

BR 3072



**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DAS ALTERAÇÕES DO EIXO
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIREÓIDEO NA HIPOPROTEINEMIA
EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR ALBINOS
(RATTUS NORVEGICUS ALBINUS)**

Vânia Caira Borghi

DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 086
IEA - DT - 086

OUTUBRO/1978

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach — Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Helcio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DAS ALTERAÇÕES DO EIXO
HIPOTÁLAMO-HIFÓFISE-TIREÓIDEO NA HIPOPROTEINEMIA
EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR ALBINOS
(RATTUS NORVEGICUS ALBINUS)**

Vânia Caira Borghi

**Tese para obtenção do Título de "Doutor em Ciências -
Área de Fisiologia" - Orientador Prof. Dr. Ary
Domingos do Amaral. Apresentada e defendida em 31
de março de 1978, ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo.**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

Nota: A redação, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	4
1 – Animais	4
2 – Dietas	5
3 – Prova de Depleção do TSH Hipofisário	6
4 – Técnicas de Dosagem	7
4.1 – Proteínas Totais e Frações Proteicas	7
4.2 – Hormônio Tireotrófico	7
4.2.1 – Hormônio Padrão e para Radiiodação e Primeiro Anticorpo	7
4.2.2 – Obtenção do Segundo Anticorpo	8
4.2.2.1 – Preparação da IgG de Coelho	8
4.2.2.2 – Preparação de Soro de Carneiro Anti-IgG de Coelho	9
4.2.3 – Técnica de Iodação	9
4.2.4 – Purificação do Hormônio Marcado	10
4.2.5 – Provas do Rendimento da Marcação e da Pureza do Hormônio Marcado	10
4.2.6 – Protocolo do Ensaio	12
4.2.7 – Cálculos	12
5 – Tratamento Estatístico	15
5.1 – Peso dos Ratos	15
5.2 – Concentração de Proteínas Totais e Frações Proteicas Séricas	17
5.3 – Concentração de Hormônio Tireotrófico no Soro	17
RESULTADOS	17
1 – Peso dos Ratos	17
1.1 – Peso Inicial	17
1.2 – Evolução do Peso	19
1.3 – Peso Final	23
2 – Concentração de Proteínas Totais e Frações Proteicas Séricas	23
3 – Concentração do Hormônio Tireotrófico (TSH) no Soro	27
DISCUSSÃO	31
1 – Modelo Experimental	31
2 – Aclimação e Manuseio dos Animais	31

3 – Método de Depleção do TSH Hipofisário	32
3.1 – Anestesia dos Animais	32
3.2 – Administração do TRH	33
4 – Peso dos Animais	33
5 – Concentração de Proteínas Totais e Frações Proteicas Séricas	34
6 – Concentração de Hormônio Tireotrófico (TSH) no Soro	36
6.1 – Método de Dosagem do TSH	36
6.2 – Depleção do TSH Hipofisário	37
6.3 – Níveis de TSH na Desnutrição	38
CONCLUSÕES	40
APÊNDICE	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DAS ALTERAÇÕES DO EIXO
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIREÓIDEO NA HIPOPROTEINEMIA
EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR ALBINOS
(RATTUS NORVEGICUS ALBINUS)**

Vânia Caira Borghi

RESUMO

Este trabalho foi realizado com a finalidade de verificar a influência da dieta carente em proteínas sobre os níveis de hormônio tireotrófico no soro de ratos, em condições basais e em resposta à administração de seu hormônio liberador (TRH).

Estudaram-se dois grupos de animais, compreendendo 24 ratos em cada grupo, submetidos, respectivamente, às dietas normoproteica, contendo 15% de caseína (grupo controle) e hipoproteica, contendo 3% de caseína (grupo carente crônico proteico).

A experiência foi realizada em ambiente provido de aparelho condicionador de ar, para controle de temperatura e exposto à iluminação natural. O período experimental estendeu-se por 30 dias, no qual os animais receberam dieta e água "ad libitum".

Analisaram-se os pesos iniciais, finais e a evolução do peso dos ratos dos dois grupos.

Determinaram-se, no final do período experimental, as concentrações séricas de proteínas totais, albumina, globulinas e hormônio tireotrófico (TSH). A concentração hormonal foi estimada antes e após a administração intra-carotídea de 10 microgramas de TRH sintético a cada animal, em horário preestabelecido, por radioimunoensaio empregando-se a técnica do duplo anticorpo.

Os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico, aplicando-se análises apropriadas.

Os animais dos dois grupos estudados, cujos pesos médios iniciais eram semelhantes, apresentaram no decorrer do período experimental diferentes evoluções de peso. Os animais controle aumentaram de peso e os carentes tiveram seus pesos diminuídos ($\alpha < 0.001$).

As concentrações séricas de proteínas totais e frações proteicas analisadas foram significativamente menores no grupo carente, quando comparadas às concentrações correspondentes do grupo controle ($\alpha < 0.001$).

O nível basal de TSH sérico não diferiu significativamente entre os dois grupos estudados. Após a administração de TRH, o grupo controle aumentou cerca de 10 vezes seu nível médio basal de TSH sérico ($\alpha < 0.001$), ao mesmo tempo em que o grupo carente apresentou um acréscimo de 17 vezes ($\alpha < 0.001$); sendo este incremento mais acentuado nos animais carentes ($\alpha < 0.001$).

Nestas condições experimentais, este trabalho vem a confirmar uma liberação exagerada de hormônio tireotrófico em resposta ao estímulo de seu hormônio liberador, nos animais submetidos à carência proteica, embora não demonstre alteração nos níveis basais.

Estes resultados foram discutidos com base nos relatos da literatura, referentes às alterações endócrinas observadas na desnutrição clínica e experimental. Possivelmente, a diminuição da frenagem hipofisária na secreção de TSH, observada no grupo carente em resposta ao TRH, seja causada pela deficiente conversão extratireóidea de tiroxina, que acarretaria diminuída formação hepática de triiodotironina.

Aprovada para publicação em Janeiro/1978.

INTRODUÇÃO

A incidência contínua e a persistente taxa de mortalidade encontrada na desnutrição humana⁽⁹⁰⁾ são dois aspectos irônicos desta condição, que, embora inteiramente evitáveis, persistem como características dominantes da nutrição mundial. Apesar da pesquisa e do desenvolvimento dirigirem-se no sentido de prevenção e cura da má nutrição, o elevado índice de ocorrências, bem como fatores sociais, culturais, econômicos e tecnológicos contribuem para sua difícil erradicação. Muitas indagações relativas a eventos metabólicos que a precedem e acompanham permanecem ainda sem resposta.

As alterações cirúrgicas e patológicas encontradas em animais desnutridos são substancialmente as mesmas que compõem os quadros de marasmo e "kwashiorkor", dois dos principais tipos de deficiência nutricional reconhecidos na espécie humana. Justifica-se, assim, a extensão dos estudos para o estabelecimento de modelos acurados em animais experimentais. O número substancial de dados obtidos em animais depletados em proteínas fundamenta a aceitação de cães, ratos, porcos e macacos como réplicas mais características da condição humana^(12,36,42,50,77,120,145,169,172,177,178). Acredita-se que a desnutrição, quando instaurada na infância, provavelmente inibe o crescimento do cérebro e o subsequente desenvolvimento intelectual⁽¹⁵⁷⁾. Quanto mais cedo a criança for vitimada pela subalimentação, maior será a probabilidade de desenvolver atrasos persistentes no crescimento e na função cerebral⁽¹³¹⁾. Crianças gravemente desnutridas apresentam déficits na capacidade mental e no desenvolvimento psicológico que persistem após a reabilitação nutricional.

Demonstrou-se que quando ratos são desnutridos durante o período neonatal e depois alimentados adequadamente, ocorrem efeitos, alguns irreversíveis, no tamanho corpóreo, no ADN¹ cerebral no número e tamanho das células gordurosas e nas taxas cardíaca e respiratória^(7,68,74,79,171,173,175). Outros efeitos relacionados com o desenvolvimento neuromotor e com o acúmulo de catecolaminas no cérebro ocorrem em ratos gerados e amamentados por mães subnutridas^(144,146). O mecanismo pelo qual a desnutrição produz estes efeitos durante a fase crítica do desenvolvimento neonatal ou mesmo desde a fase pré-natal, é pouco conhecido.

Estudos clínicos e experimentais revelam que o jejum, as restrições proteica e calórica e as deficiências vitamínicas e minerais alteram a função das glândulas endócrinas. Alterações histológicas são descritas no pâncreas endócrino e na glândula tireóide de cães e ratos procriados e alimentados por mães malnutridas⁽⁶⁶⁾. Em ratos, a restrição dietética materna durante a gestação e lactação produz uma progênie de crescimento retardado, com glândulas hipofisárias de menor tamanho e concentrações reduzidas de hormônio de crescimento hipofisário e sérico^(149,154). Concentrações diminuídas de tiroxina (T₄) e tireotrofina (TSH) circulantes, bem como de hormônio liberador da tireotrofina (TRH) hipotalâmico foram observadas em ratos recém-nascidos, privados caloricamente por amamentação intermitente⁽¹⁴³⁾.

Diversas alterações foram descritas fora do período perinatal. Da experimentação animal, bem como de estudos necrópsicos humanos derivaram muitos dados sobre as mudanças histológicas da hipófise e órgãos alvos ocorridas na desnutrição^(33,66,101,119,150,151,155,160,179). Hipófise, tireóide, adrenais, ovários e testículos apresentam alterações estruturais involutivas que podem levar à atrofia da glândula^(101,179). A observação dessas involuções permitiu a MULINOS e POMERANTZ⁽¹⁰¹⁾ introduzirem, em 1940, o termo "pseudohipofisectomia" em virtude da semelhança entre os defeitos de inanação e hipofisectomia, e da convicção que muitos desses efeitos fossem decorrentes da má nutrição da hipófise, resultando na secreção diminuída de seus hormônios.

Estudos necrópsicos de glândulas hipofisárias revelaram uma reserva hormonal diminuída de gonadotrofinas e hormônio de crescimento (GH) em pacientes caquéticos e de TSH em crianças malnutridas^(134,165). Ratos submetidos à privação proteica apresentaram diminuição no conteúdo

1. ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

hipofisário dos hormônios folículo-estimulante (FSH), estimulante das células intersticiais, de TSH e de GH^(1,15,1).

Embora a reserva hipofisária de certos hormônios esteja reduzida na desnutrição, não se pode afirmar que a concentração hormonal no sangue seja inadequada. Existe uma concordância que os níveis de GH circulante estão aumentados na má nutrição proteico-calórica infantil^(10,94,95,111,112,116) provavelmente devido à hipersecreção⁽¹¹⁴⁾, na infância do adulto e aumentados ou normais na anorexia nervosa^(3,24,86,92). O nível de cortisol plasmático também encontra-se elevado, verossimilmente em virtude de um catabolismo deficiente⁽⁵⁾. Em contraste, as gonadotrofinas estão diminuídas. Adultos com diferentes graus de desnutrição ou com anorexia nervosa apresentaram baixa excreção urinária de gonadotrofinas e estrógenos^(44,108,179). Em crianças malnutridas foram descritos níveis plasmáticos de hormônio luteinizante (LH) e FSH decrescidos insignificadamente e respostas subnormais do LH ao seu hormônio liberador⁽¹¹⁵⁾. Na desnutrição do adulto, estudos realizados em mulheres com anorexia nervosa demonstraram níveis basais de LH e estradiol diminuídos, de FSH decrescidos ou inalterados e respostas deficitárias ao clomifênio e ao hormônio liberador das gonadotrofinas^(113,86,161 e 166). Entretanto, alguns desses estudos revelaram ainda respostas de FSH aumentadas e prolongadas ou mesmo respostas de LH prolongadas à estimulação pelo hormônio liberador do hormônio luteinizante^(161,166). Recentemente, foram descritos níveis basais baixos de prolactina na desnutrição infantil e normais ou elevados em adultos com anorexia nervosa^(11,13,16*,166). O nível basal de insulina plasmática imunorreativa encontra-se diminuído na má nutrição e na privação alimentar e as respostas às administrações intravenosas de glicose e glucagonio são subnormais^(3,24,94,95).

Estas alterações da função endócrina são recuperáveis, sendo o nível hormonal normalizado com o tratamento da desnutrição, o que contrasta com as permanentes alterações que ocorrem no período perinatal.

No que diz respeito ao eixo hipotálamo-hipófise-tireóideo, a maioria dos estudos em desnutrição é difícil de ser interpretada e os relatos são controversos quanto ao local da alteração. Diversas alterações histológicas foram encontradas na tireóide de ratos e camundongos privados de alimentação⁽³³⁾. Existem também evidências histológicas de hipoplasia tireóidea na desnutrição clínica e experimental, embora glândulas de crianças malnutridas não tenham revelado alterações histológicas^(66,101,119,155,156). Significantes reduções no peso da tireóide foram determinadas em ratos submetidos à depleção proteica, em crianças malnutridas e em indivíduos caquéticos^(30,47,82,134,150,156). Atribuiu-se esta hipoplasia a uma provável diminuição na liberação do TSH hipofisário, sendo que a reduzida hiperplasia observada em ratos desnutridos como resposta à administração de substâncias baciogênicas suportava a referida hipótese⁽⁸²⁾.

Do ponto de vista funcional, várias evidências encontradas na má nutrição clínica e experimental, a saber: diminuições na taxa metabólica basal^(9,44,97,108,150), na captação de iodo radioativo pela tireóide^(8,9,14,43,47,108), nos níveis de iodo ligado à proteínas (PBI)^(9,14,60,71,123,164), e de iodo extraível pelo butanol (BEI)^(9,14), na relação entre as concentrações de radioiodo na tireóide e no soro (T/S)^(30,150), na taxa de secreção de T₄⁽¹⁴⁷⁾ e nos teores de T₄ e triiodotironina (T₃) na tireóide^(47,59) e T₄ no plasma⁽⁶⁰⁾ com quantidades de iodoaminoácidos tireóideos aumentadas, indicam uma diminuição na função tireóidea. Poderia parecer que na desnutrição uma secreção reduzida de TSH fosse responsável, pelo menos em parte, por essas alterações funcionais da tireóide, visto que a administração de TSH estimulava a glândula^(9,54). Entretanto, o TSH exógeno não elevou significativamente estes parâmetros em animais submetidos à depleção proteica, sugerindo mais um comprometimento tireóideo do que hipofisário^(30,84).

As primeiras investigações acerca dos níveis de TSH, utilizando métodos biológicos, revelaram diminuição nas concentrações de TSH sérico e hipofisário, tanto em ratos submetidos à privação alimentar ou proteica dietética, como em mulheres caquéticas e crianças com marasmo ou "kwashiorkor"^(33,134,181,185). Com o recente desenvolvimento de um radioimunoensaio para a medida de TSH, a introdução desta metodologia veio mostrar que na desnutrição a tendência deste hormônio é de estar inalterado na circulação. Assim, foram descritos níveis basais normais de TSH circulante em

crianças com marasmo, "kwashiorkor", "kwashiorkor"-marasmático, em pacientes com anorexia nervosa, em adultos obesos ou normais submetidos ao jejum, e em adultos com má nutrição proteico-calórica (13,28,59,60,62,70,93,99,121,124,161,166). Entretanto, oito entre 24 crianças com má nutrição proteico-calórica estudadas por PIMSTONE e cols.⁽¹¹³⁾ apresentaram TSH sérico basal elevado e, inversamente, baixos níveis deste hormônio foram determinados em crianças marasmáticas e em indivíduos obesos mantidos em jejum^(60,62,131).

O uso do tripeptídeo sintético, hormônio liberador da tireotrofina (TRH) como uma prova estimulante da reserva hipofisária de TSH, tornou possível o estudo da função hipotálamo-hipófise-tireóidea na desnutrição, revelando respostas do TSH ao TRH, na maioria das vezes exageradas e prolongadas^(32,113,124,131,161,166).

Estes estudos da dinâmica do TSH na desnutrição humana foram realizados em condições clínicas em que os grupos estudados nem sempre são homogêneos, e os resultados são, às vezes, discutíveis. Portanto, a confirmação desses achados em condições experimentais controladas era desejável.

Julgou-se então necessário avaliar o nível basal de TSH sérico e sua resposta ao TRH sintético em ratos malnutridos.

Este trabalho compara observações realizadas em dois grupos de ratos, carente crônico proteico e controle, analisando-se os parâmetros seguintes:

- pesos iniciais, finais e evolução dos pesos dos animais,
- concentração de proteínas totais séricas,
- concentração das frações proteicas séricas,
- nível basal do hormônio tireotrófico (TSH) no soro,
- nível sérico do TSH em resposta à administração de seu hormônio liberador (TRH).

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Animais

Utilizaram-se 48 ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus albinus*) - Myomorpha - RODENTIA, do sexo feminino, com idade em torno de 70 dias, de peso homogêneo e criados no biotério do Instituto de Energia Atômica de São Paulo (I.E.A.).

Os animais foram encerrados em gaiolas metabólicas individuais, sendo mantidos durante o decorrer da experiência em sala fechada sujeita à iluminação natural por aproximadamente 12 horas diárias e provida de aparelho condicionador de ar que manteve a temperatura média ambiente de $24,4 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$.

A experiência durou 30 dias, período em que os animais receberam dieta e água "ad libitum".

Constituíram-se, assim, os dois grupos de estudo do presente experimento:

- a) Grupo controle - compreendendo 24 ratos que receberam dieta normoproteica, contendo 15% de proteína de caseína (GC);

b) Grupo carente crônico em proteínas – compreendendo 24 ratos que receberam dieta hipoproteica, contendo 3% de proteína da caseína (GCCP).

Determinou-se o peso dos ratos em intervalos de dois a três dias. Precedendo a pesagem, os animais eram mantidos nas mãos do experimentador, durante algum tempo, a fim de evitar o estresse¹ decorrente do seu manuseio.

2 – Dietas

As dietas utilizadas neste trabalho tiveram as seguintes composições:

Composição Percentual das Dietas de Caseína
Fornecidas aos Animais

Ingredientes (g/100 g de dieta)	Dietas	
	Normoproteica	Hipoproteica
Caseína	15	3
Mistura de sais minerais	4	4
Solução de vitaminas	2	2
Óleo de fígado de bacalhau	2	2
Óleo de milho	4	4
Maisena	73	85

Mistura de sais minerais – preparada segundo a mistura de PHILLIPS e HART⁽¹⁰⁹⁾ modificada. Cem gramas de dieta contém as seguintes quantidades de sais:

NaCl	0,5949 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .H ₂ O	0,1332 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,5008 g
KI	0,0028 g
Ca ₃ H ₂ (PO ₄) ₂ .4H ₂ O	0,3374 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,0012 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3623 g
ZnCl ₂	0,0009 g
CaCO ₃	1,0665 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0011 g

Solução de vitaminas⁽¹³⁸⁾ – Cem mililitros da solução contribuíram com as seguintes quantidades em mg/100g/dieta:

¹ Do Inglês "stress": segundo Suerque de Holanda Ferreira, A. *Novo Dicionário de Língua Portuguesa*, 1 ed. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 1975.

Tiamina HCl	3,57
Riboflavina	3,57
Piridoxina HCl	3,57
Pantotenato de cálcio	8,94
Ácido nicótico	3,57
Colina HCl	1.787,28
Ácido fólico	1,79
Inositol	178,73
Vitamina B ₁₂	0,04
Vitamina K ₃	8,94
Água desionizada q.s.p.	100 ml

Observação — Cem gramas de dieta normoproteica e hipoproteica forneceram respectivamente 408,41 e 381,65 Kcal.¹

O preparo das dietas obedeceu à seqüência: dissolução da mistura de sais na solução de vitaminas, adição dos óleos, adição da caseína e maisena; homogeneização da mistura seguida de duas passagens do pó, correspondente à mistura final, através de peneira de malhas de "nylon".

As dietas foram armazenadas em recipientes e guardadas em câmara fria a quatro graus centígrados.

Retirou-se, diariamente, das dietas estocadas, a quantidade suficiente para o suprimento dos animais durante 24 horas. Com a finalidade de evitar o fornecimento de alimentos em temperatura baixa, a dieta foi mantida durante cerca de duas horas, à temperatura ambiente, antes de ser oferecida aos ratos.

Após os 30 dias em que os animais receberam as dietas balanceadas, eles permaneceram em jejum durante as duas horas precedentes ao início da prova de depleção do hormônio tireotrófico (TSH) hipofisário.

3 — Prova de Depleção do TSH Hipofisário

Os animais dos dois grupos (GC e GCCP) foram submetidos à prova de depleção do TSH hipofisário por meio de injeção do hormônio liberador da tireotrofina (TRH).

Utilizou-se o método da depleção pituitária para o bioensaio dos fatores hipotalâmicos, padronizado por MOTTA e cols.⁽¹⁰⁰⁾, modificado por PIVA e STEINER⁽¹¹⁸⁾ e adaptado às condições experimentais deste trabalho.

Os animais previamente anestesiados por injeção intraperitoneal de Pentobarbital sódico² (três mg por 100 g de peso corpóreo) tiveram a artéria carótica exposta por meio de uma incisão longitudinal na região anterior do pescoço. Por meio de uma cânula (tubo de polietileno PE 50³) introduzida na artéria retirou-se pequena amostra de sangue, administrando-se à seguir, pela mesma via, 10 microgramas de TRH⁴ sintético diluído em 0,5 ml de solução fisiológica; no período pré-estabelecido compreendido entre 9,50 e 10,30 horas⁽¹⁶⁾

1 Segundo Best, C. H. e Taylor, N. B. The physiological basis of medical practice, 7 th Edition, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1961, ch. 44, p. 743 e Tables Científicas Documenta Geigy, 6ª Edición, J. R. Geigy S.A., Basilea, 1966, p. 521.

