

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB**

***AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE NUTRICIONAL PROMOVIDO PELO
DÉFICIT PROTÉICO PÓS-DESMAME SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE
RATOS.***

Ouro Preto, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE NUTRICIONAL PROMOVIDO PELO DÉFICIT PROTÉICO PÓS-DESMAME SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS.

AUTOR: João Victor Rocha Soares de Albuquerque
ORIENTADOR: PROF. DR. DEOCLÉCIO ALVES CHIANCA JR.
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. LUCIANO GONÇALVES FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto, novembro de 2009

Este trabalho foi realizado no *Laboratório de Fisiologia Cardiovascular* do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio do CNPq, FAPEMIG e UFOP.

“Ensinar não é transferir conhecimentos, conteúdos nem formar é a ação pela qual um sujeito criador dá forma, estilo ou alma a um corpo indeciso e acomodado. Não há docência sem discência, as duas se explicam e seus sujeitos, apesar das diferenças que os conotam, não se reduzem à condição de objeto um do outro. Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender”.

Paulo Freire

*À minha vó Eloisa.
Aos meus pais Nuno e Andréa,
e minhas tias Heloisa, Cláudia e Jaísa.
Com todo amor, essa vitória também é de vocês.*

À CAPES, FAPEMIG e UFOP pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Ouro Preto, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr**, por ter aberto as portas do Laboratório de Fisiologia cardiovascular e com isso ter contribuído com minha formação.

Ao **Prof. Dr. Luciano Gonçalves Fernandes**, exemplo de uma mente brilhante, agradeço pela colaboração, disponibilidade e apoio, sem os quais este trabalho não chegaria ao seu final.

Ao **Prof. Clóvis Andrade Neves** do Laboratório de Biologia Geral da UFV pela ajuda com as análises histológicas.

À minha namorada **Elisângela** por todo amor e cumplicidade nesse período de ausência, estresse e dificuldade. Essa vitória também é sua. Obrigado por tudo, eu amo você!

Ao irmão que a vida me permitiu escolher, amigo de infância, companheiro em todos os momentos, **Thiago Mafra Batista**, pelos momentos marcantes vividos nesse período de luta!

Aos amigos do LFC, Alessandro, Aline, Arlete, Arthur, Bajú, Carlito, Fabiana, Lílian, Luis, Manoel, Mara, Márcio, Mirian, Tchalton e Vanessa pelos ótimos momentos de convivência.

Aos colegas de pós-graduação que se tornaram **amigos**, em especial Tiago “Listerine” e Larissa (grande amiga e irmã de caminhada).

Ao Sr. Milton por todo o trabalho prestado no LFC.

Aos diversos amigos conquistados nos demais laboratórios do NUPEB, obrigado pelo excelente convívio durante este trabalho.

À **Cida**, por sua competência e amizade!

Ao Sr. Milton, Dona Iraci e toda família, por me acolherem tão bem durante essa estada em Ouro Preto.

E finalmente, à minha **família**, minha **avó Eloisa (a culpada de tudo)**, meu pai **Nuno**, minha mãe **Andréa**, meus irmãos **Rafa e Nana** e meus tios **Heloisa, Jaísa, Cláudia e Oliveira** pelo carinho sempre demonstrado e toda a ajuda prestada. Vocês são cúmplices disso tudo. Amo vocês!

Entre os vários estressores potenciais decidimos abordar nesse trabalho o estresse nutricional causado pelo déficit protéico pós desmame em ratos. Os hormônios relacionados ao estresse podem alterar a homeostase de diversos sistemas do organismo, entre eles o cardiovascular. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram, em ratos, que a desnutrição protéica pós desmame promove aumento dos níveis basais de frequência cardíaca (FC) e alteração na variabilidade desse parâmetro. Foram demonstrados também aumento na sensibilidade do reflexo barorreceptor e aumento da atividade do sistema renina-angiotensina nesses animais. Diante disso, nos propusemos a avaliar a produção de cortisol como parâmetro de estresse em animais desnutridos e o possível efeito do excesso desse hormônio sobre alguns parâmetros cardiovasculares. Foram utilizados ratos Fisher, divididos em 12 grupos: controles tratados por 1, 15 e 30 dias com salina, controles tratados por 1, 15 e 30 dias com cetoconazol, desnutridos tratados por 1, 15 e 30 dias com salina e desnutridos tratados por 1, 15 e 30 dias com cetoconazol. Todos os animais controle receberam uma dieta contendo 15% de proteína durante 35 dias e todos os animais desnutridos, 6% de proteína. Um dia antes dos experimentos foi realizada a cirurgia de implante do eletrodo para aquisição do sinal eletrocardiográfico e em seguida foi inserido um cateter na artéria femoral para avaliação dos parâmetros cardiovasculares. Os resultados obtidos no presente estudo nos demonstraram um aumento na produção de cortisol pelos animais desnutridos em relação aos animais controle tratados por salina por 1 ($4,9 \pm 0,5$ $\mu\text{g/dL}$ vs. $2,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g/dL}$ respectivamente), 15 ($5,7 \pm 0,5$ $\mu\text{g/dL}$ vs. $2,5 \pm 0,4$ $\mu\text{g/dL}$ respectivamente) e 30 dias ($5,6 \pm 0,5$ $\mu\text{g/dL}$ vs. $2,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/dL}$ respectivamente). Tais animais desnutridos tratados com salina apresentaram valores de FC média significativamente maior que os animais controle tratados com salina por 1 ($418 \pm 2,0$ bpm vs. $338 \pm 3,9$ bpm), 15 ($427 \pm 2,0$ bpm vs. $333 \pm 4,1$ bpm) e 30 dias (435 ± 13 bpm vs. $337 \pm 2,3$ bpm). O tratamento com cetoconazol diminuiu significativamente a produção de cortisol nos animais desnutridos tratados por 15 ($1,9 \pm 0,3$ $\mu\text{g/dL}$) e 30 dias ($0,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g/dL}$) em relação aos animais desnutridos tratados com salina concomitantemente a diminuiu da FC média desses animais em relação aos desnutridos tratados com salina por 15 dias ($427 \pm 2,0$ bpm vs. 376 ± 12 bpm) e 30 dias (435 ± 13 bpm vs. 379 ± 12 bpm). Mesmo com tal diminuição

sendo significativa, os animais desnutridos tratados com cetoconazol por 1, 15 e 30 dias ainda apresentaram FC média significativamente mais elevada que os animais controle tratados com salina por 1, 15 ou 30 dias. O fato da FC dos animais desnutridos tratados com cetoconazol ainda ter se mostrado elevada em relação aos animais controles tratados com salina pode estar ligado ao aumento na relação LF/HF nesses animais (1 dia: $0,89 \pm 0,02$ n.u., 15 dias: $0,89 \pm 0,04$ n.u. e 30 dias: $0,85 \pm 0,02$ n.u.) em relação aos animais controle tratados com salina (1 dia: $0,55 \pm 0,01$ n.u., 15 dias $0,59 \pm 0,01$ n.u. ou 30 dias: $0,55 \pm 0,03$ n.u.) observado pela análise da variabilidade da frequência cardíaca. Nossos resultados em conjunto demonstram o efeito estressor promovido pela desnutrição protéica pós desmame visualizado pelo aumento nos níveis de cortisol nos animais desnutridos sugerindo uma participação conjunta do excesso de tal hormônio e do aumento da atividade simpática na alteração da FC.

This work focuses on the nutritional stress caused by post-breast-feeding protein deficiency in rats. Stress-related hormones may alter homeostasis in several body systems; among them, the cardiovascular system was chosen for our present studies. Early works in our laboratory have shown that, in rats, the post-breast-feeding protein malnutrition leads to an increase in cardiac rate (CR) and mean arterial pressure (MAP), besides increasing the variation range of these parameters. Higher baroreflex sensibility and higher renin-angiotensin system activity have also been demonstrated in this type of protein-deficient animals. In view of these findings, we decided to investigate the production of cortisol as a stress indicator in protein-malnourished animals and the possible effect of the excess of this hormone on some cardiovascular parameters. Twelve groups of Fisher rats were employed in the investigation: (i) control groups 1-3, treated with saline solution for 1, 15 and 30 days respectively; (ii) control groups 4-6, treated with ketoconazole for the same time periods; (iii) groups 7-9, protein-underfed animals treated with saline for 1, 15 and 30 days respectively; and (iv) groups 10-12, protein-underfed animals treated with ketoconazole, same time intervals. All control groups were fed on a 15% protein diet during 35 days, while the malnourished animals were on 6% protein. One day before the experiments, an electrocardiographic signal electrode was surgically implanted and a catheter was inserted into the femoral artery for measurement of cardiovascular parameters. Results demonstrated an increased production of cortisol by the underfed animals as compared with the control groups treated with saline for 1 ($4.9 \pm 0.5 \mu\text{g/dL}$ versus $2.1 \pm 0.2 \mu\text{g/dL}$ respectively), 15 ($5.7 \pm 0.5 \mu\text{g/dL}$ versus $2.5 \pm 0.4 \mu\text{g/dL}$) and 30 days ($5.6 \pm 0.5 \mu\text{g/dL}$ versus $2.3 \pm 0.1 \mu\text{g/dL}$). The saline-treated underfed animals have shown significantly higher average CR values than the control rats treated with saline for 1 ($418 \pm 2.0 \text{ bpm}$ versus $338 \pm 3.9 \text{ bpm}$), 15 ($427 \pm 2.0 \text{ bpm}$ versus $333 \pm 4.1 \text{ bpm}$) and 30 days ($435 \pm 13 \text{ bpm}$ versus $337 \pm 2.3 \text{ bpm}$). The administration of ketoconazole led to a significant decrease in the production of cortisol by the protein-malnourished animals treated for 15 ($1.9 \pm 0.3 \mu\text{g/dL}$) and 30 days ($0.7 \pm 0.1 \mu\text{g/dL}$), when compared with the respective saline-treated underfed animals. There has also been a concomitant reduction in the average CR for the former group when compared with the underfed rats which were saline-treated for 15 days ($427 \pm 2.0 \text{ bpm}$ versus $376 \pm 12 \text{ bpm}$) and 30 days ($435 \pm 13 \text{ bpm}$ versus $379 \pm 12 \text{ bpm}$).

Although this is a noticeable decrease, the underfed animals treated with ketoconazole for 1, 15 and 30 days still presented average FC values significantly higher than those from the control rats treated with saline for 1, 15 or 30 days. This result may be related to the increase in the LF/HF ratio observed for the protein-malnourished animals in the cardiac rate variability tests (1 day: 0.89 ± 0.02 n.u., 15 days: 0.89 ± 0.04 n.u. and 30 days: 0.85 ± 0.02 n.u.) compared with the saline-treated control (1 day: 0.55 ± 0.01 n.u., 15 days 0.59 ± 0.01 n.u. and 30 days: 0.55 ± 0.03 n.u.). Taken together, our results demonstrate the stress promoted by post-breast-feeding protein deficiency, as indicated by the higher cortisol levels in the protein-underfed animals, and suggest a joint influence of the excess of cortisol and the increased sympathetic activity on the alteration of the CR values.

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XXII

1. INTRODUÇÃO

1.1	Desnutrição	1
1.2	Desnutrição, estresse e patologias associadas	3

2. OBJETIVOS

2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos	9

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1	Modelo animal e nutricional	10
3.2	Preparo e utilização das drogas	12
3.3	Metodologia do bloqueio da esteroidogênese adrenal e respectivos controles	13
3.4	Confecção e implantação da cânulas arteriais e eletrodos para ECG	15
3.5	Registro da pressão arterial e do eletrocardiograma	17
3.6	Médida de cortisol sérico	18
3.7	Peso dos animais e dos órgãos	18
3.8	Análise histológica	19
3.9	Análise dos dados	21
3.10	Análise da variabilidade da FC no domínio da frequência	21
3.11	Análise estatística	21

4. RESULTADOS	
4.1 Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos	23
4.2 Efeito da desnutrição sobre o peso da adrenal	27
4.3 Efeito da desnutrição sobre a utilização de lipídeo pela glândula adrenal	33
4.4 Efeito da desnutrição sobre o metabolismo de cortisol	38
4.5 Efeito da desnutrição sobre os parâmetros cardiovasculares	44
4.6 Efeito da desnutrição sobre a relação LF/HF da variabilidade FC	52
5. DISCUSSÃO	71
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7. APENDICE	

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
Ang II	Angiotensina II
AT 1	Receptores do Tipo I para Angiotensina
AVP	Arginina vasopressina
BPM	Batimentos por minuto
CRH	Hormônio liberador de Corticotropina
DEP	Desnutrição energético-protéica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
EM	Eminência Mediana
FC	Frequência Cardíaca
GC	Glicocorticóides
HF	High Frequency – Componente simpático do espectro da variabilidade da FC
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IP	Administração por via intraperitoneal
LF	Low Frequency – Componente parassimpático do espectro da variabilidade da FC
LFC	Laboratório de Fisiologia Cardiovascular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
PAN	Peso Corporal do Animal
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular
RG	Receptor de Glicocorticóide
RM	Receptor de Mineralocorticóide

RPT Resistência Periférica Total
SNC Sistema Nervoso Central
SNS Sistema nervoso simpático
TAG Triacilgliceróis
UFOP Universidade Federal de Ouro Preto
VFC Variabilidade da Frequência Cardíaca

Figura 1 – Eixo HPA. Mecanismo de produção e de regulação dos glicocorticóides	5
Figura. 2 – Cronograma de preparo dos animais, metodologia da desnutrição protéica e protocolo farmacológico	12
Figura 3 – Representação esquemática do implante dos eletrodos para aquisição do sinal eletrocardiográfico e da FC basal dos animais.	17
Figura 4 – Representação da janela de visualização do software Kananda® durante a aquisição eletrocardiográfica e aquisição dos parâmetros cardiovasculares.	19
Figura 5 – Representação da metodologia utilizada para análise das fotomicroscopias adrenais	21
Figura 6 - Comparação do peso corpóreo (g) de animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas), desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30)	25
Figura 7 - Comparação do peso corpóreo (g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (A) e dos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30)	26
Figura 8 - Comparação do peso corpóreo (g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) (A) e dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B)	27

Figura. 9 - Comparação do PAN (g/100g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas), desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 30

Figura 10 - Comparação do PAN (g/100g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (A), dos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) e dos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (C) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 31

Figura 11 - Comparação do PAN (g/100g) dos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais controle tratados com salina (barras amarelas) (A) e dos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 32

Figura 12 - Comparação do PAN (g/100g) entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) (A) e entre os animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 33

Figura 13 - Comparação do PAN (g/100g) entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) (A) e entre os animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 36

Figura 14 - Comparação da quantidade de lipídeo na glândula adrenal dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (A) e controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos 37

tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). ()*

Figura 15 - *Comparação da quantidade de lipídeo na glândula adrenal entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) (A), dos animais controles tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) e dos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (C) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).* 38

Figura 16 - *Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).* 41

Figura 17 - *Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).* 41

Figura 18- *Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre os animais controle tratados com salina (barras amarelas) (A) e entre os animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).* 42

Figura 19 - *Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras azuis) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).* 43

Figura 20 - *Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre os animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).* 43

Figura 21 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia. ($P < 0,05$). 44

Figura 22 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 44

Figura 23 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinza) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 45

Figura 24 - Comparação da pressão arterial média basal (PAM) (mmHg) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30) 47

Figura 25 - Comparação da pressão arterial média basal (PAM) (mmHg) dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (A) e dos animais controle tratados com salina em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 48

Figura 26 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 49

- Figura 27** - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 49
- Figura 28** - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre os animais controle tratados com salina (barras amarelas) (A) e entre os animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 50
- Figura 29** - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre os animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) 51
- Figura 30** - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 51
- Figura 31** - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 52
- Figura 32** - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 52
- Figura 33** - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 53
- Figura 34** - Comparação da relação LF/HF (u.n.) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30) 55

Figura 35 - Comparação do percentual de participação do componente LF (u.n) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 56

Figura 38 - Comparação da relação LF/HF (u.n) (A) do percentual de participação do componente LF (u.n) (B) e do percentual de participação do componente HF (u.n.) (C) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas) e animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento. 57

Figura 39 - Comparação da relação LF/HF (u.n.) entre animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e animais controle tratados com salina (barras amarelas) (A) e animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) e animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). 59

<i>Tabela 1 – Composição química das dietas (g/100g de ração).</i>	13
<i>Tabela 2 – Características dos diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais foram submetidos.</i>	16

INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição

A alimentação é fator primordial na rotina diária da humanidade, não apenas por constituir-se em necessidade básica, mas principalmente porque a sua utilização tornou-se um problema de saúde pública, uma vez que o seu excesso ou falta podem causar doenças. Assim, a desnutrição está definida como o estado nutricional em que ocorre deficiência, excesso ou desbalanço de energia, proteína e outros nutrientes, causando alteração física, tecidual, funcional e clínica (Lochs *et al.*, 2006).

Hoje em dia é cada vez mais claro que, para uma compreensão real das doenças e suas conseqüências, é fundamental o entendimento dos aspectos antropológicos, o dinamismo psicológico e o diagnóstico social das pessoas em situação de debilidade física (Sawaya A.L., 2006). De acordo com isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que, para que aconteça uma melhora na situação alimentar do mundo, ambos os problemas médico e social precisam ser reconhecidos e corrigidos, uma vez que a desnutrição grave é uma desordem onde os problemas médicos da criança resultam, em parte, dos problemas sociais do domicílio em que a criança vive (OMS, 1999). Por se tratar de uma doença de natureza clínico-social multifatorial cujas raízes se encontram na pobreza, a prevenção e o controle da desnutrição dependem de medidas mais amplas e eficientes de combate à pobreza e à fome e políticas de inclusão social. Talvez pela dificuldade de se definir estratégias de prevenção e tratamento que englobem todas as necessidades acerca da desnutrição, ela ainda seja responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro, esteja associada a várias outras patologias e ainda hoje seja considerada a doença que mais mata crianças abaixo de cinco anos (Sawaya A.L., 2006).

No Brasil, apesar de estudos epidemiológicos indicarem que a prevalência da desnutrição energético-protéica (DEP) tem diminuído, a doença continua a ser um relevante problema de Saúde Pública no País, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, na área rural do Brasil e nos bolsões de pobreza das periferias das grandes metrópoles, com conseqüências desastrosas para a sobrevivência e saúde das crianças (WHO, 2007).

A desnutrição causada por deficiência protéica é também vastamente encontrada no Brasil e em países em desenvolvimento, sendo que, nessa forma de desnutrição, a disponibilidade de calorias pode existir, porém sem ingestão de produtos ricos em proteínas. Esse fato deve-se em geral à dificuldade na obtenção de alimentos que sejam fonte de proteínas, principalmente por se tratarem de produtos com custo mais elevado (de Sousa *et al.*, 2007). A desnutrição protéica é altamente prejudicial ao organismo uma vez que as proteínas são moléculas essenciais aos organismos animais, devendo, portanto, estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. A composição de proteína da dieta é um fator importante a ser considerado a partir do momento que, dos vinte aminoácidos que constituem as proteínas, nove são considerados essenciais, ou seja, não são sintetizados pelo organismo e devem ser adquiridos através da alimentação (Elia, 2000).

O presente trabalho objetiva identificar os impactos da desnutrição nos sistemas fisiológicos, procurando definir estratégias para o seu enfrentamento. Sabendo-se que, em humanos, estudos sobre a desnutrição são muito mais observacionais do que averiguações experimentais, tornou-se importante a avaliação através de práticas experimentais em modelo animal. Além de a utilização animal permitir um controle do tempo e dos níveis desejados da carência nutricional que se pretende estudar, o rato, modelo animal mais utilizado nestes estudos, apresenta vantagens tais como facilidade de manejo e alta capacidade de adaptação aos diferentes protocolos de desnutrição empregados. Além disso, possui metabolismo acelerado, o que permite investigações experimentais rápidas, principalmente daqueles distúrbios promovidos pela desnutrição apenas tardiamente no ser humano (Bello A.C.D., 2005).

