

BR 7801589



**AVALIAÇÃO DA RESPONSABILIDADE DA HIPÓFISE AO HORMÔNIO HIPOTALÂMICO  
(TRH) EM RATOS, NO PERÍODO DAS 8,00 ÀS 12 HORAS**

**Vânia C. Borghi, Wilian Nicolau, Clara Bojarczuk e  
Rômulo R. Pieroni**

**PUBLICAÇÃO IEA 486  
CABRR - AAMRR 7**

**OUTUBRO/1977**

**AVALIAÇÃO DA RESPONSIVIDADE DA HIPÓFISE AO HORMÔNIO HIPOTALÂMICO  
(TRH) EM RATOS, NO PERÍODO DAS 8,00 ÀS 12 HORAS**

**Vânia C. Borghi, Wilian Nicolau, Clara Bojarczuk e  
Rômulo R. Pieroni**

**CENTRO DE APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE RADIOISÓTOPOS E RADIAÇÕES**  
**Área de Aplicações Médicas de Radioisótopos e de Radiações**

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
**SÃO PAULO - BRASIL**

**APROVADO PARA PUBLICAÇÃO EM AGOSTO/1977.**

## **CONSELHO DELIBERATIVO**

### **MEMBROS**

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

### **PARTICIPANTES**

Regina Sibete Azevedo Beretta  
Flávia ...

## **SUPERINTENDENTE**

**NOME:** Ribeiro Pieroni

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
Caixa Postal 11.049 (Pinheiros)  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
**SÃO PAULO — BRASIL**

**NOTA** Este trabalho foi conferido pelo autor depois de composto e sua redação está conforme o original, sem qualquer correção ou mudança.

# AVALIAÇÃO DA RESPONSIVIDADE DA HIPÓFISE AO HORMÔNIO HIPOTALÂMICO (TRH) EM RATOS, NO PERÍODO DAS 8,00 ÀS 12 HORAS

Vânia C. Borghi,<sup>1</sup> Wilian Nicolau,<sup>1</sup> Clara Bojarczuk<sup>1</sup> e  
Rômulo R. Pieroni<sup>1</sup>

## RESUMO

Avaliou-se, no período compreendido entre 8,00 e 12,00 horas, a reserva funcional hipofisária de tireotrofina em ratos pela administração de TRH sintético (hormônio liberador da tireotrofina). O horário no qual a hipófise é mais responsiva a este hormônio hipotalâmico está compreendido entre 9,50 e 10,30 horas.

## INTRODUÇÃO

A partir do fim da década de 1940, vários autores evidenciaram o controle hipotalâmico da adeno-hipófise, especialmente sobre as funções adenocorticotróficas, tireotróficas e gonadotróficas. Este controle é mediado por substâncias neurosecretoras contidas nas terminações nervosas da eminência média do hipotálamo, denominadas hormônios liberadores hipotalâmicos; entre elas o TRH (hormônio liberador da tireotrofina).

O TRH difunde-se através do plexo capilar da eminência média e é levado pelas veias do pedúnculo hipofisário (circulação porta-hipofisária) aos sinusóides da adeno-hipófise, onde atua na liberação do TSH (tireotrofina).

A liberação do TSH pelo TRH parece ser mediada pelo sistema adenil-ciclase. A resposta ao TRH pelo tecido hipofisário exige íons cálcio e traduz-se por um aumento do metabolismo oxidativo de glicose e piruvato, mas não necessita nova síntese protéica.

O TRH parece estimular a liberação do TSH pre-formado e a neossíntese de TSH<sup>(21)</sup>. Esses dois efeitos podem ser parcialmente dissociados, sendo a síntese um processo mais lento e secundário ao efeito de liberação<sup>(10)</sup>.

Existe ainda a possibilidade de que o TSH circulante exerça um controle direto sobre a secreção hipotalâmica de TRH por meio do chamado "feed-back negativo de alça curta"<sup>(10)</sup>.

Bakke e col.<sup>(1)</sup> e Jobin e col.<sup>(11)</sup> em 1964, Ducommun et al. em 1966<sup>(4)</sup>, Singh et al. em 1967<sup>(26)</sup>, Retiene et al. em 1968<sup>(23)</sup>, Leppaluoto et al em 1974<sup>(13)</sup> e Fukuda et al. em 1975<sup>(5,8)</sup>, demonstraram a existência de um ciclo circadiano de TSH em ratos.

Segundo os trabalhos de Bakke e de Singh, verifica-se que o TSH hipofisário se apresenta elevado às 8,00 horas, sofrendo uma diminuição contínua até às 13 horas, período este em que, segundo Singh, há uma relação inversa entre o TSH hipofisário e plasmático.