2 Indústrias Farmacéuticas Fontoura — Wyeth S.A. — São Bernardo do Campo, S.P.

3 Cley Adams — Parsippany, N. J., USA.

4 Cedido pela F. Hoffmann — La Roche & Co. Ltda — Basileia, Suíça.

Coletou-se o sangue total dos animais 10 minutos após a administração do hormônio, sacrificando-os por decapitação rápida com guilhotina.

As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4°C, durante 20 minutos a 2000 rpm. Determinou-se, no soro obtido antes da administração de TRH a concentração de TSH. Nas amostras séricas, após a administração do TRH, dosaram-se o TSH, as proteínas totais e as frações proteicas.

4 – Técnicas de Dosagem

4.1 – Proteínas Totais e Frações Proteicas

A concentração das proteínas totais do soro (g/100 ml de soro) foi estimada colorimetricamente pelo método de LOWRY e cols.⁽⁸⁵⁾, usando como referência uma curva padrão de soro albumina bovina (SAB).

As frações proteicas do soro, pré-albumina, albumina e globulinas, foram separadas pela técnica de eletroforese em acetato de celulose (Cellogel)¹, adaptada segundo as instruções do fabricante das fitas⁽¹³⁷⁾.

Após diafanização, as fitas foram lidas em fotodensitômetro, delineando seu perfil eletroforético sobre papel adequado; tendo-se tomado a precaução de utilizar o mesmo papel a fim de manter a homogeneidade entre os traçados obtidos.

Pesando-se em balança analítica Mettler² a área total ocupada pelo diagrama e as áreas correspondentes à pré-albumina, albumina e globulinas; calculou-se a porcentagem de distribuição das frações proteicas com relação ao peso da superfície total de cada gráfico.

A partir dos valores das proteínas totais do soro obtidos pelo método de Lowry, determinou-se a concentração relativa a cada fração proteica expressa em gramas por 100 mililitros de soro.

4.2 – Hormônio Tireotrófico

Determinou-se o hormônio tireotrófico no soro por radioimunoensaio, utilizando a técnica do duplo anticorpo, baseado no método descrito por ODELL e cols.⁽¹⁰⁶⁾ com algumas modificações, segundo as instruções recebidas do National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases (NIAMD).

4.2.1 – Hormônios Padrão e Para Radiolodação e Primeiro Anticorpo

- Hormônio tireotrófico de rato para construção de curva padrão (NIAMD-Rat TSH-RP-1). Potência biológica: 0,22 unidades de TSH-USP (bovinas) por miligrama (ensaio de Mackenzie).
- Hormônio tireotrófico de rato para radiolodação (NIAMD-Rat TSH-I-3). Potência biológica: aproximadamente 35 unidades internacionais por miligrama (ensaio de Mackenzie).
- Anticorpo contra tireotrofina de rato, preparado em coelhos (NIAMD-Anti-Rat TSH Serum 2)

1 Chematron -- Milano, Itália

2 Mettler -- H20T -- Zürich, Swiss.

Estes materiais biológicos foram cedidos pelo National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institute of Health, Rat Pituitary Hormone Distribution Program¹.

4.2.2 – Obtenção do Segundo Anticorpo

Como segundo anticorpo empregou-se imunesoro de carneiro contra gamaglobulina (IgG) de coelho.

4.2.2.1 – Preparação da IgG de Coelho

Do soro normal de coelho, obtido por sangria de animais do biotério do I.E.A., foram separadas as frações globulinas por meio de precipitação com sulfato de sódio⁽³⁷⁾.

O material obtido foi dialisado inicialmente contra água destilada para retirada do sulfato e concentrado através de membrana Diaflo PM 30 em sistema de ultrafiltração Amicon². Após nova diálise contra tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 8³, dosou-se a proteína pelo método do biureto, sendo depois cromatografada em DEAE-celulose⁴ equilibrado no mesmo tampão^(46,76).

A imuneleletróforese da fração cromatográfica revelou, frente ao imunesoro de carneiro anti-soro total de coelho, uma única linha de precipitação, com mobilidade de IgG (Figura 1).



Figure 1 – Padrão Eletroforético da Preparação do IgG Obtida em Cromatografia de DEAE-celulosa.
(1) Soro Total de Coelho; (2) Fração Eluída em DEAE celulose; (3) Imunesoro de Carneiro anti-soro Total de Coelho

1 Harbor General Hospital – 1000 West Carson Street, Torrance California, USA.

2 Amicon Corporation – Lexington, Massachusetts, USA.

3 Composição: KH_2PO_4 67,13 mg
 K_2HPO_4 919,46 mg
Água bidestilada q. s. p. 1 000 ml

4 Bio-Rad Laboratories – Richmond, California, USA.

A solução de IgG obtida, contendo 60 miligramas de proteína por mililitro de tampão, foi conservada a -20°C .

4.2.2.2 – Preparação de Soro de Carneiro Anti-IgG de Coelho

Utilizou-se um carneiro do sexo masculino da raça Corriedale, com 10 meses de idade, proveniente do Posto de Ovinos e Caprinos do Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de São Paulo.

A imunização do animal foi realizada por injeções subcutâneas, na região paraesternal, de dois miligramas de IgG emulsionados em adjuvante de Freund completo, durante um período de quatro semanas.

Quinze dias após a última inoculação, procedeu-se à imunização de reforço empregando-se seis miligramas de IgG em solução fisiológica, por via intramuscular na região interna da coxa, semanalmente, por um período de quatro semanas. Sete dias após, realizou-se a sangria pela veia jugular. O imunesoro de carneiro anti-IgG de coelho foi dosado pela técnica de precipitação quantitativa, segundo Heidelberg e Kendall, descrita por MAURER⁽⁸⁹⁾, obtendo-se 2,4 miligramas de proteína anticorpo por mililitro de soro.

Concomitantemente à sangria, procedeu-se a novo reforço que se repetiu quinzenalmente a fim de manter elevado o nível dos anticorpos.

4.2.3 – Técnica de Iodação

Com as precauções usuais na manipulação de material radioativo, efetuou-se a iodação do TSH com ^{125}I ¹, na forma de iodeto de sódio, livre de carregador e agentes redutores; com elevada atividade específica (aproximadamente 300 milicuries por mililitro) pelo método de GREENWOOD e cols.⁽⁶³⁾ modificado.

A um tubo de ensaio que continha 20 microlitros (μl) de tampão fosfato 0.5 M, pH 7,6² adicionaram-se sucessivamente:

- a) 1,5 mCi de ^{125}I ;
- b) hormônio tireotrófico para radiiodação: 25 μl da solução de concentração de 200 microgramas por mililitro (ml);
- c) cloramina T: 20 μl da solução de concentração de 15 miligramas (mg) por 10 ml;
- d) agitação moderada e contínua, durante 40 segundos;
- e) metabissulfito de sódio: 50 μl da solução de concentração de 24 mg/10 ml;
- f) continuou-se a agitar o sistema durante 40 segundos;
- g) iodeto de potássio: 200 μl da solução de concentração de 100 mg/10 ml;
- h) soro normal de coelho: 100 μl corados com azul de bromofenol.

¹ Farbwerke Hoechst AG – Frankfurt (Main), Germany.

² Composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8,9712 g
 Na_2HPO_4 81,7813 g
 Água bidestilada q. s. p. 1 000 ml

Observações:

1 – Os reativos dos itens c, e, g, foram diluídos em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,6¹.

2 – O hormônio tireotrófico foi diluído em fosfo-salina (tampão fosfato 0,01 M², NaCl 0,15 M e mertiolato 0,01%, pH 7,6).

4.2.4 – Purificação do Hormônio Marcado

A purificação do hormônio marcado foi feita por cromatografia em coluna de exclusão molecular (Gel Sephadex G-75³).

O gel previamente entumescido com fosfo-salina durante aproximadamente 24 horas, à temperatura ambiente, foi empacotado em coluna de vidro refrigerada a 4°C, de dimensões de 30 centímetros (cm) de altura e 0.9 cm de diâmetro.

A coluna foi saturada com fosfo-salina contendo 2% de soro albumina bovina (SAB) e em seguida lavada com o tampão de eluição (fosfo-salina).

O hormônio marcado foi aplicado à coluna, coletando-se frações de 0,5 ml em tubos contendo 0,5 ml de fosfo-salina com 1% de SAB.

Para prevenir a desnaturação da molécula proteica pela temperatura, fez-se a purificação em sistema refrigerado a 4°C (coletor automático refrigerado LKB⁴).

Controlou-se os diversos eluatos por meio de espectrômetro-automático de cintilografia munido de cristal de NaI(Tl), tipo poço (Nuclear Chicago Corporation⁵), a fim de localizar os picos radioativos.

Obtiveram-se três picos radioativos: o primeiro pico é hormônio não íntegro, material pouco imunorreativo, o segundo pico corresponde ao hormônio marcado puro, usado para o radioimunoensaio. O terceiro pico, acusado em efluentes bem distanciados do hormônio íntegro, contém o iodeto livre (Figura 2).

O primeiro e o terceiro pico foram desprezados, sendo o TSH-¹²⁵I, congelado a -20°C após as provas de pureza.

4.2.5 – Provas do Rendimento da Marcação e da Pureza do Hormônio Marcado

As amostras de TSH marcado com ¹²⁵I, obtidas antes e após a purificação pelo Sephadex, às quais adicionou-se plasma humano corado com azul de bromofenol, foram submetidas a eletroforese em fitas de papel Whatman 3MM⁽¹⁷⁶⁾.

A análise eletroforética foi desenvolvida em tampão veronal (força iônica 0,05), pH 8,8⁶; a 800 V.

1 Preparado a partir do tampão fosfato 0,5 M, pH 7,6

2 Composição: NaH₂PO₄·H₂O 0,17942 g
Na₂HPO₄ 1,23523 g
Água bidestilada q. s. p. 1 000 ml

3 Pharmacia – Uppsala, Sweden.

4 LKB – Produkter AB – Bromma, Sweden.

5 Nuclear Chicago Corporation – Des Plaines, Illinois, USA.

6 Composição: Ácido dietil barbúrico 1,84 g
Barbital sódico 10,30 g
Água bidestilada q. s. p. 1 000 ml

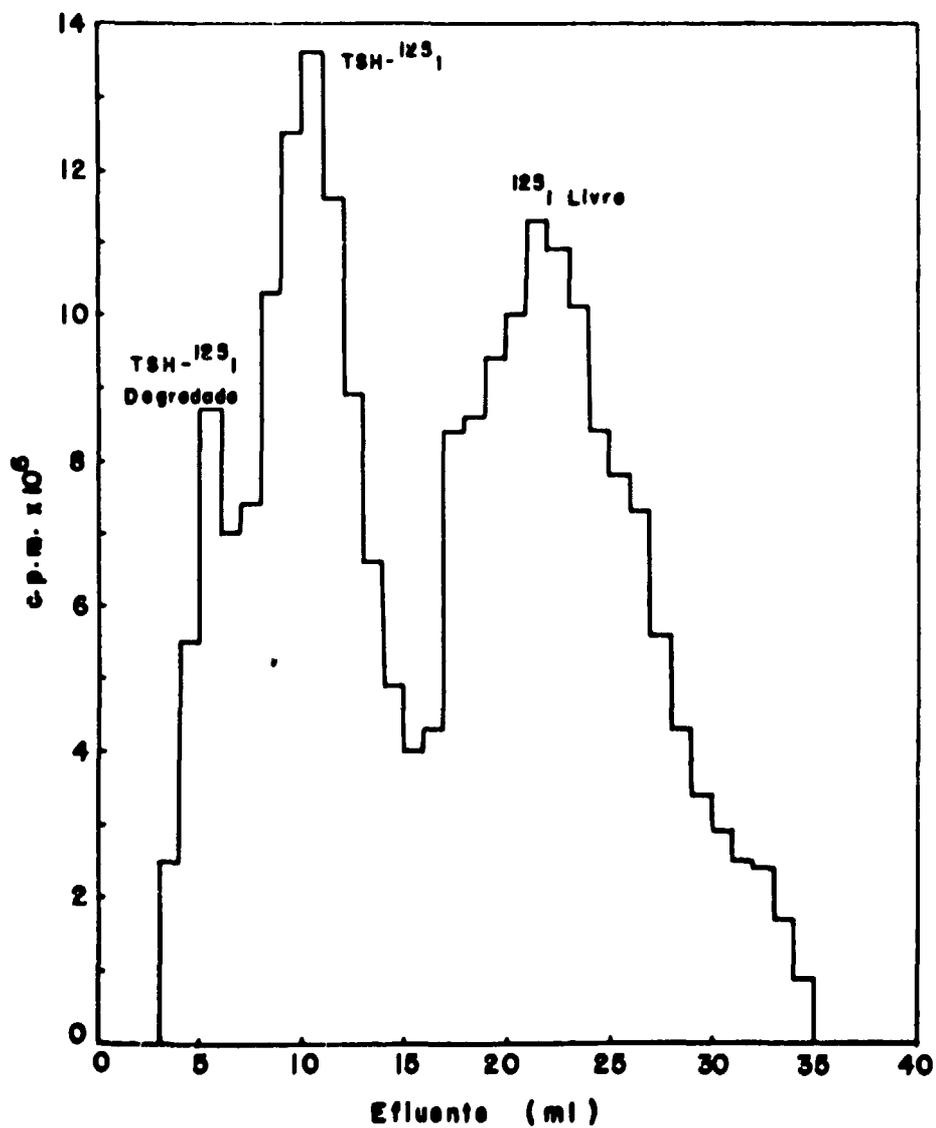


Figure 2 - Cromatograma da Purificação do TSH-¹²⁵I em Coluna de Exclusão Molecular (Sephadex G-75)

A corrida foi interrompida quando as proteínas séricas coradas alcançaram 7,5 cm da origem, o que correspondeu a um tempo médio de 30 minutos.

A radioatividade das fitas foi determinada em segmentos de um centímetro, a partir da origem, no espectrômetro-automático de cintilografia gama tipo poço.

O diagrama da eletroforese, realizada com a amostra de TSH logo após sua iodação, revelou três picos de atividade, correspondentes a um pico na origem de hormônio íntegro que permaneceu no local da aplicação, um pico central de hormônio danificado que migrou com as proteínas séricas coradas e um pico final de iodeto radioativo livre (Figura 3).

Na eletroforese da amostra obtida após a filtração em coluna de Sephadex, identificou-se apenas um pico de TSH marcado localizado na origem, indicando a eficiência da purificação que permitiu a separação do hormônio íntegro da fração hormonal degradada e do ^{125}I livre (Figura 3).

A relação entre as contagens da área em que se localizou o hormônio íntegro e as contagens totais da fita forneceu 45,02% de rendimento e 90,36% de pureza para o hormônio marcado e purificado respectivamente.

4.2.6 – Protocolo do Ensaio

No protocolo, os tubos de números um a três (traçadores), contém apenas o hormônio marcado. Os tubos de números quatro a seis (controles) contém hormônio marcado sem anti-soro e representam a ligação inespecífica do hormônio marcado com o segundo anticorpo. Os tubos de números sete a 30 contém hormônio tireotrófico padrão, nas concentrações de zero, cinco, 25, 50, 100, 250, 500 e 1 000 manogramas por 0,3 mililitros. Os tubos seguintes contém soro de rato contido antes e após a administração de TRH.

A seqüência de adição dos reagentes obedeceu à disposição do protocolo (Tabela I).

Após a adição do primeiro anticorpo o sistema foi incubado a quatro graus centígrados durante 72 horas e, após a adição do segundo anticorpo, por 24 horas nas mesmas condições.

A seguir, todos os tubos, exceto os traçadores, foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 2500 rpm durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram decantados e as atividades dos precipitados determinadas no espectrômetro-automático de cintilografia gama, acumulando-se no mínimo 10 000 contagens.

4.2.7 – Cálculos

Tendo sido ensaiados em triplicata a curva padrão, traçadores e controles, e em duplicata as amostras séricas; calcularam-se os valores médios das contagens correspondentes.

A contagem que representa a ligação inespecífica do hormônio marcado com o segundo anticorpo foi subtraída dos demais valores; constituindo 0,86% da contagem indicada pelos traçadores.

A partir dos valores corrigidos, calcularam-se as porcentagens de ligação do hormônio marcado com o anticorpo específico na presença das diferentes concentrações de hormônio padrão, em relação à contagem do ponto zero da curva padrão. Estabeleceu-se como sendo 100% a ligação neste ponto, devido a ausência de TSH padrão para competir com o TSH- ^{125}I pelos lugares de ligação do anticorpo.

Os dados assim obtidos foram processados de acordo com o método de ROBBARD e FRAZIER⁽¹³⁰⁾ que permite a transformação da curva padrão para a forma linear, por meio da seguinte equação:

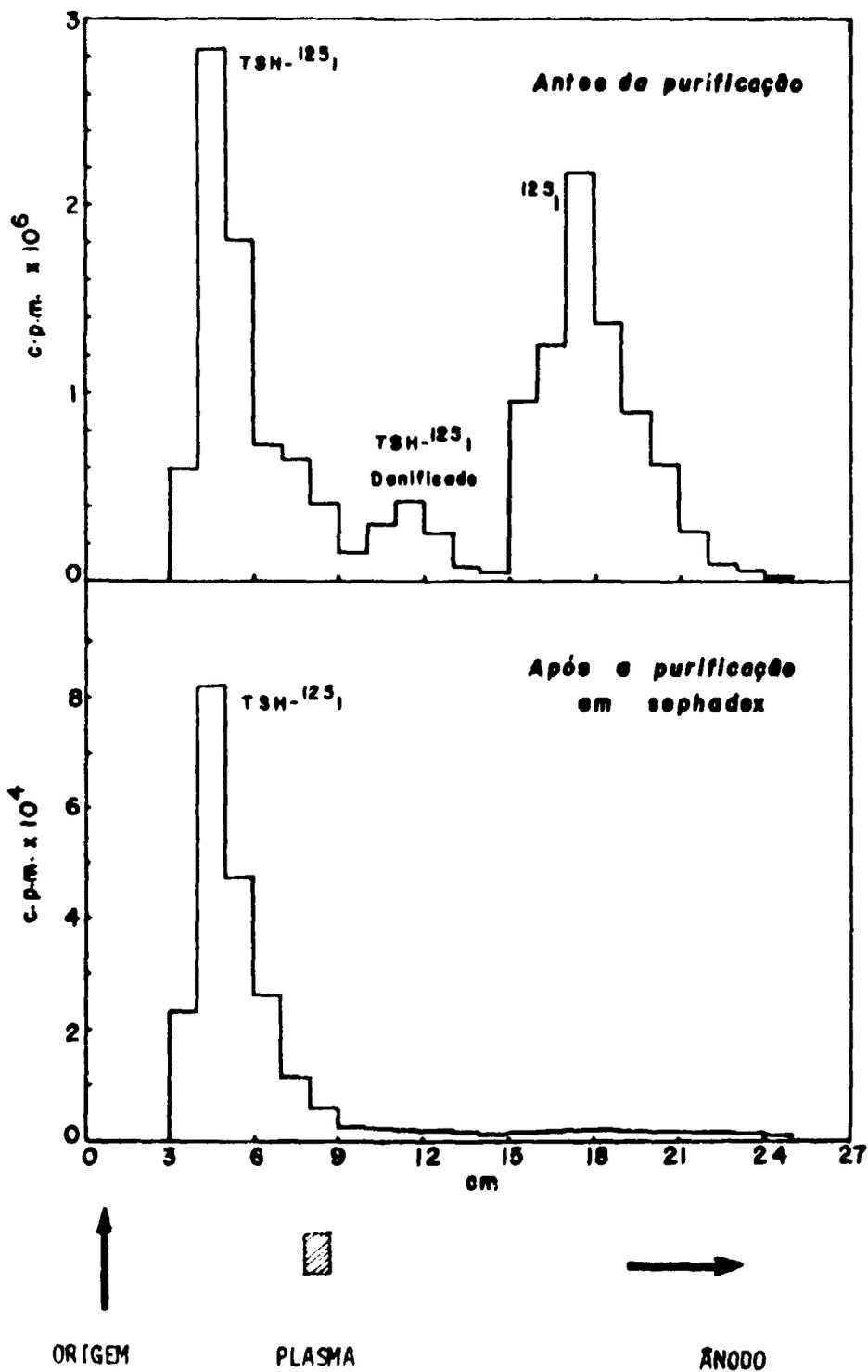


Figura 3 - Eletroforetograma do TSH-¹²⁵I

Tabela I

Hormônio Tireotrófico Protocolo do Ensaio

Tubos Nº	TSH padrão ng/300 µl	Amostra µl	Tampão µl	TSH- ¹²⁵ I µl	Ac 1 1:10 000 µl	Ac 2 µl
1 a 3	---	---	---	100	---	---
4 a 6	---	---	700	100	---	200
7 a 9	0	---	200	100	200	200
10 a 12	5	---	200	100	200	200
13 a 15	25	---	200	100	200	200
16 a 18	50	---	200	100	200	200
19 a 21	100	---	200	100	200	200
22 a 24	250	---	200	100	200	200
25 a 27	500	---	200	100	200	200
28 a 30	1 000	---	200	100	200	200
31 - 32	---	300	200	100	200	200
.
.
.

Tampão: fosfo-salina, pH 7,6, contendo albumina bovina sérica a 1%.

TSH padrão: hormônio tireotrófico padrão, dissolvido em tampão.

TSH-¹²⁵I: hormônio tireotrófico marcado, diluído em tampão (20 000 cpm/100 µl).

Ac 1: primeiro anticorpo diluído em fosfo-salina, pH 7,6 contendo EDTA 0,05 M e soro normal de coelho a 3%.

Ac 2: segundo anticorpo.

$$\text{logito}(y) = a + b \ln x$$

onde:

$$\text{logito}(y) = \ln(y/1 - y),$$

y é a porcentagem de ligação relativa e

x é a concentração de hormônio tireotrófico padrão.

