2006).

Análise histológica da laringe com as pregas vocais

A análise foi realizada através de fotomicrografias dos cortes montados em lâminas histológicas capturadas por uma microcâmera acoplada ao microscópio óptico, Olympus BX41 (aumento de 400X), e transferidas ao computador através de um software de captura de imagem, ATI-Tv Player, 6.3 (DUARTE et al, 2006). Foram analisados três cortes de cada laringe, de seis animais. Utilizou-se microscópio, Olympus BX41 (aumento de 400X), com objetiva 10x para a análise da supraglote, glote e infraglote (MARCELINO; OLIVEIRA, 2005; GORTI et al, 1999; DUARTE et al, 2006; SANTOS et al, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; RAMOS et al, 2005; PADOVANI JUNIOR et al, 2005).

Consideraram-se os critérios de presença e ausência. Considerando, para as análises, a escala em percentual de estruturas encontradas em determinada região:

90 - 100 % = +++++

70 - 90 % = ++++

50 - 70 % = +++

40 - 50 % = ++

0 - 40 % = +

Análise histológica da supraglote e infraglote

A histologia da supraglote e infraglote analisada foi referente ao epitélio, glândulas, células linfáticas e vasos sanguíneos segundo descrição abaixo:

Epitélio: Epitélio estratificado pavimentoso na supraglote. Na infraglote o epitélio é pseudo-estratificado cilíndrico ciliado. O epitélio foi considerado estratificado pavimentoso quando possui várias camadas celulares na qual as células vão se achatando a medida que se aproximam da superfície. E considerado pseudo-estratificado cilíndrico ciliado quando apresentava uma camada de células cilíndricas com núcleos elípticos em várias alturas e cílios (estruturas delgadas e curtas) direcionados para a luz laríngea.

Glândulas: Presença de glândula formada por células mucosas caracterizadas por possuir citoplasma abundante e pouco corado, núcleo achatado direcionado para a base da célula, imersa em tecido conjuntivo.

Células linfáticas: Presença de células linfáticas na supraglote. São encontrados nódulos linfáticos isolados no tecido conjuntivo frouxo das vias respiratórias. São de estrutura esféricas formados por linfócitos fortemente corados.

Vasos: Presença de vasos sanguíneos constituídos por epitélio simples pavimentoso, ou seja, única camada celular de células achatadas de núcleo achatado.

Análise da glote

A histologia da glote analisada no que diz respeito ao epitélio, tecido conjuntivo, células linfáticas e vasos sanguíneos segundo descrição abaixo:

Epitélio: Presença de epitélio escamoso estratificado não queratinizado, caracterizado por apresentar várias camadas de células, na qual as mais superficiais são achatadas de núcleo de forma similar.

Tecido conjuntivo: Presença de tecido conectivo frouxo com fibroblastos e células colágenas característico da prega vocal, sendo explanado adiante.

Células linfáticas: Presença de células linfóides dentre elas macrófagos, similar às regiões da supraglote e infraglote.

Vasos: Presença de vasos sanguíneos similar às regiões da supraglote e infraglote.

Análise da prega vocal

Através do programa, Scion Image, Beta 4.0.2, as imagens da prega vocal foram submetidas à análise histológica (objetiva de 10x) para a mensuração das camadas e do diâmetro do núcleo da célula epitelial (objetiva de 40x) (figura 11).

Camadas da prega vocal:

Espessura do epitélio: Perímetro do epitélio escamoso estratificado não queratinizado encontrado na porção mais superficial da prega vocal. Distância entre a porção mais externa da célula epitelial mais superficial à porção mais interna da célula epitelial mais profunda.

Diâmetro do núcleo das células epiteliais: análise do diâmetro do núcleo no eixo mais longo e no mais curto.

Dimensão da camada superficial: Definida como o tecido de forma homogênea localizada nas adjacências do epitélio e que possua limites profundos bem definidos. Distância entre a porção mais externa das células da camada superficial da prega vocal mais próxima ao epitélio até a porção mais interna das células mais profundas da camada superficial da prega vocal.

Dimensão da camada intermediária: Definida como a de forma homogênea que se localizasse na adjacência da superficial. Distância entre a porção mais externa das células da camada intermediária da prega vocal mais próxima à camada superficial da prega vocal até a porção mais interna das células mais profundas da camada intermediária da prega vocal.

Dimensão da camada profunda: Localizada na região da lâmina própria que mantém estreita relação com o músculo tireoaritenóideo. Distância entre a porção mais externa das células da camada profunda da prega vocal mais próxima à camada intermediária da prega vocal até a porção mais interna das células mais profundas da camada profunda da prega vocal próximas ao músculo vocal.

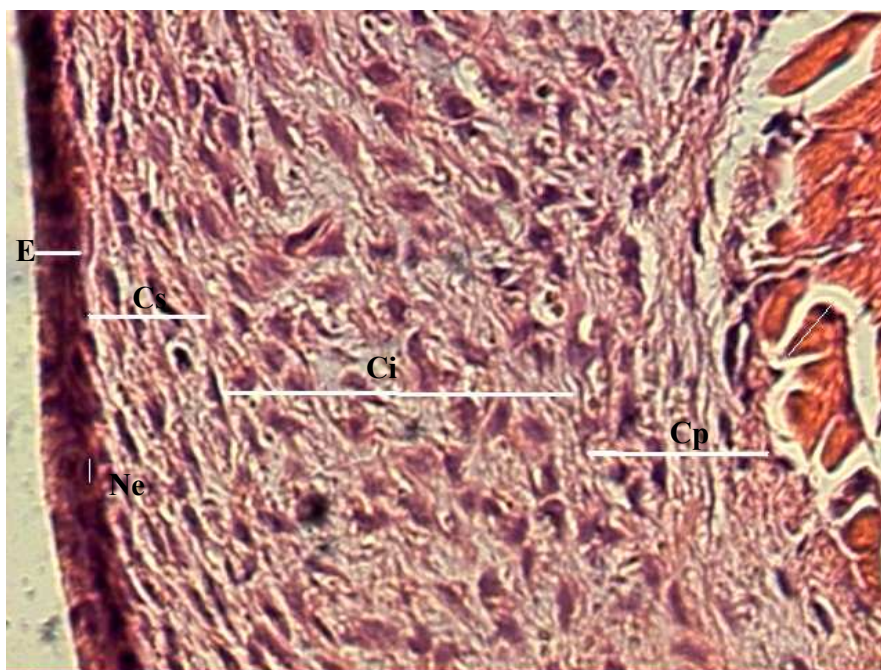


Figura 11: Mensurações da prega vocal: E – epitélio, Ne – núcleo do epitélio, Cs – camada superficial, Ci – camada intermediária, Cp – camada profunda. H/E (Objetiva 10x)

5.5 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (nº 018527/2006-14). Para o correto manuseio dos animais, os pesquisadores foram devidamente treinados e as normas de biossegurança e do biotério foram rigorosamente seguidas.

5.6 Análise estatística

Os valores estão expressos em média e desvio padrão (DP). Para comparação entre os grupos nutrido e desnutrido foi utilizado o T-teste *student* de medidas independentes. Para a comparação entre os grupos com relação à análise de parâmetros morfológicos foi utilizado o teste ANOVA two-way, seguido do teste de Bufferroni de comparações múltiplas. O nível de significância foi mantido em 5%. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prim 4 para Windows.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

A apresentação dos resultados está dividida em duas partes: a primeira descreve a evolução ponderal dos filhotes até os 60 dias de idade, a segunda os resultados da análise da morfologia da laringe.

1ª PARTE – Diagnóstico da desnutrição protéica neonatal

O peso corporal ao nascer dos animais desnutridos foi semelhante ao controle (controle = $7,29 \pm 0,56$; desnutrido = $6,69 \pm 0,5$). Durante o período de lactação, o peso corporal dos animais foi progressivamente aumentando até os 22 dias de idade em ambos os grupos. Contudo, os animais desnutridos apresentaram menor ganho de peso corporal a partir do 7º dia de vida quando comparados ao controle ($p < 0,05$) (figura 12A). Da mesma forma, os animais desnutridos apresentaram uma menor taxa de crescimento no desmame (controle = $2,6 \pm 1,1$ e desnutrido = $1,1 \pm 0,5$, $p < 0,05$) (figura 12B).

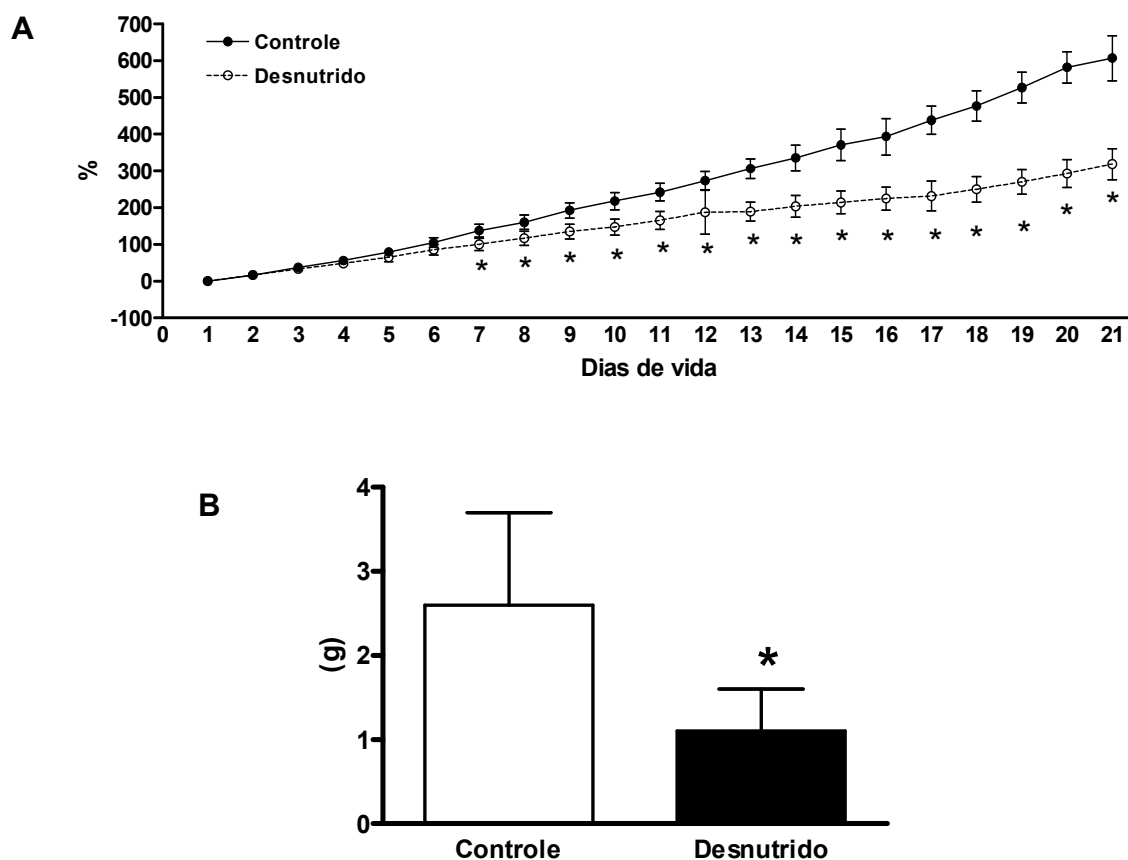


Figura 12: Efeito da desnutrição neonatal sobre o peso corporal de ratos do nascimento aos 21 dias de vida. A - Ganho de peso corporal de animais controle e desnutrido. B- Taxa de crescimento dos animais controle e desnutrido. Os valores estão expressos em Média $\pm$ DP. * $p < 0.05$

Aos 22 e 60 dias de idade, os animais do grupo desnutridos apresentaram um menor peso corporal (aos 22 dias: controle = 61.18 ± 7.23 e desnutrido = 29.61 ± 2.59 , aos 60 dias: controle = 255.93 ± 13.89 e desnutrido = 224.49 ± 10.53 , $p < 0.05$). Contudo, aos 60 dias de idade, a diferença entre os grupos foi menor (12,2%) comparativamente aos 22 dias (figura 13 A e B). De fato, os animais desnutridos apresentaram um maior ganho de peso corporal a partir do 30º dia de vida, que se manteve até o 60º dia de vida ($p < 0.05$) (figura 13 C). A taxa de crescimento aos 60 dias não diferiu entre os grupos (controle = $5,86 \pm 1,99$, desnutrido = $5,8 \pm 1,9$). Pode-se observar o tamanho de alguns dos animais, aos 22 e aos 60 dias nas figuras 14 e 15.