Vários são os modelos experimentais utilizados para provocar a desnutrição em ratos. Por exemplo, ela pode ser induzida durante a gestação, diminuindo o teor protéico da dieta das fêmeas grávidas (Tatli *et al.*, 2007; Tonkiss *et al.*, 1998), ou após o nascimento, aumentando o tamanho da ninhada durante a amamentação (Bell *et al.*, 1988). Pode-se também reduzir o conteúdo de proteínas da dieta oferecida à fêmea que está amamentando (Pedrosa *et al.*, 1987), ou ainda reduzir o conteúdo de proteínas da dieta oferecida aos filhotes logo após o desmame, sendo que este último modelo é o que tem sido adotado pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFOP (LFC) e conseqüentemente no presente estudo (Ferreira *et al.*, 2003a).

1.2 Desnutrição, estresse e patologias associadas

A vida existe devido à manutenção da homeostase. Essa condição de equilíbrio das propriedades físico-químicas e metabólicas do meio interno é constantemente desafiada por forças adversas intrínsecas e extrínsecas (Carrasco *et al* 2003). O estresse pode ser entendido como um estado de homeostase ameaçado ou em desequilíbrio. Se os mecanismos para lidar com o enfrentamento de situações onde existem estressores não forem eficientes, ocorre o estresse via ativação de sistemas complexos que resultam em alterações hormonais, autonômicas e comportamentais (Woodward *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2002).

Os estressores potenciais podem ser ambientais (frio, calor), psicológicos (depressão, ansiedade), sociais (desemprego, morte de pessoas próximas) e nutricionais (deficiência de uma alimentação adequada quantitativa e qualitativa) e, aliados às características individuais da pessoa, são determinantes na ruptura da homeostase interna do organismo humano (Greenberg, 2002).

O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) constitui um dos principais sistemas endócrinos responsável pela manutenção da homeostase quando um organismo é estressado ou desafiado (Jacobson, 2005) sendo os glicocorticóides (GC) os produtos finais desta ativação (Tsigos *et al.*, 2002). Todos os organismos desenvolvem mecanismos de adaptação para lidar com estressores. Em mamíferos, o eixo HPA integra os vários sinais indicativos de estresse em uma via comum representada pelos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Mouri *et al.*, 1993). Na ativação do eixo HPA, ocorre o estímulo e a liberação do hormônio liberador da corticotropina (CRH) pelo núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo no sistema porta hipotálamo-hipofisário que então estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise anterior (Figura 1).

A liberação do CRH pelos neurônios do PVN ocorre tanto no ritmo basal como na resposta a situações de estresse. Além do CRH, outros importantes peptídeos são liberados pelo PVN, e interagem com CRH ao nível da eminência mediana (EM), podendo alterar a ação estimulatória sobre a secreção do ACTH. Particularmente a arginina vasopressina (AVP), é co-secretada com CRH por um subconjunto de neurônios parvocelulares. O CRH liberado para o sistema porta hipotálamo-hipofisário, ao se ligar a receptores específicos, promove a síntese e liberação do ACTH. O ACTH, através da circulação sistêmica, atinge as

adrenais, onde estimula a produção de glicocorticóides (em sua maioria corticosterona nos roedores e cortisol em humanos) (McCann *et al.*, 2000)

A atividade do eixo HPA é controlada principalmente pelos GC que inibem a sua própria liberação a partir de mecanismos de (*Elias et al.*, 2004) negativo sobre a liberação de ACTH e de CRH na hipófise e no hipotálamo. O cortisol também age no sistema nervoso central (SNC) promovendo a retroalimentação por meio de dois tipos de receptores. Os receptores mineralocorticóides (RM) possuem alta afinidade por GC ficando saturados mesmo através dos níveis basais de GC, são responsáveis pela resposta basal durante o ritmo circadiano e apresentam distribuição limitada e relativamente alta no hipocampo (Reul *et al.*, 1987). Os receptores glicocorticóides (RG) são de baixa afinidade por GC, sua saturação ocorre durante as fases de pico do ritmo circadiano e nas respostas ao estresse. Sua distribuição é mais difusa, e é encontrado preferencialmente no hipocampo, na amígdala e no hipotálamo (Fuxe *et al.*, 1985).

Apesar de a corticosterona ser o marcador mais utilizado para caracterizar uma situação de estresse animal, na literatura há evidências de que outros marcadores de estresse também podem ser utilizados (Marti *et al.*, 1998). Em ratos submetidos a um estresse agudo, hormônios derivados da pro-opiomelanocortina (POMC) (ex., ACTH), e a prolactina parecem refletir a intensidade do estresse experimentado pelos animais (Euker *et al.*, 1975; Armario *et al.*, 1986; Reis *et al.*, 1998; Marquez *et al.*, 2006). Também foi demonstrado em ratos que o nível plasmático de adrenalina e noradrenalina podem ser considerados como marcadores de estresse (Natelson *et al.*, 1987). O aumento dos níveis de cálcio sérico foi usado como marcador de estresse em camundongos submetidos a estresse físico e estresse emocional (Sutoo *et al.*, 2002), e em humanos, após a exposição ao frio (Lennquist, 1975).

Verago e colaboradores (2001) após submeterem ratos a estresse físico dosaram, além dos níveis sanguíneos de corticosterona, os de glicose, de triacilgliceróis (TAG) e de glicerol. A corticosterona aumentou significativamente após cada sessão de estresse; os níveis de TAG aumentaram somente após a primeira sessão; os de glicose aumentaram apenas após a segunda e a terceira sessão e os níveis de glicerol não foram alterados (Verago *et al.*, 2001).

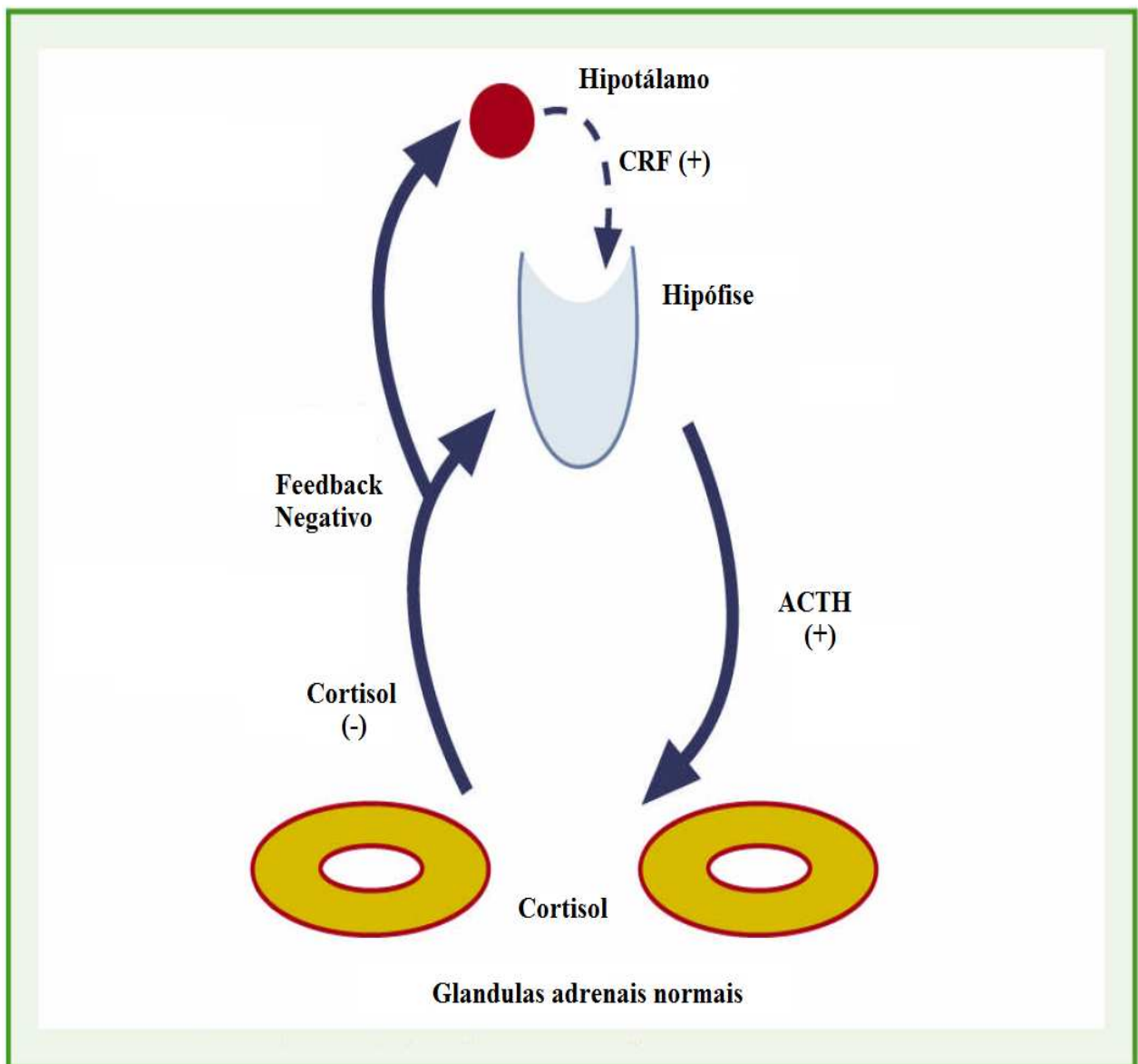


Fig. 1 – Mecanismo de regulação dos glicocorticóides. A liberação do cortisol pelas glândulas adrenais é controlada pela secreção de ACTH pela hipófise que por sua vez é regulada pelo CRH hipotalâmico. O aumento na liberação de cortisol exerce um mecanismo de feedback negativo sobre ambos os hormônios.

No presente estudo, escolhemos o cortisol como marcador de estresse em ratos. Apesar de ser encontrado na literatura trabalhos que afirmam categoricamente a ausência da produção de tal hormônio em tal espécie (Dallman *et al.*, 1987), podemos encontrar estudos que também utilizaram tal parâmetro demonstrando que, mesmo observado em menor quantidade essa medida é válida como um índice de estresse (Chen *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009).

Um modelo de restrição alimentar materna em ratos promoveu um aumento considerável nos níveis de ACTH e corticosterona plasmáticos além de demonstrarem uma diminuição na expressão da enzima 11 β hidroxisteroide dehidrogenase placentária nas mães submetidas à restrição alimentar. A diminuição na expressão placentária dessa enzima está diretamente ligada ao aumento da exposição fetal a altas concentrações de corticosterona provenientes da mãe, tendo ação direta na programação de doenças em uma fase mais tardia da vida. A análise do eixo HPA dos filhotes dessas mães que sofreram restrição alimentar demonstrou diversas alterações como atrofia da glândula adrenal, além da diminuição da expressão gênica de RM e RG hipocâmpais, diminuição dos níveis de mRNA para CRH no PVN e redução drástica no nível de ACTH plasmático (Lesage *et al.*, 2001).

Em um modelo de restrição alimentar utilizando uma dieta com 60% de redução do teor calórico, foi investigada a influência desse déficit alimentar sobre os níveis de ACTH plasmático e hipofisal, além do nível de corticosterona plasmático. Os resultados desse trabalho demonstram que os animais submetidos ao protocolo de restrição calórica apresentam níveis de corticosterona plasmático duas vezes maior que os animais que receberam alimentação controle, porém sem alteração nas concentrações de ACTH plasmático. Já na hipófise anterior, os níveis de ACTH diminuíram cerca de 50%, provavelmente orquestrado pelo mecanismo de *feed-back* negativo ativado pela elevação dos níveis de corticosterona plasmático. Esses resultados também indicam que a elevação nos níveis de corticosterona nesse modelo de restrição alimentar pode ser causada por um aumento na responsividade adrenal ao ACTH e não por um aumento na atividade do eixo HPA, visto que não foi observado aumento nos níveis de ACTH plasmático (Han *et al.*, 1995).

Ratos alimentados com uma dieta contendo 7% de proteína apresentaram aumento da atividade do sistema nervoso simpático quando comparados a animais que receberam dieta contendo 22% de proteína (Young *et al.*, 1985). No estudo mencionado verificou-se que a

restrição protéica levou a um aumento do processo de “turnover” de norepinefrina, e que esse aumento é independente da diminuição da tirosina oferecida na dieta. Esse mesmo estudo evidenciou que a acentuação da atividade simpática observada nos animais desnutridos é conseqüência de um aumento da descarga simpática central. A desnutrição protéico-calórica imposta durante o período de amamentação causou um prejuízo no mecanismo de regulação da liberação central de noradrenalina, o que leva ao aumento da concentração desse neurotransmissor no córtex cerebral desses animais (Bertram *et al.*, 2000). Diversos outros sistemas são afetados pela desnutrição, podendo levar ao mau funcionamento de órgãos e conseqüentemente desenvolvimento de doenças. A gravidade dessas alterações é dependente do tempo de exposição e da fase da vida em que o indivíduo é submetido à desnutrição. Vários autores já demonstraram em humanos que a desnutrição nas fases iniciais da vida leva a um crescimento deficiente, ou seja, crianças desnutridas são mais baixas e pesam menos do que deveriam para a sua idade. Em animais também se observa um prejuízo no desenvolvimento, com depleção de massa muscular e diminuição do peso (Winick *et al.*, 1966). Observou-se também, em ratos desnutridos durante a gestação, uma significativa redução no peso e no tamanho de diversos órgãos como o rim, adrenal, e tecido cerebral e prejuízo na função desempenhada por eles (Sawaya *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1997) .

O sistema nervoso também é afetado pelo déficit alimentar uma vez que a desnutrição protéica ou protéico-calórica ocorrida nos primeiros anos de vida está associada a alterações neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais tanto em animais quanto em seres humanos (Almeida *et al.*, 1996). A formação da mielina e de seus constituintes (colesterol, galactolipídeos e fosfolipídeos) em cérebros de ratos desnutridos também é reduzida (Reddy *et al.*, 1979; Egwim *et al.*, 1986). Em 2000, Lukoyanov e colaboradores demonstraram que a manutenção de uma dieta hipoprotéica por um período prolongado leva à perda de neurônios e sinapses do hipocampo, acompanhado de um prejuízo substancial de comportamentos hipocampo dependentes (Lukoyanov *et al.*, 2000).

Sabendo-se que o hipotálamo é uma importante região do SNC que atua principalmente na homeostase, e que seus efeitos estão diretamente envolvidos na regulação central da ingestão de alimentos, peso corporal, metabolismo e atividade autonômica cardiovascular, não é surpreendente imaginar ser esta área fortemente afetada pela desnutrição (Bernardis *et al.*, 1986) Também por isso, tem sido proposto que o eixo HPA também é passivo a alterações a partir de uma alimentação inadequada, levando a um aumento da

atividade do eixo HPA e subsequente aumento das concentrações de cortisol (de Rooij *et al.*, 2006).

Diversas alterações cardiovasculares são observadas a partir de um quadro de excesso de glicocorticóides (Odermatt, 2004; Hammer *et al.*, 2006). A hipertensão é um importante exemplo de alteração por ser amplamente encontrada na prática clínica. São variados os mecanismos propostos para explicar as alterações cardiovasculares.

Dentre os vários mecanismos que promovem as alterações cardiovasculares a partir do excesso de cortisol, grande importância tem sido empregada ao sódio. Isso se justifica pois, quando o cortisol é administrado em indivíduos normais, ele tem a capacidade de promover aumento na retenção urinária de sódio com conseqüente aumento do volume sanguíneo e da pressão arterial (Connell *et al.*, 1987). Apesar da importância do sódio no aparecimento das alterações cardiovasculares promovidas pelo excesso de cortisol, este mecanismo não parece ser o único promotor dessas alterações. A partir disso, alguns trabalhos demonstram que o pré-tratamento com Atenolol, um bloqueador beta-adrenérgico, impede o aumento do débito cardíaco, mas não impede o surgimento da hipertensão arterial, a qual pode estar sofrendo influência de outros mecanismos compensatórios, como o aumento da resistência periférica total (RPT) (Pirpiris *et al.*, 1993).

Alem de interferir na RPT, os glicocorticóides influenciam a regulação do sistema cardiovascular também através de outros mecanismos periféricos, incluindo o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina e do sistema nervoso simpático (Saruta, 1996). A elevação nos níveis de glicocorticóides aumenta a expressão de receptores do tipo I para angiotensina (AT1), tanto na vasculatura periférica quanto no sistema nervoso central, além de elevar também a concentração da enzima conversora de angiotensina (ECA) periférica e centralmente. Tanto o aumento na expressão de receptores AT1, quanto a elevação nos níveis de ECA, são gatilhos para o aumento da utilização de Angiotensina II (Ang II) a nível central, podendo influenciar no aumento da atividade simpática, estimular a liberação de vasopressina e interferir no funcionamento do reflexo barorreceptor arterial (Saavedra, 1992; Scheuer *et al.*, 2001a; Scheuer *et al.*, 2001b).

Um papel importante na modulação da função vascular também tem sido dado aos glicocorticóides. Receptores de glicocorticóides são amplamente distribuídos na vasculatura, local também onde é devidamente instalada a enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (11 β HSD) modulando o acesso dos glicocorticóides a esses receptores

vasculares. A aplicação tópica de glicocorticóides resulta em vasoconstrição cutânea, apoiando uma interação entre a administração de glicocorticóides e acentuação da reatividade vascular acentuada (Walker, 2007).

Dados do LFC também demonstram efeitos deletérios da desnutrição após o período de amamentação sobre o sistema cardiovascular. Tropia e colaboradores, em 2001, demonstraram um aumento da sensibilidade do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch em animais submetidos a uma dieta contendo 6% de proteína. Ainda nesse trabalho, foi observado aumento do tônus vasomotor simpático nos animais (Tropia *et al.*, 2001). Utilizando o mesmo modelo animal, Oliveira e colaboradores observaram aumento dos níveis basais de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA), além do aumento da variabilidade desses parâmetros quando analisados no domínio do tempo (Oliveira *et al.*, 2004). Loss e colaboradores demonstraram uma perturbação da homeostase cardiovascular decorrente da desnutrição protéica. Nesse trabalho, foram demonstradas alterações no ganho do barorreflexo antes e após bloqueios autonômicos, além de alteração no período de latência da resposta barorreflexa. Ainda segundo o autor, essas alterações na modulação da atividade autonômica eferente seriam responsáveis pela manutenção dos altos valores de FC e PAM basais (Loss *et al.*, 2007). Trabalho realizado por Gomide e colaboradores (2007) demonstrou uma importante interação entre o sistema renina-angiotensina e o sistema simpático vasomotor. Esses autores mostraram uma hiperatividade do eixo renina-angiotensina na gênese da pressão arterial em animais desnutridos (Gomide, 2007).

Diante disso, o desenvolvimento do presente estudo ganha relevância para o LFC a partir do momento que o déficit energético pode provocar um aumento na produção de cortisol como resposta ao estresse nutricional. Das diversas alterações cardiovasculares provocadas por um quadro de aumento na concentração de cortisol, muitas são compatíveis àquelas já encontradas no LFC. Dessa forma, nos propusemos a avaliar a produção de cortisol em ratos submetidos ao modelo de desnutrição protéica pós desmame e a possível influência dessa alteração neuroendócrina em alguns parâmetros cardiovasculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o possível estresse promovido pela desnutrição protéica pós desmame sobre o sistema cardiovascular em ratos.

2.2 Específicos

- Avaliar a influência da desnutrição protéica pós desmame sobre a produção de cortisol em ratos
- Avaliar a influência da desnutrição protéica pós desmame sobre o peso da glândula de ratos.
- Avaliar a influência da desnutrição protéica pós desmame sobre a quantidade de lipídeo armazenado na glândula adrenal.
- Avaliar a influência da desnutrição protéica pós desmame sobre a PAM e FC de ratos submetidos ao bloqueio da esteroidogênese adrenal
- Avaliar a participação da inibição da esteroidogênese adrenal sobre os componentes simpático e parassimpático do SNA em ratos submetidos à desnutrição protéica pós desmame, através da análise espectral da variabilidade da FC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo animal e nutricional

Neste trabalho foram utilizados ratos Fischer adultos jovens fornecidos tanto pelo Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto quanto procriados e mantidos em biotério próprio do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular dessa mesma universidade, ambos de acordo com o **Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Olfert E.D. & Cross, 1993)**.