A reta de regressão linear resultante, obedeceu a equação:

$$\text{logito}(y) = -0,823 \ln x + 4,199$$

coeficiente de correlação (r) = -0,998.

Estas determinações e a subsequente computação dos valores da concentração hormonal das amostras séricas foram efetuadas em calculadora Hewlett-Packard¹.

A precisão deste método foi confirmada pela concordância entre as concentrações obtidas pela equação e as concentrações lidas na curva aritmética.

As leituras na curva supra citada foram compreendidas na região correspondente à concentração de 40 a 130 nanogramas por 0,3 mililitros, que se apresentou linear e sensível. (Figura 4).

Fixou-se, em ensaio prévio, como sendo de 1:10 a diluição apropriada das amostras séricas obtidas após o estímulo pelo TRH; o que permitiu a leitura das concentrações na região linear.

Os resultados foram expressos em nanogramas de TSH padrão (NIAMD-Rat TSH-RP-1) por mililitro de soro.

5 – Tratamento Estatístico

O estudo comparativo dos resultados experimentais obtidos para os grupos controle e carente crônico proteico foi efetuado aplicando-se técnicas de comparação de duas médias, análise de regressão e análise de variância.

Neste estudo utilizaram-se os índices de aferição seguintes:

- peso dos ratos,
- concentração de proteínas totais e frações proteicas séricas e
- concentração de hormônio tireotrófico no soro.

5.1 – Peso dos Ratos

A comparação entre as médias dos pesos iniciais dos ratos dos dois grupos, antes de serem submetidos às dietas normoproteica ou hipoproteica, foi feita pelo teste t de Student, verificando-se inicialmente, por meio de um teste F, se havia ou não diferença entre as variâncias.

¹ Hewlett Packard, modelo 9100B, Englewood, Colorado, USA.

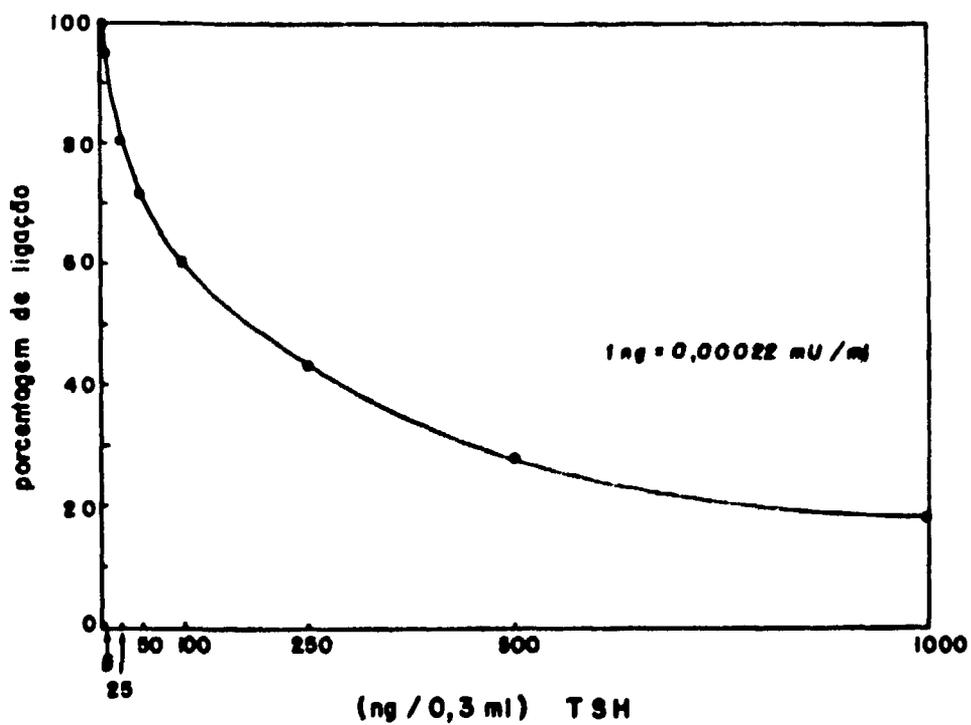


Figura 4 - Ensaio de Hormônio Tireotrófico de Rato. Curva Padrão

Pelo método de regressão linear simples, estudou-se a evolução do peso dos animais em função do tempo em que eles foram submetidos às dietas. Realizou-se a análise de variância para avaliar se as retas resultantes satisfaziam as condições de linearidade, isto é, o coeficiente angular ser diferente de zero e não existir falta de ajustamento. A diferença entre as inclinações das retas dos dois grupos foi analisada por *t* de Student.

As médias dos pesos atingidos pelos ratos no trigésimo dia de fornecimento das dietas foram estimadas a partir das retas de regressão linear correspondentes. A comparação entre estas médias relativas aos pesos finais dos ratos dos grupos controle e carente foi efetuada pelo teste *t* de Student.

5.2 – Concentração de Proteínas Totais e Frações Proteicas Séricas

A comparação entre as médias dos dois grupos de animais (GC e GCCP), segundo concentração sérica de proteínas totais, albumina e globulinas, foi realizada pelo teste *t* de Student, tomando-se o cuidado de verificar se possuíam variâncias iguais.

5.3 – Concentração de Hormônio Tireotrófico no Soro

As comparações entre as concentrações do hormônio tireotrófico no soro dos ratos dos grupos controle e carente, antes e após o estímulo com TRH, foram estabelecidas por uma análise de variância. Em caso de resultados significantes, aplicou-se o método das comparações múltiplas de Scheffé.

RESULTADOS

1 – Peso dos Ratos

Os valores correspondentes aos dados individuais do peso dos animais, verificados durante o período em que foram submetidos às dietas normoproteicas ou hipoproteica, encontram-se na Tabela VIII do apêndice.

Estão representados na Tabela IX do apêndice os valores relativos às variações individuais do peso dos ratos, calculados a partir dos pesos estimados no decorrer do período, com relação ao peso inicial. Ver na folha a seguir do apêndice, a Figura 9.

As médias aritméticas dos pesos inicial e final dos animais, bem como das variações entre estes pesos estão expressas na Tabela II, juntamente com os respectivos desvios padrão.

1.1 – Peso Inicial

A significância estatística entre as médias dos pesos iniciais dos ratos que passaram a receber as dietas normoproteica e hipoproteica foi avaliada pelo teste *t* de Student.

Comparando-se as variâncias dos pesos dos animais dos dois grupos pelo teste $F^{(38)}$, o valor de *F* observado foi igual a 3,9366 (GL: 23 e 23), demonstrando a existência de diferença significativa ao nível de 1% entre elas. Aplicou-se então o teste *t* de Student para variâncias desiguais⁽³⁹⁾, dado pela fórmula seguinte:

$$t = \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

com $GL = n_1 + n_2 - 2$, onde:

Os índices 1 e 2 referem-se, respectivamente, aos dados dos grupos controle e carente crônico proteico,

n é o número de animais de cada grupo,

\bar{Y} representa o valor médio do peso inicial,

s^2 representa a variância do referido peso e

GL figura como sigla dos graus de liberdade.

Evidenciou-se pelo valor de t observado, igual a 0,5269 que as médias dos pesos iniciais dos ratos dos dois grupos não diferem, significativamente, entre si.

Tabela II

Peso Inicial, Peso Final e Variação de Peso dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Submetido à Carência Crônica Proteica (GCCP)

Grupos	Dados analisados	Peso inicial	Peso final	Variação de peso
GC	\bar{X}	105,08 g	174,88 g	+ 69,79 g
	d.p.	21,09	16,78	14,62
GCCP	\bar{X}	102,54 g	84,88 g	- 17,67 g
	d.p.	11,09	12,40	5,18

\bar{X} : Média

d.p. : Desvio padrão

1.2 – Evolução do Peso

O estudo, pelo método de regressão linear simples, da evolução do peso dos animais durante os 30 dias em que foram submetidos às dietas, foi realizado com os valores estimados a partir do segundo dia. Neste segundo dia, correspondente à primeira pesagem feita após o início do fornecimento das dietas, inicia-se a avaliação das alterações do peso dos animais em resposta às mesmas.

As retas de regressão linear estimadas, segundo as fórmulas descritas em DRAPER e SMITH⁽³⁹⁾, relativas à evolução do peso dos ratos dos grupos de controles (GC) e carente (GCCP), são:

$$\text{— reta nº 1 (GC)} \quad : \quad \hat{y} = 112,5000 + 2,1079 x$$

$$\text{— reta nº 2 (GCCP)} \quad : \quad \hat{y} = 93,9735 - 0,3162 x$$

onde:

\hat{y} é o peso médio estimado no dia x , e

x é o dia do período analisado.

A análise de regressão forneceu as tabelas de análise de variância referentes aos dados dos grupos controle (Tabela III) e carente (Tabela IV).

Evidenciou-se, pelas análises de variância efetuadas que as regressões são significantes e que não são significantes as faltas de ajustamento linear. Em outras palavras, os coeficientes angulares dos modelos lineares são diferentes de zero e não há evidências de que os modelos adotados não sejam os ideais.

A comparação entre os coeficientes angulares dos modelos lineares teóricos foi feita pelo teste t de Student, segundo as fórmulas encontradas em DRAPER e SMITH⁽³⁹⁾.

O valor de t observado, igual a 16,6450, demonstrou existir diferença significativa ao nível de 1% entre os coeficientes angulares das retas analisadas, ou seja, os modelos lineares teóricos possuem inclinações diferentes.

A análise estatística permitiu concluir que o peso dos ratos se alterou durante o período em que foram alimentados com as dietas normoproteica ou hipoproteica e que as evoluções de peso apresentadas pelos dois grupos diferem entre si. Isto é, os animais do grupo controle aumentaram de peso e os do grupo carente tiveram seus pesos diminuídos.

Na Figura 5 estão representadas as retas estimadas que indicam a evolução do peso corpóreo dos animais. Ainda estão representadas regiões de confiança resultantes da análise de regressão. Esses intervalos foram obtidos por $\hat{y}_1 + dp_1$, onde \hat{y}_1 é o valor do peso médio estimado no t -ésimo dia e dp_1 figura como símbolo do desvio padrão, dado pela seguinte fórmula⁽³⁹⁾:

$$dp_1 = \sqrt{\left\{ \frac{1}{n} + \frac{(X_1 - \bar{X})^2}{X_1^2} \right\} s^2}$$

na qual,

n é o número de observações realizadas,

X_1 é o t -ésimo dia,

Tabela III

Análise de Variância Aplicada ao Modelo Linear Teórico Relativo a Evolução do Peso dos Ratos, no Decorrer do Período em que Foram Submetidos à Dieta Normoproteica (GC)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão	1	105 441,3738	105 441,3738	300,5139***
Resíduo	310	108 769,7512	350,8702	
Erro puro	299	106 332,5765	355,6273	
Falta de ajustamento linear	11	2 437,1747	221,5613	0,6230 NS
Total	311	214 211,1250		

***: significante ao nível $\alpha < 0,001$

NS: não significante

GL: Graus de liberdade

SQ: Soma de quadrados

QM: Quadrado médio

Tabela IV

Análise de Variância Aplicada ao Modelo Linear Teórico Relativo a Evolução do Peso dos Ratos, no Decorrer do Período em que Foram Submetidos à Dieta Hipoproteica (GCCP)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão	1	2 372,9107	2 372,9107	15,5654***
Resíduo	310	47 258,6758	152,4473	
Erro puro	299	46 889,7941	156,8221	
Falta de ajustamento linear	11	368,8817	33,5347	0,2138 NS
Total	311	49 631,4190		

***: **significante ao nível $\alpha < 0,001$**

NS: **não significante**

GL: **Graus de liberdade**

SQ: **Soma de quadrados**

QM: **Quadrado médio**

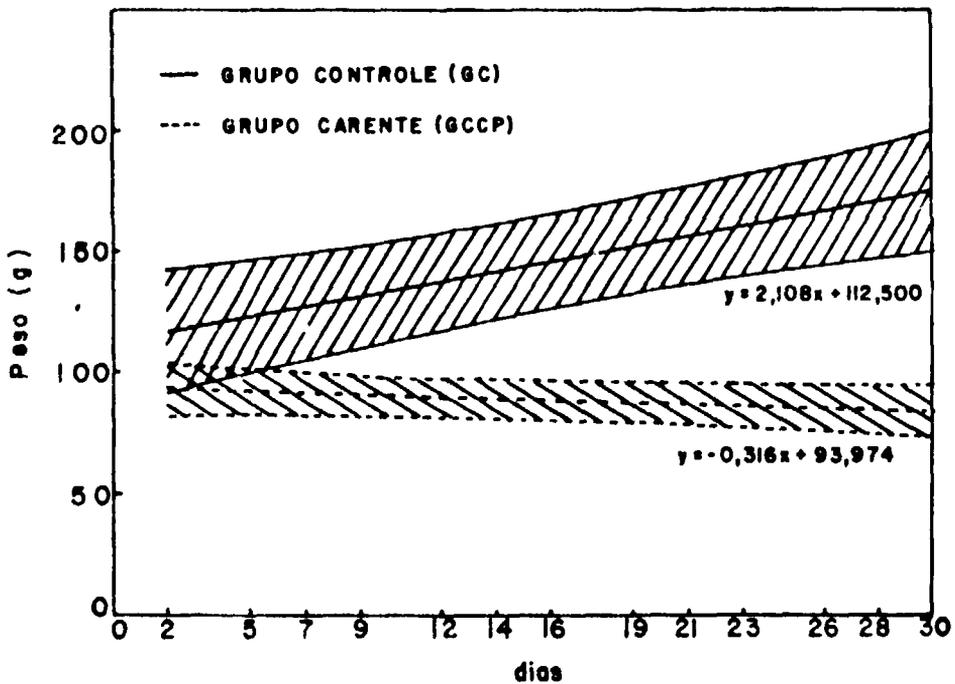


Figura 5 - Evolução do Peso Corpóreo dos Ratos Submetidos às Dietas Normoproteicas (GC) ou Hipoproteicas (GCCP). As Curvas Ponderais foram Calculadas por Regressão Linear, com os Valores Estimados em cada Ponto a Partir da Pesagem Efetuada no Segundo Dia do Período, Quando se Começa a Avaliar as Alterações do Peso dos Animais em Resposta às Dietas Recebidas. As Áreas Hachuradas Representam o Desvio Padrão Acima e Abaixo dos Pontos Pertinentes às Retas

\bar{X} representa o valor médio de dias do período analisado, e

s representa o valor do quadrado médio residual obtido da tabela de análise de variância.

1.3 – Peso Final

Usando as retas de regressão estimaram-se os valores médios dos pesos finais dos ratos dos grupos estudados, relativos ao trigésimo dia do período de dieta. As médias foram, respectivamente, 175,74 gramas para o grupo controle e 84,48 gramas para o grupo carente.

A comparação entre essas médias foi feita pelo teste t de Student, de acordo com DRAPER e SMITH⁽³⁹⁾.

O valor t observado, igual a 3,3862 revelou existir diferença significativa ao nível de 1% entre a média do peso final dos ratos do grupo controle e a média do peso final dos ratos do grupo carente em proteínas.

2 – Concentração de Proteínas Totais e Frações Proteicas Séricas

Os valores individuais da concentração de proteínas totais no soro dos ratos, após terem sido submetidos às dietas normoproteicas ou hipoproteica, estão expressos na Tabela X do apêndice. Esses valores foram estimados colorimetricamente a partir da leitura em uma curva construída com concentrações conhecidas de soro albumina bovina (SAB) (vide Figura 10 no apêndice).

A análise eletroforética do soro dos ratos estudados revelou a presença de seis frações proteicas, em ordem decrescente de cargas elétricas: pré-albumina, albumina globulina alfa₁, globulina alfa₂, globulina beta e globulina gama. Ver exemplo de perfil eletroforético na Figura 6.

De acordo com o método utilizado para o cálculo da concentração relativa dessas frações, foram determinados os valores correspondentes a pré-albumina, albumina e globulinas (expressos na referida Tabela X do apêndice). A concentração das quatro frações globulinas foi estimada em conjunto, visto não ser possível estabelecer com precisão os limites entre as áreas ocupadas por elas nos traçados eletroforéticos.

As médias aritméticas com os respectivos desvios padrão das concentrações de proteínas totais e frações proteicas encontram-se na Tabela seguinte (5); a essas médias corresponde a Figura 7. Dada a pequena área ocupada pela fração pré-albumina no perfil eletroforético determinou-se sua concentração em apenas quatro e três amostras dos grupos controle e carente respectivamente que apresentaram áreas de tamanhos passíveis de serem pesadas.

A comparação das médias das concentrações séricas de proteínas totais, albumina e globulinas, entre os grupos controle e carente foi feita pelo teste t de Student.

Comparando-se as variâncias dessas concentrações, referentes aos dois grupos estudados, pelo teste F⁽³⁸⁾, o valor de F observado foi igual a 0,8866 para as proteínas totais; 1,4566 para a albumina e 1,0506 para as globulinas, demonstrando não existir diferença significativa entre as variâncias comparadas (GL: 23 e 23). Aplicou-se então o teste t de STUDENT para variâncias iguais⁽³⁸⁾, dado pela seguinte fórmula:

$$t = \frac{Y_1 - Y_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) S^2}}$$

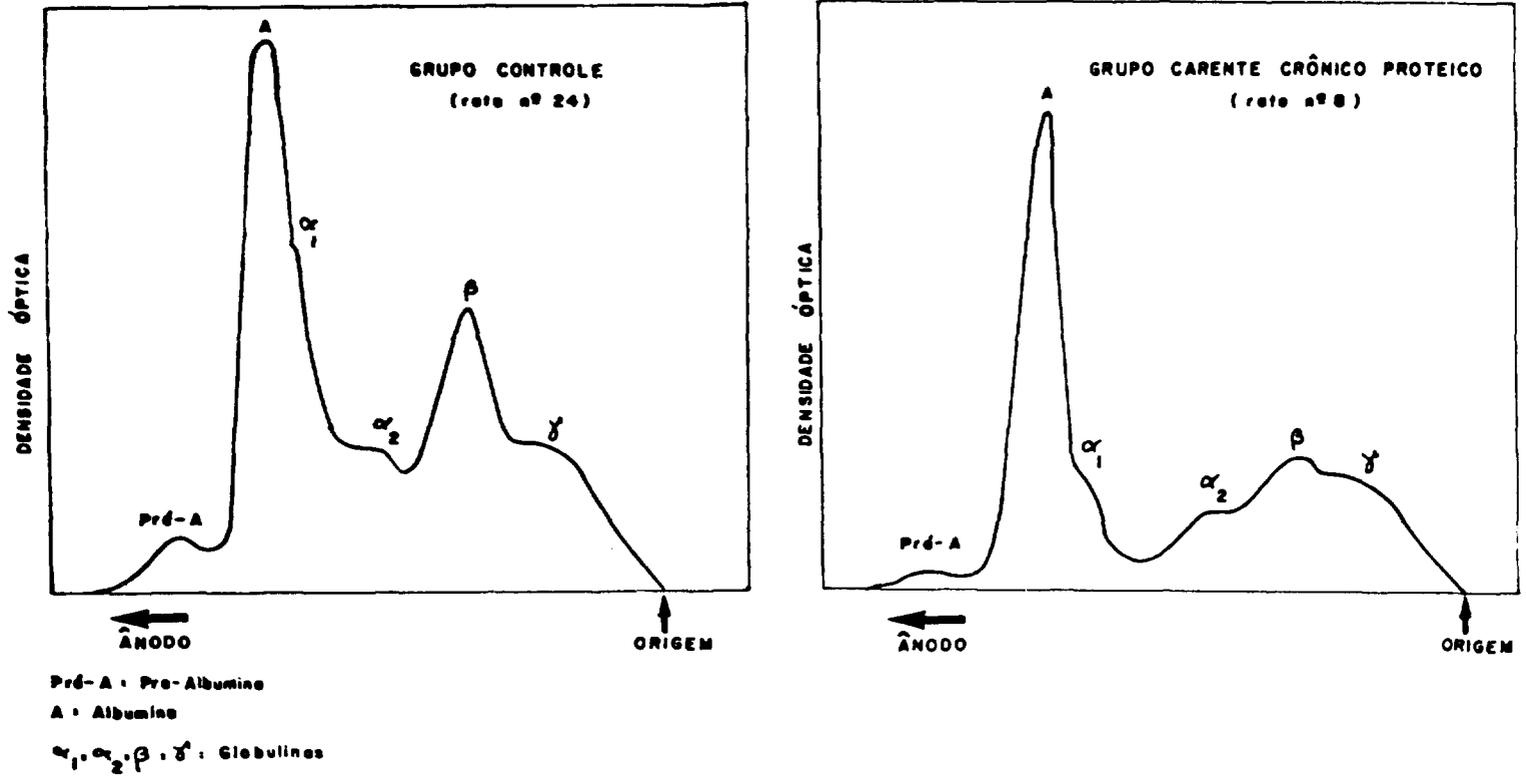


Figura 6 - Perfil Eletroforético de Soro de Ratos, Realizado em Fitas de Acetato de Celulose. (Tampão Veronal Sódico 0,04M, pH 8,4, Tempo de Corrida, de 45 minutos, Voltagem Fixa de 240 V e 1,3 mA por Fita)

Tabela V

Concentração de Proteínas Totais, Pré-Albumina, Albumina e Globulinas no Soro dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Submetido à Carência Crônica de Proteínas (GCCP):

	Proteínas totais g/100 ml		Pré-albumina g/100 ml		Albumina g/100 ml		Globulinas g/100 ml	
	GC	GCCP [†]	GC*	GCCP**	GC	GCCP	GC	GCCP
\bar{x}	7,52	5,69	0,23	0,15	2,63	2,30	4,68	3,14
d.p.	0,52	0,55	0,04	0,02	0,35	0,29	0,41	0,40

\bar{x} : Média

d.p. : Desvio padrão

* : valores estimados a partir de quatro amostras

** : valores estimados a partir de três amostras

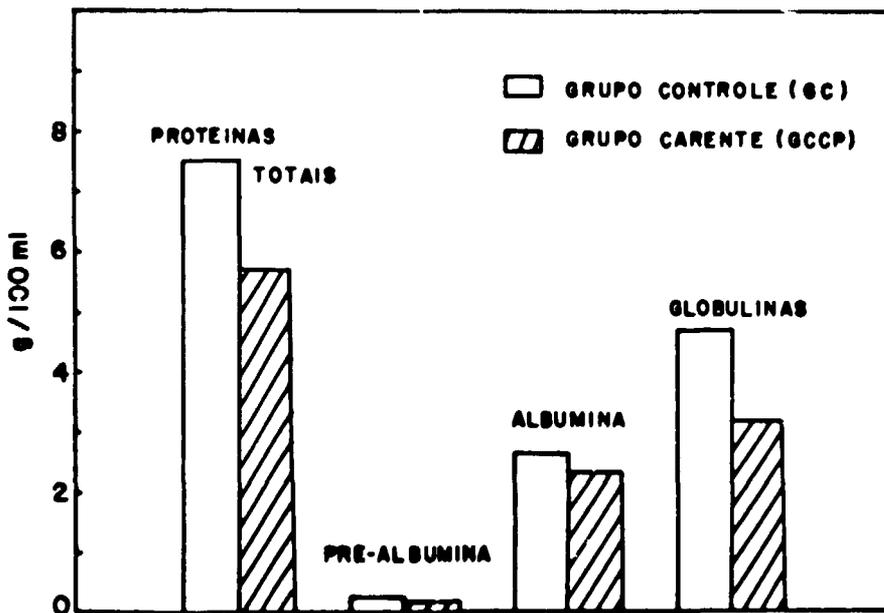


Figura 7 - Concentração de Proteínas Totais e Frações Proteicas Séricas

com $GL = n_1 + n_2 - 2$, onde:

os índices 1 e 2 referem-se respectivamente aos dados dos grupos controle e carente crônico proteico,

n é o número de animais de cada grupo,

\bar{Y} representa o valor médio da concentração analisada,

GL figura como sigla dos graus de liberdade, e

S^2 é obtido pela expressão:

$$S_2^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

na qual s^2 representa a variância da concentração analisada.