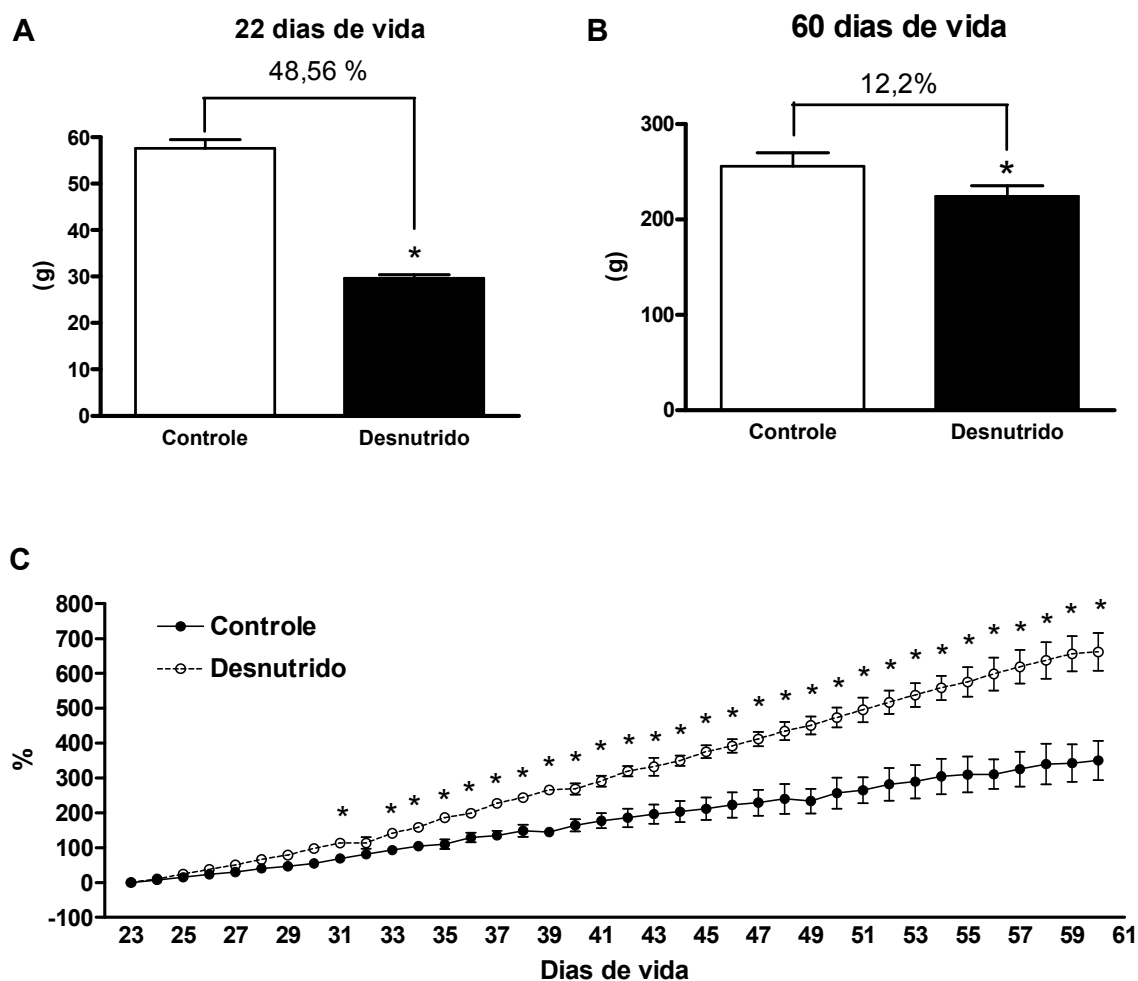


Figura 13: Efeito da desnutrição neonatal sobre o peso corporal de ratos do 22º ao 60º dia de vida. A – Peso corporal no 22º dia de vida. B – Peso corporal ao 60º dia de vida. C - Ganho de peso corporal de animais nutridos e desnutridos do 22º ao 60º dia de vida. Os valores estão expressos em Média $\pm$ DP. * $p < 0.05$.

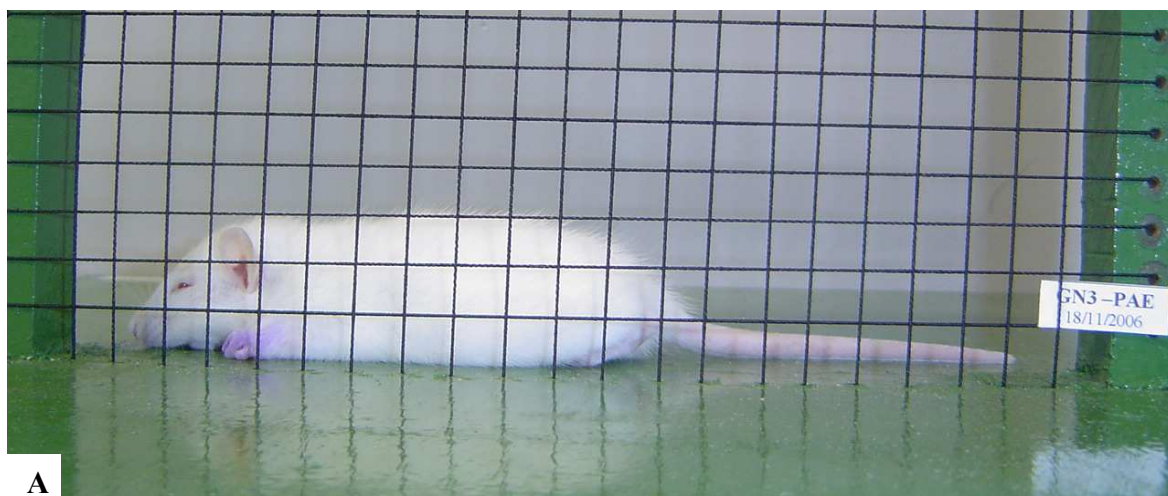


Figura 14: Proporção corporal de ratos controle (A) e desnutridos (B) após o desmame (22 dias de vida).



Figura 14: Proporção corporal de ratos controle (A) e desnutridos (B) após o desmame (60 dias de vida).

2ª PARTE – Morfologia da laringe

Aos 22 dias de idade, os animais do grupo desnutrido apresentaram redução nas dimensões ântero-posterior e látero-lateral da laringe quando comparados ao controle. As dimensões verticais epiglote a cricóide, e tireóide a cricóide foram semelhantes ao controle (tabela 4). As dimensões da laringe reduzidas aos 22 dias (látero – lateral e antero – posterior) dos animais desnutridos cresceram mais, considerando suas dimensões aos 22 dias, que as dimensões restantes (epiglote-cricóide e tireóide-cricóide) (tabela 4). Aos 60 dias, não houve diferença entre os grupos em relação as dimensões da laringe foram analisadas (tabela 4).

Tabela 4: Dimensões macroscópicas da laringe de ratos (mm) submetidos ou não à desnutrição no período neonatal, aos 22 e 60 dias de vida.

	22 dias de idade		60 dias de idade		Δ crescimento (%)	
	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>
Epiglote-cricóide	4,6±0,3	4,5 ±0,5	6,4±0,3	6,2±0,3	41,9±11,0	41,4±15,1
Tireóide-cricóide	3,1±0,3	3,1±0,5	4,1±0,2	4,0±0,3	36,4±12,4	39,8±22,3
Látero-lateral	4,5±0,3	3,9±0,2 *	5,8±0,2	5,7±0,4	32,2±6,1	52,6±6,9 *
Antero-posterior	2,2±0,2	1,8±0,2 *	3,1±0,3	3,0±0,2	49,2±10,2	82,0±24,9 *

Valores expressos em Média ± DP. *p < 0.05 vs controle.

Na análise microscópica descritiva da laringe (n = 18), em corte frontal, os grupos não diferiram com relação aos tipos de estruturas apresentadas (tabela 5). A supraglote apresentou epitélio estratificado pavimentoso em ambos os grupos (figura 16). Frequentemente, nos animais desnutridos, foi observado processo de queratinização na porção mais superior do epitélio da supraglote (figura 17).

Tabela 5: Análise qualitativa de características histológicas da supraglote da laringe de ratos submetidos à desnutrição neonatal, com 22 e 60 dias de vida.

	22 dias de idade		60 dias de idade	
	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>
Epitélio estratificado pavimentoso	+++++	+++++	+++++	+++++
Queratinização	+++	++++	++	++++
Vasos sangüíneos	+++++	+++++	+++++	+++++
Células linfáticas	+++++	+++++	+++++	+++++
Glândulas	+++++	+++++	+++++	+++++

+ presença das características. +++++ (100-90%), ++++ (70-90%), +++(50-70%), ++ (40-50%, +(0-40%)

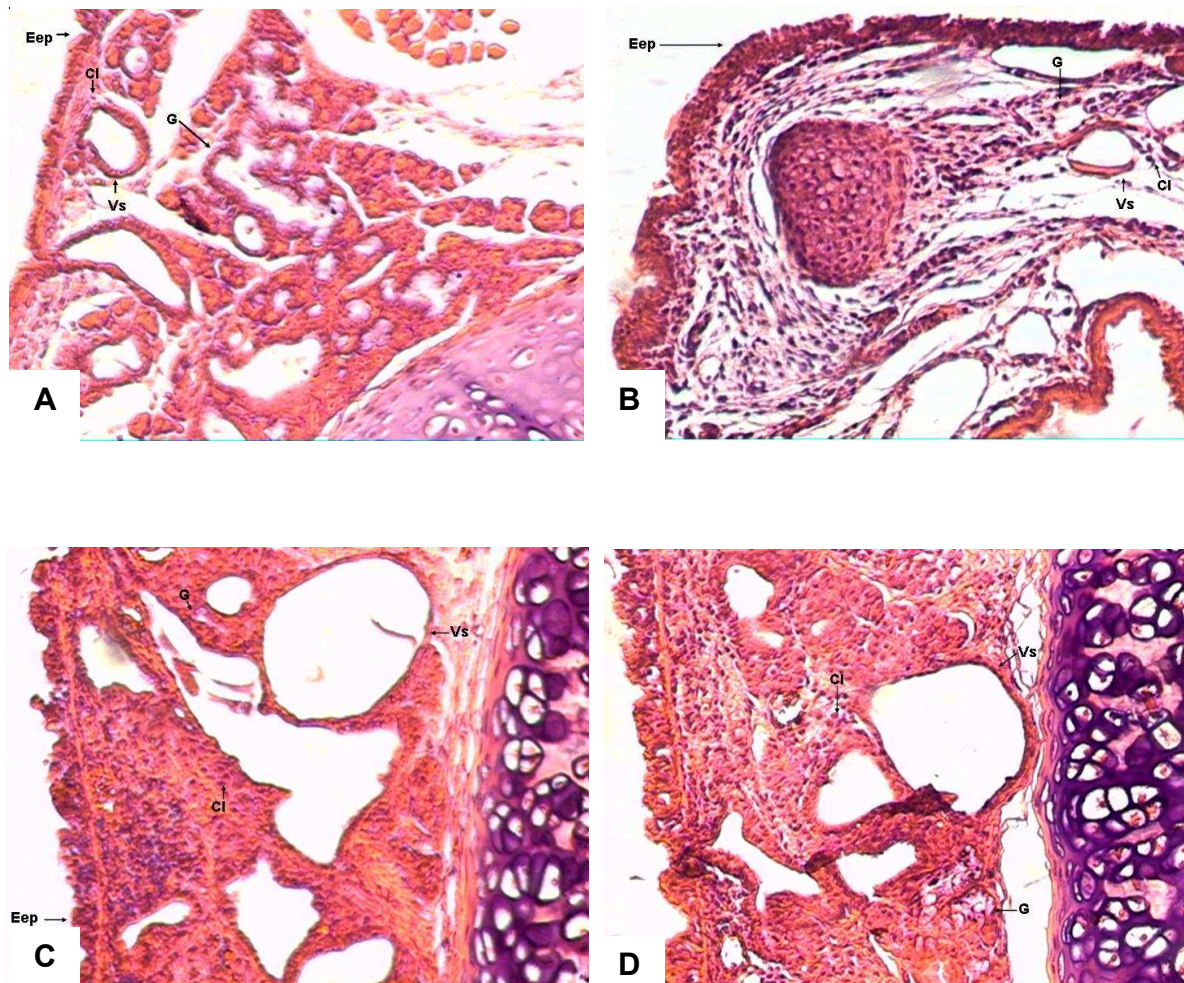


Figura 16: Fotomicrografia da supraglote de ratos nutridos (A e C) e desnutridos (B e D) aos 22 (A e B) e 60 dias de idade (C e D). Os cortes evidenciam as estruturas analisadas: Cl – Células linfáticas, Vs – Vaso sanguíneo, Eep – Epitélio estratificado pavimentoso, G – glândula. H/E (Objetiva 10x).