Para a procriação dos animais, três fêmeas e um macho foram colocados em gaiolas plásticas de polipropileno de 47 x 33 x 15 cm. Após dez dias de acasalamento, os machos foram retirados permanecendo apenas as fêmeas nas gaiolas por mais uma semana. Após esse período, as fêmeas foram separadas em caixas individuais até o fim da gestação. Dez dias após o nascimento, as ninhadas foram manipuladas para que só os filhotes machos permanecessem com a mãe por mais dezoito dias a fim de totalizar um período de 28 dias de amamentação exclusiva.

Após o desmame os machos da ninhada foram divididos em dois grupos:

- Controle: Animais previamente hípidos que receberam dieta comercial (dieta controle) por 35 dias;
- Desnutrido: Animais previamente hípidos que receberam dieta de desnutrição durante 35 dias.

Ao fim do período dedicado à alimentação exclusiva, os animais foram submetidos à aplicação do protocolo farmacológico onde receberam por um, quinze ou trinta dias consecutivos o tratamento com cetoconazol ou salina dependendo do protocolo empregado ao animal. O cronograma com a metodologia de desnutrição e do tratamento farmacológico está demonstrado na fig. 2.

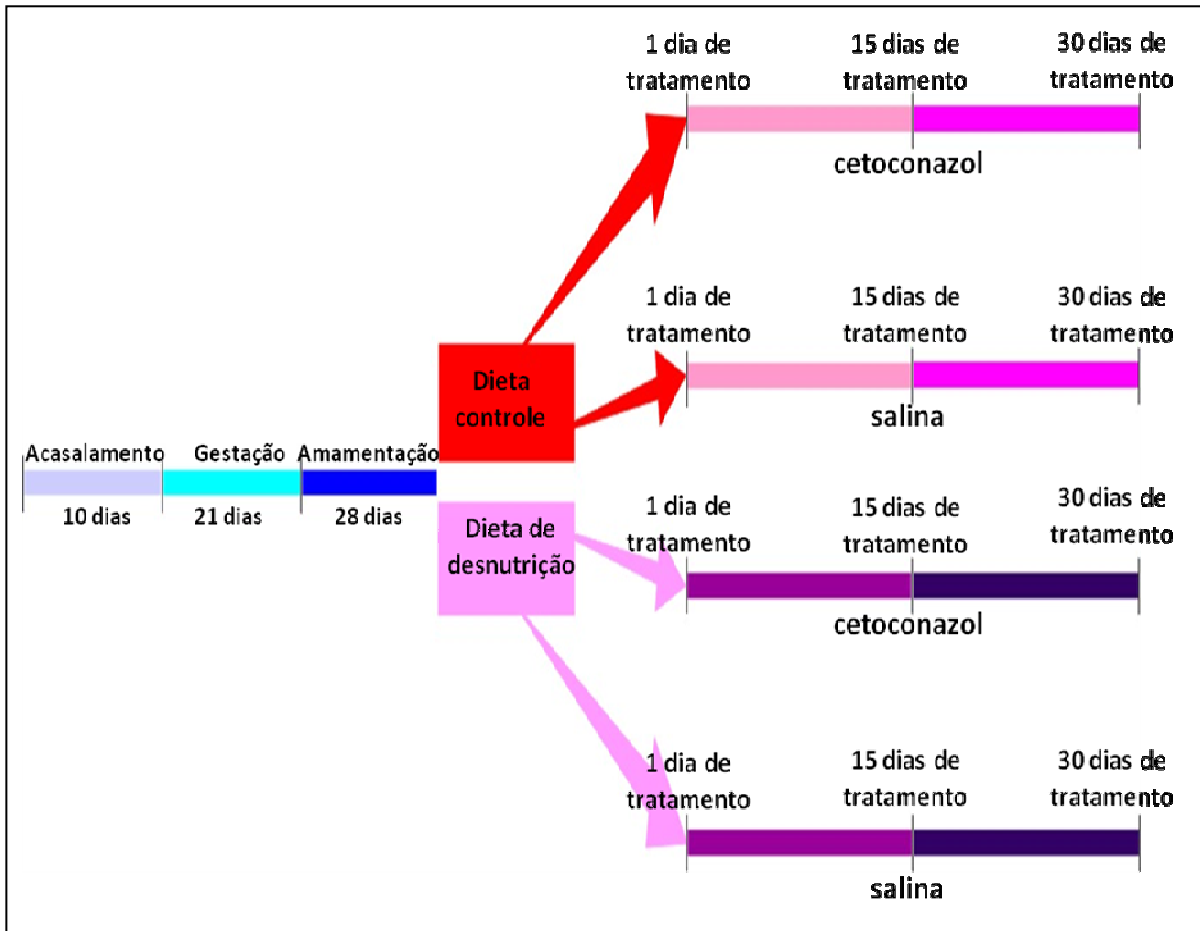


Fig. 2 – Cronograma de preparo dos animais, metodologia da desnutrição protéica e protocolo farmacológico. Após o acasalamento e nascimento, os animais foram amamentados por um período de 28 dias. Em seguida foram divididos em grupo controle (que receberam dieta com 15% de proteína) e desnutrido (dieta com 6% de proteína) por um período de 35 dias. Após esse período os animais eram considerados aptos a serem utilizados e foram submetidos ao tratamento com cetoconazol ou salina por 1, 15 ou 30 dias.

As dietas utilizadas nos modelos experimentais diferiram quanto ao teor protéico. A dieta ofertada ao grupo controle foi ração comercial Socil® que apresentava 15% de proteína e a dieta para induzir a desnutrição apresentava 6% de proteína e foi preparada com elementos semi-purificados. A composição química das dietas está representada na Tabela I.

	<i>Controle</i>	<i>Desnutrido</i>
Proteína (caseína)	15	6
Amido de Milho	70	79
Óleo de Soja	8	8
Mistura de Sais	5	5
Mistura de Vitaminas	1	1
Fibra (Celulose)	1	1
Teor Calórico	422 Kcal	422 Kcal

Tabela 1 – Composição química das dietas (g/100g de ração).

Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (média de 24,7° C) e fotoperíodo (12-h claro/escuro).

3.2 Preparo e utilização das drogas

- **Solução Salina 0,9%:** A solução veículo foi preparada dissolvendo-se 9,0 g de NaCl em q.s.p. 1000,0 mL de água destilada. Para o tratamento dos animais, foi utilizado um volume de 1 ml/kg de peso vivo do animal por via intraperitoneal (IP).
- **Suspensão de Cetoconazol:** 25mg/Kg de Cetoconazol suspensos em salina 0.9 % e 5% de propilenoglicol. Para o tratamento dos animais foi utilizado um volume de 1 ml/kg de peso vivo do animal IP.

- **Ketamina + Xilasina:** Anestésico utilizado para experimentação em animais acordados. Foi realizada uma mistura de Ketamina 10% (0,1 mL/100g) e Xilasina 2% (0,02 mL /100 g). Essa concentração foi acondicionada em um frasco âmbar.
- **Antibiótico:** Como medida profilática, os animais receberam 0,2 ml (animal controle) e 0,1 ml (animal desnutrido) de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge, São Paulo, Brasil) após o fim do procedimento cirúrgico.

3.3 Metodologia do bloqueio da esteroidogênese adrenal e respectivos controles

Passados os dias destinados à amamentação e à alimentação com dieta específica, os animais controle e os animais desnutridos considerados aptos a serem utilizados, foram então aleatoriamente divididos em grupos com números iguais de animais onde receberam o tratamento com Cetoconazol ou veículo por via intraperitoneal (IP), diferindo-se da seguinte forma:

- **Grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia:** Grupo de 5 animais controle que receberam uma única aplicação de Cetoconazol. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados antes e 40 minutos após a droga;
- **Grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias:** Grupo de 5 animais controle que receberam o tratamento com cetoconazol por 15 dias consecutivos. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação da droga no 15º dia de tratamento;
- **Grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias:** Grupo de 5 animais controle que receberam o tratamento com cetoconazol por 30 dias consecutivos. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação da droga no 30º dia de tratamento;
- **Grupo controle tratado com salina por 1 dia:** Grupo de 5 animais controle que receberam uma única aplicação de veículo. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados antes e 40 minutos após a aplicação;

- **Grupo controle tratado com salina por 15 dias:** Grupo de 5 animais controle que receberam o tratamento com salina por 15 dias consecutivos. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação do veículo no 15º dia de tratamento;
- **Grupo controle tratado com salina por 30 dias:** Grupo de 5 animais controle que receberam o tratamento com salina por 30 dias consecutivos. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação do veículo no 30º dia de tratamento;
- **Grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia:** Grupo de 5 animais desnutridos que receberam uma única aplicação de Cetoconazol. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados antes e 40 minutos após a droga;
- **Grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 15 dias:** Grupo de 5 animais desnutridos que receberam o tratamento com cetoconazol por 15 dias consecutivos. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação da droga no 15º dia de tratamento;
- **Grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 30 dias:** Grupo de 5 animais desnutridos que receberam o tratamento com cetoconazol por 30 dias consecutivos. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação da droga no 30º dia de tratamento;
- **Grupo desnutrido tratado com salina por 1 dia:** Grupo de 5 animais desnutridos que receberam uma única aplicação de veículo. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados antes e 40 minutos após a aplicação;
- **Grupo desnutrido tratado com salina por 15 dias:** Grupo de 5 animais desnutridos que receberam o tratamento com salina por 15 dias consecutivos. Para esses animais, o registro dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação veículo no 15º dia de tratamento;
- **Grupo desnutrido tratado com salina por 30 dias:** Grupo de 5 animais desnutridos que receberam o tratamento com salina por 30 dias consecutivos. Para esses animais, o registro

dos parâmetros basais de frequência cardíaca média e pressão arterial média foram realizados 40 minutos após a aplicação do veículo no 30º dia de tratamento.

Todas as aplicações foram realizadas intraperitonealmente entre às 19:00 e 19:30 de cada dia, respeitando o ciclo circadiano do animal, exceto a aplicação realizada no dia do experimento. As características dos diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais foram submetidos estão sumariadas na tabela 2.

Tratamento	Características
I	Grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia
II	Grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias
III	Grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias
IV	Grupo controle tratado com salina por 1 dia
V	Grupo controle tratado com salina por 15 dias
VI	Grupo controle tratado com salina por 30 dias
VII	Grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia
VIII	Grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 15 dias
IX	Grupo desnutridos tratado com cetoconazol por 30 dias
X	Grupo desnutridos tratado com salina por 1 dia
XI	Grupo desnutridos tratado com salina por 15 dias
XII	Grupo desnutridos tratado com salina por 30 dias

Tabela 2 – Características dos diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais foram submetidos.

3.4 Confeção e implantação da cânulas arteriais e eletrodos para ECG

O procedimento de canulação da artéria e da veia femoral e o implante dos eletrodos para o eletrocardiograma foi realizado com antecedência de 24h do registro dos parâmetros cardiovasculares. Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 (Becton Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD) contíguos a tubos de polietileno PE-10 (Becton Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD). Antes do implante, o interior das cânulas foi lavado e preenchido com solução salina fisiológica esterilizada e despirogenizada. A extremidade PE-50 de cada cânula foi obstruída com pino de metal niquelado e esterilizado. Os animais foram submetidos ao procedimento de canulação da artéria e veia femoral e implante dos eletrodos para o registro eletrocardiográfico no 14º e 29º dia de tratamento, referindo-se aos animais tratados por 15 e 30 dias consecutivos com Cetoconazol ou salina, e no dia anterior do registro dos animais

tratados por 1 dia com Cetoconazol ou salina. Os ratos foram anestesiados com a interação do anestésico Ketamina com o relaxante muscular Xilasina IP e, depois de verificada a perda total dos reflexos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica para realização da tricotomia da região inguinal esquerda do animal. Posteriormente, uma pequena incisão na pele foi realizada e com o auxílio de lupa em caso de animais desnutridos, e a olho nu em caso de animais controle, o feixe vasculonervoso femoral foi localizado e a artéria femoral cuidadosamente isolada. A cânula foi introduzida na aorta abdominal através da artéria femoral, sendo utilizada para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares e na veia cava inferior, a partir da veia femoral, para infusão de drogas e posteriormente transpassadas por sob a pele do dorso onde as extremidades destas cânulas foram exteriorizadas e fixadas próximo ao pescoço.

Aproveitando-se ainda do efeito sedativo obtido pelo anestésico, os animais foram submetidos a uma nova incisão na região torácica, próximo ao osso esterno, para implante do eletrodo para aquisição eletrocardiográfica. Os fios de números 1 e 2 do eletrodo foram subcutaneamente transpassados a partir do dorso até o peito do animal e suturados à musculatura peitoral utilizando-se uma linha de nylon, para minimizar registro de eletromiografia formando duas derivações do Triângulo de Einthoven. O fio de número 1 foi suturado próximo ao membro superior direito do animal, o fio de número 2 foi suturado próximo ao membro superior esquerdo e o fio de número 3 na musculatura do dorso do animal, funcionando como *terra* (Fig. 3).

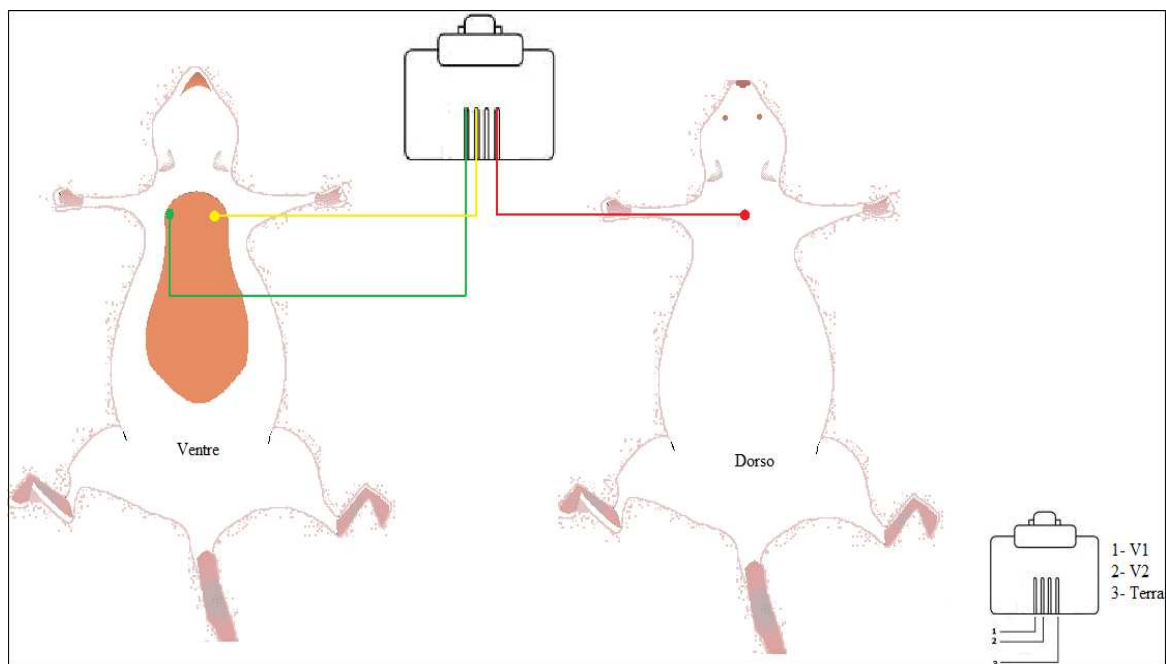


Fig. 3 – Representação esquemática do implante dos eletrodos para aquisição do sinal 6-lead eletrocardiográfico e da FC basal dos animais.

Para a fabricação dos eletrodos para registro eletrocardiográfico foram utilizados conectores RJ45 de 4 pinos crimpados a fios de cobre rígido. Encerrada a cirurgia, os animais receberam o Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®, São Paulo, Brasil), administrado por via intramuscular profunda na pata traseira esquerda para cobertura antibiótica profilática. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais e mantidos sobre manta térmica a fim de evitar o efeito hipotérmico provocado pela anestesia até a passagem completa do efeito da droga. Posteriormente, os animais foram mantidos na sala de experimentos sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados até o momento dos experimentos. Também durante esse período, os animais receberam alimentação de acordo com o protocolo previamente estabelecido e água purificada *ad libidum*.

3.5 Registro da pressão arterial e do eletrocardiograma

Antes de iniciar o registro, foi administrada salina heparinizada (1:40) na cânula implantada na artéria femoral do animal com o intuito de impedir a formação de coágulos durante o experimento. Essa cânula foi conectada a um transdutor de pressão (STATHAM P23DB®) que, por sua vez, foi conectado à placa de aquisição Akilah 4. O conector do ECG também foi conectado ao mesmo sistema de aquisição que, por sua vez, foi conectado ao computador através de um cabo USB. O registro dos dados foi feito pelo software de aquisição Kananda® em uma frequência de amostragem de 1000 Hz. A partir do registro da pressão arterial pulsátil, foi calculada on-line a pressão arterial média e, a partir do registro do ECG, foi calculada também on-line, a frequência cardíaca. A janela de exibição do software Kananda® está representada pela Figura 4, que segue abaixo.



Fig. 4 – Representação da janela de visualização do software Kananda® durante a aquisição eletrocardiográfica e aquisição dos parâmetros cardiovasculares. As linhas representam: eletrocardiograma (1º canal), pressão arterial pulsátil- PAP (2º canal), frequência cardíaca (3º canal) e pressão arterial média (4º canal).

3.6 Medida de cortisol sérico

Todas as amostras de sangue foram coletadas em tubos *Eppendorff* e imediatamente centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. Amostras de soro foram separadas (0,5 ml) e estocadas à 4 °C até a dosagem do cortisol. Para tal dosagem foi utilizado o kit IMULLITE® Cortisol, por quimiluminescência. Informações técnicas em anexo.

3.7 Peso dos animais e dos órgãos

Ao término do registro das medidas hemodinâmicas, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina e então submetidos a toracotomia a fim de expor o coração do animal. Através de pulsão cardíaca, o animal foi perfundido com solução salina seguida de solução formalina. Após um tempo de perfusão satisfatório, a glândula adrenal dos animais foi retirada, pesada em balança de alta precisão e fixada em solução de formol tamponado até análise histológica posterior.

3.8 Análise Histológica

No Laboratório de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, as glândulas adrenais já preservadas em formalina tamponada, foram desidratadas em séries crescentes de álcool etílico (80%, 90%, 95% e 100%) em passagens de 30 em 30 minutos. O processo de pré-infiltração das amostras, colocadas em posição craniocaudal nas formas de inclusão já identificadas, iniciou-se com a substituição de parte do álcool por resina usada de glicol metacrilato (2-hidroxo-etil metacrilato) da marca Historesina-Leicaâ, sem a substância catalisadora, durante o período de uma noite (aproximadamente 12 horas). Na infiltração utilizou-se resina nova, sendo substituído todo o líquido da pré-infiltração por esta resina nova, passando por um período de espera de, no mínimo, duas horas antes da inclusão. Para a inclusão e polimerização da amostra em resina, foi realizada uma solução contendo 15 ml de resina nova e 1 ml da substância catalisadora do Kit Historesin-Leicaâ (conservada em temperatura abaixo de 0°C), substituindo toda a resina de infiltração pela nova solução, até completar o limite da forma de inclusão. Após este procedimento, as formas de inclusão ficaram em estufa a 45°C até que o bloco de resina estivesse totalmente seco (aproximadamente 24 horas, dependendo da umidade relativa do ar do ambiente) ou, se necessário, posteriormente colocadas em câmara de dessecação com sílica.