Nos trabalhos referentes à dosagem de TSH em ratos<sup>(12,21)</sup> há uma tendência dos autores em coletar as amostras, à mesma hora do dia, devido ao ritmo nictemeral do TSH hipofisário e plasmático.

(1) Centro de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e Radiações (C.A.B.R.R.) Instituto de Energia Atômica, Cidade Universitária, Caixa Postal 11049 - Pinheiros, São Paulo, SP.

Vários autores<sup>(8,12,21,25)</sup> têm utilizado o TRH sintético em estudos sobre a reserva hipofisária de TSH em ratos.

Devido à variação circadiana do TSH hipofisário e a fim de se determinar um horário em que a glândula é mais responsiva ao TRH, estudou-se, neste trabalho a liberação do TSH hipofisário pelo TRH em ratos, no período das 8,00 às 12,00 horas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 116 ratos fêmeas Wistar de 6 meses de idade, pesando em média  $207 \pm 32$  gramas.

A fim de se evitar "stress"<sup>(4,22,24)</sup> fator que altera o nível de TSH, os animais foram aclimatados durante 20 dias em gaiolas individuais, sob temperatura constante de 23°C. Fimdo esse período, os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo I (TRH) – 98 ratos separados em subgrupos de dois animais. Os animais de cada subgrupo receberam, ao mesmo horário, apenas uma injeção de TRH<sup>1</sup>, deixando-se um intervalo de cinco minutos na administração do hormônio entre um subgrupo e outro, desde 8,00 até 12,00 horas. A via de administração foi a intracarotídea<sup>(3,16,18,17,21)</sup> sob anestesia pelo pentobarbital sódico e a dose de 10 microgramas do hormônio em 0,5 mililitros de solução fisiológica (S.F.), de acordo com o método da depleção padronizado por Martini et al.<sup>(3,16,20)</sup> com as modificações introduzidas por Piva e Steiner<sup>(21)</sup> e adaptado às condições experimentais deste trabalho.

Grupo II (Controle) – Dezoito ratos separados em subgrupos de dois animais, segundo metodologia concordante com a aplicada ao Grupo I, receberam apenas 0,5 mililitros de S.F. no período correspondente; sendo o intervalo na administração da solução fisiológica entre cada subgrupo de aproximadamente 30 minutos.

Dez minutos após a administração das substâncias (TRH ou S.F.) os animais foram decapitados por meio de guilhotina para a coleta do sangue e separação do soro. Com o soro dos dois animais de cada subgrupo que receberam TRH ou S.F., no mesmo horário, constitui-se um "pool".

O procedimento para a detecção da presença de TSH nos diversos "pools" foi feito seguindo o método de ensaio biológico com camundongo, descrito por Mackenzie<sup>(15)</sup> modificado por Furth et al.<sup>(7)</sup> com algumas alterações introduzidas por Muramoto et al.<sup>(19)</sup>.

Neste método, camundongos fêmeas Swiss que estavam em dieta hipoiódica, receberam<sup>(25)</sup> e em seguida tiveram a secreção endógena de TSH suprimida com triiodotironina. Os animais foram distribuídos em lotes de 6 a 10 exemplares para cada "pool" de soro a ser analisado.

Coletaram-se amostras sanguíneas (100 microlitros) do seio retro-orbital dos camundongos de um mesmo lote, antes e duas horas<sup>(14)</sup> após a administração, por via intraperitoneal de 0,5 mililitros de soro dos ratos submetidos à depleção conforme descrição anterior.

A radioatividade sanguínea foi contada em período de 10 minutos para cada amostra em espectrômetro automático de cintilografia munido de cristal de NaI tipo poço. Os resultados foram expressos em aumento percentual da radioatividade nas amostras de duas horas em relação ao valor inicial (100%), aplicando-se a eles o t teste t de Student.

## RESULTADOS

A tabela I mostra os resultados (expressos em aumento percentual sobre o valor inicial de radioatividade sanguínea) referentes às respostas obtidas nos camundongos pelo TSH basal dos ratos

(L) Cedido pela F. Hoffmann – La Roche & Co. Ltd., Basileia, Suíça.

somado ao TSH hipofisário liberado pelo TRH (Grupo I) nos diferentes horários estudados. Foram considerados, estatisticamente significantes, os incrementos ao nível de  $p \leq 0,05$ .

Os resultados obtidos com os soros dos animais pertencentes ao Grupo II (Controle) se mostraram iguais ou inferiores ao valor inicial da radioatividade sanguínea dos camundongos, não sendo significantes, ao nível escolhido, quando analisados estatisticamente (Tabela I).