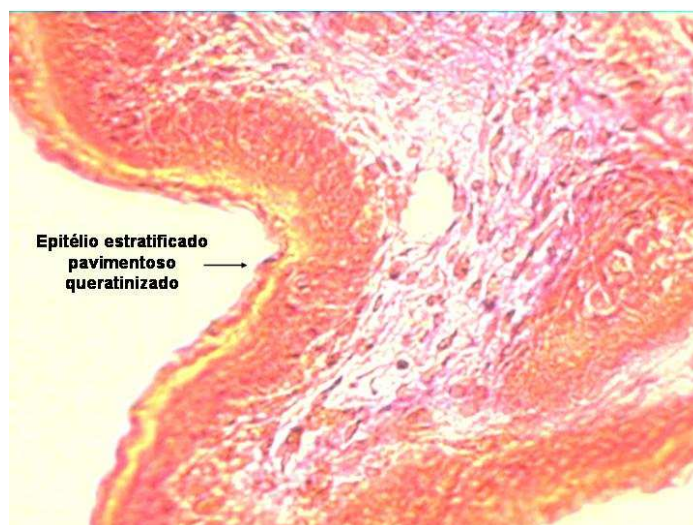


Figura 17: Fotomicrografia do epitélio pavimentoso estratificado queratinizado da supraglote de rato aos 60 dias de idade do grupo desnutrido. H/E (Objetiva 40x).

Todas as estruturas analisadas da infraglote dos animais controles e desnutridos apresentaram-se semelhantes (tabela 6). O epitélio encontrado foi pseudo-estratificado cilíndrico ciliado recobrimdo o tecido conjuntivo. Neste encontram-se inclusos células linfáticas, um grande número de glândulas e vasos sanguíneos (figura 18).

Tabela 6: Análise qualitativa de características histológicas da infraglote da laringe de ratos submetidos à desnutrição neonatal, com 22 e 60 dias de vida.

	22 dias de idade		60 dias de idade	
	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>
Epitélio pseudo estratificado cilíndrico ciliado	+++++	++++	+++++	+++++
Vasos sanguíneos	+++++	+++++	+++++	+++++
Células linfáticas	+++++	+++++	+++++	+++++
Glândulas	+++++	+++++	+++++	+++++

+ presença das características. +++++ (100-90%), ++++ (70-90%), +++(50-70%), ++ (40-50%), +(0-40%)

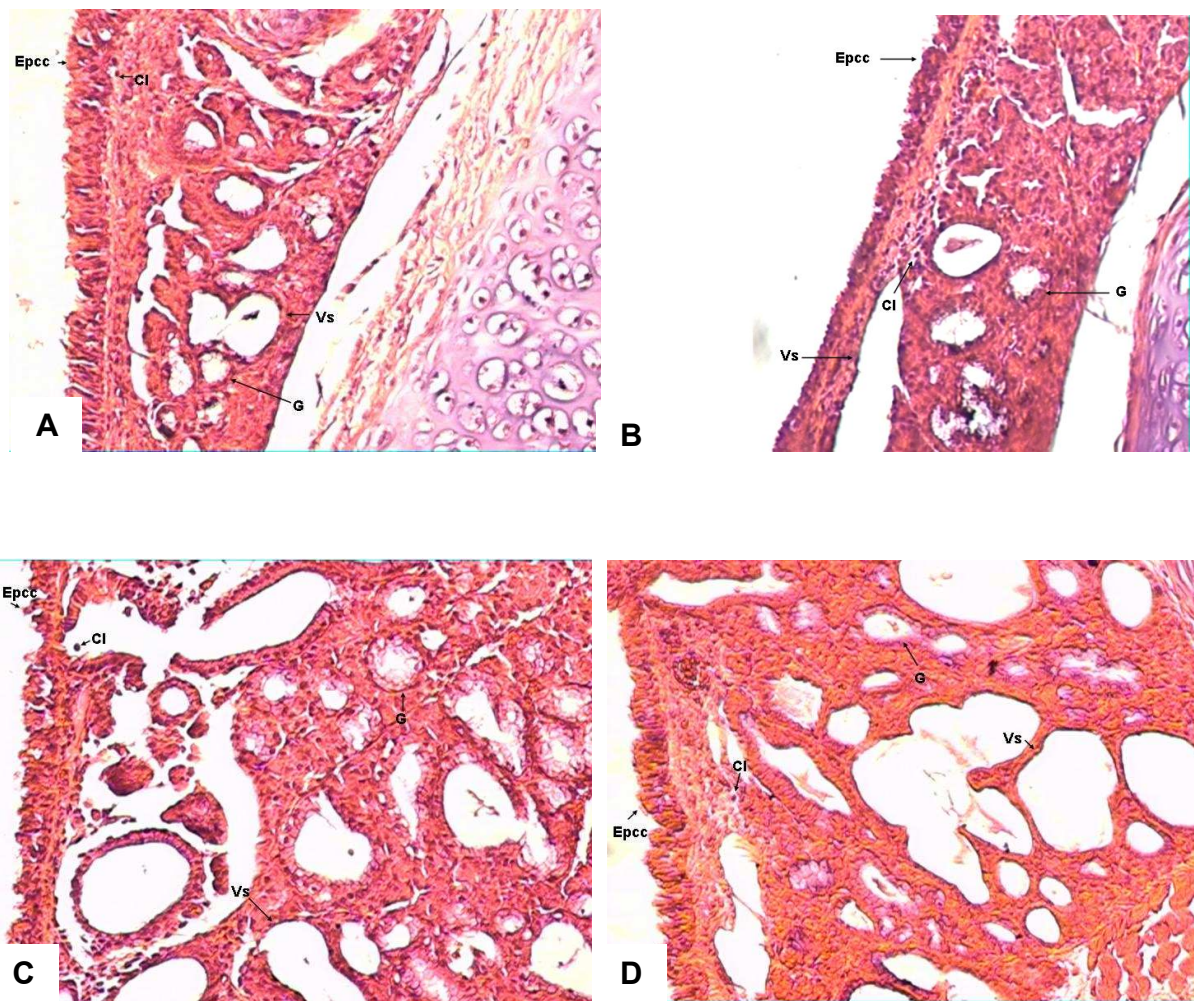


Figura 18: Fotomicrografia da infraglotte de ratos nutridos (A e C) e desnutridos (B e D) aos 22 (A e B) e 60 dias de idade (C e D). Os cortes evidenciam as estruturas analisadas: Cl – Células linfáticas, Vs – Vaso sanguíneo, Epcc – Epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado, G – glândula. H/E (Objetiva 10x).

Na glote observa-se epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, mais internamente se encontra o tecido conjuntivo frouxo que se subdivide em três camadas: As camadas superficial, intermediária e profunda da prega vocal foram semelhantes entre os grupos. Em ambos os grupos, as células linfáticas, glândulas e vasos sanguíneos encontraram-se presentes em grande parte dos animais, porém as glândulas e vasos sanguíneos em quantidade reduzida (tabela 7) (figura 19).

Tabela 7: Análise qualitativa de características histológicas da glote da laringe de ratos, com 22 e 60 dias de vida.

	22 dias de idade		60 dias de idade	
	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>
Epitélio estratificado pavimentoso	+++++	++++	+++++	++++
Vasos sanguíneos	+++	+++	++++	++++
Células linfáticas	+++++	+++++	+++++	+++++
Glândulas	++	++	++	++

+ presença das características. +++++ (100-90%), ++++ (70-90%), +++(50-70%), ++ (40-50%), +(0-40%)

As estruturas microscópicas das pregas vocais analisadas aos 22 dias de idade não diferiram entre os grupos. Porém, aos 60 dias de idade, após recuperação nutricional, os animais apresentaram redução nas dimensões da espessura do epitélio, diâmetro do núcleo do epitélio e da espessura da camada intermediária (tabela 8) (figura 19).

Tabela 8: Dimensões microscópicas (μm) das estruturas da prega vocal da laringe de ratos Wistar desnutridos no período neonatal.

	22 dias		60 dias	
	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>
Espessura do epitélio	20,34 $\pm$ 3,14	13,46 $\pm$ 3,30	22,26 $\pm$ 7,73	12,8 $\pm$ 2,9*
Diâmetro do núcleo	1,47 $\pm$ 0,32	1,45 $\pm$ 0,30	1,73 $\pm$ 0,25	1,22 $\pm$ 0,37*
Camada superficial	35,83 $\pm$ 5,97	51,24 $\pm$ 18,37	38,28 $\pm$ 5,9	39,22 $\pm$ 8,9
Camada intermediária	90,18 $\pm$ 31,06	72,45 $\pm$ 7,87	138,05 $\pm$ 30,95	100,08 $\pm$ 25,55*
Camada profunda	35,81 $\pm$ 11,15	37,57 $\pm$ 13,66	40,57 $\pm$ 4,90	40,84 $\pm$ 8,65

* Média $\pm$ DP $p < 0.05$ vs controle.