O valor de t observado foi igual a 11,8445 para as proteínas totais, 3,5568 para a albumina e 13,1712 para as globulinas, com significância ao nível de $\alpha < 0,001$. Evidenciou-se existir diferença significativa entre as médias da concentração de proteínas totais dos dois grupos estudados. As médias da concentração de albumina dos referidos grupos diferem, significativamente, entre si. Analogamente, existe diferença significativa entre as médias da concentração de globulinas desses grupos.

Apesar dos valores obtidos, referentes a concentração média de pré-albumina terem sido mais elevados no grupo controle, não foi possível aplicar uma análise estatística para comparação dessas médias em virtude do número restrito de amostras ensaiadas em cada grupo.

3 – Concentração de Hormônio Tireotrófico (TSH) no Soro

Os valores individuais da concentração de TSH no soro dos ratos do grupo controle e do grupo carente, determinados pela técnica de radioimunensaio antes e após o estímulo pelo TRH, encontram-se na Tabela XI do apêndice.

As médias aritméticas e os respectivos desvios padrão das concentrações séricas de TSH, estimadas antes e após o estímulo com o hormônio liberador, bem como das respectivas diferenças calculadas, estão expressos na Tabela VI, a essas médias corresponde a Figura 8.

Os resultados referentes às concentrações de TSH foram submetidos a uma análise de variância com uma classificação definindo como tratamento as combinações Grupos e Tempo. A análise revelou diferença altamente significativa entre os tratamentos, o que sugeriu testar certos contrastes, usando para isto o método de comparações múltiplas de SCHEFFÉ⁽¹⁴⁰⁾, (vide Tabela VII).

Não se evidenciou diferença significativa nas concentrações de TSH entre os ratos dos grupos controle e carente antes de serem estimulados com o TRH; estas concentrações foram significativamente diferentes das estimadas nos mesmos animais após a administração do hormônio liberador. Evidenciou-se também que as concentrações determinadas nos dois grupos após o estímulo diferem, significativamente, entre si. Em outras palavras, a análise aplicada permitiu concluir que os níveis basais de TSH sérico dos ratos dos grupos estudados são similares. Os animais de ambos os grupos respondem ao TRH apresentando seus níveis séricos de TSH incrementados, sendo este incremento mais acentuado nos animais submetidos à carência crônica proteica.

Tabela VI

Concentração de Hormônio Tireotrófico (TSH) no Soro dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Carente Crônico Proteico (GCCP), Antes e Após o Estímulo pelo Hormônio Liberador da Tireotrofina (TRH)

Grupos	TSH (ng/ml)	Antes TRH	Após TRH	Diferença
	GC	\bar{x}	225,53	2 165,99
	d.p.	85,53	558,38	549,82
GCCP	\bar{x}	226,45	3 646,47	3 420,02
	d.p.	75,32	639,65	639,96

\bar{x} : Média

d.p. : Desvio padrão

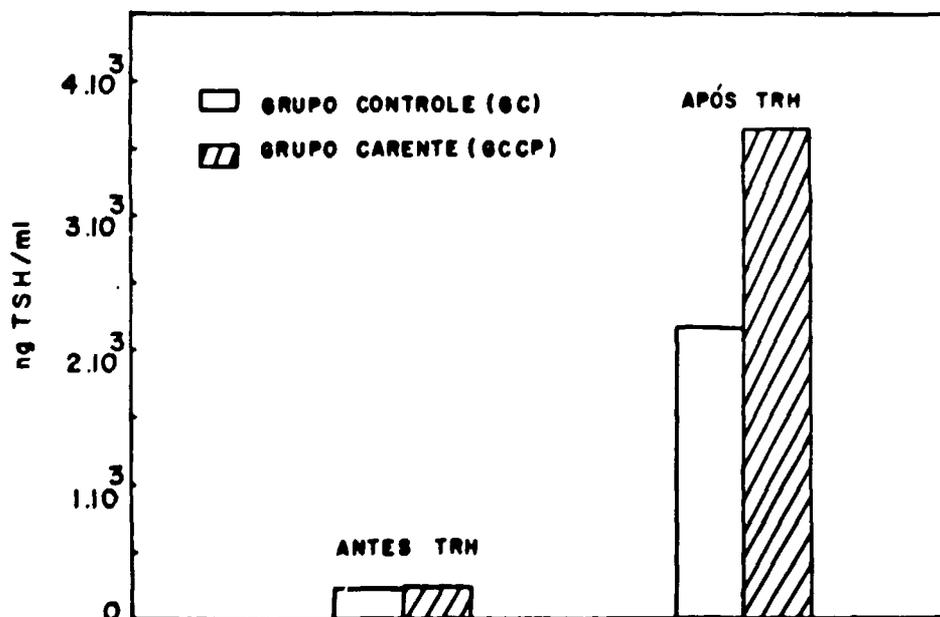


Figura 8 - Concentração de Hormônio Tireotrófico (TSH) no Soro dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Carente Crônico Proteico (GCCP), Antes e Após o Estímulo pelo Hormônio Liberador da Tireotrofina (TRH)

Tabela VII

Análise da Variância Relativa à Comparação das Concentrações de TSH no Soro dos Ratos dos Grupos Controle e Carente, Antes e Depois do Estímulo com TRH

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	3	198 708 937	66 236 312	362,1008***
Contrastes: GCA x GCD				247,0140***
GCCPA x GCCPD				767,3030***
GCD x GCCPD				143,7882***
GCA x GCCPA				0,000058 NS
Resíduo	92	16 828 851	182 922	
Total	95	215 537 788		

***: *significante ao nível $\alpha < 0,001$*

NS: *não significativa*

GCA: *Grupo controle antes TRH.*

GCD: *Grupo controle depois TRH.*

GCCPA: *Grupo carente crônico proteico antes TRH.*

GCCPD: *Grupo carente crônico proteico depois TRH.*

GL: *Graus de liberdade.*

SQ: *Soma de quadrados.*

QM: *Quadrado médio.*

DISCUSSÃO

1 – Modelo Experimental

Os modelos experimentais de má nutrição proteica, com o objetivo de investigar problemas relacionados com os da espécie humana, incluem o uso de animais e dietas deficientes ou isentas de proteínas. A maioria das alterações físicas e bioquímicas que ocorrem nesta síndrome carencial tem sido reproduzida com êxito em ratos jovens ou adultos, após um período experimental relativamente curto^(1,35,98,152).

Muitos autores utilizaram em suas investigações animais de maior porte do que o rato, tais como macacos e porcos^(36,50,61,120). Apesar dos resultados obtidos em macacos serem mais adequados para serem aplicados à espécie humana do que os obtidos em ratos; quando muitas amostras são necessárias, o uso de grandes animais se torna impraticável.

SREBNIK e NELSON⁽¹⁵¹⁾ estudaram a função hipofisária anterior em ratos machos que foram privados de dieta proteica por um período de cinco semanas.

SREBNIK com outros colaboradores⁽¹⁵⁰⁾ estudou também a função tireóidea em ratos fêmeas mantidos em dieta aprotéica por cinco semanas. O mesmo tema foi investigado por COWAN e MARGOSSIAN⁽³⁰⁾ em ratos fêmeas alimentados com dieta isenta de proteínas e deficiente em iodo, durante um período que variou de 24 a 32 dias.

GAITONDE e TAWALKAR⁽⁵⁴⁾ verificaram o efeito do TSH exógeno na liberação de hormônios tireóideos marcados com ¹³¹I em ratos submetidos à dieta carente em proteínas por um período de quatro semanas.

Considerando as observações acima, utilizou-se na elaboração do presente modelo experimental período de 30 dias de carência dietética de proteínas, julgando-o suficiente para induzir as alterações inerentes ao estado de deficiência nutricional.

O modelo deficiente em proteínas foi conseguido alimentando os animais com dieta contendo 3% de caseína, sendo que aos animais controle foi fornecida dieta contendo 15% de caseína.

Estes teores proteicos obedecem ao estudo realizado por HALAC⁽⁶⁵⁾ em ratos, no qual sugere uma ingestão proteica "mínima adequada" para o crescimento dos animais de 15%. Segundo o autor, ingestões abaixo desse nível estariam incluídas no intervalo da má nutrição proteica; asserção esta confirmada por KIRSH e cols.⁽⁷⁷⁾ que desenvolveram em ratos alimentados com dieta contendo 5% de proteínas, distúrbios clínicos, bioquímicos e histológicos similares aos encontrados em crianças portadoras de "kwashiorkor".

2 – Acimação e Manuseio dos Animais

Estudos de carência proteica em ratos revelam a influência da temperatura sobre a ingestão alimentar e o peso dos animais.

HEGSTED e cols.⁽⁶⁷⁾ em experimento com ratos submetidos a depleção proteica, evidenciaram maior perda de peso dos animais expostos durante 11 dias em temperatura baixa (12,8°C) do que nos mantidos a 25,5°C, pelo mesmo período de tempo. Após 35 dias de exposição a essas temperaturas, os animais perderam, respectivamente, 35% e 27% do peso original.

JOBIN e SAMEL⁽⁷³⁾ verificaram que a exposição de ratos ao frio moderado (13°C), durante 24 horas, determinava aumento da tireotrofina e tiroxina plasmáticas à partir de 30 minutos e quatro horas

de exposição, respectivamente. Comparando as respostas de TSH plasmático ao frio de intensidade progressiva, estes autores observaram estímulo máximo para as temperaturas de oito e dois graus centígrados.

Segundo TUOMISTO e cols.⁽¹⁶²⁾ a exposição de ratos ao frio (quatro graus centígrados) durante 30 minutos, após um período de aclimação mínimo de sete dias, sob temperatura constante de 30°C, aumentava muitas vezes o nível de TSH imunoensaiável.

ROWE e cols.⁽¹³³⁾ estudando a relação entre a iluminação ambiental e o eixo hipófise-tireóideo, em ratos, verificaram que a privação de luz resultava no aumento de peso da tireóide e a iluminação constante diminuía o peso da glândula.

Levando em consideração esses dados e a fim de evitar padrões díspares no metabolismo periférico dos hormônios tireóideos dos animais, eles foram mantidos, durante toda a experiência, em ambiente fechado sujeito à iluminação natural por cerca de 12 horas diárias e provido de condicionador de ar com temperatura variando entre 22,7°C e 26,1°C.

Além da temperatura e luz, deve-se considerar a influência de outros estímulos nos níveis de TSH circulante dos ratos. Assim, DUCOMMUN e cols.⁽⁴¹⁾, verificaram que estímulos êxtero-receptivos inespecíficos suaves, a saber, o manuseio e a transferência de ratos de uma sala para outra, conduzem a uma rápida diminuição da concentração plasmática de TSH nesses animais.

Portanto, no presente experimento, evitou-se a variação dos níveis séricos de TSH dos animais, manipulando-os delicadamente por ocasião das freqüentes determinações de seus pesos corpóreos e mantendo-os no mesmo ambiente até o final do experimento.

3 – Método da Depleção do TSH Hipofisário

Alguns fatores foram considerados na aplicação do método da depleção do TSH hipofisário pela injeção do hormônio liberador da tireotrofina (TRH):

3.1 – Anestesia dos Animais

Trabalhos encontrados na literatura têm demonstrado que após o estresse ocorre uma diminuição aguda do TSH plasmático, ao mesmo tempo em que a excreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é máxima.

SAKIZ e GUILLEMIN⁽¹³⁶⁾ verificaram que quando a hipófise é induzida a secretar TSH pelo TRH, ela concomitantemente secreta menos ACTH em resposta ao estresse; inversamente, quando a secreção do ACTH é inibida pela dexametasona durante o estresse, mais TSH é liberado da hipófise em resposta ao TRH. As observações de REDDING e SCHALLY⁽¹²⁶⁾ sobre o acúmulo de TSH na hipófise de camundongos submetidos à injeção intravenosa de histamina, poderoso agente indutor de estresse, suportam estas evidências.

DUCOMMUN e cols.⁽⁴¹⁾ observaram que em ratos mantidos em ambiente tranquilo, até 10 minutos após a injeção intraperitoneal de Nembutal (4,50 miligramas por 100 gramas de peso corpóreo), os níveis de TSH plasmático não diferiam estatisticamente dos níveis determinados nos animais controle, sacrificados no mesmo horário. Segundo MARTIN e REICHLIN⁽⁸⁸⁾, a resposta do TSH plasmático à administração de TRH sintético é afetada pelo tipo de anestesia usada. Esses autores verificaram que o aumento do nível plasmático de TSH, cinco minutos após a administração de 0,1 micrograma de TRH, era comparável nos ratos anestesiados com éter e com pentobarbital. Entretanto, a resposta era significativamente mais prolongada nos animais anestesiados com pentobarbital.

Tendo em vista essas observações, no presente experimento os animais foram anestesiados com pentobarbital, injetado intraperitonealmente na dose de três miligramas por 100 gramas de peso corpóreo, tomando-se a precaução em causar o mínimo possível de estresse no momento da injeção.

3.2 – Administração do TRH

Vários autores já utilizavam a via intracarotídea para a injeção de extratos hipotalâmicos em ratos na investigação dos fatores liberadores dos hormônios folículo estimulante, adrenocorticotrófico, de crescimento e tireotrófico, devido a injeção intracarotídea permitir o uso de menor quantidade de princípios liberadores quando comparada com a intravenosa^(25,34,100,102,107).

PIVA e STEINER⁽¹¹⁸⁾ citam no bioensaio do TRH que a via intracarotídea é preferida porque aumenta a sensibilidade do ensaio e menores quantidades de TRH podem ser usadas. Nesse estudo, os autores observaram a máxima depleção do TSH hipofisário administrando, aos ratos, altas doses de TRH sintético. Com doses de 10 microgramas (μg), verificaram depleção quase imediata e determinaram altos níveis de TSH em soros coletados 10 minutos após a injeção dessa dose. MARTIN e REICHLIN⁽⁸⁸⁾ obtiveram em ratos respostas progressivamente maiores de TSH plasmático aumentando a dose do TRH administrado que variou de 0,001 a cinco microgramas. Entretanto, somente a resposta à maior dose resultou em depleção significativa do TSH hipofisário nos animais sacrificados 15 minutos após a injeção do TRH.

A literatura refere-se à existência de um ciclo circadiano de TSH em ratos, porém as observações sobre este ritmo nictemeral não são concordes e também são um tanto controversas^(6,41,52,73,83,129,141,148). Segundo os trabalhos de BAKKE e LAWRENCE⁽⁶⁾ em ratos machos e de SINGH e cols.⁽¹⁴⁸⁾ em fêmeas, verifica-se que o TSH hipofisário se apresenta elevado às 8,00 horas, diminuindo respectivamente até as 13,00 e 15,00 horas; período no qual SINGH e cols.⁽¹⁴⁸⁾ observaram uma relação inversa entre o TSH hipofisário e plasmático. Apesar de SCHINDLER e cols.⁽¹⁴¹⁾ não terem encontrado, em animais de ambos os sexos, flutuações significativas da concentração de TSH hipofisário, observaram níveis plasmáticos mais elevados pela manhã. Esta observação concorda com os resultados de JOBIN e SAMEL⁽⁷³⁾ e de DUCOMMUN e cols.⁽⁴¹⁾ em ratos machos que encontraram níveis plasmáticos culminantes às 8,00 e 7,00 horas respectivamente. RETIENE e cols.⁽¹²⁹⁾ estimando a concentração hipofisária por um período de 24 horas evidenciaram alguma variação em ratos machos e nenhuma flutuação em fêmeas. Estudando ratos de ambos os sexos, LEPPÄLUOTO e cols.⁽⁸³⁾ verificaram o valor mais alto de TSH sérico às 11,00 horas nos machos e um aumento gradual das 11,00 às 15,00 horas nas fêmeas. FUKUDA e cols.⁽⁵²⁾ demonstraram nítida ritmicidade nictemeral do TSH plasmático de ratos machos, caracterizada pelo zênite às 12,00 horas. A propósito, verifica-se que nas determinações de TSH em ratos os investigadores coletam as amostras na mesma hora do dia a fim de minimizarem as flutuações na concentração desse hormônio^(7,53,75,118,143,162).

Considerando o ritmo circadiano de secreção de TSH e com o intuito de determinar o horário em que a hipófise é mais responsiva ao TRH, avaliou-se em estudo prévio a liberação do TSH hipofisário pela administração de TRH sintético em ratos fêmeas, no período das 8,00 às 12,00 horas⁽¹⁶⁾. Os resultados desta pesquisa sugeriram que entre 9,50 e 10,30 horas a glândula apresenta um nível de secreção de TSH elevado e quase constante⁽¹⁶⁾.

Baseando-se nas considerações acima expostas, procedeu-se à administração intracarotídea de 10 μg de TRH sintético aos ratos, no período compreendido entre 9,50 e 10,30 horas, sacrificando-os 10 minutos após a injeção.

4 – Peso dos Animais

Os ratos dos dois grupos estudados apresentavam no início do experimento pesos iguais, não existindo diferença significativa entre as médias de seus pesos iniciais (páginas 17 e 18).

Observou-se que os ratos alimentados com dieta normoproteica por 30 dias, ganharam 69,79 gramas, ao mesmo tempo em que os alimentados com dieta hipoproteica perderam 17,67 gramas. Tanto o acréscimo como o decréscimo de peso foram significantes quando analisados estatisticamente (páginas 19 a 23), da mesma forma que se evidenciou existir diferença significativa entre as médias dos pesos atingidos pelos ratos dos dois grupos estudados (página 23).

Encontram-se na literatura relatos similares acerca da evolução do peso corpóreo de ratos em estudos sobre carência proteica. A perda de peso foi observada em estudos realizados com animais mantidos em dieta proteica como também em estudos que utilizaram dieta hipoproteica, sendo o ganho de peso evidenciado nos respectivos controles, provistos de dieta normoproteica (2,30,42,47,122,150,151,169).

5 - Concentração de Proteínas Totais e Frações Proteicas Séricas

As médias das concentrações séricas de proteínas totais e frações proteicas analisadas, foram significativamente menores, no grupo carente crônico proteico, quando comparadas às médias correspondentes do grupo controle; o que está de acordo com dados publicados sobre o assunto (1,42,77,98), (páginas 23 a 27).

O nível médio das proteínas totais obtido no grupo controle (7,52 g/100 ml) se aproxima dos citados por MÉNDEZ e MENCHÚ⁽⁹¹⁾ (7,22 g/100 ml), CHANDRASEKHARAN⁽²⁶⁾ (6,85 g/100 ml) e ACHILLES⁽¹¹⁾ (7,90 g/100 ml) verificados em ratos alimentados com dietas normoproteicas, havendo maior similaridade com o nível observado por MÉNDEZ e MENCHÚ⁽⁹¹⁾, antes de submeterem os animais a períodos de restrição alimentar, que utilizaram o mesmo método de dosagem. Com relação ao grupo carente, o resultado obtido (5,69 g/100 ml) se assemelha ao descrito por MÉNDEZ e MENCHÚ⁽⁹¹⁾ (5,86 g/100 ml) em animais mantidos em dieta hipoproteica, sem subsequente privação alimentar, e por MORGAN e PETERS⁽⁵⁸⁾ (5,83 g/100 ml) e ACHILLES⁽¹¹⁾ (5,47 g/100 ml) em animais alimentados com dietas aprotéicas; como também ao obtido por CHANDRASEKHARAN⁽²⁶⁾ (5,88 g/100 ml) em ratos submetidos durante 16 dias à privação alimentar.