Os blocos de resina foram aderidos em moldes feitos de madeira com cianocrilato (Super Bonder®) para que fossem fixados no micrótomo de marca Leicaâ. Na confecção dos cortes histológicos, utilizou-se navalha de vidro e o padrão de corte foi estabelecido em 2 micrometros. Cada lâmina, identificada a lápis, recebeu aproximadamente doze cortes histológicos, com a finalidade de minimizar o erro da leitura em cortes não-perfeitos (dobrados ou pouco corados). As lâminas foram coradas com o corante Azul de Toluidina, utilizando uma cubeta de coloração contendo a solução do corante por 30 segundos, e lavadas posteriormente com água destilada. A secagem foi feita por placa aquecedora a 70°C. Para a fixação da lamínula na lâmina utilizou-se Entellan, de forma que todos os cortes histológicos ficassem cobertos por este. De cada amostra de adrenal confeccionou-se 12 lâminas e, de cada lâmina, analisou-se 10 imagens.

As análises e a captura das imagens computadorizadas foram realizadas pelo programa *Image – Pró Plus*, versão 4.5.0.29 (media Cibertecnicos), com o auxílio de microscópio ótico, conectado a uma câmera de captura e um computador. O aumento utilizado para a captura da imagem foi de 40X, e a visualização do corte histológico foi realizado em 10X. Pelo

programa *Image – Pró Plus* foi criada uma máscara em forma de grade padronizada, com quadrados simétricos de um pixel de diâmetro, sem margens, e espaçamentos de 287 pixels na horizontal e 124 na vertical entre os quadrados, somando-se 49 quadrados sobrepostos às imagens capturadas (Fig. 5) Os vértices dos quadrados que estavam em sobreposição às gotículas de gordura dentro das glândulas adrenais foram contados em números absolutos.

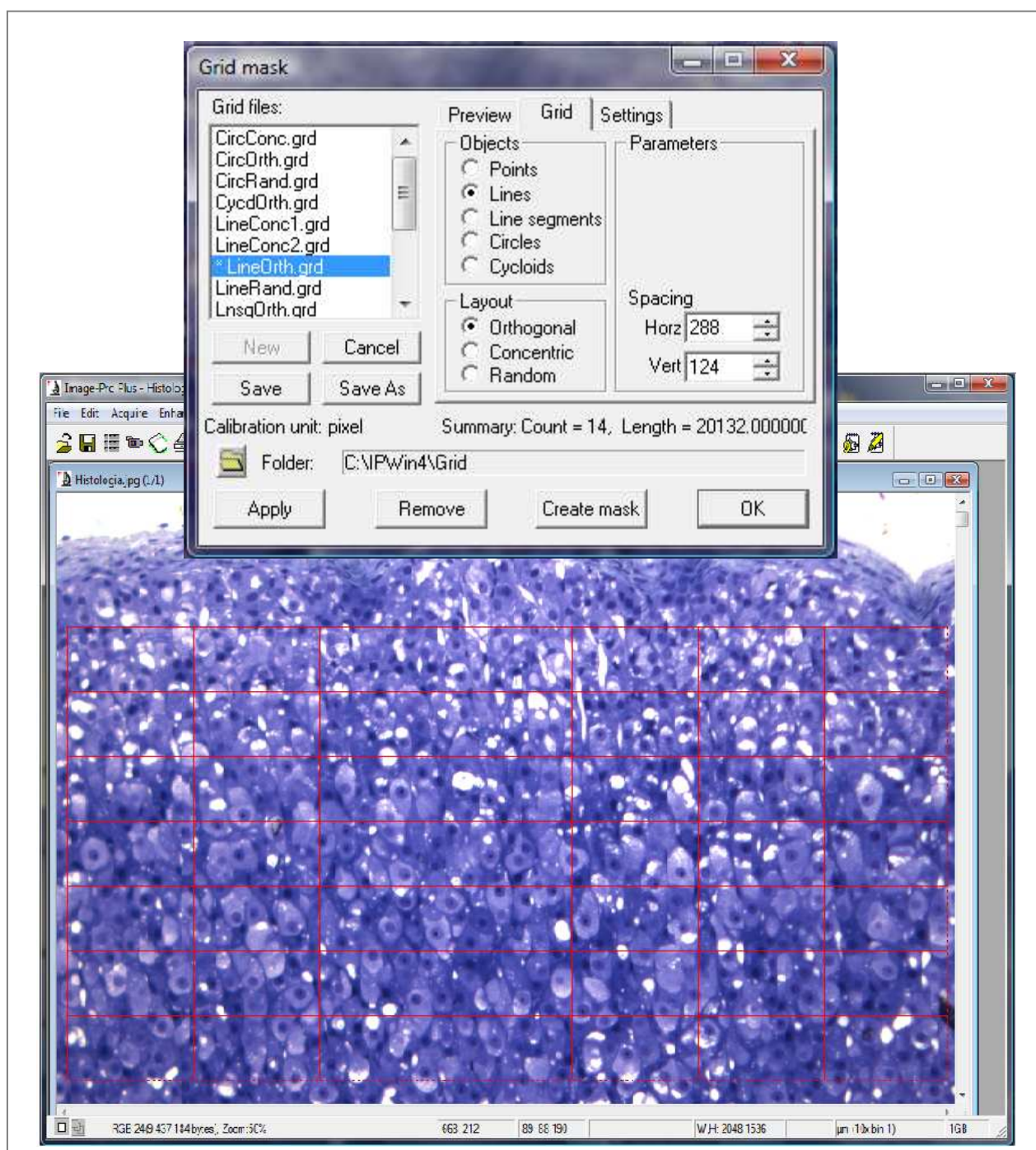


Fig. 5 – Representação da metodologia utilizada para análise das fotomicroscopias adrenais.

3.9 Análise dos dados

O software Kananda®, além de ser utilizado para o registro dos dados, foi também utilizado para converter os mesmos do formato “.knd” (originalmente gerado pelo Kananda®) para o formato “.txt” (arquivos de texto). Após a conversão, os dados foram carregados no software AcqKnowledge v 3.5.7®, onde foram realizadas as análises.

3.10 Análise da variabilidade da FC no domínio da frequência

O algoritmo da transformada rápida de Fourier foi aplicado diretamente sobre segmentos de 5 minutos de registro de intervalo R-R. A janela de Hamming foi utilizada para se evitar o “vazamento espectral”. O espectro foi dividido em baixa frequência (LF 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF 0,75 – 2,50 Hz) de acordo com a literatura (Dias da Silva e cols., 2001). Para melhor comparação de dados entre diferentes animais, foram calculados a razão LF/HF e a porcentagem com que cada uma das bandas de frequência contribui para o poder total sem se levar em conta a banda de VLF.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados obtidos foram submetidos à análise Anova two way seguido do pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações e teste-t de Student para simples comparações. O nível de significância foi fixado em menor de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos

A metodologia escolhida para promover a desnutrição nos animais utilizados foi a redução no teor protéico da dieta a eles oferecida logo após o desmame. Dessa forma, promovemos uma redução de 60% da proteína ofertada na dieta, ou seja, os animais desnutridos receberam uma dieta contendo 6% de proteína, contra os 15% de proteína ofertada na dieta dos animais controle. A fig. 6 representa a comparação geral entre os valores referentes ao peso de todos os grupos utilizados nesse trabalho e demonstra que a desnutrição protéica promoveu uma redução significativa no peso dos animais submetidos a ela, em relação aos animais controle, independentemente do tratamento com cetoconazol ou salina (Fig. 6). Para uma melhor comparação entre os diferentes grupos experimentais, distribuiremos em partes a demonstração destes resultados.

Analisando separadamente o efeito da desnutrição protéica sobre o peso dos animais, de acordo com o tratamento proposto, observamos uma redução significativa no peso dos animais desnutridos tratados com salina em relação aos animais controle também tratados com salina tanto nos grupos tratados por 1 dia ($67,6 \pm 1,4\text{g}$ vs. $278,0 \pm 1,5\text{g}$ respectivamente), quanto nos grupos tratados por 15 dias ($69,6 \pm 1,2\text{g}$ vs. $282,3 \pm 1,8\text{g}$ respectivamente) e por 30 dias ($70,0 \pm 1,1\text{g}$ vs. $287 \pm 0,7\text{g}$ respectivamente) (Fig.7A). Essa redução também foi significativa quando analisado o peso dos animais desnutridos tratados com cetoconazol em relação aos animais controle também tratados com a droga, respeitados os mesmos tempos de tratamento: grupos tratados por 1 dia ($66,7 \pm 1,0\text{g}$ vs. $271,0 \pm 2,9\text{g}$ respectivamente), grupos tratados por 15 dias ($69,8 \pm 0,6\text{g}$ vs. $284,5 \pm 2,1\text{g}$ respectivamente) e grupos tratados por 30 dias ($69,4 \pm 0,6\text{g}$ vs. $291,3 \pm 2,5\text{g}$ respectivamente) (Fig. 7B).

Ainda em relação ao peso dos animais, podemos observar que o tempo de tratamento (1, 15 e 30 dias) e o tipo de tratamento (cetoconazol ou salina) não foram capazes de alterar o peso dos animais desnutridos e controle durante o desenvolvimento do trabalho (Fig. 8 A e B).

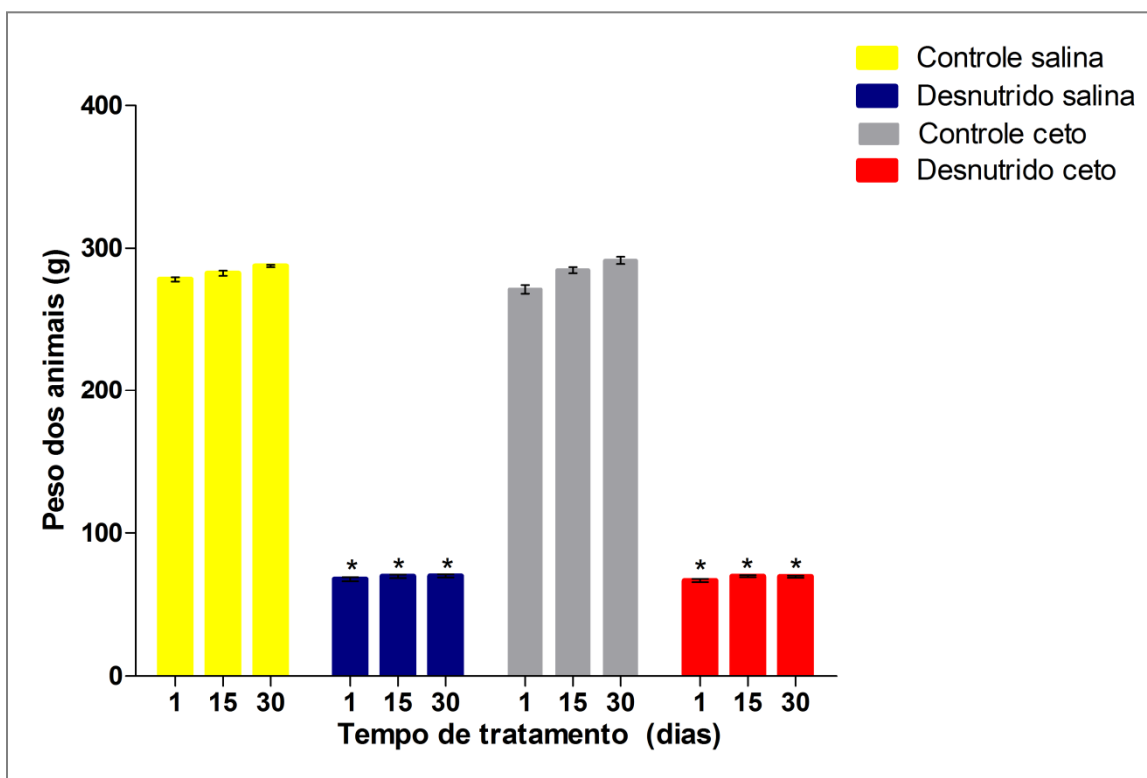


Fig. 6 - Comparação do peso corpóreo (g) de animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas), desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle. (n= 3, 3,5; 3,3,3; 6,4,6; 4,5,5 respectivamente, $P < 0,05$).

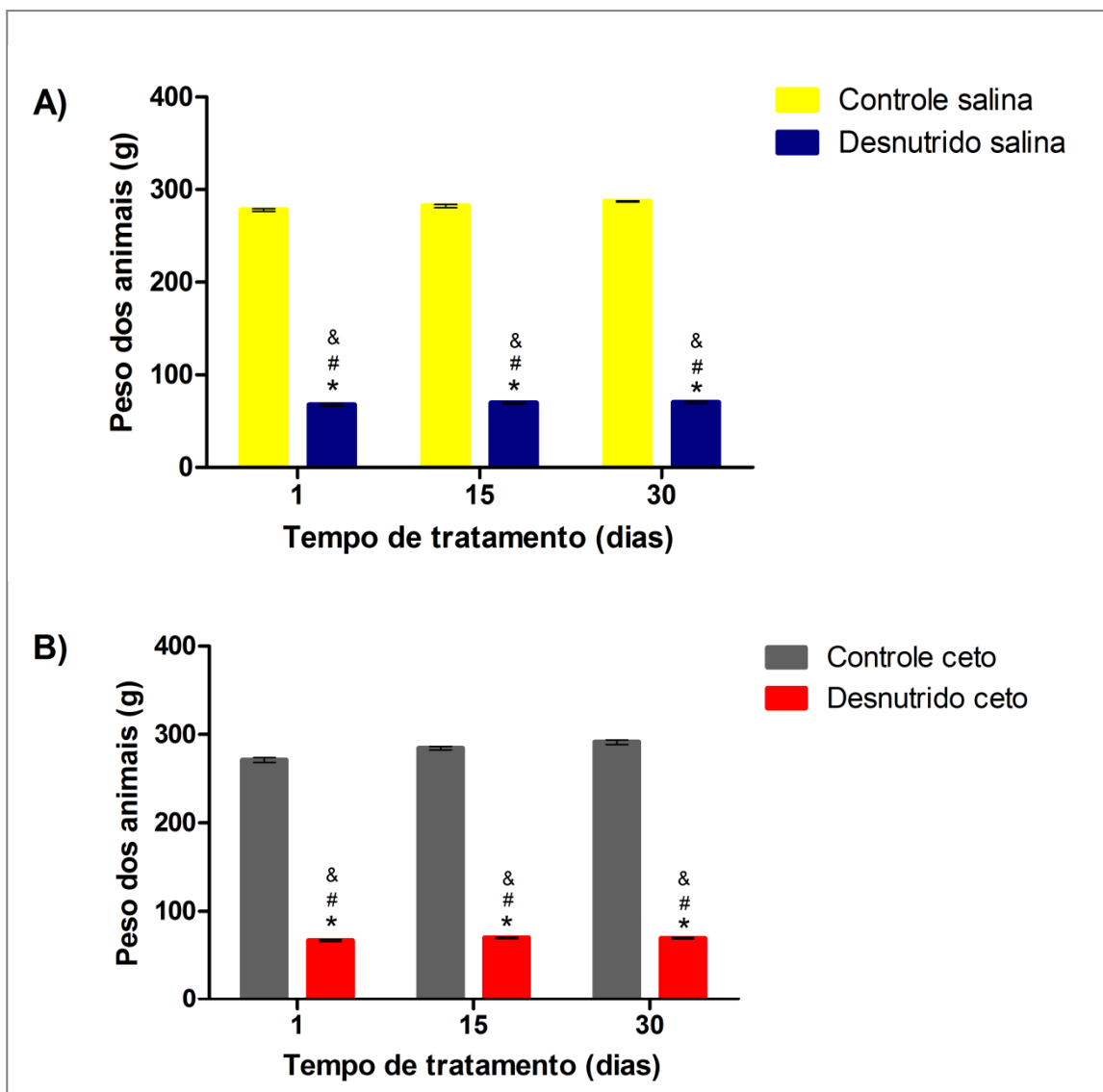


Fig. 7 - Comparação do peso corpóreo (g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (**A**) e dos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (**B**) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias (**A**). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias (**B**). ($P < 0,05$).

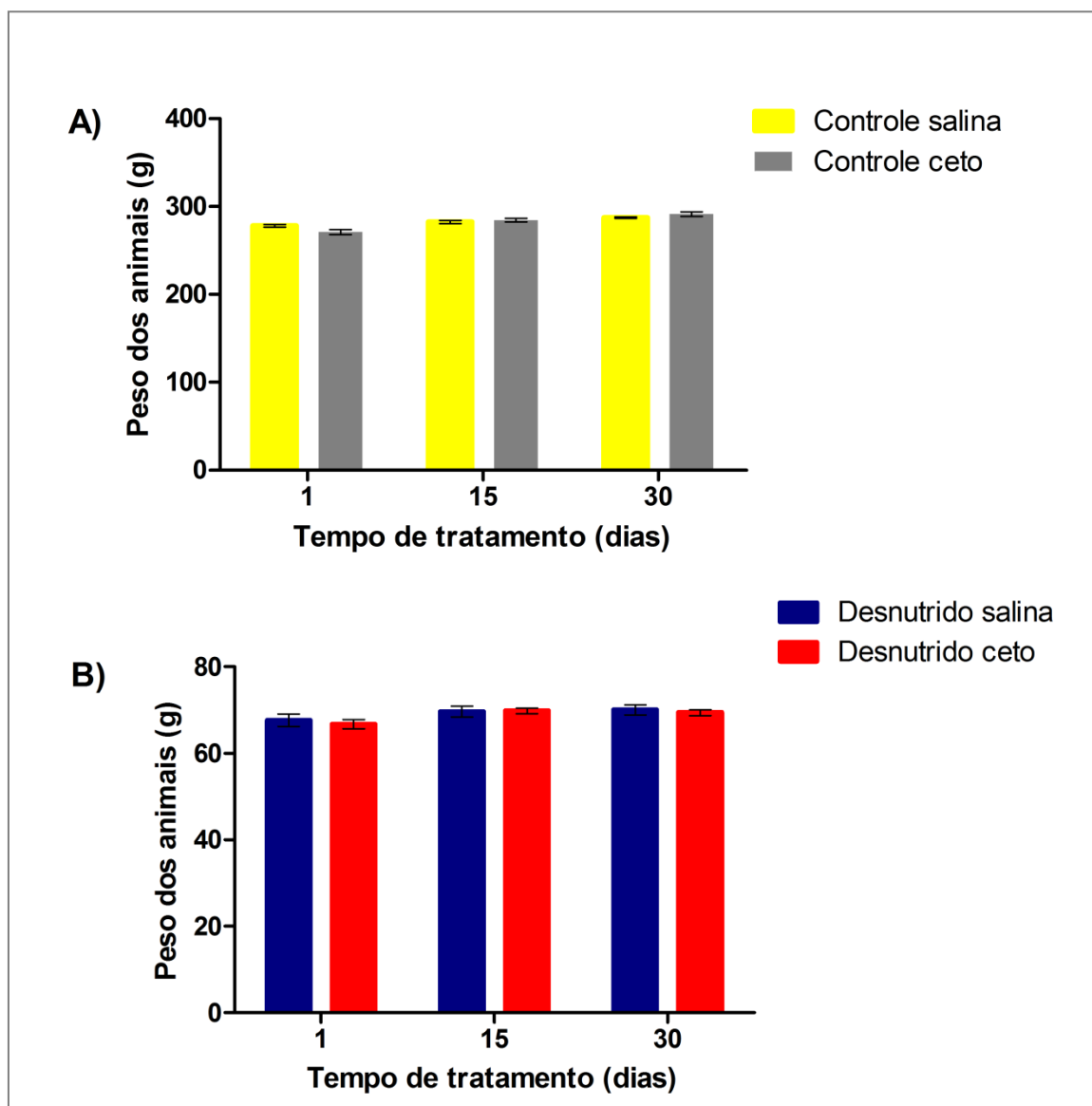


Fig. 8 - Comparação do peso corpóreo (g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) (A) e dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).