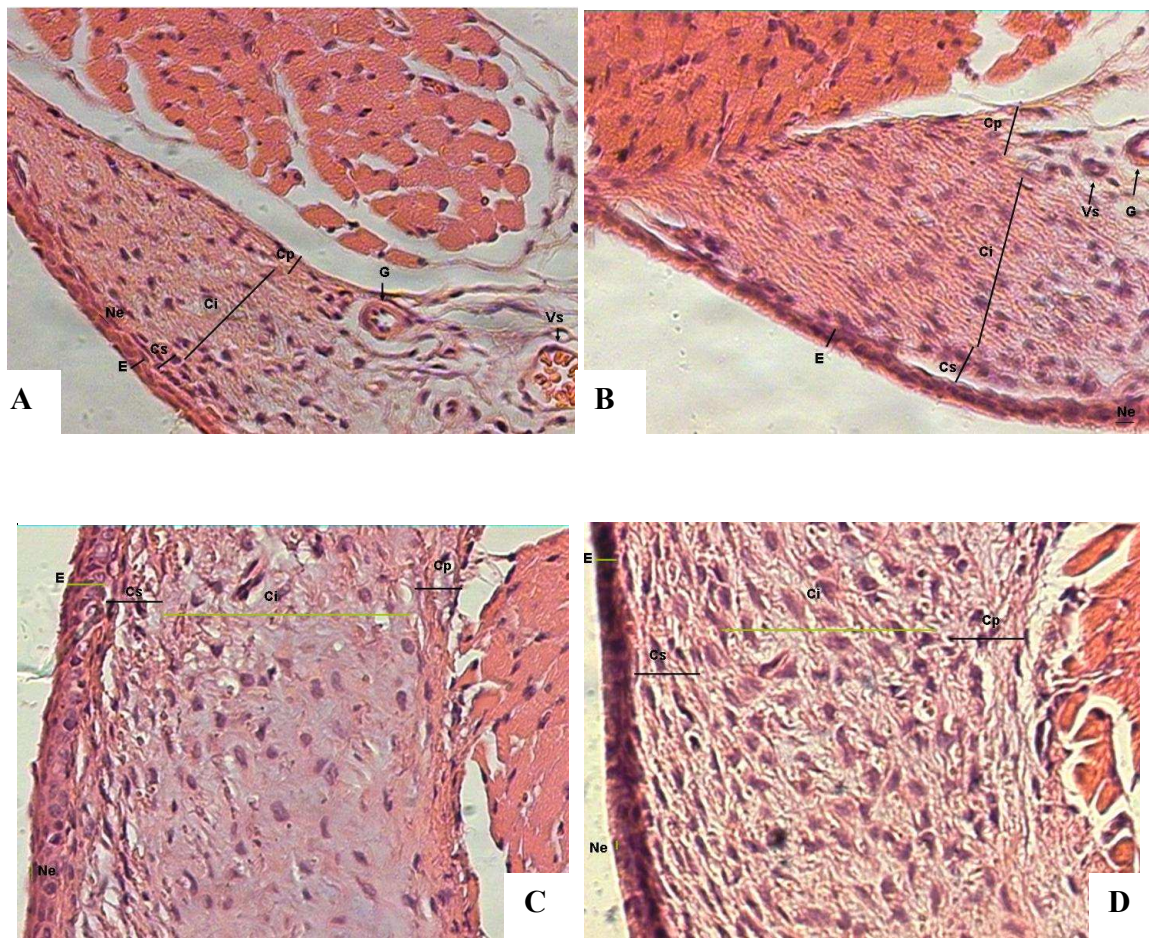


Figura 19: Fotomicrografia da prega vocal de ratos nutridos (A e C) e desnutridos (B e D) aos 22 (A e B) e 60 dias de idade (C e D), apresentando redução do diâmetro do núcleo do epitélio, da espessura do epitélio e da camada intermediária nos animais desnutridos aos 60 dias de vida. Os cortes evidenciam as estruturas analisadas: E – epitélio, Ne – Núcleo do epitélio, Cs – Camada superficial, Ci – Camada intermediária, Cp – Camada profunda, Vs – Vaso sanguíneo, G – Glândula. H/E (Objetiva 10x).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da desnutrição durante a lactação na morfologia macro e microscópica da laringe de ratos. Para tanto, e particularmente no que respeita aos efeitos a curto e longo prazo da desnutrição, os animais foram avaliados em idades diferentes, logo ao desmame (22 dias) e na idade de 60 dias. A dieta oferecida às mães durante a lactação foi hipo-protéica (caseína a 8%), porém, isocalórica. Esse modelo de desnutrição tem sido utilizado por vários estudos para avaliar o efeito da desnutrição durante o período crítico do desenvolvimento de sistemas fisiológicos e as repercussões na vida adulta (BAIRD et al, 2000; PASSOS et al, 2001; TOSCANO, 2004, FEITAS-SILVA, 2007). Por exemplo, em ratos, o fornecimento de dieta hipo-proteica (caseína 8%) durante a lactação induziu alterações morfológicas no coração dos filhotes aos 30 e 71 dias de vida (TOSCANO, 2004). Feitas-Silva (2007) verificou uma redução na excitabilidade reflexa ao desmame de ratos que foram submetidos à desnutrição neonatal (caseína a 8%).

No presente estudo, o ganho de peso corporal e a taxa de crescimento dos animais submetidos à desnutrição na lactação foram menores comparativamente aos seus controles normonutridos. Passos et al (2001), utilizando o mesmo modelo de desnutrição (caseína a 8%) durante a lactação, observou uma diminuição no peso corporal de ratos até os 40 dias de vida. Baird et al (2000) observaram uma redução no peso corporal de animais submetidos à desnutrição neonatal (caseína 8%) e também durante o período de recuperação nutricional (caseína a 17%). Silva-Freitas (2007) verificou que a desnutrição (caseína a 8%) na lactação induziu uma redução do peso a partir do 10º dia de vida. A utilização de outro modelo de desnutrição (dieta multideficiência, proteína a 7%) induziu redução do peso corporal durante a desnutrição e no período em que a dieta foi recuperada (dieta padrão de biotério, proteína a 20%)

(SOUZA, 2001; FERREIRA-E-SILVA, 2002; SILVA, 2006). Em humanos, observou-se que adolescentes que sofreram desnutrição no período da infância apresentam indicadores de crescimento somático comprometidos, como o peso e a altura, mas com a recuperação da dieta, tais parâmetros foram normalizados (SAIGAL et al, 2001). De fato, a desnutrição durante a lactação induzida por diminuição do conteúdo de proteína na dieta da mãe pode levar a alterações metabólicas periféricas no filhote (como no músculo esquelético e no tecido adiposo), de forma a manter tecidos nobres como o cérebro e o coração (OZANNE; HALES, 2002; LUMBERS; YU; GIBSON, 2001). O mecanismo subjacente pode estar relacionado a oxidação parcial de ácidos graxos resultando na formação de corpos cetônicos que podem atuar como combustível para o cérebro durante a escassez de nutrientes (DESAI; CROWTHER et al, 1995). Da mesma forma, a glicose pode ser metabolizada até lactato que pode ser utilizado pelo coração em estados de desnutrição ou jejum prolongado (LUCAS, BAKER et al, 1996). Assim, a disponibilidade de nutrientes para outros tecidos como o muscular-esquelético e o tecido adiposo pode ser comprometida e ocorrer uma redução de peso corporal.

A diminuição da taxa de crescimento e do ganho de peso corporal (percentual de peso adquirido em relação ao nascimento) dos filhotes de mães desnutridas contribuiu para a redução do peso corporal aos 22 dias de vida. O ganho de peso pode ser considerado um indicador da adaptação do organismo ao meio que está inserido (SAWAYA, MARTINS et al, 2004). Apesar do peso corporal dos animais desnutridos permanecer reduzido, o ganho de peso corporal no período de recuperação nutricional foi maior a partir do 31º dia de vida. Isso proporcionou uma diminuição da diferença de peso entre os grupos (controle e desnutrido) no período de recuperação nutricional (12,2%) em relação ao de lactação (48,56%). A desnutrição no período crítico de desenvolvimento otimiza a utilização de nutrientes para assegurar sua sobrevivência, se há um aumento na disponibilidade de nutrientes a seguir esse período crítico, o organismo

compensa o tempo de escassez, acelerando o aporte nutricional, fase chamada de *catch-up* do crescimento (HALES; BARKER, 1992). No presente estudo, a dieta nutricionalmente equilibrada apesar de não recuperar a deficiência de peso até os 60 dias de vida, possivelmente o normalizaria com o decorrer do tempo, visto que, a diferença de peso entre os grupos (controle e desnutrido) vinha diminuindo progressivamente.

As características morfométricas da laringe são bem conhecidas em humanos (PAES, 2002; BRASIL; YAMASAKI; LEÃO, 2005; XIMENES FILHO et al, 2003), porém em animais experimentais esses dados são escassos durante o período de desenvolvimento.

Em ratos normonutridos, de acordo com os nossos dados, as dimensões verticais (epiglote - cricóide e tireóide – cricóide) apresentaram-se maiores que a dimensão horizontal (antero – posterior), indicando que a laringe é um órgão maior em seu eixo vertical, que no eixo horizontal (medida antero – posterior) aos 22 dias. Aos 60 dias, todas as dimensões aumentaram, representando um crescimento estrutural nesse período (41,9% epiglote – cricóide, 36,4% tireóide – cricóide, 32,2% látero – lateral, 49,2% ântero – posterior). Os animais submetidos à desnutrição neonatal apresentaram similaridade aos normonutridos quanto às dimensões verticais (crescimento de 41,4% epiglote-cricóide e 39,8% tireóide – cricóide). Os movimentos verticais da laringe (elevação e anteriorização) são os principais mantenedores da deglutição (ZEMPLIN, 2000; BEHLAU, 2001; LE HUCHE; ALLALI, 2005). Souza (2001) observou que animais desnutridos (dieta regional básica durante a lactação) apresentaram um aumento no tempo de sucção de leite da mãe e isso induziu hiperfagia após o 20º dia de vida. Assim, essa hiperfagia pode ter sido um mecanismo compensador para os animais desnutridos, de forma a consumir maior quantidade de leite, e as estruturas mantenedoras da função da deglutição certamente se adequaram ao comportamento alimentar.

As dimensões horizontais (ântero – posterior e látero – lateral) estão intimamente relacionadas à fonação, visto que, as pregas vocais possuem origem no ângulo da cartilagem tireóide e inserção no processo vocal das cartilagens aritenóides homólogas, que têm sua base fixada na cartilagem cricóide (GREENE, 1955). Aos 22 dias, os animais submetidos à desnutrição apresentaram redução nas dimensões horizontais da laringe (látero-lateral e antero-posterior). Aos 60 dias de vida, tais dimensões foram normalizadas devido ao aumento percentual das estruturas da laringe (52,6% látero - lateral e 82,0% antero-posterior) em relação ao controle (32,2% látero – lateral e 49,2% antero – posterior). Isso demonstrou que a redução estrutural na laringe vista no período de escassez de nutrientes foi compensada via crescimento acelerado no período de recuperação nutricional. Tais resultados em curto prazo foram igualmente observados em prévios estudos relativamente a outros órgãos como intestino delgado, coração e esôfago (AMORIM, 1984; TOSCANO, 2004; SILVA et al, 2006). Esses órgãos possuem músculo em sua estrutura, assim como a laringe (ZEMPLIM, 2000). O tecido muscular sofre influência da desnutrição acarreta diminuição da força muscular, alterações irreversíveis no desenvolvimento do tecido muscular (BARROS et al, 2004). A partir dos nossos resultados com animais, pode-se inferir que as estruturas necessárias para a manutenção da função laríngea primordial para a sobrevivência, deglutição (medidas verticais), foram privilegiadas em relação à fonação (medidas horizontais).

De acordo com a análise histológica da laringe, os ratos normonutridos e desnutridos apresentam semelhança quanto às estruturas previamente já descritas em outros estudos com roedores (GORTI et al, 1999; SANTOS et al, 2003; MARCELINO e OLIVEIRA, 2005; PADOVANI JUNIOR et al, 2005; RAMOS et al, 2005; DUARTE, et al, 2006). Entretanto, o epitélio da supraglote dos animais aos 22 e 60 dias que foram submetidos à desnutrição neonatal apresentou queratinização. A queratina, proteína fibrosa produzida pelos queratinócitos,

proporciona proteção contra abrasão (BLOWW; FAWCETT, 1975). Quando ocorre queratinização de estruturas significa que o atrito que atinge o epitélio descama os queratinócitos superficiais, fazendo-se necessária a renovação destas células (BLOWW; FAWCETT, 1975). Os queratinócitos das camadas superficiais produzem filamentos de queratina, que se acumulam no seu interior até provocar a morte celular (células queratinizadas), que se desprendem como resíduo inerte e laminar de uma célula (BLOWW; FAWCETT, 1975). A supraglote é uma região que está em contato com a epiglote durante a deglutição gerando atritos no epitélio dessas estruturas no momento da deglutição (COSTA, 1987). Logo a supraglote submetida ao atrito desenvolve queratina a fim de aumentar a resistência do epitélio e diminuir a troca de substâncias entre o meio externo e o epitélio, através da morte celular. Esse acontecimento na supraglote possivelmente diminui o fluido na luz laríngea, necessário para a lubrificação para a vibração das pregas vocais e a retirada de substâncias nocivas através da onda mucosa gerada pelos cílios das células epiteliais. A deglutição em animais desnutridos, no período neonatal pela dieta regional básica, aumenta o tempo de sucção e leva a hiperfagia (SOUZA, 2002). Possivelmente, o maior número de deglutições em animais desnutridos provocou maior atrito na supraglote (COSTA, 1987; SOUZA, 2002). Estudos são necessários para a avaliação dos efeitos da queratinização sobre a função laríngea.

Os animais controle apresentaram a mucosa e os limites das camadas da lâmina própria da prega vocal definidas. As células epiteliais da mucosa e o seu núcleo apresentaram estrutura mais delgada, seguido pelas camadas superficial e profunda, as quais possuem dimensões semelhantes. A camada intermediária da lâmina própria é a mais espessa. Essas estruturas parecem apresentar dimensões definidas no período neonatal, pois, aos 60 dias não é notado grandes diferenças de espessura, exceto um crescimento da camada intermediária. Relativamente ao crescimento de espessura da prega vocal nesse período em animais ainda não há estudos. Aos 22 dias de vida, os

animais desnutridos apresentaram semelhança ao controle, quanto às dimensões da prega vocal. Já aos 60 dias de idade, os animais submetidos à desnutrição apresentaram alteração na estrutura microscópica das pregas vocais, compreendendo a espessura da mucosa, o diâmetro do núcleo do epitélio e a dimensão da camada intermediária da lâmina própria da prega vocal.