Verifica-se nos trabalhos da literatura que o fracionamento de soro normal de ratos, por eletroforese em papel ou acetato de celulose, evidencia a presença de cinco frações proteicas, a saber: albumina, globulina alfa₁, globulina alfa₂, globulina beta e globulina gama^(87,91,132,169). No presente experimento, a análise eletroforética, realizada em fitas de acetato de celulose, revelou a existência de mais uma fração, a pré-albumina (Figura 6). Entretanto, esta fração não foi observada no trabalho de WEIMER e cols.⁽¹⁷⁰⁾ e também nos trabalhos de EDOZIEN⁽⁴²⁾, de CHANDRASEKHARAN⁽²⁶⁾ e de MADI e CAMPOS⁽⁸⁷⁾ que utilizaram a mesma técnica de fracionamento.

Embora a concentração de pré-albumina tenha sido estimada em um pequeno número de amostras, o valor médio observado no grupo carente crônico proteico, diminuído em relação ao grupo controle, concorda com o estudo de INGELBLEEK⁽⁶⁹⁾ em crianças senegalesas portadoras de má nutrição proteico-calórica, em que sugere esta determinação como um sensível indicador de deficiência proteico-calórica.

O valor médio da concentração de albumina estimada no grupo controle (2,63 g/100 ml) é comparável aos valores relatados por WEIMER⁽¹⁶⁹⁾ (2,60 g/100 ml), KIRSCH e cols.⁽⁷⁷⁾ (2,82 g/100 ml) e CHANDRASEKHARAN⁽²⁶⁾ (2,50 g/100 ml), referentes aos ratos controle, alimentados com dieta normoproteica. Considerando-se a somatória dos valores médios das frações globulinas, estimadas separadamente nos mesmos animais do último trabalho citado⁽²⁶⁾, igual a 4,35 gramas por 100 mililitros de soro, poder-se-ia estabelecer uma correlação com o valor médio estimado no presente estudo, que foi igual a 4,68 gramas por 100 mililitros de soro (Tabela V).

O valor da concentração média de albumina observada no grupo carente crônico proteico

(2,30 g/100 ml), concorda com os resultados verificados em trabalhos já mencionados, relativos às investigações realizadas com ratos submetidos a dietas aprroteica⁽¹⁶⁹⁾ (2,30 g/100 ml), ou contendo 5% de proteína antes de serem sujeitos à restrição alimentar⁽⁹¹⁾ (2,45 g/100 ml), ou 1% de lactoalbumina⁽⁴²⁾ (2,40 g/100 ml), ou 0,5% da mesma⁽²⁾ (2,22 g/100 ml) ou mesmo após 16 dias de privação alimentar⁽²⁶⁾ (2,24 g/100 ml). Baseando-se nas somas dos valores médios das frações globulinas analisadas individualmente em estudos já referidos^(26,91), iguais a 3,39 e 3,65 gramas por 100 mililitros de soro respectivamente, verificar-se-ia que as mesmas se aproximam do resultado médio obtido nos animais carentes do presente experimento, igual a 3,14 gramas por 100 mililitros de soro (Tabela V).

Apesar de alguns autores terem observado nos ratos desnutridos níveis de albumina mais altos, ou mais baixos, ou mesmo níveis de globulina menores do que os verificados nos animais desnutridos do presente trabalho^(1,4,42,77,98,152,169), as concentrações de proteínas totais ou frações proteicas, ou ambas, analisadas em trabalhos já citados foram significativamente menores quando comparadas com as observadas nos respectivos animais controle^(1,2,4,26,42,77,91,98,152,169).

Entretanto, a propósito das frações globulinas, MÉNDEZ e MENCHÚ⁽⁹¹⁾ verificaram diminuição significante apenas na subfração alfa₁ em ratos mantidos em dieta hipoproteica e CHANDRASEKHARAN⁽²⁶⁾ nas subfrações alfa e beta em ratos submetidos à privação alimentar. WEIMER e cols.⁽¹⁷⁰⁾, alguns anos antes já haviam observado, em ratos sujeitos à moderada ou aguda restrição alimentar, níveis de proteínas totais séricas, albumina e globulinas alfa₁ e beta significativamente diminuídos e níveis de globulinas alfa₂ e gama normais ou aumentados. Eles concluíram que essas alterações não seriam primariamente um resultado de diferentes graus de hemodiluição, baseando-se nas divergentes respostas das subfrações séricas à realimentação. No mesmo sentido, MÉNDEZ e MENCHÚ⁽⁹¹⁾ e CHANDRASEKHARAN⁽²⁶⁾ afirmam que se as alterações na hemoconcentração fossem o único mecanismo ativo, então todas as frações e subfrações séricas deveriam estar alteradas, proporcionalmente, na mesma direção.

A hipalbuminemia, bioquimicamente, é um achado invariável no desenvolvimento da má nutrição proteico-calórica e têm sido obtida experimentalmente em macacos, porcos e ratos^(36,42,48,50,77,84,120,169). KIRSCH e cols.⁽⁷⁷⁾ observaram que ratos alimentados com dieta hipoproteica apresentaram diminuição de crescimento e hipalbuminemia, distúrbios estes semelhantes aos apresentados por crianças portadoras de "kwashiorkor".

Segundo EDOZIEN⁽⁴²⁾, as alterações associadas com má nutrição proteico-calórica em ratos, incluem perda de peso corpóreo, perda de pelo e diminuição nas concentrações de proteínas totais e albumina plasmáticas.

STEAD e BROCK⁽¹⁵²⁾, estudando o efeito da depleção proteica em ratos jovens, precocemente desmamados, utilizaram como índices primários de má nutrição proteico-calórica, entre outros, níveis de albumina e globulina plasmáticas, os quais se apresentaram diminuídos nesta síndrome carencial.

No presente estudo, os ratos alimentados com dieta hipoproteica desenvolveram os sintomas acima mencionados, indicando que eles foram mantidos em dieta o tempo suficiente para serem considerados deficientes proteicos.

Do ponto de vista nutricional, a proteína mais importante é presumivelmente a albumina. Existem evidências que em condições de carencia dietética de proteínas o catabolismo de albumina é reduzido em homens e animais, e que a meia vida de albumina é prolongada em animais.

Em 1957, GITLIN e JANEWAY⁽⁵⁸⁾ já haviam verificado em camundongos que injeções proteicas reduzidas conduziam a uma diminuição no catabolismo da albumina plasmática e uma diminuição na síntese da albumina.

Estudando o metabolismo dessa proteína sérica em crianças com má nutrição proteica, GITLIN e cols.⁽⁵⁷⁾ concluíram em 1958 que na má nutrição a taxa catabólica de albumina não se alterava e que a hipalbuminemia seria devido primariamente à síntese diminuída.

Entretanto, em 1962, PICOU e WATERLOW⁽¹¹⁰⁾ em estudo similar, sugeriram que a rápida regeneração da albumina plasmática ocorrida em resposta ao tratamento de crianças malnutridas, seria produzida principalmente pela redução na taxa catabólica antes que por qualquer estimulação de síntese. No mesmo ano, COHEN e HANSEN⁽²⁹⁾ examinando a distribuição e a velocidade de renovação da albumina em crianças com "kwashiorkor", encontraram taxas absoluta de síntese e fracionárias de catabolismo diminuídas durante a depleção proteica e aumentadas após a recuperação.

FREEMAN e GORDON em 1964⁽⁴⁹⁾, observaram em ratos deficientes proteicos, redução nas taxas absoluta e fracionária de catabolismo e aumento na meia vida da albumina.

KIRSCH e cols⁽⁷⁸⁾ em 1968, estudando a regulação da síntese e catabolismo da albumina em ratos, verificaram que a redução ou a retirada de proteínas da dieta causava um decréscimo na taxa de síntese, presumivelmente mediante redução na utilização de aminoácidos. A taxa catabólica continuava normal, refletindo uma diminuição gradual na concentração plasmática e no tamanho de compartimento da albumina. Em um certo nível crítico, seguia-se um decréscimo na taxa catabólica. Segundo esses autores, isto seria, provavelmente, uma tentativa para conservar o compartimento de albumina em face da iminente depleção. Conclusões similares foram descritas no mesmo ano por JAMES e HAY⁽⁷²⁾ em estudo com crianças desnutridas, alimentadas com dieta deficiente em proteínas.

Mais recentemente, MORGAN e PETERS⁽⁹⁸⁾ também verificaram em ratos desnutridos diminuição na concentração sérica e biossíntese da albumina, sugerindo que a hipoalbuminemia deveria ser à síntese diminuída que teria como fator limitante o suprimento de aminoácidos. Observaram ainda que a concentração plasmática diminuía menos do que a taxa de síntese, possivelmente em razão da simultânea redução na taxa catabólica, verificada anteriormente por KIRSCH e cols.⁽⁷⁸⁾.

Conforme citam WATERLOW⁽¹⁶⁷⁾, WATERLOW e ALLEYNE⁽¹⁶⁸⁾, parece que quando a ingestão proteica é reduzida, ocorre uma queda na taxa de síntese da albumina, conduzindo a um pequeno decréscimo na concentração plasmática e na massa intravascular da albumina. Porém, a massa intravascular é mantida por dois mecanismos adaptativos: transferência da albumina do compartimento extravascular para o intravascular e redução na taxa catabólica.

6 - Concentração de Hormônio Tireotrófico (TSH) no Soro

6.1 - Método de Dosagem do TSH

A similaridade imunológica entre o TSH bovino e o TSH de ratos proporcionou a muitos investigadores a elaboração de imunossaios capazes de medirem o TSH no plasma de ratos (65,106,127,128,174).

O desenvolvimento de um sistema de radioimunoensaio para TSH de ratos foi descrito inicialmente em 1966 por REICHLIN e cols.⁽¹²⁸⁾. Este ensaio baseava-se na inibição da ligação entre TSH bovino e soro anti-TSH bovino pelo soro e extrato hipofisário de ratos.

WILBER e UTIGER⁽¹⁷⁴⁾, no ano seguinte, desenvolveram um método de radioimunoensaio suficientemente sensível para detectar o TSH no soro de ratos eutireóideos, empregando TSH de tumor tireotrófico de camundongo marcado com ¹²⁵I e soro anti-TSH bovino. Nestes radioimunoensaios heterólogos, os autores citados utilizavam padrões de TSH bovino^(128,174).

Em 1970, REICHLIN e cols.⁽¹²⁷⁾ e GARCIA e MORREALE DE ESCOBAR⁽⁵⁵⁾ desenvolveram radioimunoensaios empregando TSH marcado bovino, soro anti-TSH bovino e extrato bruto de hipófises de ratos, obtendo melhores resultados do que com o uso de padrões de TSH bovino altamente purificado.

Mesmo assim, a determinação do nível absoluto de TSH no plasma de ratos, por imunoenensaio de espécies cruzadas, era difícil e a conclusão final sobre a verdadeira concentração dependia do isolamento e purificação do TSH desses animais. Somente após a obtenção de TSH altamente purificado e soro anti-TSH específico pelo National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A., foi possível a realização de radioimunoensaios completamente homólogos para TSH de ratos^(7,15,51,52,75,80,83,162).

Neste trabalho, pelo motivo exposto, dosou-se o hormônio tireotrófico dos ratos por radioimunoensaio homólogo, utilizando a técnica do duplo anticorpo (páginas 7 a 15).

Os níveis basais de hormônio tireotrófico no plasma ou soro de ratos, referidos na literatura quando dosados por radioimunoensaio homólogos são variáveis^(53,75,83,162). Esta variabilidade depende de certos fatores e já foram mencionados alguns fatores que alteram o nível de hormônio circulante: temperatura^(73,162), estresse^(126,136), manuseio dos animais⁽⁴¹⁾, emprego de anestésicos^(41,88), luz⁽¹³³⁾ e horário da colheita de sangue^(41,52,73,83,141,148). Além desses fatores, deve-se considerar o sexo do animal estudado; FUKUDA e cols.⁽⁵²⁾ e BAKKE e cols.⁽⁷⁾ verificaram que ratos machos apresentavam níveis de TSH circulante mais elevados do que fêmeas.

Os níveis médios basais de TSH sérico, obtidos neste experimento (Tabela VI), aproximam-se dos citados por TUOMISTO e cols.⁽¹⁶²⁾ verificados em animais controle, expostos à temperatura ambiente de 30°C e por FUKUDA e cols.⁽⁵³⁾ determinados no plasma de ratos fêmeas, antes de serem submetidos a uma dieta deficiente em iodo.

6.2 – Depleção do TSH Hipofisário

Já se demonstrou que o hipotálamo produz uma substância reguladora, o hormônio liberador da tireotrofina (TRH), que controla a liberação de hormônio tireotrófico da hipófise anterior. O hormônio liberador é contido nas terminações nervosas da eminência média do hipotálamo e liberado na circulação porta-hipofisária; seguindo até a parte distal da adenohipófise, onde atua na liberação do TSH. A liberação do TSH da hipófise é estimulada pela TRH e inibida pelos níveis aumentados de hormônios tireóideos^(18,21).

O isolamento e a identificação da estrutura do TRH (piroglutamil histidil prolina amida) a partir de centenas de milhares de hipotálamos suínos e ovinos por dois grupos diferentes nos Estados Unidos da América, respectivamente, de SCHALLY e cols.^(45,103,139) e de GUILLEMIN e cols.⁽²³⁾, com subsequente síntese, possibilitou a realização de estudos em animais sobre as interações hipotálamo-hipófise-tireóideas, com maior precisão.

Os resultados de vários estudos fisiológicos conduzidos desde o início da década de 1960 com preparações naturais de TRH, foram confirmados e ampliados com o uso do TRH sintético^(17,19,40,125,126,136,138). Estudos posteriores revelaram que o TRH sintético possui a mesma atividade que o TRH natural^(20,56).

Tem sido estabelecido que o TRH, por meio de um mecanismo de retro-regulação positiva, estimula a liberação do TSH pré-formado e sua neo-síntese^(96,118). Estes dois efeitos podem ser parcialmente dissociados, sendo a síntese um processo mais lento e secundário ao efeito de liberação.

Estudos realizados com hipófises bovinas mostraram que o TRH triciado é ligado especificamente às membranas receptoras hipofisárias⁽⁸¹⁾. Adenil ciclase, a enzima que cataliza a formação de 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico) está associada a essas membranas. A atividade da adenil ciclase é estimulada pela adição de TRH, e os derivativos do AMP cíclico também podem estimular a liberação do TSH "in vitro"⁽¹⁵³⁾. Assim, o TRH atua diretamente estimulando a célula hipofisária por meio da formação de AMP cíclico.

A resposta ao TRH pelo tecido hipofisário exige íons cálcio e traduz-se por um aumento do metabolismo oxidativo da glicose e piruvato, mas não necessita nova síntese proteica^(117,163).

Poderia ainda ser mencionada a possibilidade que o TSH circulante exerça controle direto sobre a secreção hipotalâmica de TRH por meio da denominada retro-regulação de alça curta.

Vários autores, analisando o efeito do TRH exógeno no nível de TSH circulante, encontraram níveis aumentados em resposta a esse hormônio liberador^(7,75,83).

KIEFFER e cols.⁽⁷⁵⁾ verificaram em ratos fêmeas imaturas que receberam TRH, nível de TSH 12 vezes maior do que o de animais tratados com solução fisiológica e LEPPALUOTO e cols.⁽⁸³⁾ observaram um incremento de aproximadamente seis vezes na concentração de TSH sérico de ratos fêmeas normais, em resposta à injeção de 50 microgramas de TRH.

Neste trabalho, após a administração de TRH, o grupo controle incrementou em cerca de 10 vezes seu nível médio basal de TSH sérico, ao mesmo tempo em que o grupo carente sofreu em acréscimo de 17 vezes (Tabela VI).

6.3 – Níveis de TSH na Desnutrição

Verificou-se, no presente experimento, após um período de 30 dias no qual os ratos foram submetidos à carência proteica dietética que o nível sérico basal de TSH não diferiu significativamente em relação aos respectivos níveis dos animais controle. Após o estímulo com o TRH exógeno, tanto os ratos carentes como os controles tiveram um aumento significativo nos níveis séricos de TSH, sendo este incremento maior nos animais carentes (páginas 27 a 30).

Embora PIMSTONE e cols.⁽¹¹³⁾ tenham encontrado níveis basais de TSH circulante aumentados em crianças com má nutrição proteico-calórica, os dados obtidos no presente trabalho concordam com os descritos por GODARD e LEMARCHAND-BÉRAUD^(59,60), GRAHAN e cols.⁽⁶²⁾, CHOPRA e SMITH⁽²⁸⁾ e INGENBLEEK e BECKERS⁽⁷⁰⁾ na má nutrição proteico-calórica, no marasmo e no "kwashiorkor"; por MERIMEE e FINEBERG⁽⁹³⁾ no jejum e por TRAVAGLINI e cols.⁽¹⁶¹⁾ e VIGERSKY e cols.⁽¹⁶⁶⁾ na anorexia nervosa que encontraram níveis basais normais de TSH circulante.

No entanto, são poucos os relatos existentes na literatura que mostram efetivamente um mecanismo de retro-regulação alterado para o sistema hipotálamo-hipófise-tireóideo.

Na opinião de GODARD e LEMARCHAND-BÉRAUD^(59,60) que estudaram crianças com má nutrição grave, a observação da atividade tireóidea diminuída e níveis normais de TSH basal seria compatível com uma função adenohipofisária relativamente deprimida.

INGENBLEEK e BECKERS⁽⁷⁰⁾ sugeriram uma alteração no mecanismo de retro-regulação para explicar a falta de correlação negativa observada entre as concentrações séricas de triiodotironina (T₃) e TSH em pacientes senegaleses com má nutrição proteico-calórica grave.

PIMSTONE e cols.⁽¹¹³⁾ descrevendo níveis basais de TSH elevados e respostas exageradas e prolongadas à estimulação pelo TRH em oito entre 24 crianças com desnutrição proteico-calórica, refutaram a hipótese de uma falha da supressão retro-reguladora pelos hormônios tireóideos circulantes, pois a administração de T₃ exógeno a esses pacientes suprimia prontamente o TSH basal. Propuseram, então que a causa mais provável seria um distúrbio primário da função tireóidea e que a reserva de TSH seria normal, argumentando contra o antigo conceito de uma pseudo-hiposectomia ocorrente na desnutrição⁽¹⁰¹⁾.

Embora na desnutrição a glândula tireóide possa estar realmente alterada estrutural e funcionalmente^(30,43,44,47,66,97,119,123,147,150), e possa ser menos responsiva ao TSH, fato este

contestado pelos trabalhos de STEPHENS⁽¹⁵⁵⁾ e de GAITONDE e TAWALKAR⁽⁵⁴⁾ que encontraram respostas tireóideas exageradas ou normais, respectivamente, "in vivo" ao fator tireotrófico e "in vitro" ao TSH exógeno em animais malnutridos, estas alterações, seguramente, não são devidas, pelo menos quantitativamente, à diminuição de TSH imunorreativo liberado pela hipófise. O conceito de uma diminuída eficiência biológica do TSH na má nutrição, não foi comprovado, visto que o baixo valor da relação entre as concentrações de radioiodo na tireóide e no soro (T/S) e a captação de iodo radioativo pela tireóide, encontrados em ratos privados de proteínas, não aumentaram em resposta ao TSH exógeno^(30,64). A deficiência iódica pode ser afastada teoricamente, conforme citam PIMSTONE e cols.⁽¹¹³⁾, considerando que ela levaria à hiperplasia glandular, fato esse não verificado na desnutrição.

A disponibilidade periférica hormonal parece também estar alterada em consequência ou como causa das modificações no eixo hipotálamo-hipófise-tireóideo decorrentes da má nutrição. Assim, exceto alguns relatos de diminuição nos níveis de tiroxina (T_4) total com níveis normais ou alterados de T_4 livre^(60,62), provavelmente causada pela diminuição de proteínas transportadoras, a alteração mais evidente é um decréscimo no nível de T_3 total e sua resposta normal ao TRH⁽¹²¹⁾.

CHOPRA e SMITH⁽²⁸⁾ sugeriram que o decréscimo de T_3 total, correspondente à diminuição de T_3 livre, com T_4 total normal, observado em pacientes indianos com má nutrição proteico-calórica, provavelmente seria causado por um defeito reversível na conversão extratireóidea de T_4 em T_3 . Conclusões semelhantes foram relatadas nos estudos de INGENBLEEK e BECKERS⁽⁷⁰⁾ realizados com crianças senegalesas desnutridas e de MERIMEE e FINEBERG⁽³³⁾ com adultos submetidos ao jejum; esses autores atribuem a diminuição de T_3 a uma ineficiência da monodesiodação hepática de T_4 .

Portanto, parece estar bem fundamentado o achado de baixos níveis de T_3 e a manutenção de um nível normal de T_4 circulantes na desnutrição, o que teoricamente poderia ser explicado por várias proposições.

A diminuição na concentração das proteínas transportadoras de T_3 poderia ser a causa dos baixos níveis de T_3 circulante com subsequente aumento na fração livre, pois a maior parte deste hormônio está ligada a três proteínas séricas; a globulina (TLG)¹, a albumina e em menor grau a pré-albumina (TLPA)². Contribuem para esta hipótese as reduzidas concentrações de TLPA e albumina encontradas na má nutrição proteico-calórica⁽⁶⁹⁾, porém os níveis de TLG são normais ou mesmo aumentados⁽²⁸⁾. Logo, outros mecanismos devem estar envolvidos, visto que a diminuição das proteínas transportadoras na desnutrição não poderia explicar a baixa concentração de T_3 livre observada por alguns autores⁽²⁸⁾, bem como as concentrações de T_3 diminuídas com T_4 normal, considerando que a tiroxina é transportada pelas mesmas proteínas séricas.