4.2 Efeito da desnutrição sobre o peso da adrenal

Ao fim de cada período experimental (1, 15 ou 30 dias), a glândula adrenal de todos os animais utilizados foram removidas, pesadas e conservadas em formalina 4% para análise histológica posterior. A figura com a representação geral de todos os grupos utilizados nesse estudo demonstra que todos os grupos de animais desnutridos tratados com salina apresentaram peso da adrenal normalizado, em relação ao peso corporal do animal (PAN), significativamente maior que o PAN de todos os grupos de animais controle tratados com salina. Nos grupos tratados com cetoconazol, os animais desnutridos tratados por 1 dia apresentaram PAN similar ao PAN dos animais controle tratados por 30 dias com a droga (Fig. 9). Também para uma melhor comparação entre os diferentes grupos experimentais, demonstraremos cada um dos resultados separadamente.

Assim, analisando o efeito da desnutrição hipoprotéica sobre o PAN, de acordo com o tipo de tratamento proposto (cetoconazol ou salina) e a duração do tratamento (1, 15 ou 30 dias), em comparação aos animais controle, observamos um aumento significativo no PAN nos animais desnutridos quando tratados com salina em relação aos animais controle também tratados com salina em todos os tempos de tratamento estudados: grupos tratado por um dia ($0,020 \pm 0,002$ g vs. $0,013 \pm 0,001$ g respectivamente), grupos tratados por 15 dias ($0,022 \pm 0,003$ g vs. $0,013 \pm 0,001$ g respectivamente) e por 30 dias ($0,023 \pm 0,002$ g vs. $0,014 \pm 0,001$ g respectivamente) (Fig. 10A). Esse aumento também foi significativo quando comparado o PAN dos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 1 dia ($0,023 \pm 0,001$ g), 15 ($0,031 \pm 0,002$ g) e por 30 dias ($0,029 \pm 0,002$ g) com o PAN dos animais controle também tratados com a droga por 1 dia ($0,013 \pm 0,0006$ g) e por 15 dias ($0,016 \pm 0,0008$ g). O animais controle tratados com cetoconazol por 30 dias ($0,021 \pm 0,001$ g) não apresentaram diferença estatística em relação ao PAN dos animais desnutridos tratados por 1 dia com cetoconazol ($0,023 \pm 0,001$ g) (Fig. 10B). Conseqüentemente, como não houve diferença estatística entre os animais do grupo desnutrido tratado por 1 dia com cetoconazol e os animais desnutridos tratados com salina (independentemente do tempo de tratamento), podemos dizer que os animais controle tratados por 30 dias com cetoconazol apresentaram o PAN semelhante ao PAN dos animais desnutridos tratados com salina por 1, 15 ou 30 dias (Fig. 10C).

Tanto os animais controle quanto os animais desnutridos apresentaram um aumento significativo no PAN quando submetidos ao tratamento com cetoconazol em comparação aos animais desnutridos e controle tratados com salina. Os animais controle demonstraram que o

tratamento com cetoconazol por 30 dias promoveu um aumento significativo no PAN ($0,021 \pm 0,001$ g) em comparação aos animais controle tratados com salina por 1 dia ($0,013 \pm 0,001$ g), 15 ($0,013 \pm 0,001$ g) e por 30 dias ($0,014 \pm 0,001$ g) (Fig. 11A). Dentre os animais desnutridos, tanto o tratamento com cetoconazol por 15 dias ($0,031 \pm 0,002$ g) quanto por 30 dias ($0,029 \pm 0,002$ g) tornou o órgão dos animais significativamente mais pesado que nos animais desnutridos tratados com salina por 1 dia ($0,020 \pm 0,002$ g), 15 dias ($0,022 \pm 0,002$ g) ou 30 dias ($0,023 \pm 0,002$ g) (Fig. 11B). O aumento no peso da glândula adrenal dos animais controle tratados com cetoconazol acompanhou o aumento no tempo de tratamento imposto aos animais, sendo dessa forma o peso da adrenal dos animais tratados com cetoconazol por 30 dias ($0,021 \pm 0,001$ g) significativamente maior que o peso das adrenais nos animais tratados por 15 dias ($0,016 \pm 0,0008$ g). Os animais tratados por 15 dias com cetoconazol apresentaram, por sua vez, o peso da adrenal também significativamente maior que os animais controle tratados por 1 dia ($0,013 \pm 0,0006$ g) (Fig. 12A). Já entre os animais desnutridos, o tratamento com cetoconazol por 15 dias ($0,031 \pm 0,002$ g) e por 30 dias ($0,029 \pm 0,002$ g) promoveu um aumento significativo no peso da adrenal quando comparado com o peso de tal órgão nos animais tratados com cetoconazol por 1 dia ($0,023 \pm 0,001$ g). No entanto, podemos observar também que o PAN do grupo tratado por 15 dias com cetoconazol ($0,031 \pm 0,002$ g) não diferiu estatisticamente do PAN dos animais tratados por 30 dias com a mesma droga ($0,029 \pm 0,002$ g) (Fig. 12B).

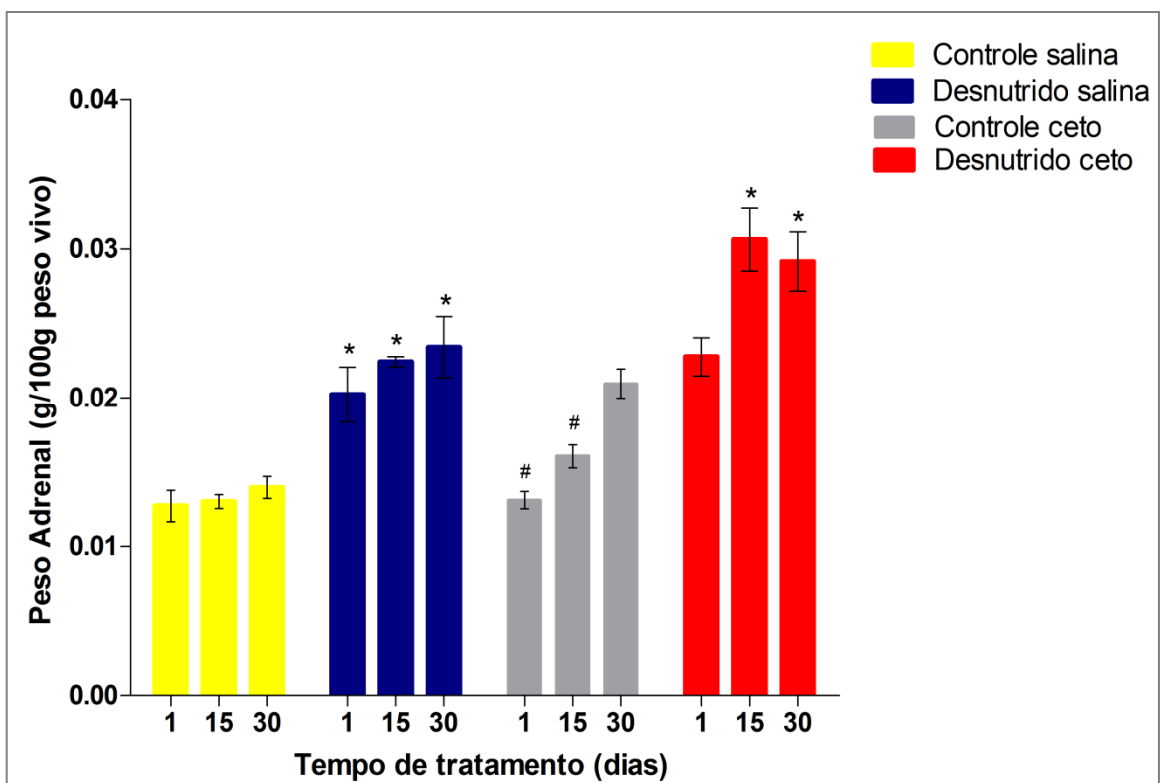


Fig. 9 - Comparação do PAN (g/100g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas), desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). () Diferença significativa em relação aos grupos controle. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia. (n=3,3,4; 3,3,3; 6,3,6; 4,4,5 respectivamente, P<0,05).*

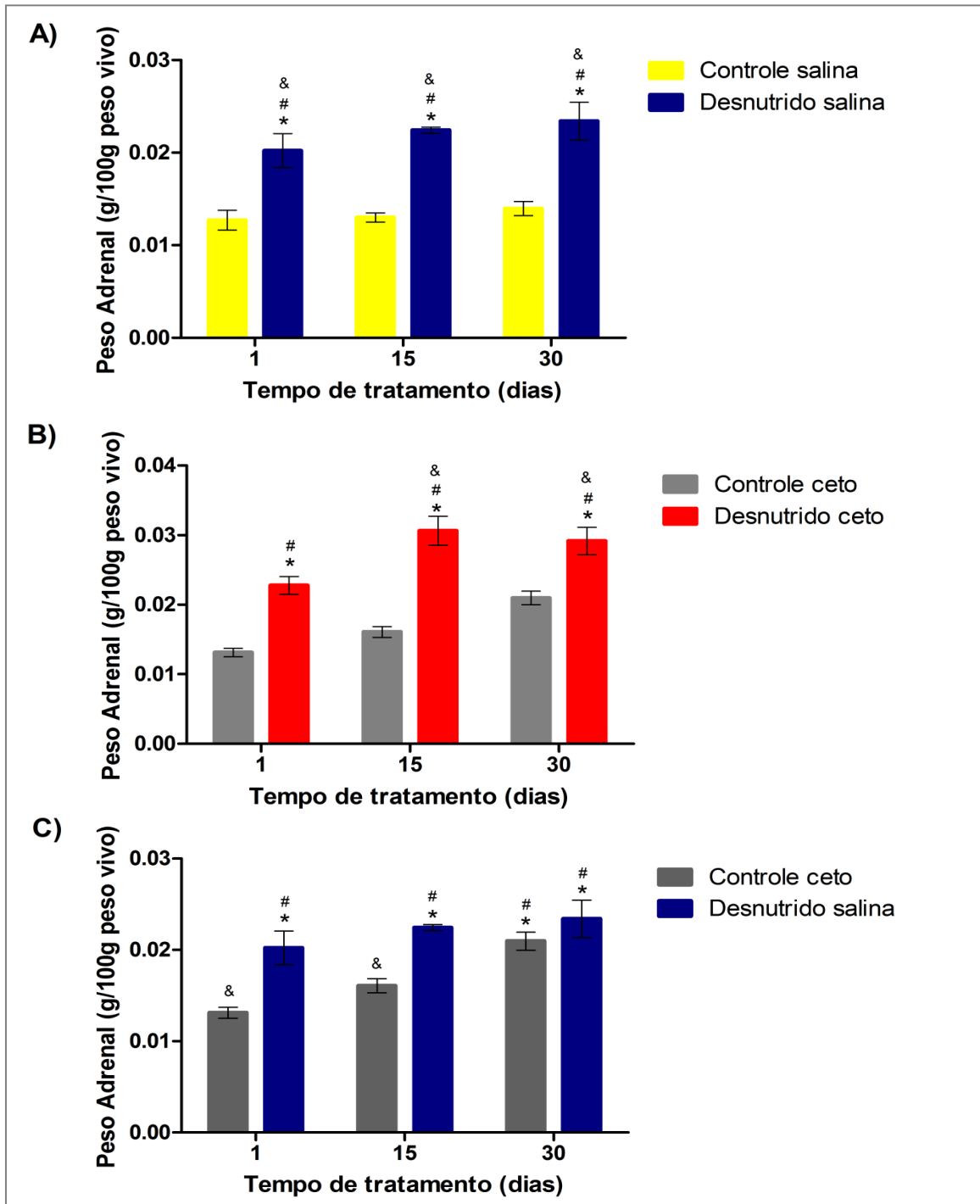


Fig. 10 - Comparação do PAN (g/100g) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (A), dos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) e dos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (C) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias (A). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias (B). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias (C). ($P < 0,05$).

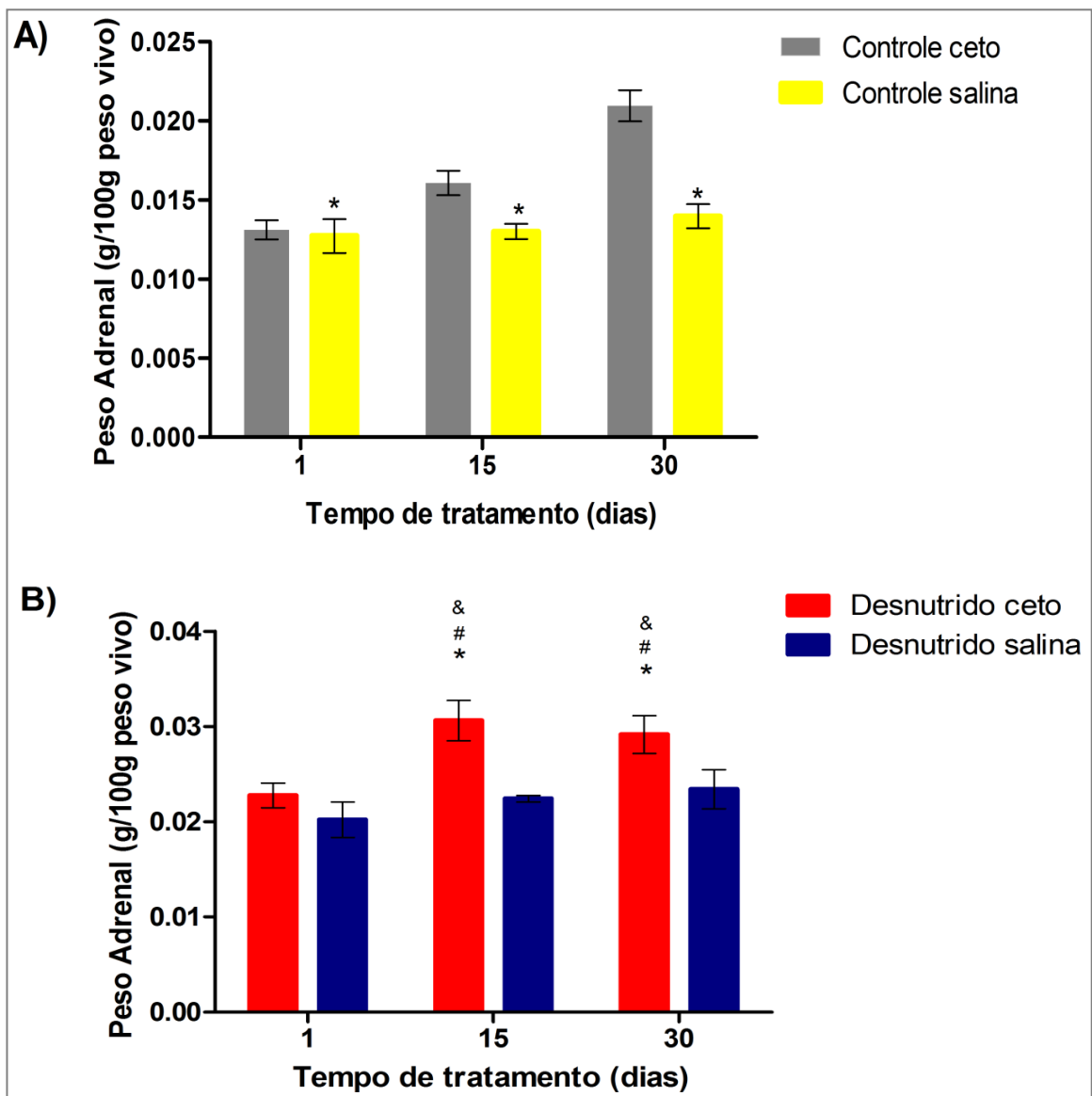


Fig. 11 - Comparação do PAN (g/100g) dos animais controle tratados com cetozol (barras cinzas) em relação aos animais controle tratados com salina (barras amarelas) (A) e dos animais desnutridos tratados com cetozol (barras vermelhas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). () Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 30 dias com cetozol (A). (*) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado por 1 dia com salina. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com salina por 30 dias (B). (P<0,05).*

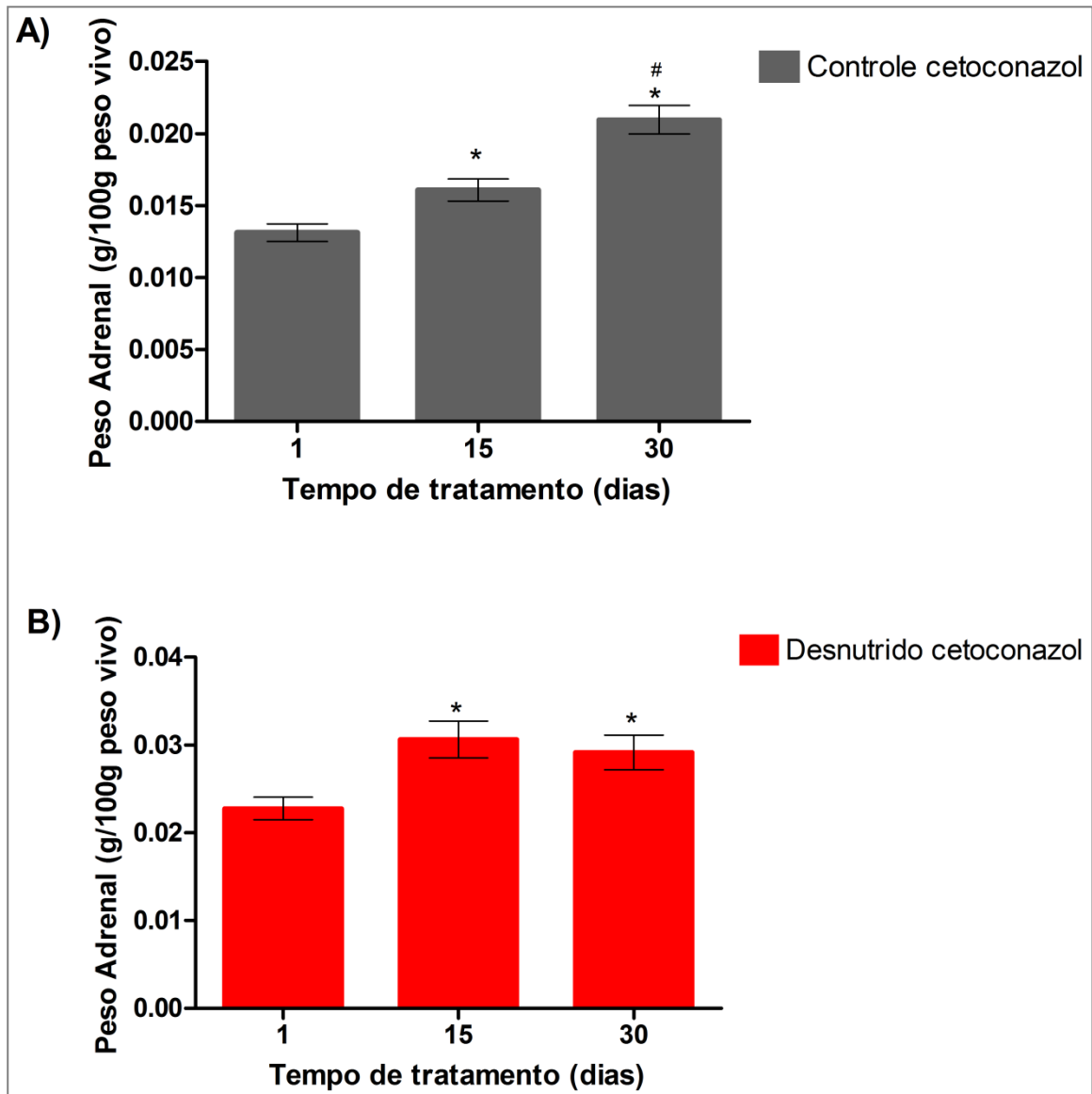


Fig. 12 - Comparação do PAN (g/100g) entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) **(A)** e entre os animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) **(B)** ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 1 dia com cetoconazol. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 15 dias com cetoconazol **(A)**. (*) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado por 1 dia com cetoconazol **(B)**. ($P < 0,05$).

4.3 Efeito da desnutrição sobre a utilização de lipídeo pela glândula adrenal

Com o intuito de dar início ao estudo das possíveis alterações causadas ao Eixo HPA a partir de uma desnutrição protéica pós desmame, realizamos a análise histológica da glândula adrenal a fim de observarmos alterações na utilização de gotículas de lipídeo pela mesma.