Estudos relacionados à desnutrição neonatal e a mucosa da prega vocal não são conhecidos. Porém, sabe-se sobre os efeitos da desnutrição sobre a mucosa de outros órgãos. Animais desnutridos no período neonatal (DBR) apresentaram redução na dimensão das camadas do esôfago aos 22 e 71 dias de vida (SILVA, 2006). Neste estudo, a desnutrição neonatal interferiu no desenvolvimento da mucosa das pregas vocais, reduzindo sua espessura aos 60 dias de vida.

Os animais que foram submetidos à desnutrição neonatal, apresentaram alteração na dimensão da camada intermediária da lâmina própria da prega vocal, aos 60 dias de idade. As camadas da lâmina própria da prega vocal humana possuem fibras elásticas em sua estrutura, sendo observadas fibras do tipo *elaunin* e *oxytalan*, em diferentes proporções (HAMMOND et al, 1997). Na camada intermediária da lâmina própria da prega vocal, diferentemente das outras camadas, as fibras elásticas do tipo *elaunin* são abundantes (HAMMOND et al, 1997). Uma vez que a composição diferencial entre as fibras elásticas e colágenas, ocorre até o adulto jovem (YAMASHITA, 1997; HARTNICK; REHBAR; PRASAD, 2005) é possível que a redução na dimensão da camada intermediária da lâmina própria da prega vocal e o aumento da quantidade de fibras de *elaunin* estejam relacionados ao aporte de nutrientes no período neonatal.

Assim, o presente estudo demonstrou que a desnutrição neonatal modificou as macro e micro estruturas da laringe de animais, mesmo após a recuperação nutricional. A macro estrutura sofre os efeitos imediatos da restrição nutricional diminuindo as dimensões horizontais da laringe com recuperação a longo-prazo. A micro estrutura sofre efeitos tanto a curto como em longo

prazo. Em curto-prazo o epitélio da supraglote apresenta queratinização que segue até os 60 dias. Em longo prazo, o epitélio da prega vocal é reduzido, assim como, o diâmetro de seus núcleos e o comprimento da camada intermediária. Isto sugere que este período parece ser crítico na determinação do padrão adulto desta resposta. Contudo, estudos que associem as alterações macro e micro estruturais na laringe e órgãos co-relatos com suas respectivas funções são necessários.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

A desnutrição neonatal modifica a evolução ponderal dos animais, reduzindo o peso absoluto, o ganho de peso corporal e a taxa de crescimento no período neonatal. Como efeito da desnutrição neonatal pode ser evidenciado o *catch-up* do crescimento, aos 60 dias de vida, através do aumento do ganho de peso que normalizou taxa de crescimento e minimizou déficit de peso dos animais desnutridos apesar do peso absoluto permanecer reduzido.

As estruturas macroscópicas da laringe são sensíveis aos efeitos agudos, apenas a curto-prazo, da desnutrição neonatal. Esta reduz as dimensões horizontais relacionadas à fonação, poupando as medidas relacionadas à manutenção da sobrevivência, ou seja, as estruturas relacionadas aos movimentos necessários à deglutição.

A maturação de estruturas microscópicas da prega vocal é sensível à desnutrição neonatal. A curto-prazo, a desnutrição neonatal provoca a queratinização do epitélio da supraglote devido a provável necessidade de proteger o mesmo do atrito, permanecendo mesmo após a recuperação nutricional. A longo-prazo, a desnutrição neonatal parece ter influenciado no crescimento da laringe pois este órgão apresentou-se com comprimento do epitélio da prega vocal, diâmetro de seu núcleo e comprimento da camada intermediária da prega vocal reduzidos.

PERSPECTIVAS DE ESTUDO

9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO

- Acompanhar o ganho de peso e a taxa de crescimento dos animais por um período maior, até 150 dias de vida
- Avaliar a evolução de crescimento e desenvolvimento dos órgãos da fonação dos animais em intervalos de dias menores
- Comparar os estudos morfológicos do presente estudo com a análise funcional da laringe através da análise da emissão de sons pelos animais
- Avaliar a função e a morfologia da laringe de humanos, na infância e adolescência, relacionando com seu estado nutricional no período da lactação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. F.; SILVEIRA, A. C.; GUEDES, R. C.; HOKOÇO, J. N.; MARTINEZ, A. M. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. Nutr Neurosci, v. 8, p. 91-9, 2005.

AMORIM, C. S. C. Estudo morfológico da mucosa intestinal de ratos submetidos a desnutrição protéico-calórica experimental. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. 1984.

BAIRD, J.; OSMAND, C.; MacGREGOR, A.; SNIEDER, H.; HALES, C.N.; PHILLIPS, D.I.W. Testing the fetal hypotesis in twins: the Birmingham twin study. Diabetologia, n. 44, p. 33-39, 2001.

BARRETO-MEDEIROS, J.M.; CABRAL-FILHO, J. E.; DE SOUZA, S. L.; FREITAS-SILVA, S. R.; MENDES-DA-SILVA, C.; DEIRÓ, T. C.; MONTEIRO, J. M.; GUEDES, R. C.; DE-CASTRO, C. M.; MANHÃES- DE-CASTRO, R. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. Nutr Neurosci, v.5, n.3, p.211-4, 2002.

BARRETO-MEDEIROS, J. M.; FEITOZA, E. G.; MAGALHAES, K.; CABRAL-FILHO, J. E.; MANHAES-DE-CASTRO, F. M.; DE-CASTRO, C. M.; MANHAES-DE-CASTRO, R. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. Nutr Neurosci, v.7, n.1, p.49-52, 2004.

BARROS, K.M.F.T. Efeitos da desnutrição neonatal e/ou do tratamento com agonista 5-HT_{1A} sobre o desenvolvimento sensório-motor e atividade exploratória em ratos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição, 1999.

BARROS, KMFT; CANON, F; FREITAS-SILVA, SR; MANHAES-DE-CASTRO, R; GOUBEL, F Neonatal malnutrition: effects on contractile and elastic properties on rat soleus muscle. Archiv. Physiol. Biochem, v.112, p.154, 2004.

BARROS KM, MANHÃES-DE-CASTRO R, LOPES-DE-SOUZA S, MATOS RJ, DEIRÓ TC, CABRAL-FILHO JE, CANON F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. Nutr Neurosci, v.9, n.1-2, p.99-104, 2006.

BARKER, DJP; ERIKSSON, JG; OSMOND, C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. Intern. J. Epid., v.31, p.1235-1239, 2002.

BARKER, D. J. e OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet, v.1, n. 8489, p.1077-1081, 1986.

BARKER, D.J.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, M.E. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ, v. 298, n.6673, p. 564-567, 1989.

BATISTA-FILHO, M. Introdução à nutrição. In: FIGUEIRA, F.; FERREIRA, O. S.; ALVES, J. G. B. Pediatria: Instituto materno Infantil de Pernambuco (IMIP). 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI. c. 1, p. 65 – 68, 1996.

BEHLAU, M. Voz: O livro do especialista. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. v. 1.

BLOOW, W; FAWCETT, DW. Tratado de Histologia. 10ª ed. São Paulo: Interamericana. 1975.

BRASIL, O. O.; YAMASAKI, R.; LEÃO, S. H. Proposal of measurement of vertical larynx position at rest. Rev Bras Otorrinolaringol., v. 71, n. 3, p. 313-317, 2005.

CHEN, J.; TURIK, G.; GAILER. Effects of Prenatal Malnutrition on release of Monoamines from Hippocampal Slices. Life Sciences., v. 57, n. 16, p. 1467-1475, 1995.

CHUKWUMA, C. S. R. e TUOMILEHTO, J. The 'thrifty' hypotheses: clinical and epidemiological significance for non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease risk factors. J Cardiovasc Risk, v.5, n.1, p.11-23, 1998.

COSTA, A.; SILVESTRINI, R.; GRIGNOLIO, E.; CLEMENTE, C.; ATTILI, A.; TESTORI, A. Cell kinetics as a prognostic tool in patients with metastatic malignant melanoma of the skin. Cancer., v. 60, n. 11, p.2797-2800, 1987.

CRUZ, WP; DEDIVITIS, RA; SEMETILLI, A; RAPOPORT, A. Estudo histológico da cartilagem tireóidea. Rev. Bras. Otorrinol., v. 69, p. 734-738, 2003.

DA SILVA, V. A. JR; VIEIRA, A. C.; PINTO, C. F.; DE PAULA, T. A.; PALMA, M. B.; LINS AMORIM, M. J.; AMORIM, A. A. JR.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. Reprod Nutr Dev, v.46, n.2, p.157-66, 2006.

DESAI, M.; CROWTHER, N. J.; OZANNE, S. E.; LUCAS, A; HALES, C. N. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. Biochem Soc Trans, v.23, n.2, p.331-335, 1995.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. Amer J Dis Child, v. 120, p. 411-415, 1970.

DOBBING, J. E SANDS J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. Arch Fr Pediatr, v.42, n.3, p.199-203, 1985.

DUARTE, J. L.; FARIAS, F. A. C.; CEOLIN, D. S.; CESTARI, T. M.; ASSIS, G. F. Efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro sobre as pregas vocais de ratos. Rev. Bras Otorrinolaringol., v. 72, n. 2, p. 210-216, 2006.

ECKEL, H. E.; KOEBKE, J.; SITTEL, C.; SPRINZL, G. M.; POTOTSCHNIG, C.; STENNERT, E. Morphology of the human larynx during the first five years of life studied on whole organ serial sections. Ann Otol Rhinol Laryngol., v. 108, n. 3, p. 232-238, 1999.

ECKEL, H.E.; SPRINZL, G. M.; SITTEL, C.; KOEBKE, J.; DAMM, M.; STENNERT, E. Anatomy of the glottis and subglottis in the pediatric larynx. HNO, v. 48, n. 7, p. 501-507, 2000.

FERREIRA-E-SILVA, WT. Aspectos da resposta inflamatória em ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição no período de aleitamento. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição, 2002. 61 p.

FILHO, M. B. e RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. Cadernos de Saúde Pública, v.19, p.181-191, 2003.

FORSDAHL, A. e WAALER H. T. Height and weight of Norwegians during the late 1960's. Tidsskr Nor Laegeforen, v.96, n.4, p.215-219, 1976.

FREITAS-SILVA, SR. Desnutrição neonatal e desenvolvimento neuromuscular: avaliação da maturação da excitabilidade reflexa e da atividade locomotora em ratos. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição, 2007. 153p.

FRIEDRICH, G.; KAINZ, J.; FREIDL, W. Functional structure of the human vocal cord. Laryngorhinootologie, v. 72, n. 5, p.215-224, 1993.

GUYTON, A. C. E HALL, J. E. Fundamentos de Guyton – Tratado de Fisiologia Médica. 10ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2002.

GORTI, G. K.; BIRCHALL, M. A.; HAVERSON, K.; MACCHIARINI, P.; BAILEY, M. A preclinical model for laryngeal transplantation: anatomy and mucosal immunology of the porcine larynx. Transplantation, v. 68, n. 11, p.1638-1642, 1999.

GRANTHAM-MCGREGOR, S.; SCHOFIELD, W.; POWELL, C. Development of Severely Malnourished Children who received Psychosocial Stimulation: six-Year Follow-up. Pediatrics, v. 79, n. 2, p.247-254, 1987.

GREENE, E.C. Anatomy of the rats. New York: Hafner publishing, 1955.

HALES, C. N. Metabolic consequences of intrauterine growth retardation. Acta Paediatr. Suppl., v. 423, p.184-187, 1997.

HALES, C.N.; BARKER, D.J.; CLARK, P.M.; COX, L.J.; FALL, C.; OSMOND, C.; WINTER, P.D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. Bmj, v.303, n.6809, p.1019-22, 1991.

HALES, C. N. E BARKER D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia, v.35, n.7, Jul, p.595-601, 1992.

HAMMOND, T. H.; ZHOU, R.; HAMMOND, E. H.; PAWLAK, A.; GRAY, S. D. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. J Voice., v. 11, n. 1, p. 59-66, 1997.

HARRISON, D. F. N. The Anatomy and Physiology of the Mammalian. Nature, 1995.

HARTNICK, C.J.; REHBAR, R.; PRASAD, V. Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. Laryngoscope., v. 115, n. 1, p. 4-15, 2005.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10ª ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KUTTA, H.; STEVEN, P.; PAULSEN, F. Anatomical definition of the subglottic region. Cells Tissues Organs., v. 184, n. 3-4, p. 205-214, 2006.