O aumento do consumo periférico de T_3 acarretaria um incremento do consumo de oxigênio, resultando em taxa metabólica basal elevada, situação não encontrada na eventualidade em estudo^(9,97,150).

A síntese glandular alterada não encontra fundamentos visto que as análises qualitativas realizadas por determinados autores, utilizando técnicas cromatográficas, mostraram distribuição normal de iodoaminoácidos na desnutrição proteica experimental^(30,122). Considerando que apenas 30% do nível de T_3 no sangue origina-se da secreção tireóidea, sendo a maior proporção do T_3 circulante proveniente da monodesiodação periférica da tiroxina^(22,142,159), mesmo a inexistência de secreção de T_3 pela tireóide não explicaria a considerável diminuição de T_3 observada na má nutrição.

Tem sido demonstrado que a desiodação periférica da tiroxina pode ser processada de duas formas, resultando na formação de T_3 ou de T_3 reverso (rT_3). Se o iodo é removido do anel fenólico, forma-se 3,3',5'-triiodotironina (T_3); quando a monodesiodação ocorre primeiro no anel tirosil, é formado 3,3',5'-triiodotironina reversa (rT_3)⁽¹⁵⁸⁾.

1 TLG: Tiroxina ligada a globulina.

2 TLPA: Tiroxina ligada a pré-albumina.

A conversão deficiente de T_4 em T_3 , levando à formação hepática de quantidades aumentadas de rT_3 , com a recíproca de T_3 diminuída, observada recentemente por CHOPRA e cols.⁽²⁷⁾ em pacientes com má nutrição proteico-calórica em Calcutá, fornece um possível esclarecimento para a baixa concentração de T_3 observada na desnutrição.

Pode-se supor, portanto que a diminuição da frenação hipofisária na secreção de TSH, observada nos ratos desnutridos do presente trabalho, quando submetidos a administração de TRH, é decorrente desta imperfeita conversão extratireóidea de T_4 . Corrobora esta hipótese o fato da triiodotironina reversa ser quase inativa, não tendo participação nos mecanismos de retro-regulação. Assim, NICOD e cols.⁽¹⁰⁴⁾, em recente trabalho, demonstraram que a administração de rT_3 exógeno não altera as concentrações séricas basais de T_4 , T_3 , TSH e prolactina, ou mesmo as respostas séricas de TSH, prolactina e T_3 ao TRH.

Com base na literatura consultada, este estudo permite supor que a diminuição da frenação hipofisária na secreção de TSH, observada nos animais carentes em resposta ao TRH, possivelmente é causada pela deficiente conversão periférica de tiroxina, ocorrente na desnutrição, levando à formação hepática de quantidades diminuídas de triiodotironina (T_3), com a recíproca de T_3 reverso aumentadas.

Porém, deve-se considerar que a ocorrência de padrões anormais de respostas de TSH ao TRH, respostas atrasadas ou prolongadas, observadas na anorexia nervosa^(32,161,166), também podem sugerir a existência de alterações hipotalâmicas na desnutrição.

Espera-se que estudos futuros sobre o conhecimento das alterações endócrinas na desnutrição venham a concluir estas especulações, definindo o papel adaptativo hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-tireóideo nesta situação.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que este trabalho foi realizado e com a metodologia empregada, os principais fatos observados foram:

- 1) O peso dos animais dos dois grupos estudados, semelhantes no início do experimento, alterou-se no decorrer do período em que foram submetidos às dietas normoproteica ou hipoproteica. Os animais do grupo controle aumentaram de peso e os do grupo carente crônico proteico tiveram seus pesos diminuídos.
- 2) As concentrações séricas das proteínas totais e das frações proteicas analisadas diferiram entre os animais dos grupos controle e carente crônico proteico. Os valores médios das proteínas totais, albumina e globulinas séricas foram significativamente menores no grupo carente.
- 3) Os níveis basais de tireotrofina (TSH) sérica dos animais dos grupos estudados não diferiram significativamente entre si. Os animais dos dois grupos responderam ao hormônio liberador da tireotrofina (TRH) sintético, apresentando seus níveis séricos de TSH significativamente aumentando, sendo este incremento mais acentuado nos animais submetidos à carência crônica proteica.

Tabela VIII

Peso, em Gramas, dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Submetido à Carência Crônica Proteica (GCCP)

PESAGENS														
Ratos Nº	Peso inicial													Peso final
		Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 14	Dia 16	Dia 19	Dia 21	Dia 23	Dia 26	Dia 28	
GC														
1	85	96	101	115	124	122	131	134	141	144	144	150	153	165
2	92	107	104	120	120	125	137	140	151	157	152	159	165	176
3	114	115	124	138	142	147	148	160	165	163	165	168	169	177
4	118	123	135	146	147	155	152	163	166	165	169	173	176	182
5	126	127	138	140	141	150	154	163	164	162	166	168	170	175
6	116	120	143	138	140	152	151	161	166	164	166	170	175	179
7	126	126	129	139	144	150	148	159	153	155	165	170	170	180
8	110	115	120	126	137	139	146	150	148	158	162	164	165	166
9	94	109	120	121	128	138	148	154	154	160	168	169	173	186
10	102	115	125	132	140	140	153	153	153	158	160	164	160	174
11	89	103	115	125	133	146	158	158	157	166	168	170	175	177
12	92	100	109	112	120	124	131	136	138	141	147	148	147	160
13	123	132	145	155	158	165	170	171	176	183	188	190	198	200
14	118	132	144	154	156	167	168	163	171	177	180	181	194	197
15	134	139	147	155	156	165	165	162	168	168	170	168	170	180
16	143	143	151	155	165	169	168	175	177	184	185	187	193	196

APÊNDICE

Continua...

PESAGENS														
Ratos Nº	Peso inicial	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 14	Dia 16	Dia 19	Dia 21	Dia 23	Dia 26	Dia 28	Peso final Dia 30
	GC													
17	121	128	135	140	151	149	151	154	160	163	164	170	174	175
18	93	96	102	113	119	118	124	125	128	128	136	135	138	143
19	130	146	146	157	164	166	172	172	180	180	190	193	197	200
20	76	78	88	99	104	115	119	124	130	141	143	146	159	161
21	94	99	101	122	128	134	140	146	153	164	165	171	177	182
22	89	89	96	112	117	124	130	131	136	150	155	158	170	172
23	77	77	85	96	101	111	121	126	132	143	147	144	165	167
24	50	62	66	79	87	98	102	106	108	117	116	121	126	127
X	105,08	111,54	119,46	128,63	134,25	140,38	145,29	149,42	153,13	157,96	161,29	164,04	169,13	174,88
d.p.	21,09	21,75	22,94	20,79	20,25	19,83	18,08	17,87	17,89	16,36	16,98	16,95	17,24	16,78
GCCP														
1	93	81	81	80	74	77	76	79	79	79	78	78	76	76
2	96	81	81	81	76	74	73	72	72	71	68	68	65	65
3	99	93	88	85	84	82	82	82	82	82	80	78	78	78
4	100	96	89	86	86	81	81	81	81	80	80	80	81	81
5	120	112	107	106	104	102	100	102	102	103	104	105	104	100
6	100	92	88	83	81	80	79	81	81	81	83	84	82	81

Continua...

Continuação da Tabela VIII

PESAGENS														
Ratos Nº	Peso inicial	Die	Peso final											
		2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28	30
GCCP														
7	102	98	97	91	89	87	85	85	85	85	85	85	82	81
8	102	100	94	90	84	82	78	81	81	81	81	81	76	74
9	122	115	115	109	108	108	108	110	110	116	114	118	114	110
10	92	87	84	84	80	78	78	77	74	74	74	74	72	72
11	91	87	81	81	80	78	77	76	76	76	76	76	76	76
12	91	86	86	86	81	81	80	78	77	77	77	77	77	77
13	94	89	87	87	83	83	82	81	80	80	80	80	80	80
14	90	86	86	80	79	79	75	73	74	76	80	74	77	74
15	93	87	85	78	78	78	75	72	74	76	77	74	77	76
16	119	110	108	106	104	104	104	103	103	102	100	100	100	97
17	121	114	114	114	114	114	114	114	114	114	109	109	105	104
18	114	106	105	103	102	100	100	100	98	98	96	96	96	96
19	121	114	114	114	113	111	111	111	110	110	107	107	106	106
20	96	84	84	84	84	81	81	81	81	80	80	80	76	76
21	102	91	88	88	90	84	88	92	92	91	90	88	87	88
22	91	89	89	86	82	82	82	82	81	81	81	80	80	80
23	107	104	104	104	104	103	103	102	102	102	102	101	101	101
24	105	96	95	95	93	92	92	91	91	91	91	90	90	88
\bar{X}	102,54	95,75	93,75	91,71	89,71	88,38	87,67	87,75	87,50	87,75	87,21	86,79	85,75	84,88
d.p.	11,09	11,09	11,34	11,53	12,31	12,33	12,81	13,16	13,06	13,48	12,63	13,38	12,99	12,40

\bar{X} : Média
d.p. : Desvio padrão

Tabela IX

Varição do Peso, em Gramas, dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Carente Crônico Proteico (GCCP). Os Valores desta Tabela Foram Calculados a Partir dos Pesos Estimados em cada Dia de Pesagem. No Decorrer do Período Analisado, com Relação ao Peso Inicial

ACRÉSCIMO DE PESO													
Ratos Nº	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 14	Dia 16	Dia 19	Dia 21	Dia 23	Dia 26	Dia 28	Dia 30
GC													
1	11	16	30	39	37	46	49	56	59	59	65	68	80
2	15	12	28	28	33	45	48	59	65	60	67	73	84
3	1	10	22	28	33	34	46	51	49	51	54	55	63
4	5	17	25	29	37	34	45	48	47	51	55	58	64
5	1	10	14	15	24	28	37	38	36	40	42	44	49
6	4	27	22	24	36	35	45	50	48	50	54	59	63
7	0	3	13	18	24	22	33	27	29	39	44	44	54
8	5	10	16	27	29	36	40	38	48	52	54	55	56
9	15	26	27	34	44	54	60	60	66	74	75	79	92
10	13	23	30	38	38	51	51	51	56	58	62	58	72
11	14	26	36	44	57	69	69	68	77	79	81	86	88
12	8	17	20	28	32	39	44	46	49	55	56	55	68
13	9	22	32	35	42	47	48	53	60	65	67	75	77
14	14	26	36	38	49	50	45	53	59	62	63	76	79
15	5	13	21	22	31	31	28	34	34	36	34	36	46
16	0	8	12	22	26	25	32	34	41	42	44	50	53
17	7	14	19	30	28	30	33	39	42	43	49	53	54
18	3	9	20	26	25	31	32	35	35	43	42	45	50
19	16	16	27	34	36	42	42	50	50	60	63	67	70

Continua...

Continuação da Tabela IX

ACRÉSCIMO DE PESO													
Ratos Nº	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 14	Dia 16	Dia 19	Dia 21	Dia 23	Dia 26	Dia 28	Dia 30
GC													
20	2	12	23	28	39	43	48	54	65	67	70	83	85
21	5	7	28	34	40	46	52	59	70	71	77	83	88
22	0	7	23	28	35	41	42	47	61	66	69	81	83
23	0	8	19	24	34	44	49	55	66	70	67	88	90
24	2	6	19	27	38	42	46	48	57	56	61	66	67
\bar{X}	6,46	14,38	23,42	29,17	35,29	40,21	44,33	48,04	52,88	56,21	63,92	64,04	69,79
d.p.	5,58	7,24	6,67	6,87	7,85	10,44	9,23	10,00	12,58	11,87	15,12	15,14	14,62
DECRÉSCIMO DE PESO													
GCCP													
1	12	12	13	19	16	17	14	14	14	15	15	17	17
2	15	15	15	20	22	23	24	24	25	28	28	31	31
3	6	11	14	15	17	17	17	17	17	19	21	21	21
4	4	11	14	14	19	19	19	19	20	20	20	19	19
5	8	13	14	16	18	20	18	18	17	16	15	16	20
6	8	12	17	19	20	21	19	19	19	17	16	18	19
7	4	5	11	13	15	17	17	17	17	17	17	20	21
8	2	8	12	18	20	24	21	21	21	21	21	26	28
9	7	7	13	14	14	14	12	12	6	8	4	8	12
10	5	8	8	12	14	14	15	18	18	18	18	20	20
11	4	10	10	11	13	14	15	15	15	15	15	15	15

Continua...

Continuação da Tabela IX

DECRÉSCIMO DE PESO													
Ratos Nº	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 14	Dia 16	Dia 19	Dia 21	Dia 23	Dia 26	Dia 28	Dia 30
GCCP													
12	5	5	5	10	10	11	13	14	14	14	14	14	14
13	5	7	7	11	11	12	13	14	14	14	14	14	14
14	4	4	10	11	11	15	17	16	14	10	16	13	16
15	6	8	15	15	15	18	21	19	17	16	19	16	17
16	9	11	13	15	15	15	16	16	17	19	19	19	22
17	7	7	7	7	7	7	7	7	7	12	12	16	17
18	8	9	11	12	14	14	14	16	16	18	18	18	18
19	7	7	7	8	10	10	10	11	11	14	14	15	15
20	12	12	12	12	15	15	15	15	16	16	16	20	20
21	11	14	14	12	18	14	10	10	11	12	14	15	14
22	2	2	5	9	9	9	9	10	10	10	11	11	11
23	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6
24	9	10	10	12	13	13	14	14	14	14	15	15	17
\bar{X}	6,79	8,79	10,83	12,83	14,17	14,88	14,79	15,04	14,79	15,33	15,75	16,79	17,67
d.p.	3,34	3,48	3,69	4,02	4,35	4,77	4,55	4,36	4,73	4,71	4,85	5,19	5,18

 \bar{X} : Média

d.p. : Desvio padrão

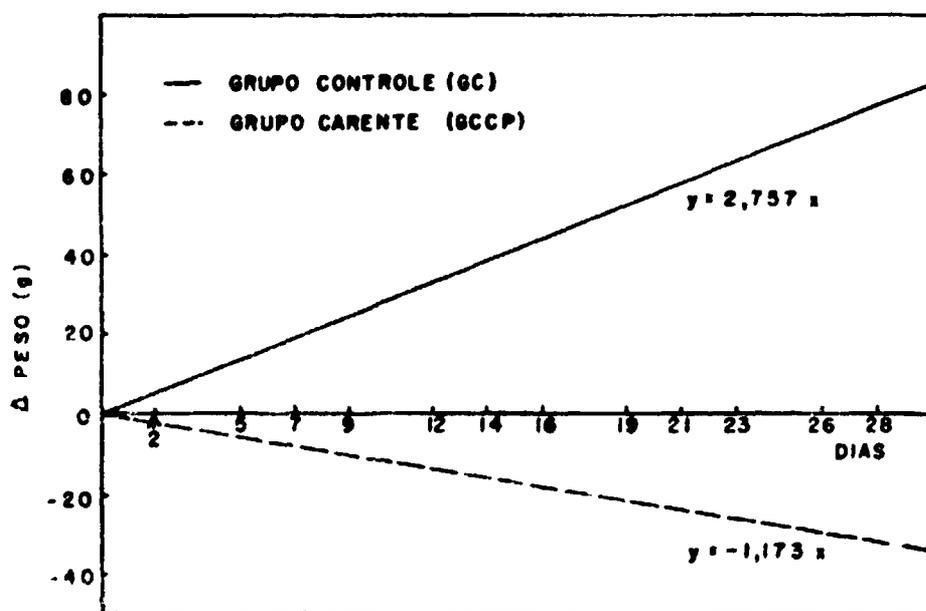


Figura 9 — Variação do Peso Corpóreo dos Ratos Mantidos com Dietas Controle (GC) ou Carente Crônica Proteica (GCCP). A Inclinação das Retas foi Calculada por Regressão a Partir dos Valores Médios Estimados em Cada Dia de Pesagem no Decorrer do Período, com Relação ao Valor Médio da Pesagem Inicial (dia 0)

Tabela X

Concentração de Proteínas Totais, Pré-Albumina, Albumina e Globulinas no Soro dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Submetido à Carência Crônica Proteica (GCCP)

Ratos Nº	Proteínas Totais g/100 ml	Pré-Albumina g/100 ml	Albumina g/100 ml	Globulinas g/100 ml
GC				
1	7,08	---	2,31	4,69
2	7,12	---	2,59	4,44
3	7,76	---	3,06	4,55
4	7,82	---	2,74	4,84
5	7,66	---	2,80	4,72
6	7,52	---	2,54	4,75
7	7,40	---	2,53	4,74
8	8,30	---	3,35	4,75
9	7,62	---	2,48	4,95
10	8,32	---	2,91	5,22
11	7,50	---	2,31	5,06
12	8,12	0,18	3,13	4,74
13	7,96	---	2,37	5,37
14	7,30	---	2,36	4,83
15	6,44	---	2,40	3,85
16	7,80	0,20	2,95	4,36
17	7,90	0,26	2,53	4,99
18	6,92	---	2,25	4,60
19	8,18	---	2,79	5,31
20	8,02	---	3,21	4,66
21	7,20	---	2,91	3,71
22	7,32	---	2,27	4,73
23	6,62	---	2,13	4,24
24	6,78	0,26	2,19	4,21
\bar{X}	7,52	0,23	2,63	4,68
d.p.	0,52	0,04	0,35	0,41

Continua...

Continuação da Tabela X

Ratos Nº	Proteínas Totais g/100 ml	Pré-Albumina g/100 ml	Albumina g/100 ml	Globulinas g/100 ml
GCCP				
1	6,10	---	2,61	3,21
2	4,82	---	2,15	2,55
3	6,26	---	2,29	3,67
4	5,48	---	2,24	3,13
5	6,00	---	1,93	3,87
6	6,28	---	2,47	3,54
7	5,60	---	2,25	3,12
8	6,36	0,16	2,44	3,64
9	5,80	---	2,82	2,74
10	5,32	0,13	2,27	2,81
11	5,78	---	2,39	3,07
12	5,40	---	2,35	2,89
13	5,54	---	1,88	3,40
14	5,72	---	2,19	3,22
15	5,60	0,16	2,11	3,25
16	6,24	---	2,48	3,43
17	5,88	---	2,48	3,11
18	5,40	---	2,01	3,09
19	6,48	---	2,81	3,24
20	4,08	---	1,60	2,31
21	5,10	---	2,57	2,35
22	5,92	---	2,32	3,45
23	6,14	---	2,43	3,43
24	5,18	---	2,05	2,94
\bar{X}	5,69	0,15	2,30	3,14
d.p.	0,55	0,02	0,29	0,40

 \bar{X} : Média

d.p. : Desvio padrão

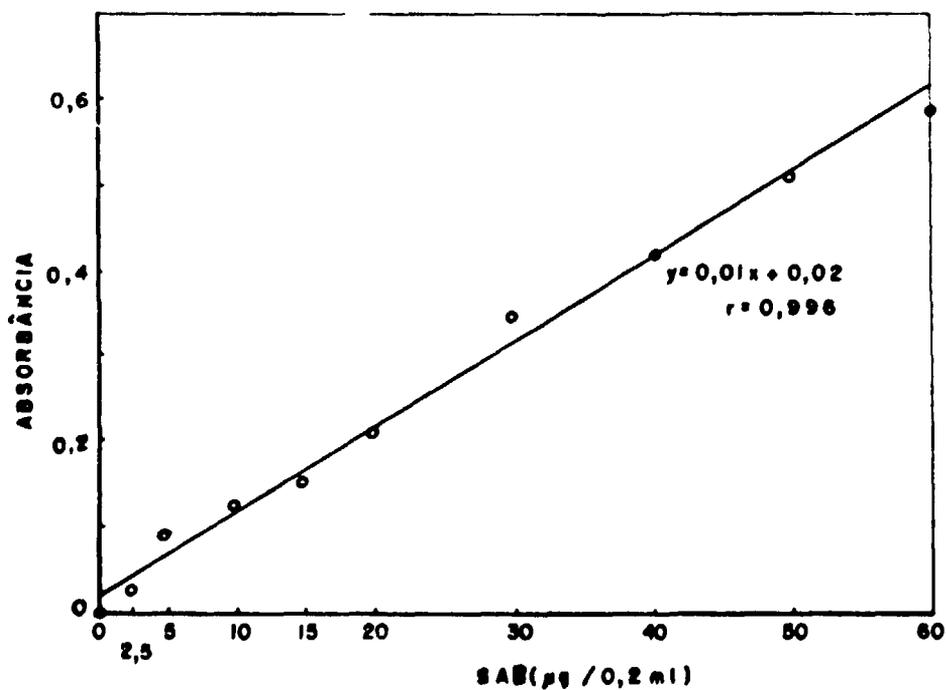


Figura 10 - Representação Gráfica da Curva Padrão de SAB Ajustada para Leitura das Proteínas Totais Séricas. As Concentrações Obtidas a Partir da Reta de Regressão Linear, Foram Expressas em Gramas de Proteína por 100 mililitros de Soro e Multiplicadas pelo Fator de Diluição das Amostras (1 : 400)

Tabela XI

Concentração de Hormônio Tireotrófico (TSH) no Soro dos Ratos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Carente Crônico Proteico (GCCP), Antes e Após o Estímulo pelo Hormônio Liberador da Tireotrofina (TRH)

Ratos Nº	Antes TRH (ng TSH/ml)	Após TRH (ng TSH/ml)	Diferença (ng TSH/ml)
GC			
1	114,00	1 983,50	1 869,50
2	174,33	2 363,50	2 189,17
3	413,73	2 795,00	2 381,27
4	308,27	2 198,67	1 890,40
5	199,13	1 692,00	1 492,87
6	287,53	1 950,00	1 662,47
7	111,40	2 813,00	2 701,60
8	314,27	2 550,00	2 235,73
9	360,87	1 275,00	914,13
10	329,40	2 172,00	1 842,60
11	238,90	3 071,67	2 832,77
12	145,37	1 560,00	1 414,63
13	158,17	2 646,67	2 488,50
14	136,43	1 881,33	1 744,90
15	247,80	2 875,33	2 627,53
16	250,40	2 917,00	2 666,60
17	120,40	1 575,00	1 454,60
18	197,07	1 669,00	1 471,93
19	216,13	2 023,33	1 807,20
20	216,13	3 048,67	2 832,54
21	211,37	1 318,00	1 106,63
22	326,80	1 872,00	1 545,20
23	108,53	1 876,67	1 568,14
24	226,33	2 056,33	1 830,00
\bar{X}	225,53	2 165,99	1 940,46
d.p.	85,53	556,38	549,82

Continua...