Dessa forma, a análise histológica realizada nesse trabalho foi responsável por verificar a quantidade de gotículas de colesterol estocadas pelas glândulas adrenais de animais desnutridos em relação aos animais controle utilizando-se cetoconazol ou salina. A análise das secções histológicas demonstrou um aumento significativo na quantidade de gotículas de lipídeos presentes nas glândulas adrenais dos animais desnutridos em relação aos respectivos controles tratados com salina por 1, 15 e 30 dias. Esse aumento também foi significativo quando comparada a quantidade de gotículas de lipídeos presentes nas glândulas adrenais dos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 1, 15 e 30 dias em relação à quantidade de gotículas de lipídeos presentes nas glândulas adrenais dos animais controle também tratados com a droga por 1 e por 15 dias. Analisando ainda esse parâmetro, os animais controle tratados com cetoconazol por 30 dias não demonstraram diferença estatística em relação aos animais desnutridos tratados por 1 dia com cetoconazol (Fig. 13). Com o mesmo intuito de promover uma melhor comparação entre os diferentes grupos experimentais, demonstraremos tais resultados separadamente.

Assim, analisando o efeito da desnutrição hipoprotéica sobre a quantidade de gotículas de colesterol estocadas pelas glândulas adrenais dos animais, de acordo com o tempo de tratamento (1, 15 ou 30 dias) e o tipo de tratamento proposto (cetoconazol ou salina), em comparação aos animais controle, observamos um aumento significativo na quantidade de gotículas de colesterol estocadas pelas glândulas adrenais nos animais desnutridos tratados com salina em relação aos animais controle também tratados com salina, em todos os tempos de tratamento estudados: grupos tratados por um dia ($8,8 \pm 0,6$ vs. $6,3 \pm 0,2$ respectivamente), grupos tratados por 15 dias ($9,2 \pm 0,4$ vs. $6,8 \pm 0,2$ respectivamente) e por 30 dias ($8,4 \pm 0,4$ vs. $6,1 \pm 0,4$ respectivamente) (Fig. 14A). Esse aumento também foi significativo quando comparada a quantidade de gotículas de colesterol estocadas pelas glândulas adrenais dos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 1 ($11,8 \pm 0,2$), 15 ($19,3 \pm 0,5$) e 30 dias ($20,4 \pm 0,3$) em relação à quantidade de gotículas de colesterol estocadas pelas glândulas adrenais dos animais controle também tratados com a droga por 1 dia ($6,1 \pm 0,6$) e 15 dias ($9,0 \pm 0,3$). Os animais controle tratados com cetoconazol por 30 dias ($11,0 \pm 0,6$) não

apresentaram diferença estatística em relação à quantidade de gotículas de colesterol estocadas pelas glândulas adrenais dos animais desnutridos tratados por 1 dia com cetoconazol ($11,8\pm 0,2$) (Fig. 14B).

O tratamento com cetoconazol por 1, 15 e 30 dias promoveu um aumento significativo e gradativo na quantidade de gotículas de lipídeo presentes na glândula adrenal dos animais controle. Dessa forma, tais animais tratados com cetoconazol por 30 dias apresentaram valores significativamente maiores que os animais tratados por 15 dias ($11,0\pm 0,6$ vs. $9,0\pm 0,3$ respectivamente), da mesma forma que os animais tratados por 15 dias com cetoconazol demonstraram quantidade de gotículas de lipídeo na glândula adrenal significativamente maior que os animais controle tratados por 1 dia ($9,0\pm 0,3$ vs. $6,1\pm 0,6$ respectivamente) (Fig. 15A). Quando esses valores são comparados com a quantidade de gotículas de lipídeos presentes na glândula adrenal dos animais desnutridos que receberam salina por 1 ($8,80\pm 0,6$), 15 ($9,2,0\pm 0,4$) ou por 30 dias ($8,4\pm 0,4$), podemos constatar que o tratamento com cetoconazol equiparou, nos animais controle, a quantidade lipídica encontrada na glândula adrenal dos animais desnutridos já nos primeiros 15 dias de tratamento com a droga ($9,0\pm 0,3$). Podemos perceber também que, com 30 dias de tratamento ($11,0\pm 0,6$), os animais controle tratados com cetoconazol apresentaram significativamente mais gotículas de lipídeos que os animais desnutridos de todos os grupos tratados com salina: 1 dia ($8,80\pm 0,6$), 15 dias ($9,2,0\pm 0,4$) ou 30 dias ($8,4\pm 0,4$) (Fig. 15B). Já nos animais desnutridos, o tratamento com cetoconazol promoveu um aumento significativo na quantidade de gotículas de lipídeos presentes na glândula adrenal dos animais tratados por 15 dias ($19,3\pm 0,5$) e por 30 dias ($20,4\pm 0,3$) em relação ao mesmo parâmetro nos animais tratados com cetoconazol por 1 dia ($11,8\pm 0,2$). Porém, podemos perceber que a quantidade de gotículas de lipídeo presentes na glândula adrenal dos animais tratados por 15 dias não foi estatisticamente diferente da quantidade encontrada nos animais tratados por 30 dias (Fig. 15C).

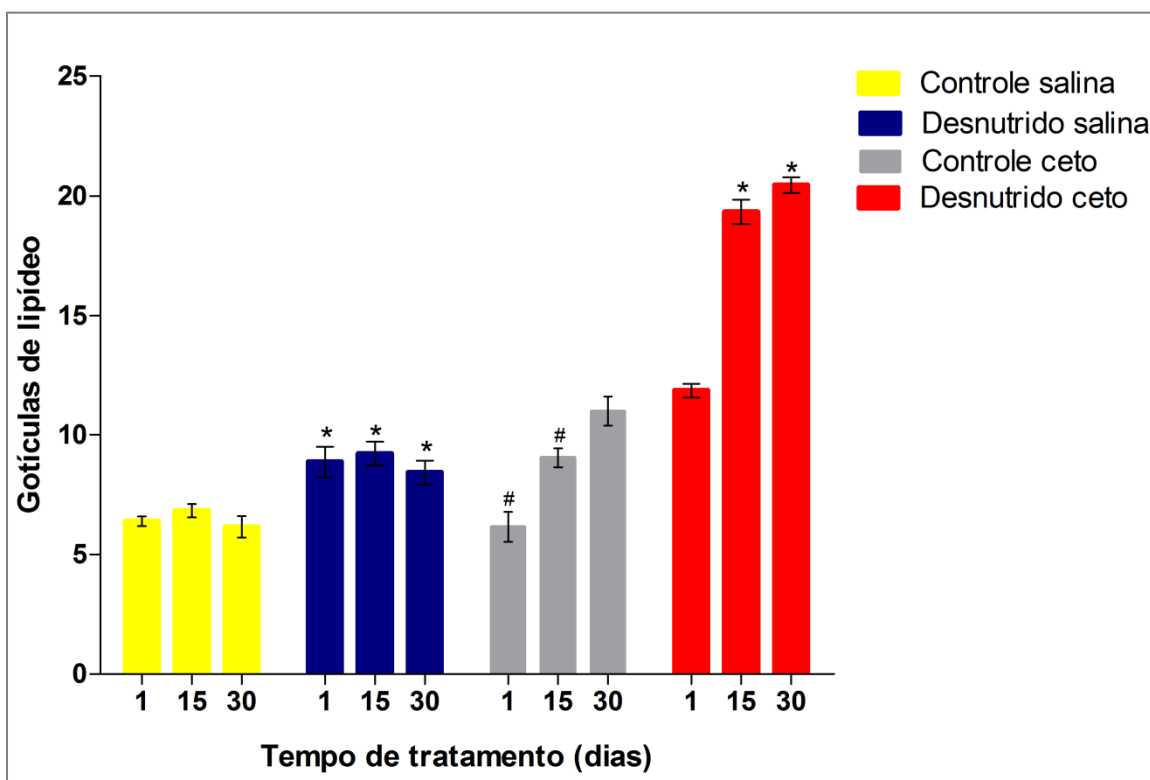


Fig. 13 - Comparação da quantidade de lipídico na glândula adrenal dos animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas), desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia. (n=3,3,4; 3,3,3; 6,3,6; 4,4,5 respectivamente, $P < 0,05$).

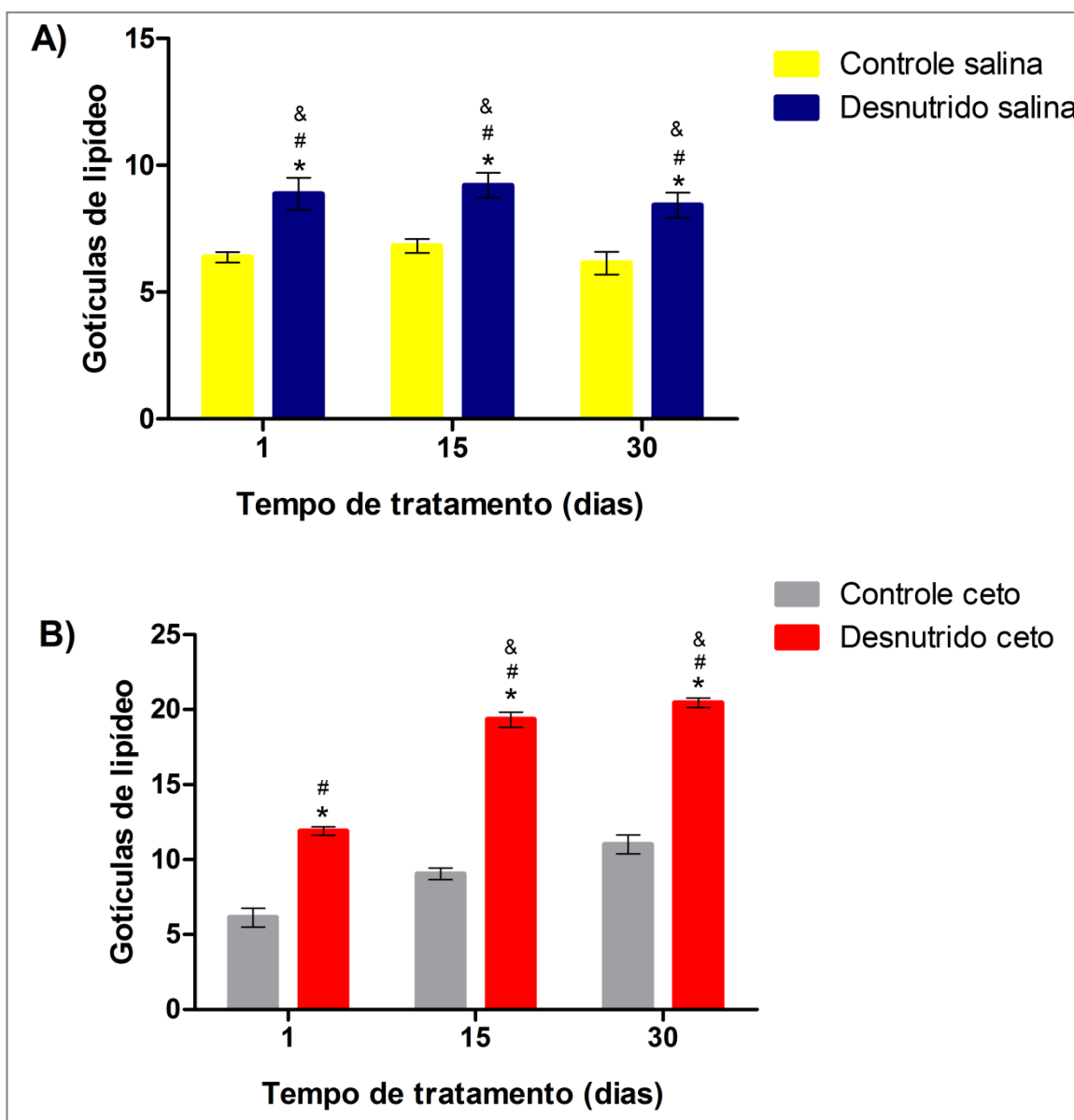


Fig. 14 - Comparação da quantidade de lipídeo na glândula adrenal dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (A) e controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias (A). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 1 dia com cetoconazol. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 15 dias com cetoconazol. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 30 dias com cetoconazol (B). ($P < 0,05$).

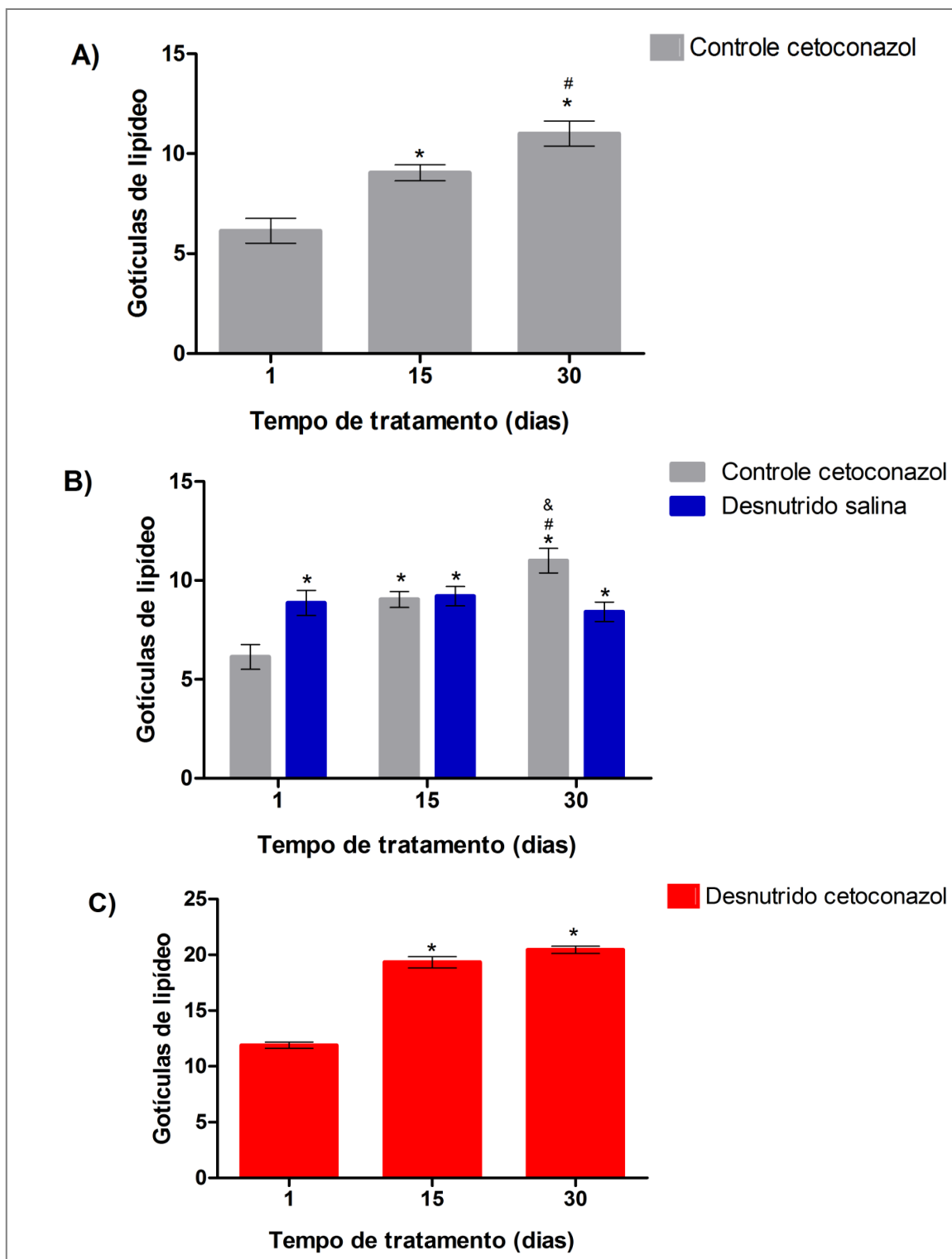


Fig. 15 - Comparação da quantidade de lipídeo na glândula adrenal entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) (A), dos animais controles tratados com cetoconazol (barras cinzas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) e dos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (C) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 1 dia com cetoconazol. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 15 dias com cetoconazol (A). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 1 dia com cetoconazol. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado por 15 dias com cetoconazol. (&) Diferença significativa em relação aos grupos desnutridos salina (B). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado por 1 dia com cetoconazol (C). ($P < 0,05$).

4.4 Efeito da desnutrição sobre o metabolismo de cortisol

Nesse trabalho, nos propusemos a analisar também o perfil de produção do hormônio glicocorticóide cortisol nos animais submetidos à desnutrição protéica, comparando esses valores a animais controle, ambos submetidos ao tratamento com cetoconazol ou salina. Apesar do hormônio adrenocorticóide mais comumente estudado em ratos ser a corticosterona, o cortisol, mesmo encontrado em menor quantidade nessa espécie, demonstrou ser também um bom índice do efeito estressor provocado pela desnutrição. Numa análise geral podemos observar que os animais desnutridos tratados com salina demonstraram níveis séricos de cortisol significativamente maiores que os níveis de cortisol dos animais controle também tratados com salina, independentemente da duração do tratamento. Ainda podemos destacar a eficiência do tratamento com cetoconazol no controle da produção esteroidogênica adrenal, tanto em animais controle quanto em animais desnutridos (Fig. 16). Assim como nos resultados anteriores, demonstraremos esses resultados separadamente a fim de promovermos uma melhor comparação entre os diferentes grupos experimentais.

Dessa forma, analisando o efeito da desnutrição protéica sobre a produção de cortisol, de acordo com cada tempo de tratamento (1, 15 ou 30 dias) e o tipo de tratamento proposto (cetoconazol ou salina) em comparação aos animais controle, observamos um aumento significativo na produção de cortisol nos animais desnutridos tratados com salina em relação aos animais controle também tratados com salina, em todos os tempos de tratamento estudados: grupos tratado por um dia ($4,9 \pm 0,5$ $\mu\text{g/dL}$ vs. $2,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g/dL}$ respectivamente), grupos tratados por 15 dias ($5,7 \pm 0,5$ $\mu\text{g/dL}$ vs. $2,5 \pm 0,4$ $\mu\text{g/dL}$ respectivamente) e por 30 dias ($5,6 \pm 0,5$ $\mu\text{g/dL}$ vs. $2,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/dL}$ respectivamente) (Fig. 17). Nesses animais tratados com salina, podemos afirmar também que o tempo de tratamento por 1, 15 ou 30 dias não interferiu na produção de cortisol uma vez que nem animais controle ($2,1 \pm 0,2$; $2,5 \pm 0,4$; $2,3 \pm 0,1$ respectivamente) e nem animais desnutridos ($4,9 \pm 0,5$; $5,7 \pm 0,5$; $5,6 \pm 0,5$ respectivamente) demonstraram alterações significativas na produção de cortisol durante o desenvolvimento do estudo (Fig. 18 A e B).

Com o objetivo de produzirmos o bloqueio na produção, ou uma redução significativa nos níveis séricos de cortisol dos animais desnutridos, utilizamos o fármaco cetoconazol. Além de ser um antifúngico de amplo espectro de ação vastamente utilizado nas infecções de pele, diversos estudos na literatura amparam o uso do cetoconazol como um potente inibidor da esteroidogênese adrenal. Nesse estudo, o tratamento com cetoconazol por 15 dias

demonstrou ser eficiente em reduzir significativamente os níveis séricos de cortisol nos animais desnutridos ($1,9 \pm 0,3 \mu\text{g/dL}$), levando a concentração de tal hormônio a valores equivalentes àqueles observados em animais controle tratados com salina por 1 dia ($2,1 \pm 0,2 \mu\text{g/dL}$). Podemos observar também que os animais desnutridos tratados com cetoconazol por 30 dias ($0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/dL}$) apresentaram níveis séricos de cortisol significativamente inferiores aos valores observados nos animais controle tratados com salina por 1 dia ($2,1 \pm 0,2 \mu\text{g/dL}$), 15 dias ($2,5 \pm 0,4 \mu\text{g/dL}$) e por 30 dias ($2,3 \pm 0,1 \mu\text{g/dL}$) (Fig. 19). Assim, podemos afirmar que o tratamento com cetoconazol promoveu uma eficiente diminuição nos níveis séricos de cortisol nos animais desnutridos, diretamente proporcional ao seu tempo de tratamento. Dessa maneira, tais animais tratados com cetoconazol por 30 dias apresentaram valores significativamente menores que os animais tratados por 15 dias ($0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/dL}$ vs. $1,9 \pm 0,3 \mu\text{g/dL}$), da mesma forma que os animais tratados por 15 dias com cetoconazol demonstraram também significativa redução nos níveis séricos de cortisol quando comparados aos animais controle tratados por 1 dia ($1,9 \pm 0,3 \mu\text{g/dL}$ vs. $8,9 \pm 1,6 \mu\text{g/dL}$ respectivamente) (Fig. 20).