LAW, C. M. Fetal and infant influences on non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). Diabet Med, v.13, n.9, Suppl 6, p.S49-52, 1996.

LE HUCHE, F.; ALLALI, A. Anatomia e fisiologia da Laringe. In: LE HUCHE, F.; ALLALI, A. A voz: Anatomia e Fisiologia dos órgãos da voz e da fala. São Paulo: ARTMED. c. 4, p.65-109, 2005.

LUMBERS, E. R.; YU, Z. Y.; GIBSON, K.J. The selfish brain and the barker hypothesis. Clin Exp Pharmacol Physiol., v.28, n.11, p.942-947, 2001.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. Ciba Found Symp, v.156, p.38-50, 1991.

LUCAS, A.; BAKER, B. A.; DESAI, M.; HALES, C. N. Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. Br J Nutr, v.76, n.4, p.605-612, 1996.

MAIER, H.; TISCH, M.; SCHNEEBERG, E.; BORN, A. An association of chronic alcohol consumption with morphological alterations of the laryngeal mucosa in rats. Eur Arch Otorhinolaryngol., v. 256, p.247-249, 1999.

MANHÃES-DE-CASTRO, R.; BARRETO-MEDEIROS, J. M.; MENDES-DA-SILVA, C.; FERREIRA, L. M.; GUEDES, R. C.; CABRAL-FILHO, J. E.; COSTA, J. A. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. Braz J Med Biol Res, v.34, n.1, p.121-4. 2001.

MARCELINO, F.C.; OLIVEIRA, D.T. Histopatological changes of vocal folds induced by chronic pollutant exposure: An experimental study. J. Voice., v. 19, p. 529- 533, 2005.

MEDEIROS, J. M.; SILVA, C. M.; SOUGEY, E. B.; COSTA, J. A.; CASTRO, C. M.; CASTRO, R. M. Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. Arq Neuropsiquiatr. v. 59 (3-A), p.499-503, 2001.

MENDES-DA-SILVA, C.; DE SOUZA, S. L.; BARRETO-MEDEIROS, J. M.; DE FREITAS-SILVA, S. R.; ANTUNES, D. E.; CUNHA, A. D.; RIBAS, V. R.; DE FRANÇA, M. F.; NOGUEIRA, M. I.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. Arq Neuropsiquiatr, v.60, n.4, p.928-31, 2002.

MOORE, K. L. e PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

NERY, F. G.; TEIXEIRA-JR, A. L.; MIRANDA, G. V.; DAKERB; M. V. Anorexia nervosa e gravidez: relato de caso. Rev Bras Psiquiatr, v. 24, n. 4, p.186-188, 2002.

NETTER, F. H. Atlas Interativo de Anatomia Humana. Rio de Janeiro: Artes Médicas. 1999.

OZANNE, S.E. e HALES, C.N. Early programming of glucose-insulin metabolism. Trends Endocrinol Metab, v. 13, n. 9, p. 368-373, 2002.

PADOVANI JUNIOR, JA; AZOUBEL, R; MARTINS, AT; *et al*. Value of Morfometry in the prognosis of laringela neoplasms. Int. J. Morphol., v.23, p. 275-278, 2005.

PAES, M. C. N. M. Mensuração da Altura da Laringe e das Pregas vocais Membranosas do Adulto e do Senescente: um estudo comparativo. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Patologia, 2002.

PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F.; TEIXEIRA, C. V.; MOURA, E. G. Comportamento alimentar de ratos adultos submetidos à restrição protéica cujas mães sofreram desnutrição durante a lactação. Rev. Nutr., v. 14 (suplemento), p. 7-11, 2001.

PAZ, ST. et al. Redução no tempo de processamento de pequenas biópsias para inclusão em parafina. In: XII Congresso Brasileiro de Histotecnologia - III Jornada do Mercosul de Histotecnologia. Salvador-BA, v.1, p.20, 2001.

PETRY, C. J.; OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Programming of intermediary metabolism. Mol Cell Endocrinol. v. 20, n. 185, p.81-91, 2001.

PHILLIPS, D. I.W. Fetal growth and programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 28, p. 967-970, 2001.

PONNAPPA, B. C. e RUBIN, E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. Alcohol Res Health, v.24, n.2, p.93-104, 2000.

RAMOS, H. V. L.; SIMÕES; M. J.; PONTES, P. A. L.; NEVES, L. R.; BARBOSA, L. H. F.; DE BIASE, N. G.; OSHIMA, C. T. S. Imunohistoquímica como método de estudo das fibras elásticas em prega vocal humana. Rev Bras Otorrinolaringol, v. 71, n. 4, p.486-491, 2005.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 Diets as improvements in the AIN-76A diet. American Society for Nutritional Sciences. Symposium: Animal diets for nutritional and toxicological research., p. 838S-841S, 1997.

ROCINHOLI, LF; OLIVEIRA, LM; COLAFEMINA, JF. Malnutrition and environmental stimulation in rats: interpeak intervals of the brainstem auditory evoked potentials. Nutr Neurosci., v.4, p. 189-198, 2001a.

ROCINHOLI, LF; OLIVEIRA, LM; COLAFEMINA, JF. Malnutrition and environmental stimulation in rats: wave latencies of the brainstem auditory evoked potentials. Nutr Neurosci., v.4, p.199-212, 2001b.

RODMAN, J. R.; GOSSELIN, P. J.; HORVATH, D. M.; FARKAS, G. A. Diaphragm plasticity following intrinsic laryngeal muscle denervation in rats. Med. Sci. Sports Exerc., v. 34, p. 251-257, 2002.

SAIGAL, S.; STOSKOPF, B. L.; STREINER, D. L.; BURROWS, E. Physical Growth and Current Health Status of Infants Who Were of Extremely Low Birth Weight and Controls at Adolescence. Pediatrics., v. 108, p. 407-415, 2001.

SANTOS, F. C. C.; GRELLET, M.; JUNIOR, A. R.; JAMUR, M. C.; PINTO, J. A.; FOMIN, D. S. Estudo comparativo histológico da prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser de CO₂ em modelo animal. Rev. Bras Otorrinolaringol. v. 6: 753-759, 2003.

SAWAYA, A. L.; MARTINS, P. A.; GRILLO, L. P.; FLORÊNCIO, T.T. Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. Nutr Rev. v.62, n.7, p.S127-133, 2004.

SILVA, HJ; CUNHA, DA. Considerações sobre o uso do paquímetro em motricidade oral. Rev. Fonoaudiol. Bras., v. 2, p. 59-64, 2003.

SILVA, HJ; MARINHO, SMO; SILVA, AETM; ALBUQUERQUE, CG; MORAES, SRA; MANHÃES DE CASTRO, R. Protocol os mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar Rats. Int. J. Morphol. v. 23, p. 227-230, 2005.

SILVA, H. J. Manipulação neonatal e da recaptção de serotonina em ratos: 1- Estabelecimento de protocolo para estudo murinométrico e validação, 2- Repercussões sobre a morfologia e a morfometria das tûnicas musculares do esôfago e sobre o consumo alimentar. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição, 2006.

SMART, J. L. Under nutrition during early life and its effects on animal development and behaviour. Neuropharmacology, v.20, n.12b, p.1251-2, 1981.

SOUZA, LS. Ontogênese do comportamento alimentar em ratos e sua relação com a desnutrição. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição, 2001.

SOUZA, S. L.; NOGUEIRA, M. I.; DEIRO, T. C. B. J.; CASTRO, F. M.; SILVA, C. M.; SILVA, M. C.; LIRA, L. O.; AZMITIA, E. C.; CASTRO, R. M. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. Physiol Behav, v. 82, n. 2-3, p. 375-379, 2004.

STEWART, R. J.; SHEPPARD, H.; PREECE, R.; WATERLOW, J.C. The effect of rehabilitation at different stages of development of rats marginally malnourished for ten to twelve generations. Br J Nutr. v. 43, n. 3, p.403-412, 1980.

TOSCANO, AE. Desnutrição e manipulação serotoninérgica neonatais: repercussões sobre o desenvolvimento da morfologia cardíaca. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição, 2004.

XIMENES FILHO, J. A.; MELO, E. C. M.; CARNEIRO, C. G.; TSUJI, T. H.; SENNES, L. U. Correlação entre altura e dimensões das pregas vocais. Rev. Bras. Otorrinolaringol. v. 69, p. 371-374, 2003.

WIDDOWSON, E. M.; MCCANCE, R. A. A review: new thoughts on growth. Pediatr Res. v. 9, n. 3, p.154-156, 1975.

YAMASHITA, K. Age-related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal folds--scanning electron microscopic examination with digestion method. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho, 1997. v. 100, n. 5, p. 499-511.

ZANIN, STM; MOLINARI, SL; SANT'ANA, DMG; DE MIRANDA NETO, M. H. NADH-diaphorase positive neurons of the jejunum of disnurtured adult rats (*Rattus norvegicus*): quantitative aspects. Arq. Neuro-Psiquiatr., v.61, p.650-653, 2003.

ZEMPLIN, W.R. Princípios de anatomia e fisiologia em Fonoaudiologia. 4ª ed. Porto Alegre: ARTMED. 2000.

ANEXOS



ANEXO 1

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 18/07

Recife, 20 de abril de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Iracema Hermes Pires de Melo**
Departamento de Patologia/Mestrado - UFPE
Processo nº 018527/2006-14

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **“Desnutrição neonatal: estudo das repercussões na morfologia da laringe de ratos em diferentes idades”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

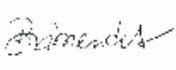
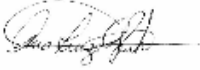
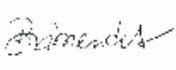
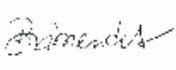
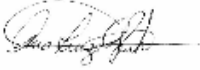