Continuação da Tabela XI

Ratos Nº	Antes TRH (ng TSH/ml)	Após TRH (ng TSH/ml)	Diferença (ng TSH/ml)
GCCP			
1	154,80	2 719,00	2 564,20
2	137,47	4 059,00	3 921,53
3	314,27	4 563,83	4 249,56
4	100,73	3 565,67	3 464,94
5	209,67	3 138,83	2 929,16
6	210,33	3 381,50	3 171,17
7	179,97	4 059,00	3 879,03
8	206,77	3 910,00	3 703,23
9	222,40	3 118,67	2 896,27
10	140,77	2 079,00	1 938,23
11	283,47	3 493,67	3 210,20
12	236,00	3 459,33	3 223,33
13	171,57	5 285,33	5 113,76
14	305,33	3 547,67	3 242,34
15	175,27	3 416,00	3 240,73
16	380,47	3 533,67	3 153,20
17	166,73	3 410,83	3 244,10
18	200,20	3 488,33	3 288,13
19	264,60	4 435,00	4 170,40
20	139,00	4 421,33	4 282,33
21	266,43	3 547,67	3 281,24
22	356,47	3 640,33	3 283,86
23	309,50	3 839,00	3 529,50
24	302,60	3 402,67	3 100,07
\bar{X}	226,45	3 646,47	3 420,02
d.p.	75,32	639,65	639,96

 \bar{X} : Média

d.p. : Desvio padrão

ABSTRACT

The purpose of the present work was to evaluate the influences of a protein-deficient diet on rat TSH levels, in basal conditions and after TRH administration.

Two groups of animals were studied, each one composed by 24 rats. One group was fed with a normal-protein diet, with casein content of 15% (control group), and the other was fed with a protein-deficient diet, with a casein content of 3%.

The animals were kept in an air-conditioned room, with controlled temperature and exposed to natural daylight; the experiment lasted 30 days, during which time the animals received food and water "ad libitum".

During the experiment the rats weight was periodically controlled, and its variation analyzed.

At the end of the experience, the total serum protein, albumin, globulins and TSH concentrations were measured. The latter concentration was determined before and after intracarotid administration of 10 micrograms of synthetic for each animal, at a predetermined time, by a radioimmunoassay technique using a double antibody technique to separate free and antibody bound labelled TSH.

The data were statistically evaluated according to appropriate methods.

The animals that, in the two groups studied had similar average initial weight, showed during the experimental period different pattern of weight variation: the control had a weight increase whereas the protein-deficient group showed a decrease ($p < 0,001$).

The concentration of total serum proteins, and protein fractions analyzed, presented significantly lower values in the protein-deficient group, when compared to the control group ($< 0,001$).

The basal level of serum TSH was not significantly different in the two groups studied. After TRH administration, the control group had approximately a tenfold increase in its average basal TSH level, while the protein-deficient group showed a seventeenfold increase significantly higher in the latter ($p < 0,001$).

The present work demonstrated an exaggerated TSH release in response to TRH in the protein-deficient animals, though there was no evidence of an alteration of the basal levels.

These results were discussed on the basis of the existent literature related to clinical and experimental malnutrition. The increased responsiveness to TRH in protein-deficient animals is probably related to the reduced modulation of pituitary TSH secretion by lower triiodothyronine levels due to deficient extrathyroidal thyroxine conversion.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHILLES, P. *Teor do hormônio de crescimento no plasma e na hipófise e balanço de nitrogênio em ratos submetidos à dieta carente em proteínas*. Botucatu, 1973. [Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu].
2. ADAMS, J. L. & LEICHTER, J. Effect of protein-deficient diets with various amounts of carbohydrate on intestinal disaccharidase activities in the rat. *J. Nutr.*, Baltimore, 103:1716-23, 1973.
3. ADIBI, S. A. & DRASH, A. L. Hormone and amino acid levels in altered nutritional states. *J. Lab. clin. Med.*, St. Louis, 76:722-32, 1970.

* Referência bibliográfica apresentada de acordo com o PNB⁶⁶ de Associação Brasileira de Normas Técnicas. Os títulos dos periódicos foram abreviados segundo World List of Scientific Periodicals, ed, 1963.

4. ADLARD, B. P. F.; HAMID, J.; LABEDZ, R. & McFARLANE, H. Uptake of (³H) corticosterone and the immune response in growth-retarded rats. *Pediat. Res.*, Baltimore, 7:883-7, 1973.
5. ALLEYNE, G. A. O. & YOUNG, V. H. Adrenocortical function in children with severe protein-calorie malnutrition. *Clin. Sci.*, London, 33:189-200, 1967.
6. BAKKE, J. L. & LAWRENCE, N. Circadian periodicity in thyroid stimulating hormone titer in the rat hypophysis and serum. *Metabolism*, Baltimore, 14:841-3, 1965.
7. BAKKE, J. L.; LAWRENCE, N. L.; BENNETT, J. & ROBINSON, S. Late effects of neonatal undernutrition and overnutrition on pituitary-thyroidal and gonadal function. *Biol. Neonate*, Basel, 27:259-70, 1975.
8. BAMJI, M. S. & SATOSKAR, R. S. Could severe undernutrition in children affect the thyroid function? *J. postgrad. Med.*, Bombay, 10:135-6, 1964.
9. BEAS, F.; MÖNCKEBERG, F. & HORWITZ, I. The response of the thyroid gland to thyroid-stimulating hormone (TSH) in infants with malnutrition. *Pediatrics. Springfield*, 38:1003-8, 1966.
10. BECKER, D. J.; KRONHEIM, S. & PIMSTONE, B. L. Serum growth hormone responses to thyrotrophin releasing hormone in children with protein-calorie malnutrition. *Horm. Metab. Res.*, New York, 7:358-9, 1975.
11. BECKER, D. J.; VINIK, A. I.; PIMSTONE, B. L. & PAUL, M. Prolactin responses to thyrotrophin-releasing hormone in protein-calorie malnutrition. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 41:782-3, 1975.
12. BEST, C. H.; HARTROFT, W. S.; LUCAS, C. C. & RIDOUT, J. H. Effects of dietary protein, lipotropic factors, and re-alimentation on total hepatic lipids and their distribution. *Br. med. J.*, London:1439-44, June 18, 1955.
13. BEUMONT, P. J. V.; GEORGE, G. C. W.; PIMSTONE, B. L. & VINIK, A. I. Body weight and the pituitary response to hypothalamic releasing hormones in patients with anorexia nervosa. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 43:487-96, 1976.
14. BONEQUI, C. C. Funcion tiroidea en la desnutricion proteico-calorica infantil. *Gac. méd. Méx.*, México, 97:1558-63, 1967.
15. BORGHI, V. C.; BOJARCZUK, C.; NICOLAU, W. & PIERONI, R. R. Radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) no soro de ratos, pela técnica do "duplo anticorpo". *Revta Biol. Med. nucl.*, Buenos Aires, 7:141-2, 1975.
16. BORGHI, V. C.; NICOLAU, W.; BOJARCZUK, C. & PIERONI, R. R. Avaliação da responsividade da hipófise ao hormônio hipotálamico (TRH) em ratos, no período das 8,00 às 12,00 horas. *Clínc. Cult.*, São Paulo, 29:47-50, 1977.
17. BOWERS, C. Y.; LEE, K. L. & SCHALLY, A. V. Effect of actinomycin D on hormones that control the release of thyrotrophin from the anterior pituitary glands of mice. *Endocrinology*, Glendale, 82:303-10, 1968.
18. BOWERS, C. Y.; LEE, K. L. & SCHALLY, A. V. A study on the interaction of the thyrotrophin-releasing factor and L-triiodothyronine: effects of puromycin and cycloheximide. *Endocrinology*, Glendale, 82:75-82, 1968.

19. BOWERS C. Y.; REDDING, T. W. & SCHALLY, A. V. Effect of thyrotropin releasing factor (TRF) of ovine, bovine, porcine and human origin on thyrotropin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, Glendale, 77:609-16, 1965.
20. BOWERS, C. Y.; SCHALLY, A. V.; ENZMANN, F.; BOLER, J. & FOLKERS, K. Porcine thyrotropin releasing hormone is (Pyro) Glu-His-Pro (NH₂). *Endocrinology*, Glendale, 86:1143-53, 1970.
21. BOWERS, C. Y.; SCHALLY, A. V.; REYNOLDS, G. A. & HAWLEY, W. D. Interactions of L-thyroxine or L-triiodothyronine and thyrotropin - releasing factor on the release and synthesis of thyrotropin from the anterior pituitary gland of mice. *Endocrinology*, Glendale, 81:741-7, 1967.
22. BRAVERMAN, L. E.; INGBAR, S. H. & STERLING, K. Conversion of thyroxine (T₄) to triiodothyronine (T₃) in athyreotic human subjects. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 49:855-64, 1970.
23. BURGUS, R.; DUNN, T. F.; DESIDERIO, D.; WARD, D. N.; VALE, W. & GUILLEMIN, R. Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature, Lond.*, 226:321-5, 1970.
24. CAHILL, G. F.; HERRERA, M. G.; MORGAN, A. P.; SOELDNER, J. S.; STEINKE, J.; LEVY, P. L.; REICHARD JR, G. A. & KIPNIS, D. M. Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 45:1751-69, 1966.
25. CASENTINI, S.; DE POLI, A.; HUKOVIC, S. & MARTINI, L. Studies on the control of corticotrophin release. *Endocrinology*, Glendale, 64:483-93, 1965.
26. CHANDRASEKHARAN, N. Effect of prolonged starvation and subsequent realimentation on serum proteins. *Nutr. Metabol.*, Basel, 14:181-90, 1972.
27. CHOPRA, I. J.; CHOPRA, U.; SMITH, S. R.; REZA, M. & SOLOMON, D. H. Reciprocal changes in serum concentration of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T₃) and 3,3',5-triiodothyronine (T₃) in systemic illnesses. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 41:1043-9, 1975.
28. CHOPRA, I. J. & SMITH, S. R. Circulating thyroid hormones and thyrotropin in adult patients with protein-calorie malnutrition. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 40:221-7, 1975.
29. COHEN, S. & HANSEN, J. D. L. Metabolism of albumin and γ -globulin in kwashiorkor. *Clin. Sci.*, London, 23:351-9, 1962.
30. COWAN, J. W. & MARGOSSIAN, S. Thyroid function in female rats severely depleted of body protein. *Endocrinology*, Glendale, 79:1023-6, 1966.
31. CRAVIOTO, J.; DELICARDIE, E. R. & BIRCH, H. G. Nutrition, growth and neurointegrative development: an experimental and ecologic study. *Pediatrics, Springfield*, 38:319-72, 1966.
32. CROXSON, M. S. & IBBERTSON, H. K. Low serum triiodothyronine (T₃) and hypothyroidism in anorexia nervosa. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 44:167-74, 1977.
33. D'ANGELO, S. A. The effect of acute starvation on the thyrotropic hormone level in the blood of the rat and mouse. *Endocrinology*, Glendale, 48:341-3, 1951.
34. DAVID, M. A.; FRASCHINI, F. & MARTINI, L. An *in vivo* method for evaluating the hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor. *Experientia*, Basel, 21:483-4, 1965.

35. DE ANGELIS, R. C. "Modelos experimentais para o estudo da carência proteica" – função absorptiva intestinal e apetite. São Paulo, 1975. [Tese de livre-docência, Universidade de São Paulo].
36. DEO, M. G.; SOOD, S. K. & RAMALINGASWAMI, V. Experimental protein deficiency. *Archs. Path.*, Chicago, 80:14-23, 1965.
37. DEUTSCH, H. F. Preparation of immunoglobulin concentrates. In: WILLIAMS, C. A. & CHASE, M. W., eds. *Methods in immunology and immunochemistry*. 3.ed. New York, Academic Press, 1970. v.1, p.319-20.
38. DIXON, W. J. & MASSEY JR., F. J. *Introduction to statistical analysis*. 3.ed. New York, McGraw-Hill, 1969.
39. DRAPER, N. R. & H. *Applied regression analysis*. New York, Wiley, 1966.
40. DUCOMMUN, P.; SAKIZ, E. & GUILLEMIN, R. Increase of plasma TSH concentration following injection of purified hypothalamic TRF. *Endocrinology*, Glendale, 77:792-6, 1965.
41. DUCOMMUN, P.; SAKIZ, E. & GUILLEMIN, R. Lability of plasma TSH levels in the rat in response to nonspecific exteroceptive stimuli. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 121:921-3, 1966.
42. EDOZIEN, J. C. Experimental kwashiorkor and marasmus. *Nature, Lond.*, 220:917-9, 1968.
43. EL-GHOLMY, A.; GHALEB, H.; KHALIFA, A. S.; SENNA, A. & EL-AKKAD, S. Studies on thyroid function in malnourished infants and children in Egypt. *J. trop. Med. Hyg.*, London, 70:74-80, 1967.
44. EMANUEL, R. W. Endocrine activity in anorexia nervosa. *J. clin. Endocr.*, Springfield, 16:801-16, 1956.
45. ENZMANN, F.; BOLER, J.; FOLKERS, K.; BOWERS, C. Y. & SCHALLY, A. V. Structure and synthesis of the thyrotropin-releasing hormone. *J. mednl Chem.*, Washington, 14:469-74, 1971.
46. FAHEY, J. L. Chromatographic separation of immunoglobulins. In: WILLIAMS, C. A. & CHASE, M. W., eds. *Methods in immunology and immunochemistry*. 3.ed. New York, Academic Press, 1970. v.1, p.323-4.
47. FLORSHEIM, W. H.; SUHR, B. Z.; MIRISE, R. T. & WILLIAMS, A. D. Thyroid function in protein-depleted rats. *J. Endocr.*, Oxford, 48:93-9, 1970.
48. FOLLIS JR, R. H. A kwashiorkor-like syndrome observed in monkeys fed maize. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 98:523-8, 1957.
49. FREEMAN, T. & GORDON, A. H. Metabolism of albumin and γ -globulin in protein deficient rats. *Clin. Sci.*, London, 26:17-26, 1964.
50. FRIEND, C. J.; HEARD, C. R. C.; PLATT, B. S.; STEWART, R. J. C. & TURNER, M. R. The effect of dietary protein deficiency on transport of vitamin A in the blood and its storage in the liver. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, 15:231-40, 1961.
51. FUKUDA, H. & GREER, M. A. The effect of basal hypothalamic deafferentation on the nycthemeral rhythm of plasma TSH. *Endocrinology*, Glendale, 97:749-52, 1975.

52. FUKUDA, H.; GREER, M. A.; ROBERTS, L.; ALLEN, C.F.; CRITCHLOW, V & WILSON, M. Nycthemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine. *Endocrinology*, Glendale, 97:1424-31, 1975.
53. FUKUDA, H.; YASUDA, N.; GREER, M. A.; KUTAS, M. & GREER, S. E. Changes in plasma thyroxine, triiodothyronine, and TSH during adaptation to iodine deficiency in the rat. *Endocrinology*, Glendale, 97:307-14, 1975.
54. GAITONDE, B. B. & TAWALKAR, S. C. A study of thyrotropia stimulated ^{131}I release *in vitro* by thyroid glands obtained from normal and protein deficient rats. *Biochem. Med.*, New York, 12:340-7, 1975.
55. GARCIA, M. D. & MORREALE DE ESCOBAR, G. Radioimmuno and McKenzie assays for rat TSH. In: FELLINGER, K. & HÖFER, R., eds. *Further advances in thyroid research: 6th international conference, 1970, Vienna, Austria*. Vienna, 1972. v.2, p.1137-54.
56. GILLESSEN, D.; FELIX, A. M.; LERGIER, W. & STUDER, R. O. Synthese des "thyrotropin-releasing" hormons (TRH) (Schaf) und verwandter peptide. *Helv. chim. Acta*. Basel, 53:63-72, 1970.
57. GITLIN, D.; CRAVIOTO, J.; FRENK, S.; MONTANO, E. L.; GALVAN, R. R.; GOMEZ, F. & JANEWAY, C. A. Albumin metabolism in children with protein malnutrition. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 37:682-6, 1958.
58. GITLIN, D.; & JANEWAY, C. A. Plasma protein sparing effect and carbohydrates: abstract. *Am. J. Dis. Child.*, Chicago, 93:79, 1957.
59. GODARD, C. & LEMARCHAND-BÉRAUD, T. Valores de tiroestimulina plasmática en la malnutrición infantil. (Free papers of International Congress of Pediatrics, 12. México, 1968. Proceedings . . . México. 1968). p.191.
60. GODARD, C. & LEMARCHAND-BÉRAUD, T. Plasma thyrotropin levels in severe infantile malnutrition. *Hormone Res.*, Basel, 4:43-52, 1973.
61. GOPALAN, C. & RAMANATHAN, K. S. Response to water load tests in induced protein deficiency. *Indian J. med. Res.*, Calcutta, 45:65-70, 1957.
62. GRAHAM, G. G.; BAERTL, J. M.; CLAEYSSEN, G.; SUSKIND, R.; GREENBERG, A. H.; THOMPSON, R. G. & BLIZZARD, R. M. Thyroid hormonal studies in normal and severely malnourished infants and small children. *J. Pediat.*, St. Louis, 83:321-31, 1973.
63. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M. & GLOVER, J. S. The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, Liverpool, 89:114-23, 1963.
64. GUÉRIN, M. T. & ASCHKENASY, A. Action des injections de thyroxine et d'hormone thyrotrope sur le métabolisme de ^{131}I chez des rats carencés en protéines. *C. r. Séan. Soc. Biol.*, Paris, 154:1405-9, 1960.
65. HALAC, E. Studies of protein reserves: the relation between protein intake and resistance to protein deprivation. *Am. J. clin. Nutr.*, New York, 11:574-6, 1962.
66. HEARD, C. R. C. & STEWART, R. J. C. Protein-calorie deficiency and disorders of the endocrine glands. *Hormones*, London, 2:40-64, 1971.
67. HEGSTED, D. M.; MILNER, J. P.; WILSON, D. & GINNA, P. Changes in muscle water and composition induced by protein depletion in rat at two environmental temperatures. *Am. J. Physiol.*, Boston, 172:14-8, 1953.

68. HOFER, M. A. The role of nutrition in the physiological and behavioral effects of early maternal separation on infant rats. *Psychosom. Med.*, Washington, 35:350-9, 1973.
69. INGENBLEEK, Y. Measurement of prealbumin as index of protein-calorie malnutrition. *Lancet*, London, 2:106-8, 1972.
70. INGENBLEEK, Y. & BECKERS, C. Triiodothyronine and thyroid-stimulating hormone in protein-calorie malnutrition in infants. *Lancet*, London, 2:845-8, 1975.
71. INGENBLEEK, Y.; DE NAYER, P. & DE VISSCHER, M. Thyroxine-binding globulin in infant protein-calorie malnutrition. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 39:178-80, 1974.
72. JAMES, W. P. T. & HAY, A. M. Albumin metabolism: effect of the nutritional state and the dietary protein intake. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 47:1958-72, 1968.
73. JOBIN, M. & SAMEL, M. Pituitary-thyroid response to cold exposure in the rat. *Proc. can. Fed. Biol. Socs*, 7:23, 1964.
74. KENNEDY, G. C. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *J. Endocr.*, Oxford, 16:9-17, 1957.
75. KIEFFER, J. D.; WEINTRAUB, B. D.; BAIGELMAN, W.; LEEMAN, S. & MALLOOF, F. Homologous radioimmunoassay of thyrotropin in rat plasma. *Acta endocr. Copenh.*, 76:495-505, 1974.
76. KING, T. P. Cellulose ion exchange chromatography. In: WILLIAMS, C. A. & CHASE, M. W. eds. *Methods in immunology and immunochemistry*. New York, Academic Press, 1968. v.2, p.154-60.
77. KIRSCH, R. E.; BROCK, J. F. & SAUNDERS, S. J. Experimental protein-calorie malnutrition. *Am. J. clin. Nutr.*, New York, 21:820-6, 1968.
78. KIRSCH, R. E.; FRITH, L.; BLACK, E. & HOFFENBERG, R. Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. *Nature, Lond.*, 217:578-9, 1968.
79. KNITTLE, J. L. & HIRSCH, J. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 47:2091-8, 1968.
80. KOJIMA, A. & HERSHMAN, J. M. Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in maternal, fetal and newborn rats. *Endocrinology*, Glendale, 94:1133-8, 1974.
81. LABRIE, F.; BARDEN, N.; POIRIER, G. & DE LEAN, A. Binding of thyrotropin-releasing hormone to plasma membranes of bovine anterior pituitary gland. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 69:283-7, 1972.
82. LEATHEM, J. H. Hormones and protein nutrition. *Recent Prog. Hormone Res.*, New York, 14:141-82, 1958.
83. LEPPÄLUOTTO, J.; RANTA, T. & TUOMISTO, J. Diurnal variation of serum immunoassay thyrotropin (TSH) concentration in the rat. *Acta physiol. scand.*, Stockholm, 90:699-702, 1974.
84. LOWREY, R. S.; POND, W. G.; BARNES, R. H.; KROOK, L. & LOOSLI, J. K. Influence of caloric level and protein quality on the manifestations of protein deficiency in the young pig. *J. Nutr.*, Baltimore, 78:245-53, 1962.

85. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. biol. Chem.*, Baltimore, 193:265-75, 1951.
86. LUNDBERG, P. O.; WALINDER, J.; WERNER, I. & WIDE, L. Effects of thyrotropin-releasing hormone on plasma levels of TSH, FSH, LH and GH in anorexia nervosa. *Eur. J. clin. Invest.*, Berlin, 2:150-3, 1972.
87. MADI, K. & CAMPOS, S. D. Desnutrição experimental: resultados anátomo-patológicos e bioquímicos da administração de dietas hipoproteicas a ratos albino jovens. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 73:153-81, 1975.
88. MARTIN, J. B. & REICHLIN, S. Plasma thyrotropin (TSH) response to hypothalamic electrical stimulation and to injection of synthetic thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology*, Glendale, 90:1079-85, 1972.
89. MAURER, P. H. The quantitative precipitin reaction. In: WILLIAMS, C. A. & CHASE, M. W. eds. *Methods in immunology and immunochemistry*. New York, Academic Press, 1971. v.3, p.1-58.
90. MCLAREN, D. S.; SHIRAJIAN, E.; LOSHKAJIAN, H. & SHADAREVIAN, S. Short-term prognosis in protein-calorie malnutrition. *Am. J. clin. Nutr.*, New York, 22:863-70, 1969.
91. MÉNDEZ, J. & MENCHÚ, M. T. Effect of dietary protein level prior to acute starvation on serum proteins in rat. *J. nutr.*, Baltimore, 88:365-9, 1966.
92. MERIMEE, T. J. & FINEBERG, E. S. Growth hormone secretion in starvation: a reassessment. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 39:385-6, 1974.
93. MERIMEE, T. J. & FINEBERG, E. S. Starvation-induced alterations of circulating thyroid hormone concentrations in man. *Metabolism*, Baltimore, 25:79-83, 1976.
94. MILNER, R. D. G. Hormonal and metabolic interrelationships in malnutrition: abstract. *Arch. Dis. Childh.*, London, 45:276, 1970.
95. MILNER, R. D. G. Metabolic and hormonal responses to oral amino acids in infantile malnutrition. *Arch. Dis. Childh.*, London, 46:301-5, 1971.
96. MITTLER, J. C.; REDDING, T. W. & SCHALLY, A. V. Stimulation of thyrotropin (TSH) secretion by TSH-releasing factor (TRF) in organ cultures of anterior pituitary. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 130:406-9, 1969.
97. MÖNCKEBERG, F.; BEAS, F.; HORWITZ, I.; DABANCENS, A. & GONZÁLEZ, M. Oxygen consumption in infant malnutrition. *Pediatrics, Springfield*, 33:554-61, 1964.
98. MORGAN, E. H. & PETERS JR, T. The biosynthesis of rat serum albumin. Effect of protein depletion and refeeding on albumin and transferrin synthesis. *J. biol. Chem.*, Baltimore, 246:3500-7, 1971.
99. MOSHANG, JR, T.; PARKS, J. S.; BAKER, L.; VAIDYA, V.; UTIGER, R. D.; BONGIOVANNI, A. M. & SNYDER, P. J. Low serum triiodothyronine in patients with anorexia nervosa. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 40:470-3, 1975.
100. MOTTA, M.; PIVA, F.; FRASCHINI, F. & MARTINI, L. "Pituitary depletion methods" for the bioassay of hypothalamic releasing-factors. In: MEITES, J., ed. *Hypophysiotropic hormones of the hypothalamus—essay and chemistry: proceedings of the workshop conference, Tucson, Arizona, Jan. 8-11, 1969*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1970. p.44-59.

101. MULINOS, M. G. & POMERANTZ, L. Pseudo-hypophysectomy. A condition resembling hypophysectomy produced by malnutrition. *J. Nutr.*, Baltimore, 19:493-504, 1940.
102. MÜLLER, E. E.; ARIMURA, A.; SAWANO, S.; SAITO, T. & SCHALLY, A. V. Growth hormone-releasing activity in the hypothalamus and plasma of rats subjected to stress. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 125:874-8, 1967.
103. NAIR, R. M. G.; BARRETT, J. F.; BOWERS, C. Y. & SCHALLY, A. V. Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. *Biochemistry, N. Y.*, 9:1103-6, 1970.
104. NICOD, P.; BURGER, A.; STRAUCH, G.; VAGENAKIS, A. G. & BRAVERMAN, L. E. The failure of physiologic doses of reverse T₃ to effect thyroid-pituitary function in man. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 43:478-81, 1976.
105. ODELL, W. D.; RAYFORD, P. L. & ROSS, G. T. Simplified, partially automated method for radioimmunoassay of human thyroid-stimulating, growth, luteinizing, and follicle stimulating hormones. *J. Lab. clin. Med.*, St. Louis, 70:973-80, 1967.
106. PANDA, J. N. & TURNER, C. W. Effect of advancing age on thyrotropin content of the pituitary and blood of the rat. *Proc. Soc. exp. Biol. med.*, New York, 124:711-4, 1967.
107. PECILE, A.; MÜLLER, E. E.; FALCONI, G. & MARTINI, L. Growth hormone-releasing activity of hypothalamic extracts at different ages. *Endocrinology*, Glendale, 77:241-6, 1965.
108. PERLOFF, W. H.; LASCHÉ, E. M.; NODINE, J. H.; SCHNEEBERG, N. G. & VIELLARD, C. B. The starvation state and functional hypopituitarism. *J. Am. med. Ass.*, Chicago, 155:1307-13, 1954.
109. PHILLIPS, P. H. & HART, E. B. The effect of organic dietary constituents upon chronic fluorine toxicosis in the rat. *J. biol. Chem.*, Baltimore, 109:657-63, 1935.
110. PICOU, D. & WATERLOW, J. C. The effect of malnutrition on the metabolism of plasma albumin. *Clin. Sci.*, London, 22:459-68, 1962.
111. PIMSTONE, B. L.; BARBEZAT, G.; HANSEN, J. D. L. & MURRAY, P. Growth hormone and protein-calorie malnutrition. *Lancet*, London, 2:1333-4, 1967.
112. PIMSTONE, B. L.; BARBEZAT, G.; HANSEN, J. D. L. & MURRAY, P. Studies on growth hormone secretion in protein-calorie malnutrition. *Am. J. clin. Nutr.*, New York, 21:482-7, 1968.
113. PIMSTONE, B. L.; BECKER, D. J. & HENDRICKS, S. TSH response to synthetic thyrotropin-releasing hormone in human protein-calorie malnutrition. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 36:779-83, 1973.
114. PIMSTONE, B. L.; BECKER, D. J. & KRONHEIM, S. Disappearance of plasma growth hormone in acromegaly and protein-calorie malnutrition after somatostatin. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 40:168-71, 1975.
115. PIMSTONE, B. L.; BECKER, D. J. & KRONHEIM, S. FSH and LH response to LH releasing hormone in normal and malnourished infants. *Horm. Metab. Res.*, New York, Suppl. Ser. (5):179-84, 1975.
116. PIMSTONE, B. L.; WITTMANN, W.; HANSEN, J. D. L. & MURRAY, P. Growth hormone and kwashiorkor. *Lancet*, London, 2:779-80, 1966.

117. PITTMAN JR, J. A.; DUBOVSKY, E. & BESCHI, R. J. Stimulation of pituitary glucose oxidation by thyrotropin-releasing hormone. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, New York, 40:1246-52, 1970.
118. PIVA, F. & STEINER, H. Bioassay and toxicology of TRH. In: MAROIS, M., ed. *Frontiers of hormone research: proceedings of a workshop conference on thyrotropin releasing hormone, Besel, 1971*. Basel, S. Karger, 1972. v.1, p.11-21
119. PLATT, B. S. & STEWART, R. J. C. Experimental protein-calorie deficiency: histopathological changes in the endocrine glands of pigs. *J. Endocr., Oxford*, 38:121-43, 1967.
120. POND, W. G.; BARNES, R. H.; BRADFIELD, R. B.; KWONG, E. & KROOK, L. Effect of dietary energy intake on protein deficiency symptoms and body composition of baby pigs fed equalized but suboptimal amounts of protein. *J. Nutr.*, Baltimore, 85:57-66, 1965.
121. PORTNAY, G. I.; O'BRIAN, J. T.; BUSH, J.; VAGENAKIS, A. G.; AZIZI, F.; ARKY, R. A.; INGBAR, S. H. & BRAVERMAN, L. E. The effect of starvation on the concentration and binding of thyroxine and triiodothyronine in serum and on the response to TRH. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 39:191-4, 1974.
122. RAMALINGASWAMI, V.; VICKERY JR, A. L.; STANBURY, J. B. & HEGSTED, D. M. Some effects of protein deficiency in the rat thyroid. *Endocrinology*, Glendale, 77:87-95, 1965.
123. RAO, K. S. J.; RAGHURAMULU, N. & SRIKANTIA, S. G. Thyroid function in kwashiorkor. *Indian J. med. Res.*, Calcutta, 59:1300-4, 1971.
124. RASTOGI, G. K.; SAWHNEY, R. C.; PANDA, N. C. & TRIPATHY, B. B. Thyroid hormone levels in adult protein calorie malnutrition (PCM). *Horm. Metab. Res.*, New York, 6:528-9, 1974.
125. REDDING, T. W.; BOWERS, C. Y. & SCHALLY, A. V. An *in vivo* assay for thyrotropin releasing factor. *Endocrinology*, Glendale, 79:229-36, 1966.
126. REDDING, T. W. & SCHALLY, A. V. Depletion of pituitary thyrotropic hormone by thyrotropin releasing factor. *Endocrinology*, Glendale, 81:918-21, 1967.
127. REICHLIN, S.; MARTIN, J. B.; BOSHANS, R. L.; SCHALCH, D. S.; PIERCE, J. G. & BOLLINGER, J. Measurement of TSH in plasma and pituitary of the rat by a radioimmunoassay utilizing bovine TSH: effect of thyroidectomy or thyroxine administration on plasma TSH levels. *Endocrinology*, Glendale, 87:1022-31, 1970.
128. REICHLIN, S.; SCHALCH, D. S.; BOSHANS, R. L. & PIERCE, J. Effects of thyroidectomy and thyroxine on TSH secretion in the rat determined *in vivo* and *in vitro* by radioimmunoassay: abstract. In: ENDOCRINE SOCIETY, Chicago. *Program 48th meeting . . .*, 1966. Chicago, 1966. p.90.
129. RETIENE, K.; ZIMMERMAN, E.; SCHINDLER, W. J.; NEUENSCHWANDER, J. & LIPSCOMB, H. S. A correlative study of endocrine rhythms in rats. *Acta endocr. Copenh.*, 57:615-22, 1968.
130. RODBARD, D. & FRAZIER, G. R. Statistical analysis of radioligand assay data. *Meth. Enzym.*, New York, 37:3-22, 1975.
131. ROTHENBUCHNER, G.; LOSS, U.; KIEBLING, W. R. BIRK, J. & PFEIFFER, E. F. The influence of total starvation on the pituitary-thyroid-axis in obese individuals. *Acta endocr. Copenh.*, (Suppl. 173):144, 1973.

132. ROTONDI, A. V. & HOXTER, G. Constituição proteica do soro de ratos normais e sua modificação na necrose maciça do fígado, induzida pela injeção endoportada de tetracloreto de carbono. *Revta Med. Cirurg. S. Paulo*, 17:41-4, 1957.
133. ROWE, J. W.; RICHBERT, J. R.; KLEIN, D. C. & REICHLIN, S. Relation of the pineal gland and environmental lighting to thyroid function in the rat. *Neuroendocrinology*, Basel, 6:247-54, 1970.
134. RUSSELD, A. B. & SOMMERS, S. C. Malnutrition and tropic hormone storage in hypophysis. *Archs. Path.*, Chicago, 75:564-71, 1963.
135. SAAD, N. A. *Contribuição ao estudo da ação tóxica do feijão mulatinho*. São Paulo, 1969. [Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
136. SAKIZ, E. & GUILLEMIN, R. Inverse effects of purified hypothalamic TRF on the acute secretion of TSH and ACTH. *Endocrinology*, Glendale, 77:797-801, 1965.
137. SARGENT, J. R. Electrophoresis on cellulose acetate. In: _____ *Methods in zone electrophoresis*, 2.ed. London, BDH, 1969. p.51-60.
138. SCHALLY, A. V.; ARIMURA, A.; BOWERS, C. Y.; KASTIN, A. J.; SAWANO, S. & REDDING, T. W. Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary function. *Recent Prog. Hormone Res.*, New York, 24:497-588, 1968.
139. SCHALLY, A. V.; REDDING, T. W.; BOWERS, C. Y. & BARRET, J. F. Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J. biol. Chem.*, Baltimore, 244:4077-88, 1969.
140. SCHEFFE, H. *Analysis of variance*. New York, Wiley, 1959.
141. SCHINDLER, W. J.; CRITCHLOW, V.; KRAUSE, D. M. & MCHORSE, T. S. Ritmo diario de la función del tiroides en ratas machos y hembras. [6th Panamerican Congress of Endocrinol., México City, oct. 1965, nº 138]. p.561.
142. SCHWARTZ, H. L.; SURKS, M. I. & OPPENHEIMER, J. H. Quantitation of extrathyroidal conversion of L-thyroxine to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in the rat. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 50:1124-30, 1971.
143. CHAMBAUGH III, G. E. & WILBER, J. F. The effect of caloric deprivation upon thyroid function in the neonatal rat. *Endocrinology*, Glendale, 94:1145-9, 1974.
144. SHOEMAKER, W. J. & WURTMAN, R. J. Perinatal undernutrition: accumulation of catecholamines in rat brain. *Science, N. Y.*, 171:1017-9, 1971.
145. SIDRANSKY, H. & RECHCIGL JR, M. Chemical pathology of acute amino acid deficiencies V Comparison of morphologic and biochemical changes in young rats fed protein-free or threonine-free diets. *J. Nutr.*, Baltimore, 78:269-77, 1962.
146. SIMONSON, M.; SHERWIN, R. W.; ANILANE, J. K.; YU, W. Y. & CHOW, B. F. Neuromotor development in progeny of underfed mother rats. *J. Nutr.*, Baltimore, 98:18-24, 1969.
147. SINGH, D. V.; ANDERSON, R. R. & TURNER, C. W. Effect of decreased dietary protein on the rat of thyroid hormone secretion and food consumption in rats. *J. Endocr.*, Oxford, 50:445-50, 1971.
148. SINGH, D. V.; PANDA, J. N.; ANDERSON, R. R. & TURNER, C. W. Diurnal variation of plasma and pituitary thyrotropin (TSH) of rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 126:563-4, 1967.

149. SINHA, Y. N.; WILKINS, J. N.; SELBY, F. & VANDERLAAN, W. P. Pituitary and serum growth hormone during undernutrition and catch-up growth in young rats. *Endocrinology*, Glendale, 92:1768-71, 1973.
150. SREBNIK, H. H.; EVANS, E. S. & ROSENBERG, I. L. Thyroid function in female rats maintained on a protein-free diet. *Endocrinology*, Glendale, 73:267-70, 1963.
151. SREBNIK, H. H. & NELSON, M. M. Anterior pituitary function in male rats deprived of dietary protein. *Endocrinology*, Glendale, 70:723-30, 1962.
152. STEAD, R. H. & BROCK, J. F. Experimental protein-calorie malnutrition: rapid induction of protein depletion signs in early-weaned rats. *J. Nutr.*, Baltimore, 102:1357-66, 1972.
153. STEINER, A. L.; PEAKE, G. T.; UTIGER, R. D.; KARL, I. E. & KIPNIS, D. M. Hypothalamic stimulation of growth hormone and thyrotropin release *in vitro* and pituitary 3'-5'-adenosine cyclic monophosphate. *Endocrinology*, Glendale, 86:1354-60, 1970.
154. STEPHAN, J. K.; CHOW, B.; FROHMAN, L. A. & CHOW, B. F. Relationship of growth hormone to the growth retardation associated with maternal dietary restriction. *J. Nutr.*, Baltimore, 101:1453-8, 1971.
155. STEPHENS, D. J. The effect of the thyrotropic principle of the anterior pituitary on the thyroid of the undernourished guinea pig. *Endocrinology*, Glendale, 26:485-92, 1940.
156. STIRLING, G. A. The thyroid in malnutrition. *Arch. Dis. Childh.*, London, 37:99-102, 1962.
157. STOCH, M. B. & SMYTHE, P. M. Does undernutrition during infancy inhibit brain growth and subsequent intellectual development? : abstract. *Arch. Dis. Childh.*, London, 38:546-52, 1963.
158. SURKS, M. I. & OPPENHEIMER, J. H. Metabolism of phenolic and thiosyring labeled L-thyroxine in human beings and rats. *J. clin. Endocr.*, Springfield, 33:612-8, 1971.
159. SURKS, M. I.; SCHADLOW, A. R.; STOCK, J. M. & OPPENHEIMER, J. H. Determination of iodothyronine absorption and conversion of L-thyroxine (T₄) to L-triiodothyronine (T₃) using turnover rate techniques. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 52:805-11, 1973.
160. TEJADA, C. & RUSSFELD, A. B. A preliminary report of the pathology of the pituitary gland in children with malnutrition. *Arch. Dis. Childh.*, London, 32:343-6, 1957.
161. TRAVAGLINI, P.; BECK-PECCOZ, P.; FERRARI, C.; AMBROSI, B.; PARACCHI, A.; SEVERGNINI, A.; SPADA, A. & FAGLIA, G. Some aspects of hypothalamic-pituitary function in patients with anorexia nervosa. *Acta. endocr. Copenh.*, 81:252-62, 1976.
162. TUOMISTO, J.; RANTA, T.; SAARINEN, A.; MANNISTO, P. & LEPPALUOTO, J. Neurotransmission and secretion of thyroid-stimulating hormone. *Lancet*, London, 2:510-11, 1973.
163. VALE, W., BURGUS, R. & GUILLEMIN, R. Presence of calcium ions as a requisite for the *in vitro* stimulation of TSH-release by hypothalamic TRF. *Experientia*, Basel, 23:853-5, 1967.
164. VALLEDOR, T.; LAVERNIA, F.; BORBOLLA, L.; STANOWSKY, C.; COSTALES, F.; PRIETO, E. & BARDELAS, A. Thyroid function disturbances in malnourished infants and small children. *Revta cub. Pediat.*, Habana, 31:521-32, 1959.
165. VARGA, F. & MESS, B. Serum thyrotrophin in semistarvation. *Acta paediat. hung.*, Budapest, 9:197-203 1968.

166. VIGERSKY, R. A.; LOURIAUX, D. L.; ANDERSEN, A. E.; MECKLENBURG, R. S. & VAITUKAITIS, J. L. Delayed pituitary hormone response to LRF and TRF in patients with anorexia nervosa and with secondary amenorrhea associated with simple weight loss. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, 43:893-900, 1976.
167. WATERLOW, J. C. Observations on the mechanism of adaptation to low protein intakes. *Lancet*, London, 2:1091-7, 1968.
168. WATERLOW, J. C. & ALLEYNE, G. A. O. *Má nutrição protéica em crianças: evolução dos conhecimentos nos últimos dez anos*. São Paulo, Nestlé, 1974.
169. WEIMER, H. E. The effects of protein depletion and repletion on the concentration and distribution of serum proteins and protein-bound carbohydrates of the adult rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, 94:225-49, 1961.
170. WEIMER, H. E.; GODFREY, J. F.; MEYERS, R. L. & MILLER, J. N. Effects of food restriction and realimentation on serum proteins: complement levels and electrophoresis patterns. *J. Nutr.*, Baltimore, 81:405-10, 1963.
171. WIDDOWSON, E. M. & KENNEDY, G. C. Rate of growth, mature weight and life-span. *Proc. R. Soc.*, London, 156:96-108, 1962.
172. WIDDOWSON, E. M. & Mc CANCE, R. A. Effect of a low-protein diet on the chemical composition of the bodies and tissues of young rats. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, 11:198-206, 1957.
173. WIDDOWSON, E. M. & Mc CANCE, R. A. Some effects of accelerating growth. 1. General somatic development. *Proc. R. Soc.*, London, 152:188-206, 1960.
174. WILBER J. F. & UTIGER, R. D. Immonoassay studies of thyrotropin in rat pituitary glands and serum. *Endocrinology*, Glendale, 81:145-51, 1967.
175. WINÍCK, M. & NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.*, Baltimore, 89:300-6, 1966.
176. YALLOW, R. S. & BERSON, S. A. Antigen adsorption: In: BERSON, S. A. & YALLOW, R. S., eds. *Methods in investigative and diagnostic endocrinology*. Amsterdam, North-Holland, 1973. v.2A, p.120-5.
177. YUILE, C. L.; LUCAS, F. V.; NEUBECKER, R. D.; COCHRANE, G. G. & WHIPPLE, G. H. Depletion of reserve protein from extravascular extracellular fluid. C¹⁴ labeling of plasma proteins in dogs after plasmapheresis. *J. exp. Med.*, 109:165-71, 1959.
178. YUILE, C. L.; LUCAS, F. V.; NEUBECKER, R. D. & WHIPPLE, G. H. Reduction of extravascular-extracellular proteins in protein-depleted dogs: abstract. *Fedn Proc.*, Baltimore, 14:424-5, 1955.
179. ZUBIRÁN, S.; MONT, F. G. & LAGUNA, J. Alteraciones endocrinas en la desnutrición. Factores dietéticos y mecanismos de producción. *Revta Invest. clín.*, México, 6:395-416, 1954.

•

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal, 11049 – Pinheiros
CEP 05508
01000 – São Paulo – SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telegráfico – IEATOMICA
Telex – 011-23592 IENA BR