Ainda em relação aos animais desnutridos, podemos observar que o tratamento com cetoconazol por 1 dia provocou um aumento exacerbado na produção de cortisol nesses animais, sendo esses valores significativamente maiores que os valores encontrados nos animais desnutridos tratados com salina por 1 dia ($8,9 \pm 1,6 \mu\text{g/DL}$ vs. $4,9 \pm 0,5 \mu\text{g/DL}$ respectivamente), 15 dias ($8,9 \pm 1,6 \mu\text{g/DL}$ vs. $5,7 \pm 0,5 \mu\text{g/DL}$ respectivamente) e 30 dias ($8,9 \pm 1,6 \mu\text{g/DL}$ vs. $5,6 \pm 0,5 \mu\text{g/DL}$ respectivamente) (Fig. 21).

Entre os grupos controle, o tratamento com cetoconazol também promoveu significativa redução no nível sérico de cortisol nos animais tratados por 15 dias ($1,3 \pm 0,2 \mu\text{g/DL}$) e nos animais tratados por 30 dias ($1,1 \pm 0,2 \mu\text{g/DL}$) em relação aos animais controle tratados com salina por 1 dia ($2,1 \pm 0,2 \mu\text{g/DL}$), 15 dias ($2,5 \pm 0,4 \mu\text{g/DL}$) e 30 dias ($2,3 \pm 0,1 \mu\text{g/DL}$) (Fig. 22). Porém, ao contrário dos animais desnutridos, que demonstraram um perfil de inibição da produção de cortisol diretamente proporcional ao tempo de tratamento com cetoconazol, o nível de cortisol nos animais controle tratados por 15 dias com cetoconazol não diferiu estatisticamente dos valores encontrados nos animais controle tratados com cetoconazol por 30 dias ($1,3 \pm 0,2 \mu\text{g/DL}$ vs. $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g/DL}$) (Fig. 23).

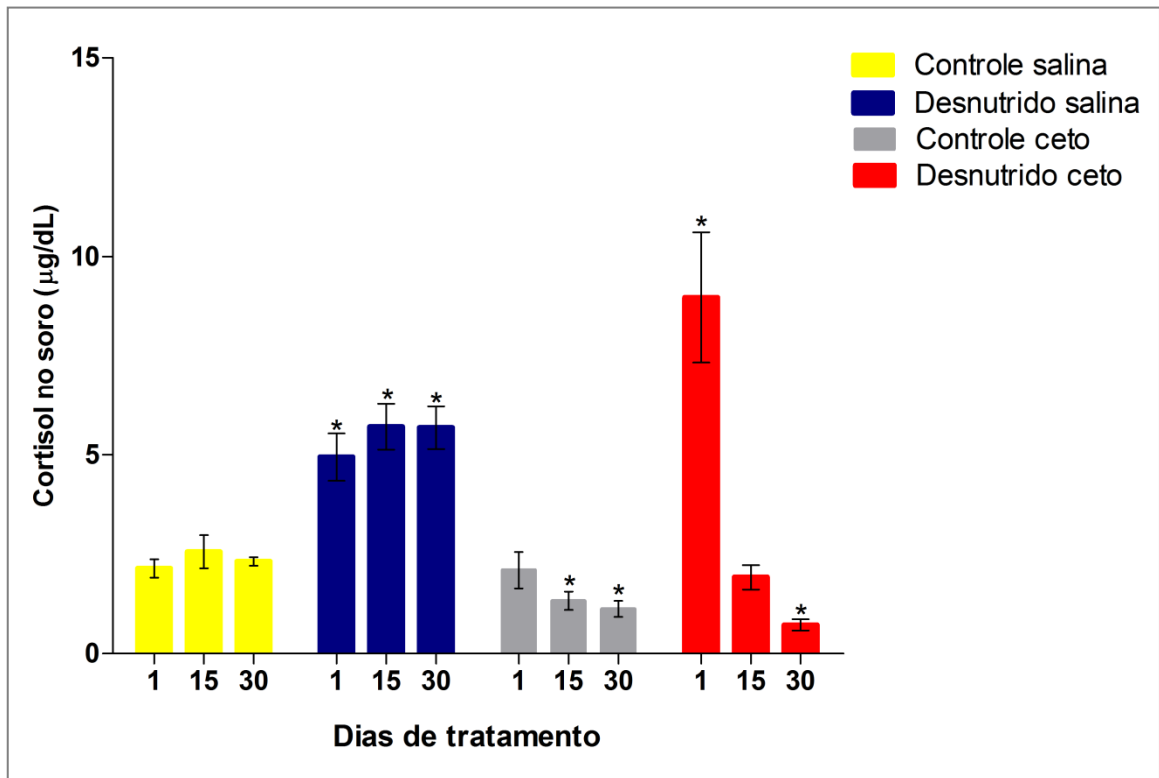


Fig. 16 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle salina. ($n= 5,5,5; 5,5,5; 5,5,5; 5,5,5$ respectivamente, $P<0,05$).

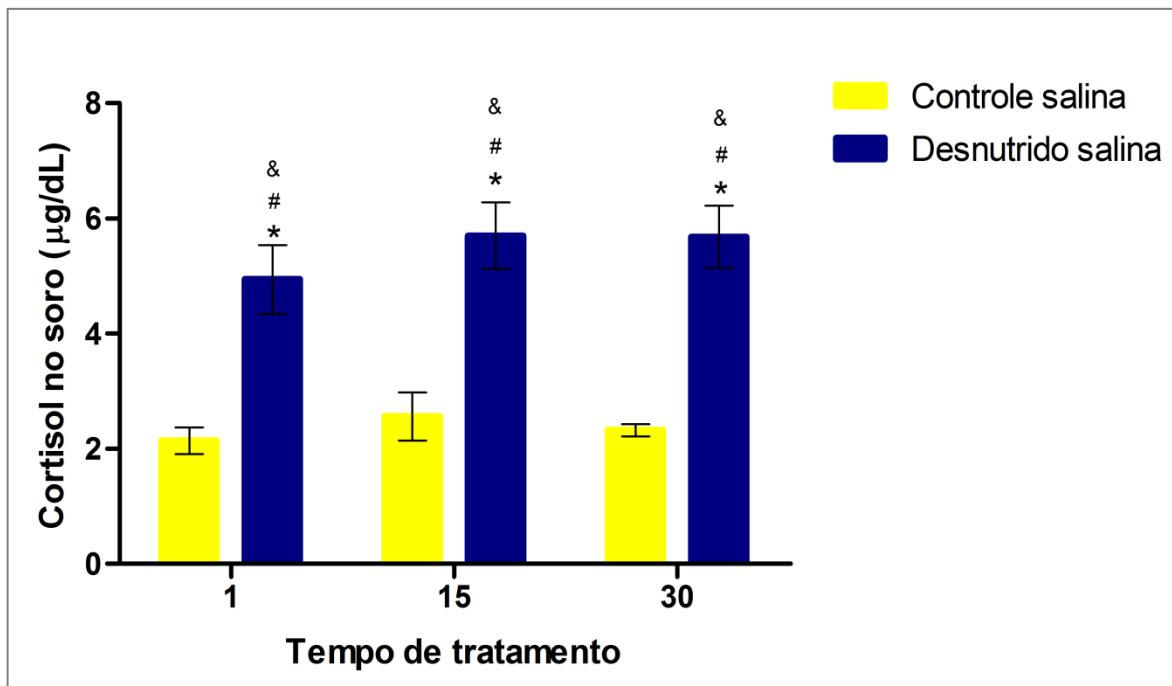


Fig.17 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias. ($P<0,05$).

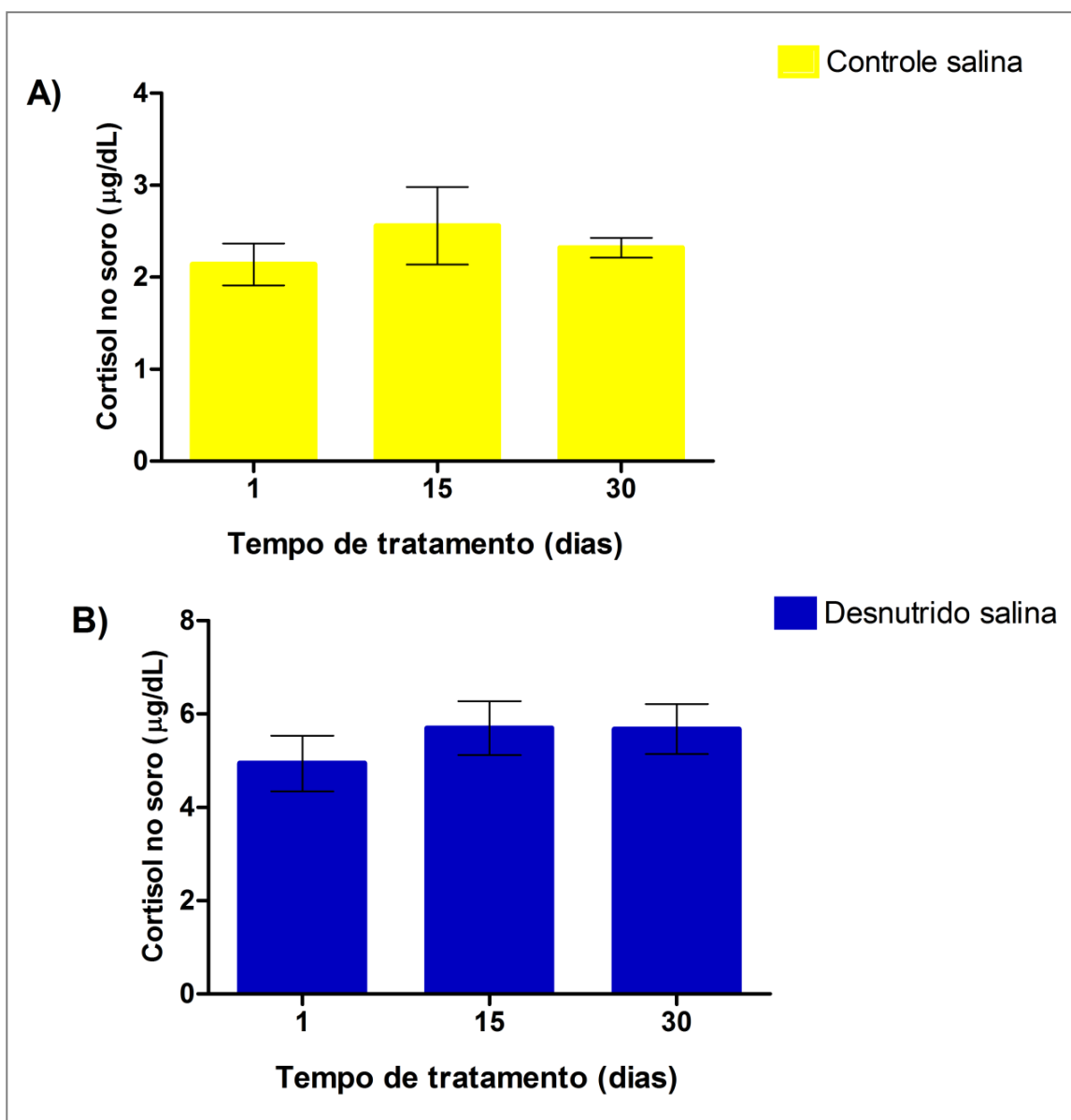


Fig. 18 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre os animais controle tratados com salina (barras amarelas) (A) e entre os animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).

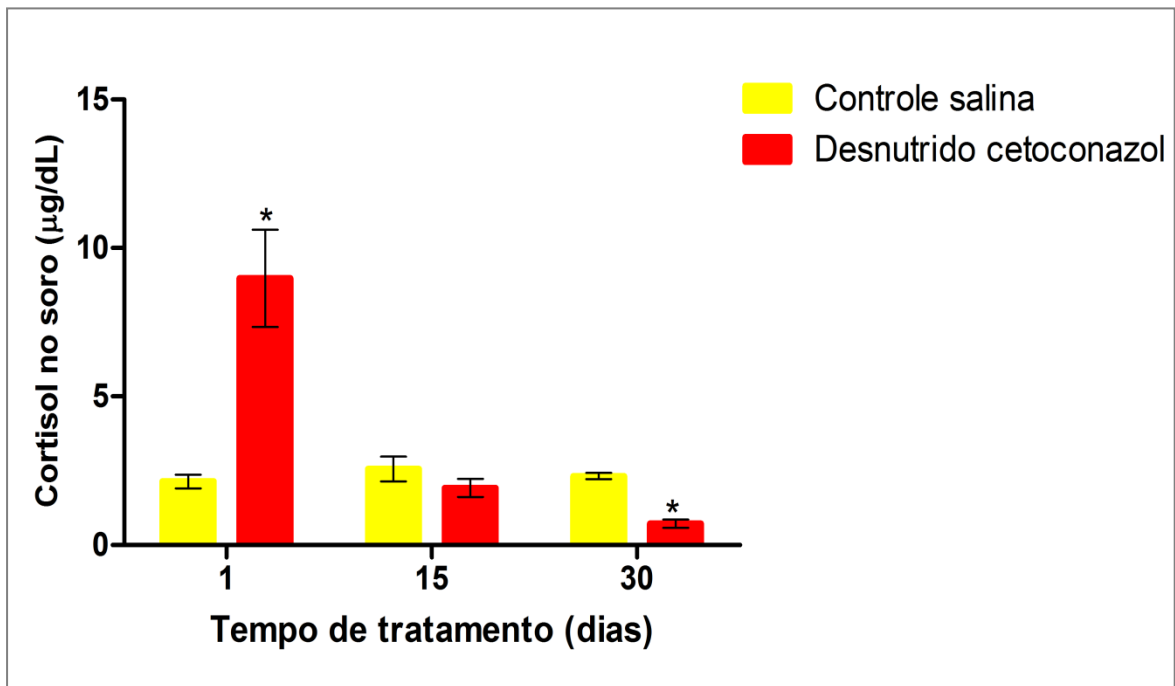


Fig. 19 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetozonazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). () Diferença significativa em relação aos grupos controle salina ($P < 0,05$).*

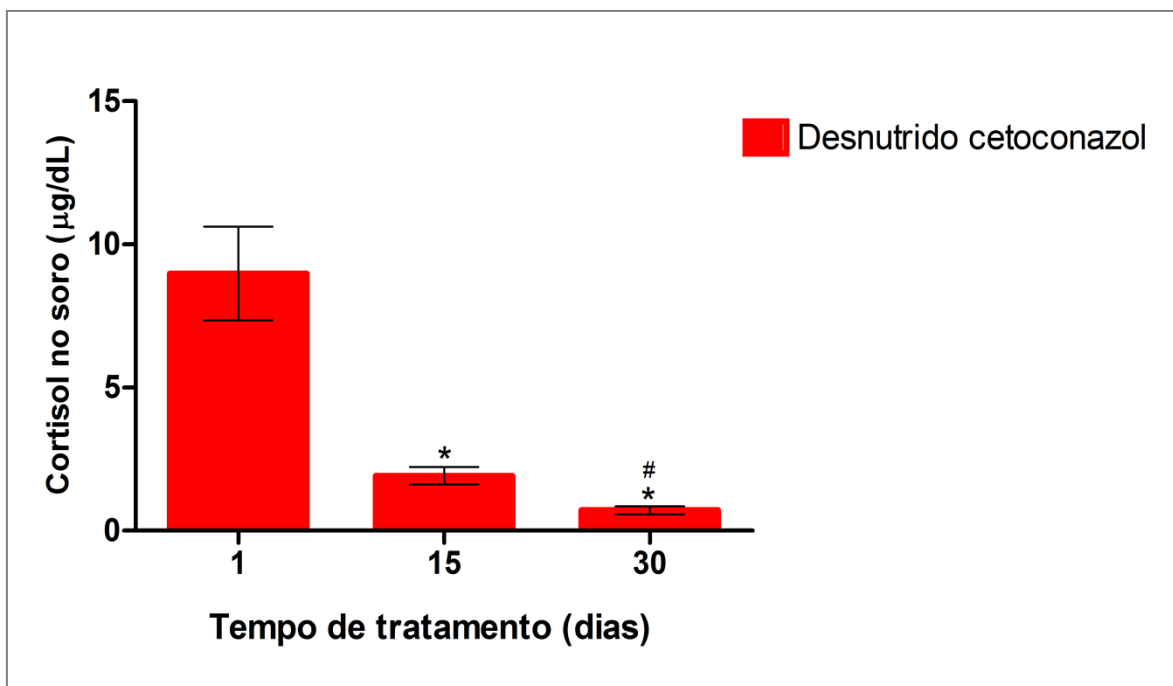


Fig. 20 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre os animais desnutridos tratados com cetozonazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). () Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetozonazol por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetozonazol por 15 dias ($P < 0,05$).*

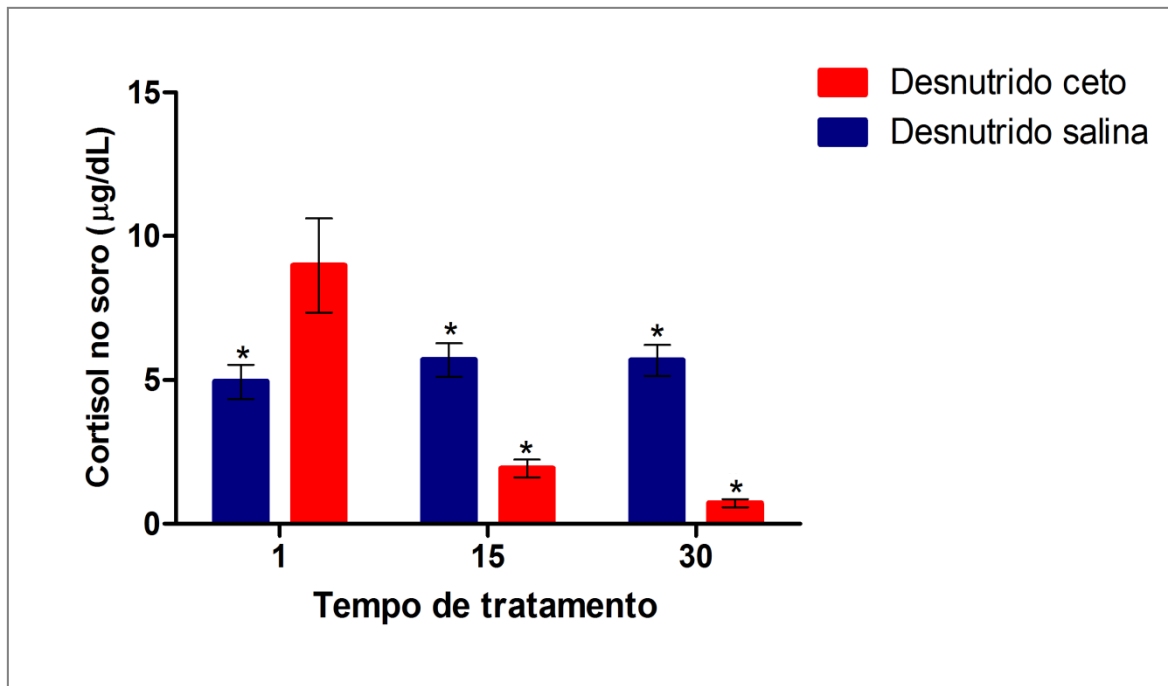


Fig. 21 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia. ($P < 0,05$).