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEA



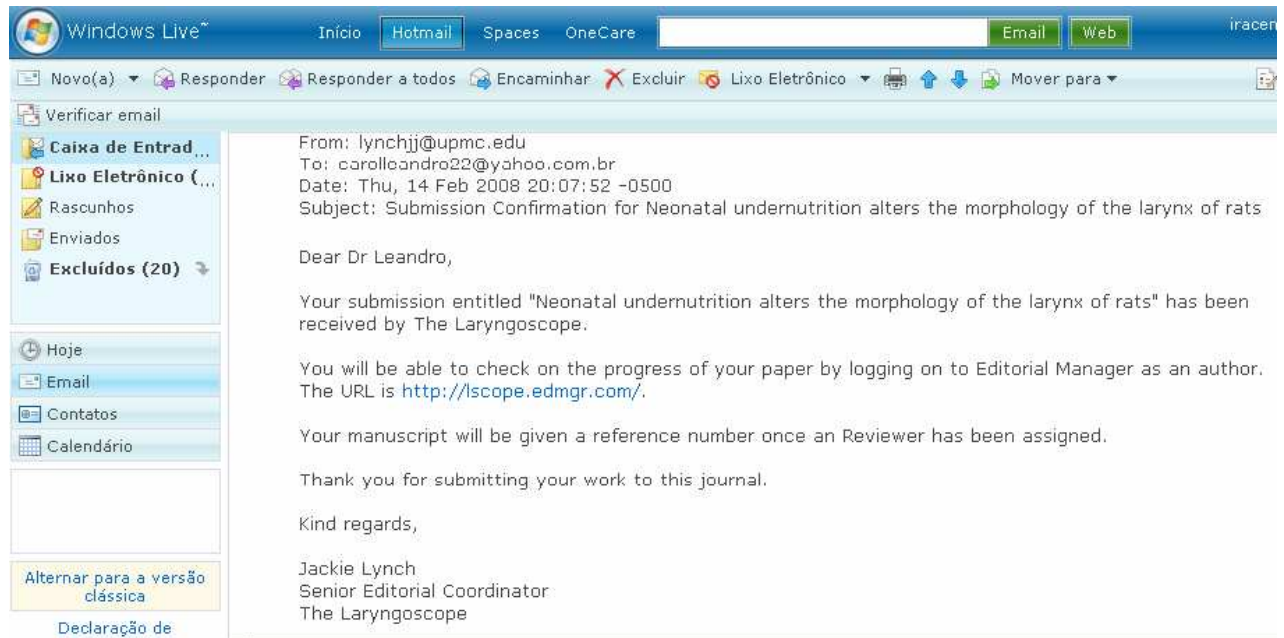
ANEXO 2



ANEXO 3

 15^o Congresso Brasileiro de Fonoaudiologia 7^o Congresso Internacional de Fonoaudiologia	 Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia SBFa		
GRAMADO - RS - BRASIL - 16 A 20 DE OUTUBRO DE 2007			
CERTIFICADO	Certificamos que o trabalho intitulado DIMENSÕES DA LARINGE DE RATOS APÓS DESNUTRIÇÃO NEONATAL, dos autores Hilton Justino da Silva (FIR - FACULDADE INTEGRADA DO RECIFE), Iracema Hermes Pires de Melo (UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - MESTRADO EM PATOLOGIA), Lívia M. S. Luz (UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO), Flávia K. W. Reis (UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO), Sandra Lopes (UFPE - UNIVERSIDADE), foi apresentado como tema livre no 15o. Congresso Brasileiro de Fonoaudiologia e 7o. Congresso Internacional de Fonoaudiologia, realizado no período de 16 a 20 de outubro de 2007.		
	Gramado, 21 de outubro de 2007 <table border="0"><tr><td data-bbox="544 1108 778 1232"> Fernanda Dreux Miranda Fernandes Presidente </td><td data-bbox="863 1108 1098 1232"> Beatriz de Castro Andrade Mendes Diretora Científica </td><td data-bbox="1198 1108 1433 1232"> Ana Luiza Gomes Pinto Navas Diretora Científica </td></tr></table>	 Fernanda Dreux Miranda Fernandes Presidente	 Beatriz de Castro Andrade Mendes Diretora Científica
 Fernanda Dreux Miranda Fernandes Presidente	 Beatriz de Castro Andrade Mendes Diretora Científica	 Ana Luiza Gomes Pinto Navas Diretora Científica	

ANEXO 4



ANEXO 5

Title: Neonatal undernutrition alters the morphology of the larynx of rats

Name of Authors:

Iracema Hermes Pires de Melo ¹

Flávia Wanderley dos Reis ²

Lívia da Silva Luz ²

Silvania Tavares Paz³

Hilton Justino da Silva ⁴

Sandra Lopes de Souza ⁵

Carol Góis Leandro ⁶

¹ Doctoral student. Department of Pathology, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

² Undergraduate student. Department of Language, Speech Therapy and Audiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Technique in histology. Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Brazil.

⁴ Doctor. Department of Language, Speech Therapy and Audiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁵ Ph.D. Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁶ Ph.D. Department of Nutrition, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

This study was done at the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil under supervision of Dr. Carol Leandro (Department of Nutrition).

Running title: Nutritional *programming* of the larynx

Source of financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes/Brazil

Address for correspondence:

Carol Góis Leandro

Rua Prof Moraes Rego, 1235 – CEP: 50670-901 – Departamento de Nutrição - Cidade Universitária - Recife, PE – Brasil.

Telefone: (81) 21268463. Fax: (81) 21268473

E-mail: carolleandro22@yahoo.com.br

Abstract

OBJECTIVES/HYPOTHESIS: To investigate the short and long-term effects of a low protein diet during lactation on the morphology of the larynx. Our hypothesis is that neonatal low-protein diet during the critical period of development alters the micro and macroscopic structure of the larynx in adult rats. **METHODS:** Male Wistar rats were divided either control (casein 17%, n=24) or undernourished (casein 8%, n=24) during lactation. Animals were killed at 22 or 60 days old. Gain of body weight and the growth rate were calculated throughout the experiment. Larynx was removed and its cartilages (epiglottis-cricoid, thyroid-cricoid, antero-posterior, and latero-lateral) were measured. Supraglottis, glottis e infraglottis, and vocal cords were stained by hematoxylin-eosin and their structure were described by a Scion Image, Beta 4.0.2 program. **RESULTS:** Pups from undernourished mothers showed a lower gain of body weight, and latero-lateral and anterior-posterior length of larynx than control only at 22 days old. There were no differences in the structure of supraglottis, glottis, and infraglottis between groups except for the keratinization in undernourished pups. Vocal cords were altered only at 60 days old. **CONCLUSIONS:** Nutrient demand in neonatal period act as the determinant for the higher gain of body weight in the period of adolescence. As well, macroscopic structures of larynx are sensible to acute effect of undernutrition, but not a long-term. Unlikely, microscopic structures of vocal cords are sensible for the effects of undernutrition in the critical period of development.

KEY-WORDS: Critical period of development, programming, neonatal undernutrition, organs for phonation, vocal cords

Introduction

In human, the lower respiratory system begins its development during the fourth week of gestation as an outgrowth of the ventral wall of the respiratory diverticulum. Epithelial lining of the larynx rises from the endodermal lining of the respiratory diverticulum¹. The cartilaginous (thyroid, cricoid, and arytenoid cartilages) and muscular components of the larynx are derived from the mesoderm of the fourth and sixth branchial arches¹. The larynx produces sounds via vocal cords and prevents the passage of food and other foreign particles into the lower respiratory tracts¹.

During fetal and postnatal development, the immature organism undergoes remarkable changes in its organization such as, cell differentiation and proliferation². There is now substantial evidence indicating that nutritional deficits occurring during the embryogenesis of physiological systems (critical period of development) can expose at long-term the function of these systems³⁻⁵. *Programming* is the term used to explain the events operating at a critical or susceptible period of development and the lasting consequences in the structure or function of the organism⁶. Our previous studies using rats demonstrate that postnatal undernutrition (multi-deficient diet with 7% of protein) may influence brain growth spurt, feeding behavior, ontogeny of reflexes and locomotor activity in adult rats^{4,5,7}. For some outcomes, the direction of response may depend on timing (pregnancy or lactation) of the programming stimulus. Life-time effects on body size were seen only in relation to postnatal undernutrition (multi-deficient diet during lactation) and animals fed by mothers fed a low protein diet during lactation were permanently smaller⁴.

It has been mainly investigated associations between neonatal undernutrition and metabolic disease in adult life, and little attention has been directed to organs of the speech. It seems that the embryogenesis of the larynx is sensible to environmental insults as undernutrition. Previous studies have used rats as experimental model to describe the morphology of larynx^{8,9}. Tetea et al⁹ have shown that rats vitamin A-deficient embryos at 18.5 days of life demonstrated laryngotracheal cartilage malformation, incomplete separation of the glottis, and/or larynoesophageal clefts. However, the long-term effects of undernutrition during the critical period of life on the morphology and physiology of the larynx is still scarce.

Thus, in the present study, we concern the question to the short and long-term effects of a low protein diet during lactation on the morphology of the larynx. Our hypothesis is that neonatal low-protein diet during the critical period of development alters the micro and macroscopic structure of the larynx in adult rats.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil. The rats were maintained at a room temperature of 23 ± 1°C and in a light–dark cycle (light 6:00 a.m. - 6:00 p.m.). During the suckling period, the offspring were kept in groups of six pups, randomly assigned to each mother. Offspring were distributed into two nutritional groups according to their mother's diet during lactation: a well-nourished group (control, C, n=24) fed by mothers receiving a 17% protein (casein) diet and a low-protein group (LP, n=24), fed by mothers receiving an 8% protein (casein) diet. After weaning (on the 22th day of age), half of animals of each group were killed. The other offsprings were kept in the collective cage and received animals' standard laboratory chow (52%

carbohydrate, 21% protein, and 4% lipids - Nuvilab CR1-Nuvital®). At the 60th day after birth, offspring were killed. Body weight was daily recorded. The measurements of the larynx and the morphological features were analyzed in the animals at 22 and 60 days old. The experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the Center of Health Science, Federal University of Pernambuco, and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Offsprings body weight

The body weight of pups was daily recorded throughout the experiment by Marte Scale, AS-1000, approach at 0.01 g. Gain of body weight was calculated by: $\% \text{ Gain} = \frac{\text{body weight} - \text{birthweight}}{\text{birthweight}} \times 100$.

Larynx histological preparation

On the day 22 or 60, animals at either 22 or 60 days old were anesthetized with ketamine (0.25 mL/100g body weight) and xylazine (0.25 mL/100g body weight) mixture injected into the triceps brachii muscle of the forelimb. Larynx was removed, and dissected. Macroscopic measurement of external surfaces of the larynx was performed by a digital caliper (0.01 mm accuracy). In order to control the evaluations of the dimensions of larynx, anatomical points were identified as follow: epiglottis-cricoid, thyroid-cricoid, latero-lateral and anterior-posterior. After dissection, larynx was cut (Microtome Leica, RM 2125RT, USA) in coronal sections (5 μm thick), placed on slides coated with 3-triethoxysilylpropylamine (Sigma, St Louis, Missouri, USA), and fixed with 1% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at 37°C overnight. Slides were washed in graded series of xylene and ethanol. The slides were stained with haematoxylin-eosine for 15 seconds, dehydrated with increasing concentrations of ethanol and xylene, and mounted. Larynx areas and staining intensities of individual histological area

were analyzed by Olympus BX41, Brazil ($\times 400$). Histological slides were analyzed using computerized image analysis ATI-TV Player, 6.3. At least three cuts per supraglottis, glottis and infraglottis were analyzed for six animals per group within larynx in consistent regions of the tissue sections to obtain representative samples of the cell type population.

For morphometrical analysis, larynx and vocal cords were analyzed (10–15 microscope fields of each type; magnification, $\times 40$; $\times 10$, in a continuous fashion). Only appropriate areas fulfilling the morphological criteria were analyzed and no other selection was done. Almost all structures in the surrounding larynx were analyzed and no selection was performed. Variation between blocks and areas of large sections occurred; vascular structures were classified according to the structure of the associated epithelium.

Based on visual inspection of the reacted sections on the optical microscope ($\times 40$), the stained structures of the larynx were classified according to their presence (+): +++++ (100-90% of presence), ++++ (70-90% of presence), +++ (50-70% of presence), ++ (40-50% of presence), and +(0-40% of presence). Vocal folds were submitted to the same histological procedure analysis ($\times 10$) for the measurement of layer cells and the diameter of the nucleus of the epithelial cell ($\times 40$).

Statistical Analysis

The results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). Comparisons between control and low-protein groups were performed using t-test student. Among groups at different ages, it was used initially two-way ANOVA followed by Bufferroni's *post hoc* test with a significance level of 0.05.

Results

The birthweight of animals was similar between groups (control = 7.29 ± 0.56 ; low-protein = 6.69 ± 0.5 , $p > 0.05$). Gain of body weight was seen in animals of both groups, however, offsprings from mothers fed by a low protein diet showed a lower gain of body weight than control (Figure 1A). Similarly, low-protein group showed a lower growth rate during the period of lactation (control = 2.6 ± 1.1 ; LP = 1.1 ± 0.5 , $p < 0.05$). During the period of adolescence (22-60 days of life), when both groups received animals' standard laboratory chow, rats from the LP group showed a recovery of gain of body weight, and it was seen an higher values at 59th when compared to control (Figure 1B). LP rats showed the same growth rate than control (control = 5.04 ± 1.1 ; LP = 5.5 ± 1.2 , $p > 0.05$).