Os valores apresentados na Tabela I, estão representados graficamente na figura 1.

A análise do gráfico sugere que nos animais submetidos ao tratamento com TRH há um aumento progressivo na liberação de TSH hipofisário no período das 8,00 às 9,05 horas, diminuindo esta liberação até às 9,45 horas.

Das 9,45 às 10,05 horas observa-se um novo incremento na liberação; apresentando a seguir uma pequena diminuição na depleção até às 10,30 horas, após o que ela se mostra mais acentuada nos 15 minutos seguintes (das 10,30 às 10,45 horas). A partir das 10,45 horas a depleção aumenta até o final do período, ocorrendo a máxima liberação às 11,55 horas. No período compreendido entre 9,50 e 10,30 horas observa-se um nível de liberação hormonal quase constante.

Nos animais tratados com solução fisiológica (Grupo Controle) não se verifica no período analisado liberação detectável de TSH hipofisário, o que demonstra que a manipulação (anestesia, exposição e cateterização da artéria carótida) dos animais não altera o nível basal de TSH.

Por ser muito complexa a função matemática de ajustamento dos dados da figura, não foi possível dar um tratamento estatístico.

## DISCUSSÃO

Muitas observações sugerem uma relação inversa entre as secreções agudas de ACTH (hormônio adenocorticotrófico) e TSH. Quando a hipófise é induzida a secretar TSH pelo TRH, ela concomitantemente secreta menos ACTH como resposta ao "stress"; inversamente, quando a secreção de ACTH é inibida por um tratamento prévio com dexametasona, a hipófise secreta quantidades maiores de TSH, em resposta ao TRH<sup>(24)</sup>.

Existem evidências de um ritmo circadiano do nível de TSH plasmático, oposto às variações de ACTH<sup>(4)</sup> e corticosteróides<sup>(4,5,6,11)</sup>. Estas observações são importantes para definir o nível basal de TSH plasmático.

Herbuté et al.<sup>(9)</sup> observaram que existe no rato um ritmo circadiano no PB<sup>1,2,7</sup> oposto ao ritmo da corticosteronemia, reafirmando o antagonismo entre a regulação das funções tireoideana e adrenal.

Tem sido demonstrado que doses farmacológicas de glicocorticóides suprimem a secreção hipofisária de TSH no rato<sup>(5,27)</sup>, presumivelmente por inibição da liberação do TRH hipotalâmico ou por ação direta ao nível hipofisário ou ainda pelos dois mecanismos.

Em recente estudo<sup>(6)</sup>, ratos adrenalectomizados crônicos apresentaram um ritmo nictemeral normal de TSH plasmático, indicando que a concentração de corticosterona plasmática não é um determinante primário do ritmo secretório de TSH.

As observações de Bakke e Lawrence<sup>(11)</sup> sugerem que a periodicidade circadiana pode ser uma propriedade geral do sistema neuro-hipofisário. O conteúdo hipofisário de ACTH no rato é mínimo pela manhã, em contraste com o de TSH em ratos eutireoideanos.

Retine et al.<sup>(23)</sup> sugerem que as flutuações do TSH não representam um ritmo circadiano intrínseco, mas apenas refletem indiretamente as alterações no ritmo nictemeral de síntese e liberação do ACTH na adeno-hipófise.

Tabela I

Resultados obtidos pela administração de TRH ou S.F.  
na liberação de TSH no período de 8,00 às 12,00\*

| Horas | Grupo I<br>(TRH) | Grupo II<br>(Controle) |
|-------|------------------|------------------------|
| 8,00  | 136              | -                      |
| 8,05  | 153              | 93                     |
| 8,10  | 156              | -                      |
| 8,15  | 137              | -                      |
| 8,20  | 159              | -                      |
| 8,25  | 165              | -                      |
| 8,30  | 179              | 88                     |
| 8,35  | 168              | -                      |
| 8,40  | 168              | -                      |
| 8,45  | 180              | -                      |
| 8,50  | 149              | -                      |
| 8,55  | 197              | -                      |
| 9,00  | 183              | 94                     |
| 9,05  | 236              | -                      |
| 9,10  | 227              | -                      |
| 9,15  | 203              | -                      |
| 9,20  | 186              | -                      |
| 9,25  | 159              | -                      |
| 9,30  | 137              | -                      |
| 9,35  | 151              | 100                    |
| 9,40  | 137              | -                      |
| 9,45  | 139              | -                      |
| 9,50  | 195              | -                      |
| 9,55  | 224              | 95                     |
| 10,00 | 232              | -                      |
| 10,05 | 239              | -                      |
| 10,10 | 229              | -                      |
| 10,15 | 229              | -                      |
| 10,20 | 194              | -                      |
| 10,25 | 208              | -                      |
| 10,30 | 207              | 93                     |
| 10,35 | 179              | -                      |
| 10,40 | 145              | -                      |
| 10,45 | 126              | -                      |
| 10,50 | 128              | -                      |
| 10,55 | 141              | -                      |
| 11,00 | 176              | 93                     |
| 11,05 | 157              | -                      |
| 11,10 | 175              | -                      |
| 11,15 | 145              | -                      |
| 11,20 | 178              | -                      |
| 11,25 | 152              | -                      |
| 11,30 | 153              | -                      |
| 11,35 | 209              | 87                     |
| 11,40 | 205              | -                      |
| 11,45 | 243              | -                      |
| 11,50 | 238              | -                      |
| 11,55 | 273              | -                      |
| 12,00 | 187              | 100                    |