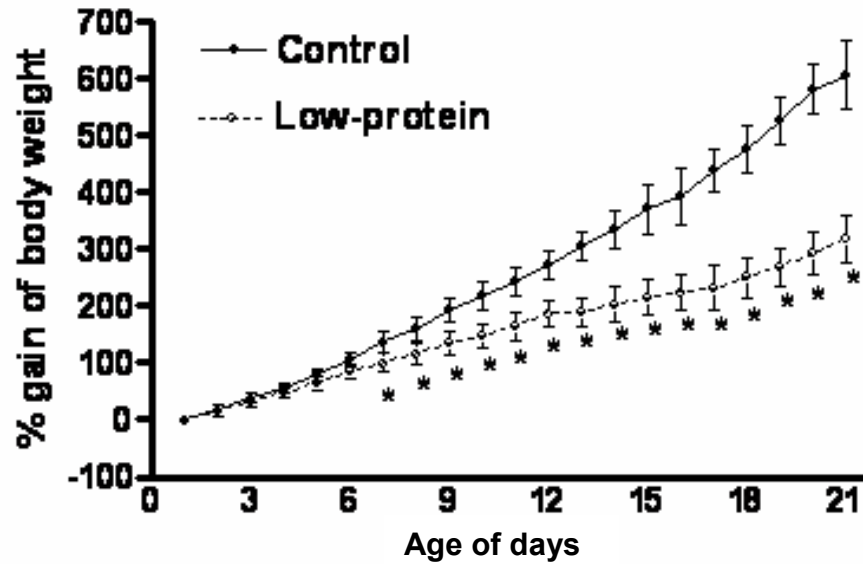
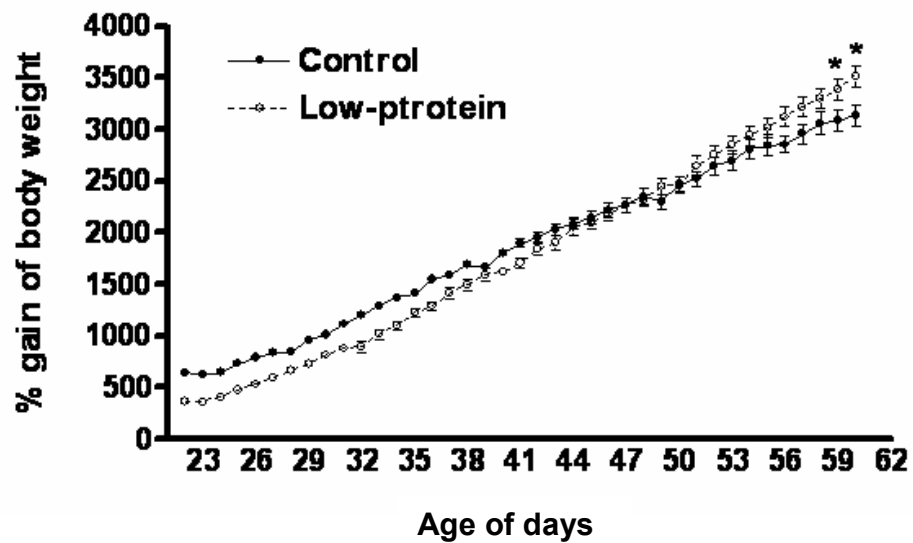
A**B**

Figure 1: Gain of body weight of animals at 22 days (A) and 60 days old (B) from mothers fed by a low-protein diet (LP, casein 8%) and normoproteic diet (control, casein 17%) during lactation.

In terms of macroscopic dimensions of the larynx, pups at 22 days old which were submitted to a low-protein diet during lactation showed a lower latero-lateral and anterior-posterior length of larynx than control. At 60 days old, there was no difference between groups (Table 1).

Table 1. Macroscopic dimensions of the larynx of pups at 22 and 60 days old from mothers fed by a low-protein diet (LP, casein 8%) and normoproteic diet (control, casein 17%) during lactation.

	22 days old		60 days old	
	Control	LP	Control	LP
Epiglottis-cricoid (mm)	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.5	6.4 ± 0.3	6.2 ± 0.3
Thyroid-cricoid (mm)	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.5	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.3
Latero-lateral (mm)	4.5 ± 0.3	3.9 ± 0.2 *	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.4
Anterior-posterior (mm)	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.2 *	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.2

*p < 0.05 vs control. LP = Low-protein

In the qualitative analysis of supraglottis, glottis, and infraglottis, there were no differences between groups except for the keratinization process seen in pups from mothers submitted to a low-protein diet (Table 2).

Table 2: Qualitative analysis of histological characteristics of supraglottis, glottis, and infraglottis of the larynx of pups at 22 and 60 days old from mothers fed by a low-protein diet (LP, casein 8%) and normoproteic diet (control, casein 17%) during lactation.

	22 days old		60 days old	
	Control	LP	Control	LP
<i>Supraglottis</i>				
Stratified Pavement Epithelium	+++++	+++++	+++++	+++++
Keratinization	+++	++++	++	++++
Blood Vessels	+++++	+++++	+++++	+++++
Lymphatic Cells	+++++	+++++	+++++	+++++
Glands	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Glottis</i>				
Stratified Pavement Epithelium	+++++	++++	+++++	+++++
Blood Vessels	+++	+++	++++	++++
Lymphatic Cells	+++++	+++++	+++++	+++++
Glands	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Infraglottis</i>				
Ciliated Cylindrical Pseudostratified epithelium	+++++	+++++	+++++	+++++
Blood Vessels	+++++	+++++	+++++	+++++
Lymphatic Cells	+++++	+++++	+++++	+++++
Glands	++	++	++	++

+ presence of structures.

+++++ (100 - 90%), ++++ (70 - 90%), +++ (50 - 70%), ++ (40 - 50%), + (0 - 4 0%)

Pups from mothers submitted to a low-protein diet showed a lower dimensions of the microscopic structures of vocal folds at 60 days old (Table 3).

Table 3: Dimensions of the microscopic structures of vocal folds of the larynx of pups at 22 and 60 days old from mothers fed by a low-protein diet (LP, casein 8%) and normoproteic diet (control, casein 17%) during lactation.

	22 days old		60 days old	
	Control	LP	Control	LP
Epithelium (μm)	20.3 $\pm$ 3.1	13.5 $\pm$ 3.3	22.3 $\pm$ 7.7	12.8 $\pm$ 2.9*
Diameter of the nucleus (μm)	1.5 $\pm$ 0.3	1.45 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.37*
Superficial layers (μm)	35.8 $\pm$ 5.9	51.2 $\pm$ 18.4	38.3 $\pm$ 5.9	39.2 $\pm$ 8.9
Intermediate layers (μm)	90.2 $\pm$ 31.1	72.5 $\pm$ 7.9	138.1 $\pm$ 30.9	100.1 $\pm$ 15.5*
Deeper layers (μm)	35.8 $\pm$ 11.2	37.6 $\pm$ 13.7	40.6 $\pm$ 4.9	40.8 $\pm$ 8.6

*p < 0.05 vs control. LP = Low-protein

Discussion

Nutritional insults are one of the most studied *programming* factors acting in the critical period of development ⁶. Depending on the period and duration of the insult, over gestation or lactation, there are different repercussions in adult life. In the present study, animals were submitted to undernutrition during lactation period, which seems to be the most crucial period in mammals to the establishment of *programming* ¹⁰. Our primary focus was to describe the acute effects (at weaning) of neonatal low-protein diet-induced changes and long-term effects (at adolescence) on the gain of body weight. The immediate metabolic response to undernutrition is the catabolism, where the own substrates of the organism is provided as search of energy, moreover, prolonged undernutrition leads to a slowing in growth rate ^{5,11,12}. In the present study, it was observed that animals from undernourished mothers showed a reduced gain of body weight throughout the experiment. In experimental animals, neonatal undernutrition leads to a lower mother's nutrient stores, transport and transfer of nutrients to the offsprings which is associated with reduced postnatal growth ⁴. It's interesting to note that pups' ability to maintain growth during a period of undernutrition depends on its previous maternal environment, more rapidly growing pups with a high demand for nutrients being less able to sustain growth. In addition, slowing of growth in the critical period of development may lead to disproportion in organ size since organs and tissues are growing rapidly ³. For example, neonatal

undernutrition may lead to reduced growth of the skeletal muscles which is developing rapidly at that time¹³. Reduced replication of muscle cells may permanently reduce cell numbers¹³. However, the body weight effects produced by undernutrition are reversible if adequate feeding is instituted to organism. In fact, in the present study, gain of body weight of undernourished animals enhanced in the beginning of adolescence (59th days of life) when compared to control. Thus, considerable "catch up" has occurred, and studies considering a longer time to adult age had shown a similar outcome in body weight^{4,5}. It would appear, therefore, that the preweaning period in the rat is a critical period not only from the standpoint of the body weight effects produced by undernutrition but also from the standpoint of the possibility for those effects to be reversed.

The second focus was to describe the macro and microscope structures of the larynx of undernourished rats at a short and long-term. At 22 days old, vertical dimensions (epiglottis-cricoid and thyroid-cricoid) did not alter while horizontal dimensions (antero-posterior and latero-lateral) showed a decrease in undernourished pups. Vertical movements of the larynx (elevation and anteriorization) are the main maintainers of food ingestion¹. In our previous study, animals submitted to a multideficient diet on period of lactation showed an increase in the time of sucking milk and undernourished pups showed an hyperphagia during lactation¹⁴. This hyperphagia can be associated to a compensatory mechanism in order to consume larger amount of milk¹⁴. Structures related to this function on feeding behavior can be more susceptible to morphological alterations. On the other hand, horizontal dimensions (anterior-posterior and latero - lateral) are closely related to speech¹. It's possible to infer that structures related to survival of species, as food intake, is privileged than structures related to the speech.

At 60 days old, all animals presented an increase in the horizontal and vertical dimensions meaning a structural growth during this period (41.9% epiglottis-cricoid, 36.4% thyroid-cricoid, 32.2% latero-lateral, and 49.2% anterior-posterior). Our results demonstrated that larynx recovery

its dimensions after the intake of a normoproteic diet. It can be suggested that larynx is sensible to the acute effects of undernutrition. Studies associating these results with functional evaluation of the larynx are necessary.

Supraglottis, glottis, and infraglottis showed similar micro structures in control and undernourished animals except for keratinization process seen in pups from mothers submitted to a low-protein diet. Keratin is a fibrous protein produced by keratinocytes and provides protection against abrasion ¹. In excess, keratinization of the epithelium can be associated to injuries in vocal cords and interarytenoid area. In addition, cases of hyperplasia with functional loss is also seen in excessively presence of keratine in the supraglottis ¹⁵.

Long-term effects (at 60 days old) of neonatal undernutrition were seen in microscopic dimensions of vocal cords. This result indicate that environmental stimulus in postnatal life may result in a normal development process in a short term, with a lasting response in the structure of organism ⁶. This response provides a number of biologically helpful purposes including the thrifty ability to alter selectively the relative growth rates of different organs according to priorities which differ among species ³. Previous studies have seen alterations of various tissues including liver, skeletal muscles, and brain. In the present study, it was seen that this also can happen with structures of vocal cords ^{4,5,13}. It seems that an organism search one way in order to induce offspring is programmed to survive under conditions of poor nutrition (the thrifty phenotype).

In conclusion, our study provide strong evidences that the nutrient demand in neonatal period is acting as the determinant for the higher gain of body weight in the period of adolescence. As well, macroscopic structures of larynx are sensible to acute effect of

undernutrition, but not a long-term. Unlikely, microscopic structures of vocal cords are sensible for the effects of undernutrition in the critical period of development.

Acknowledgements

The authors thank to financial support by Capes and Federal University of Pernambuco.

1. Castellengo M, Garcia Jr: M. A clear-sighted observer of human voice production. *Logoped Phoniatr Vocol* 2005;30:163-170.
2. Dobbing J, Sands J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. *Arch Fr Pediatr* 1985;42:199-203.
3. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235-1239.
4. Barreto-Medeiros JM, Feitoza EG, Magalhaes Ket al. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci* 2004;7:49-52.
5. Barros KM, Manhaes-De-Castro R, Lopes-De-Souza Set al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* 2006;9:99-104.
6. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991;156:38-50; discussion 50-35.
7. Barreto Medeiros JM, Cabral Filho JE, De Souza SLet al. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutr Neurosci* 2002;5:211-214.
8. Lima-Rodrigues M, Nunes R, Almeida A. Intraepithelial nerve fibers project into the lumen of the larynx. *Laryngoscope* 2004;114:1074-1077.
9. Tateya I, Tateya T, Surles RL, Tanumihardjo S, Bless DM. Prenatal vitamin A deficiency causes laryngeal malformation in rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116:785-792.
10. Ozanne SE. Metabolic programming in animals. *Br Med Bull* 2001;60:143-152.
11. Barker DJ. The long-term outcome of retarded fetal growth. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1999;129:189-196.
12. Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *American Journal of Physiology* 1996;271:E1128-1134.
13. Bayol S, Jones D, Goldspink G, Stickland NC. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr* 2004;91:331-339.
14. Souza SL, R. OS, M. CR, Jimenez F.B. . . Perinatal protein restrictin reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosc* 2008;In Press.
15. Cruz WP, Dedivitis R, Semetillia A, Rapoport A. Hystological study of the cartilaginous thyroid. *Rev Bras Otorrinol* 2003;69:734-738.