\* Cada valor expresso na tabela representa o percentual sobre o valor inicial (100%) da radioatividade sanguínea dos camundongos, nos quais foram administrados os soros dos ratos que receberam TRH ou S.F., nos horários correspondentes.

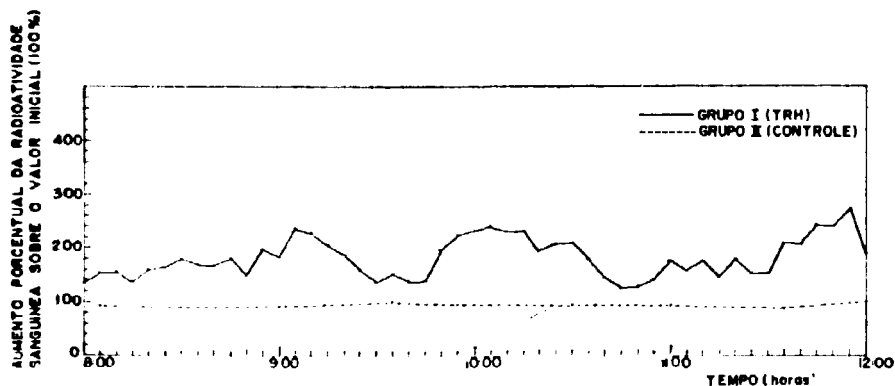


Figura 1 - Projeção dos aumentos percentuais da radioatividade sanguínea dos camundongos sobre o valor inicial (100%) em função do horário da administração do TRH ou S.F. nos ratos.

## CONCLUSÕES

- 1) Os resultados obtidos nesta pesquisa sobre a variação circadiana do TSH em ratos não possibilitam uma comparação com os dados encontrados na literatura, porque os outros Autores analisaram as alterações hormonais ocorridas durante o período diuturno com grandes intervalos de tempo entre a coleta das amostras sanguíneas; neste trabalho, o período investigado se estende por quatro horas (das 8,00 às 12,00 horas) com intervalos de cinco minutos na obtenção das amostras.
- 2) Considerando a existência de um ritmo circadiano de secreção de TSH, utilizou-se a propriedade depletora do TRH sobre a reserva hipofisária de TSH com o intuito de verificar o horário no qual a resposta da hipófise é elevada e estável. Não foram encontrados na literatura estudos similares.
- 3) Este trabalho indica que o horário no qual a hipófise é mais responsiva ao TRH, liberando TSH, está compreendido entre 9,50 e 10,30 horas; nesse período a glândula apresenta um nível de secreção de TSH elevado e quase constante.

## ABSTRACT

The functional pituitary capacity for the secretion of thyrotropin in rats, in relation to the period of time 8:00-12:00 A. M. was studied by means of the administration of synthetic TRH (thyrotropin releasing hormone). The highest pituitary response to the hypothalamic hormone attains its peak between 9:50 and 10:30 A. M., a time in which the gland denotes a high and practically constant level of TSH secretion.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKKE, J. L. & LAWRENCE, N. Circadian periodicity in thyroid stimulating hormone titer in the rat hypophysis and serum. *Metabolism*, New York, **14**:841-3, 1965.
2. BROWN, M. R. & HEDGE, G. A. Multiple effects of glucocorticoids on TSH secretion in unanesthetized rats. *Endocrinology*, Glendale, Ca., **92**:1305-11, 1973.
3. 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.
4. 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.
5. FUKUDA, H. & GREER, M. A. The effect of basal hypothalamic deafferentation on the nycthemeral rhythm of plasma TSH. *Endocrinology*, Glendale, Ca., **92**:749-52, 1975.
6. \_\_\_\_\_; GREER, M. A.; ROBERTS, L.; ALLEN, C. F.; CRITCHLOW, V. & WILSON, M. Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine. *Endocrinology*, Glendale, Ca., **97**:1424-31, 1975.
7. FURTH, E. D.; RATHBUN, M. & POSILLICO, L. A modified bioassay for the long-acting thyroid stimulator (LATS). *Endocrinology*, Glendale, Ca., **95**:592-3, 1969.
8. GUILLEMIN, R.; VALE, W. & BURGUS, R. Thyrotropin releasing factor. In: BERSON, S. A. & YALLOW, R. S., eds. *Methods in investigative and diagnostic endocrinology*. Amsterdam, North-Holland, 1973. v.2A pt. 2, p.493-8.
9. HERBUTÉ, S.; ASTIER, H. & ASSENMACHER, J. Rythmes circadiens du <sup>127</sup>I thyroïdien et du PB<sup>127</sup>I chez le rat. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, Paris, **166**:142-6, 1972.
10. HERSHMAN, J. M. & PITTMAN JR., J. A. Control of thyrotropin secretion in man. *New Engl. J. Med.*, Boston, **285**:997-1006, 1971.
11. JOBIN, M. & SAMEL, M. Pituitary-thyroid response to cold exposure in the rat. *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.*, **7**:23, 1964.
12. KIEFFER, J. D.; WEINTRAUB, B. D.; BAIGELMAN, W.; LEEMAN, S. & MALOOF, F. Homologous radioimmunoassay of thyrotropin in rat plasma. *Acta endocr., Copenh.*, **78**:495-505, 1974.
13. LEPPÄLUOTO, J.; RANTA, T. & TUOMISTO, J. Diurnal variation of serum immunoassayable thyrotropin (TSH) concentration in the rat. *Acta physiol. scand.*, Stockholm, **90**:699-702, 1974.
14. MACKENZIE, J. M. The bioassay of thyrotropin in serum. *Endocrinology*, Glendale, Ca., **63**:372-82, 1958.
15. \_\_\_\_\_. Delayed thyroid response to serum from thyrotoxic patients. *Endocrinology*, Glendale, Ca., **92**:865-8, 1958.
16. MOTTA, M.; PIVA, F.; FRASCHINI, F. & MARTINI, L. Pituitary depletion methods for the bioassay of hypothalamic releasing-factors. In: MEITES, J., ed. *Hypophysis tropic hormones of the hypothalamus-assay and chemistry: proceedings of the workshop conference, Tucson, Arizona, Jan. 8-11, 1969*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1970, p.44-50.

17. MULLER, 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.
18. \_\_\_\_\_ & PECILE, A. Growth hormone rasythesis in the pituitary after depletion induced by a hypothalamic extract. *Experientia*, Basel, 22:108, 1966.
19. MURAMOTO, E.; NICOLAU, W.; IKEDA, E.; MARQUES DE ASSIS, L. & PIERONI, R. R. Padronização do método radiobiológico para estimativa do estimulador tireoideano de ação prolongada (LATS) no soro humano. *Revta Ass. méd. bras.*, São Paulo, 18(10):379-88, 1972.
20. PECILE, A.; MÜLLER, E.; FALCONI, G. & MARTINI, L. Growth hormone-releasing activity of hypothalamic extracts at different ages. *Endocrinology*, Glendale, Ca., 77: 241-6, 1965.
21. PIVA, F. & STEINER, H. Bioassay and toxicology of TRH. In: MAROIS, M., ed. *Frontiers of hormone research: proceedings of the workshop conference on thyrotropin releasing hormone*, Basel, 1971. Basel, S. Karger, 1972. v.1, p.11-2.
22. REDDING, T. W. & SCHALLY, A. V. Depletion of pituitary thyrotropin hormone by thyrotropin releasing factor. *Endocrinology*, Glendale, Ca., 81:918-21, 1967.
23. RETIENE, L.; 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.
24. SAKIZ, E. & GUILLEMIN, R. Inverse effects of purified hypothalamic TRF on the acute secretion of TSH and ACTH. *Endocrinology*, Glendale, Ca., 77:797-801, 1965.
25. SCHALLY, A. V.; ARIMURA, A. & KASTIN, A. J. Hypothalamic regulatory hormones. *Science*, N. Y., 179(4071):341-50, 1973.
26. 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, 126:553-4, 1967.
27. WILBER, J. F. & UTIGER, R. D. The effect of glucocorticoids on thyrotropin secretion. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 48:2096-103, 1969.