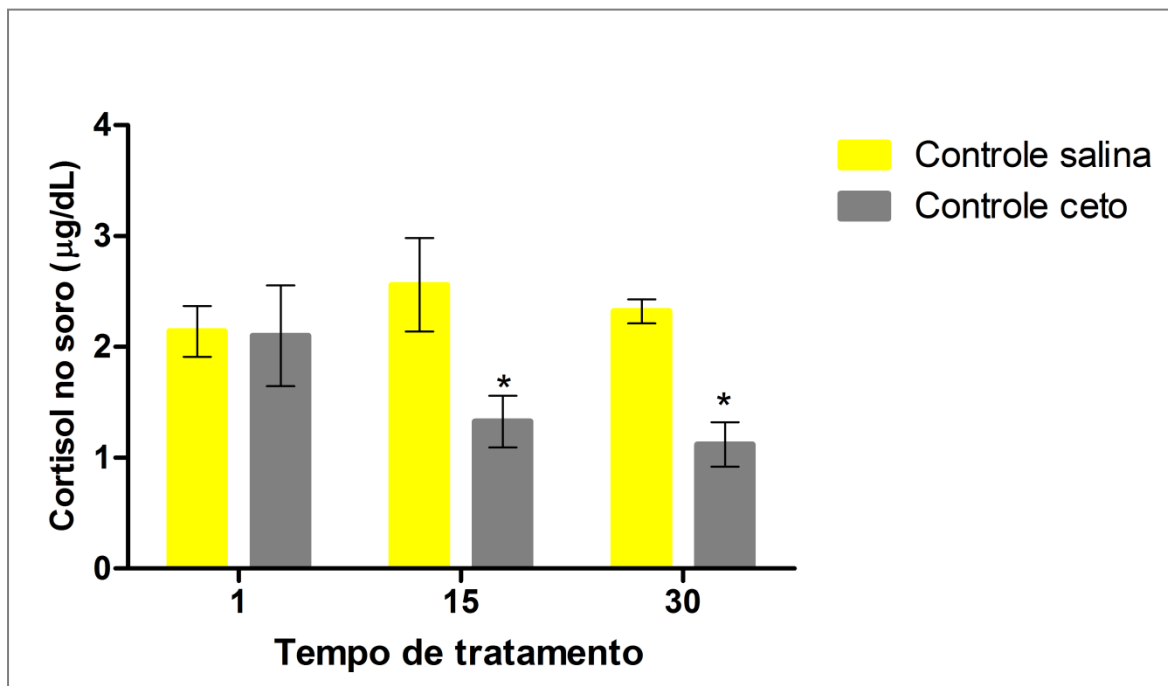


Fig. 22 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle salina ($P < 0,05$).

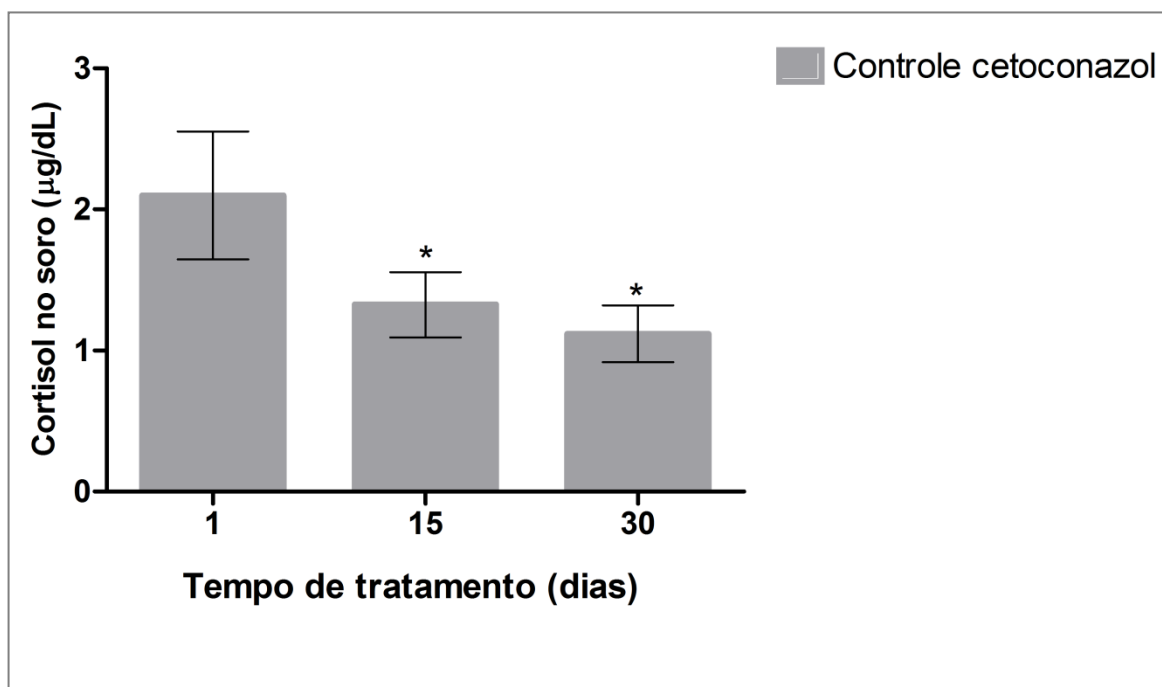


Fig. 23 - Comparação da produção de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinza) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia. ($P < 0,05$).

4.5 Efeito da desnutrição sobre os parâmetros cardiovasculares

Nessa etapa do trabalho, nos propusemos a analisar possíveis alterações em alguns parâmetros cardiovasculares como a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca média (FC) evocadas pela desnutrição protéica pós desmame. Também analisamos esses parâmetros cardiovasculares a partir do tratamento dos animais desnutridos com cetoconazol ou salina e comparamos os resultados obtidos com animais controle submetidos aos mesmos protocolos de tratamento.

Para obtermos o valor de PAM basal dos animais utilizados nesse estudo, um período médio de 10 minutos foi selecionado a partir do registro total do animal. Utilizando a fig. 24 para uma análise geral da PAM dos grupos utilizados nesse trabalho, podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos de animais controle e os grupos de animais desnutridos, independentemente do tratamento com salina ou cetoconazol. Como nos resultados já apresentados, a fim de promovermos uma melhor comparação entre os diferentes grupos experimentais, demonstraremos os resultados a seguir separadamente.

Ainda sobre a análise da PAM, podemos observar que nem o tratamento com cetoconazol e nem o período durante o qual os animais receberam salina, por 1, 15 e 30 dias,

foram capazes de provocar qualquer tipo de alteração nesse parâmetro, tanto nos animais desnutridos quanto nos animais controle durante o desenvolvimento do estudo (Fig. 25 A e B).

Assim como a PAM basal, a análise da FC basal dos animais utilizados nesse estudo foi obtida através da seleção de um período estável médio de 10 minutos a partir do registro total do animal. Analisando de forma geral todos os grupos utilizados nesse trabalho, podemos constatar que a desnutrição promoveu um aumento significativo na FC basal desses animais quando comparada à FC basal dos animais controle, independentemente do tempo e do tipo de tratamento. Observamos também que o tratamento com cetoconazol reduziu significativamente a FC basal dos animais desnutridos tratados por 15 e por 30 dias em relação aos animais desnutridos tratados com a droga por 1 dia (Fig. 26). Continuamos a apresentar os resultados separadamente, a fim de obtermos uma melhor condição de comparação entre os grupos experimentais.

Analisando primeiramente os animais tratados com salina, podemos observar que os animais desnutridos tratados por 1 ($418 \pm 2,0$ bpm), 15 ($427 \pm 2,0$ bpm) e 30 dias (435 ± 13 bpm) apresentaram uma FC basal significativamente maior que os animais controle submetidos ao mesmo tratamento: 1 dia ($338 \pm 3,9$ bpm), 15 dias ($333 \pm 4,1$ bpm) e 30 dias ($337 \pm 2,3$ bpm) (Fig. 27). Nesses animais tratados com salina, podemos afirmar também que o tempo de tratamento não interferiu na FC basal, uma vez que, durante o desenvolvimento do estudo, nem animais controle e nem animais desnutridos demonstraram alterações significativas nesse parâmetro (Fig 28 A e B).

Já nos animais tratados com cetoconazol, observamos uma significativa diminuição na FC basal dos animais desnutridos que receberam o tratamento por 15 (376 ± 12 bpm) e por 30 dias (379 ± 12 bpm) em relação aos animais desnutridos que receberam cetoconazol por 1 dia (425 ± 5 bpm). Podemos observar também que a FC basal dos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 30 dias não diferiu estatisticamente da FC basal dos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 15 dias (Fig.29). Conseqüentemente, como não houve diferença estatística entre os animais do grupo desnutrido tratado por 1 dia com cetoconazol e os animais desnutridos tratados com salina (independentemente do tempo de tratamento), podemos afirmar também que os animais desnutridos tratados por 15 e 30 dias com cetoconazol apresentaram FC significativamente menor que a FC dos animais desnutridos tratados com salina por 1, 15 ou 30 dias (Fig. 30).

Apesar dessa diminuição na FC dos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 15 e 30 dias ter sido significativa quando comparada à FC dos animais desnutridos tratados com salina, os animais desnutridos tratados com cetoconazol ainda demonstraram valores de FC basal significativamente aumentados em relação aos animais controle tratados com salina por 1 ($418 \pm 2,0$ bpm vs. $338 \pm 3,0$ bpm respectivamente), 15 ($427 \pm 2,3$ bpm vs. $333 \pm 4,1$ bpm respectivamente) ou 30 dias ($435 \pm 13,4$ bpm vs. $337 \pm 2,3$ bpm respectivamente) (Fig. 31).

Dentre os animais controle tratados com cetoconazol, nenhuma diferença estatística foi encontrada quando comparamos esses animais tratados por 1 dia ($338 \pm 3,9$ bpm) com os animais tratados por 15 ($333 \pm 4,1$ bpm) ou 30 dias ($337 \pm 2,3$ bpm) (Fig. 32). Da mesma forma, quando comparamos a FC basal dos animais controle tratados com cetoconazol com a FC basal dos animais controle tratados com salina por 1 ($344 \pm 2,7$ bpm vs. $338 \pm 3,9$ bpm respectivamente), 15 ($337 \pm 5,0$ bpm vs. 376 ± 12 bpm respectivamente) ou 30 dias ($341 \pm 4,8$ bpm vs. $379 \pm 6,8$ bpm respectivamente), também não observamos nenhuma diferença estatística entre eles (Fig. 33).

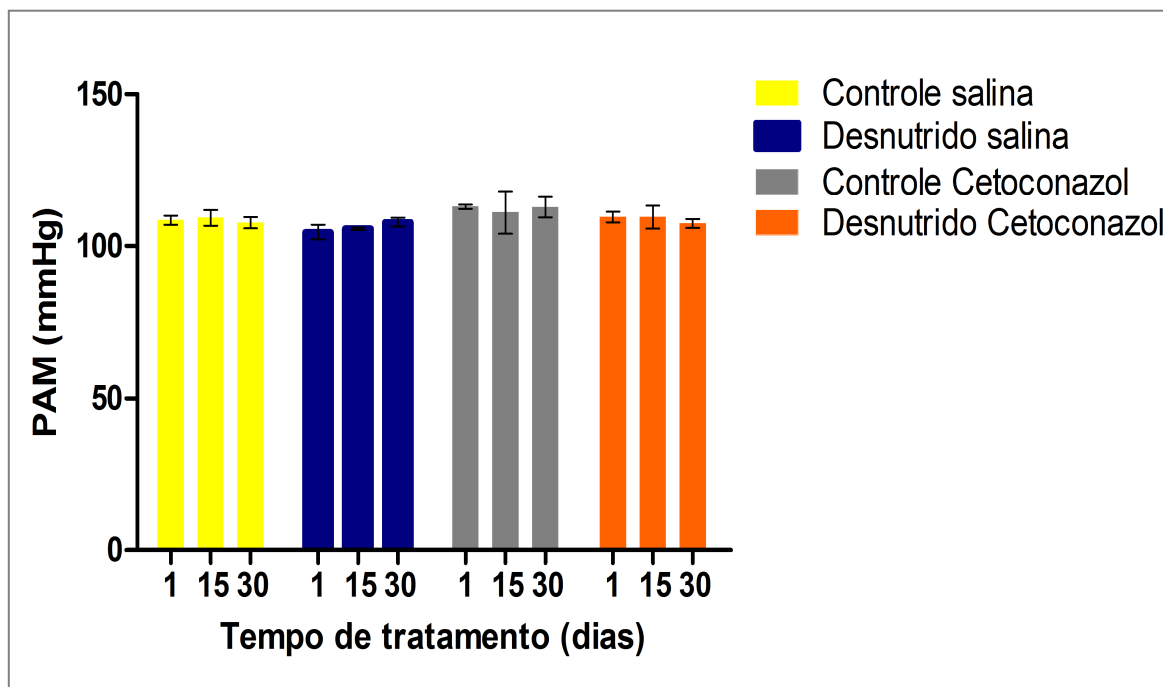


Fig. 24 - Comparação da pressão arterial média basal (PAM) (mmHg) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). ($n = 5,5,5; 3,3,3; 5,5,5; 4,5,4$ respectivamente, $P < 0,05$).

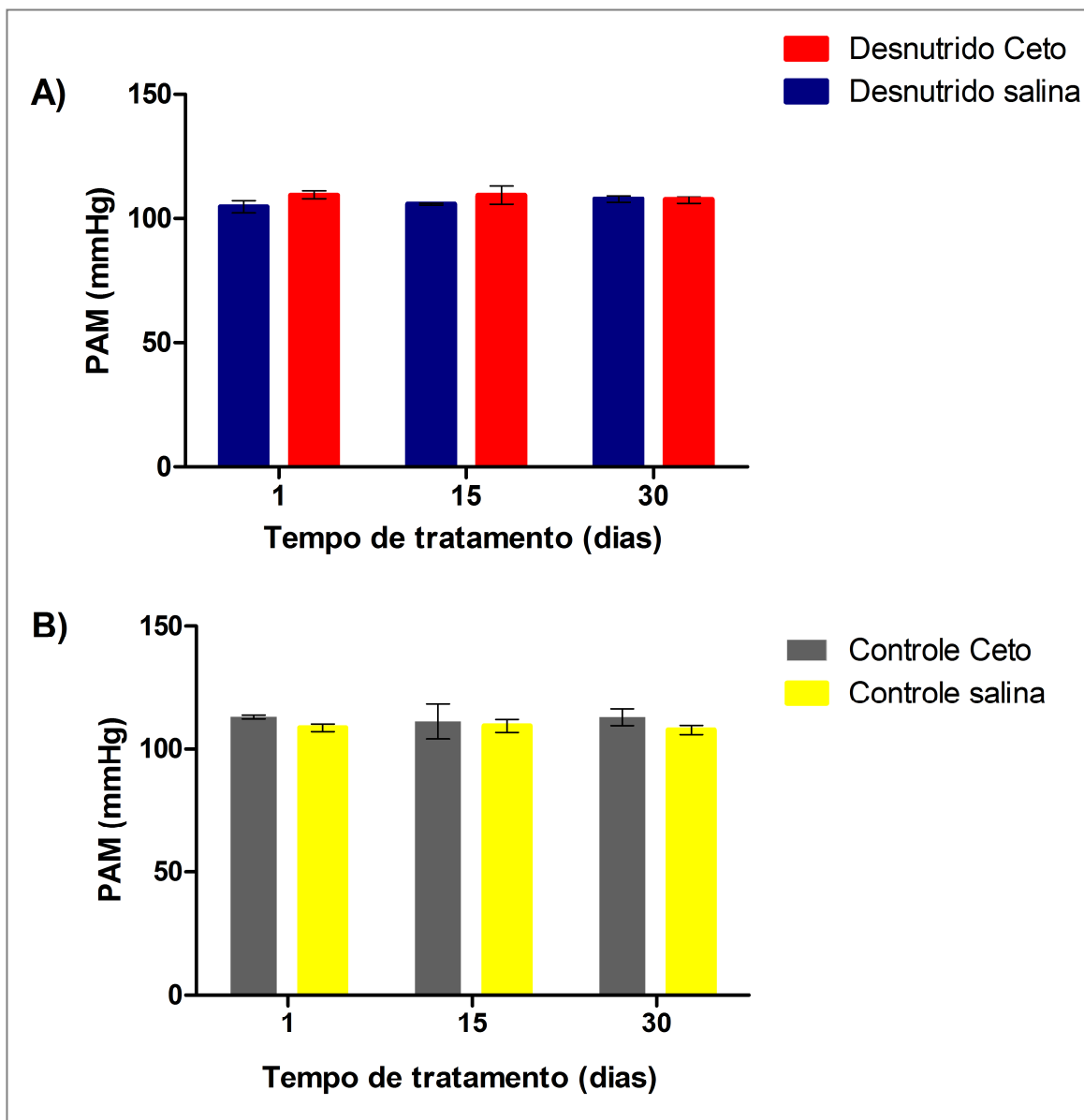


Fig. 25 - Comparação da pressão arterial média basal (PAM) (mmHg) dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) (A) e dos animais controle tratados com salina em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).

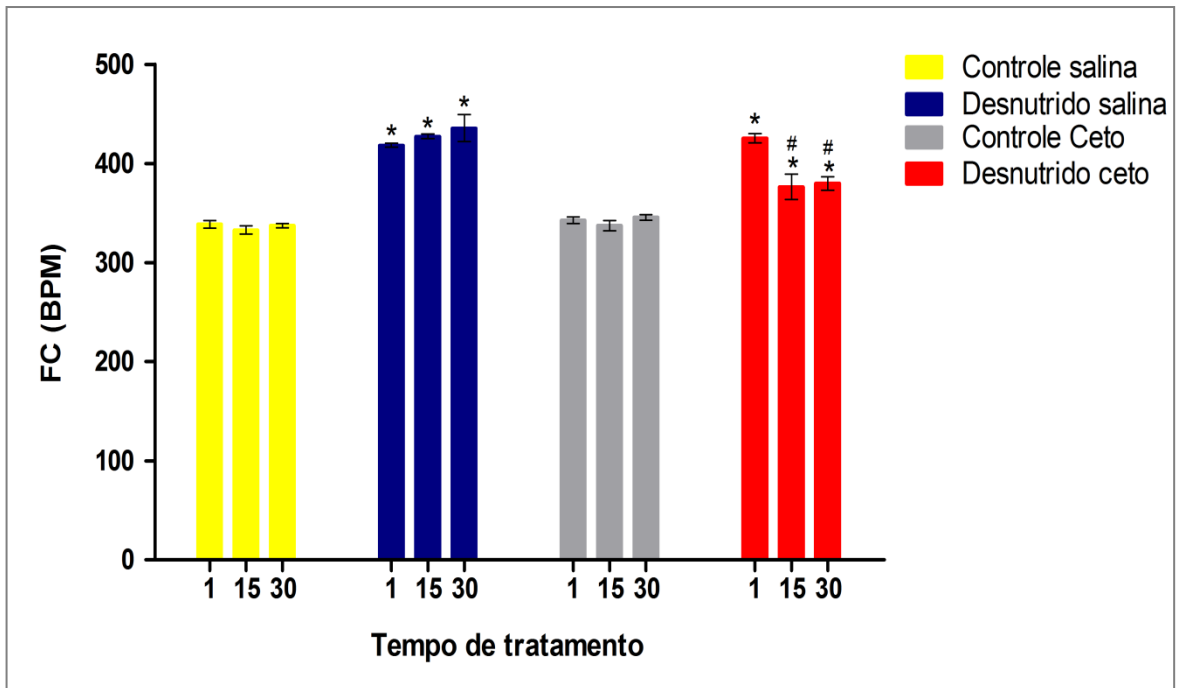


Fig. 26 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e tratados com cetoconazol ($P < 0,05$). (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia ($n = 5,5,5; 3,3,3; 5,5,5; 4,5,4$ respectivamente, $P < 0,05$).

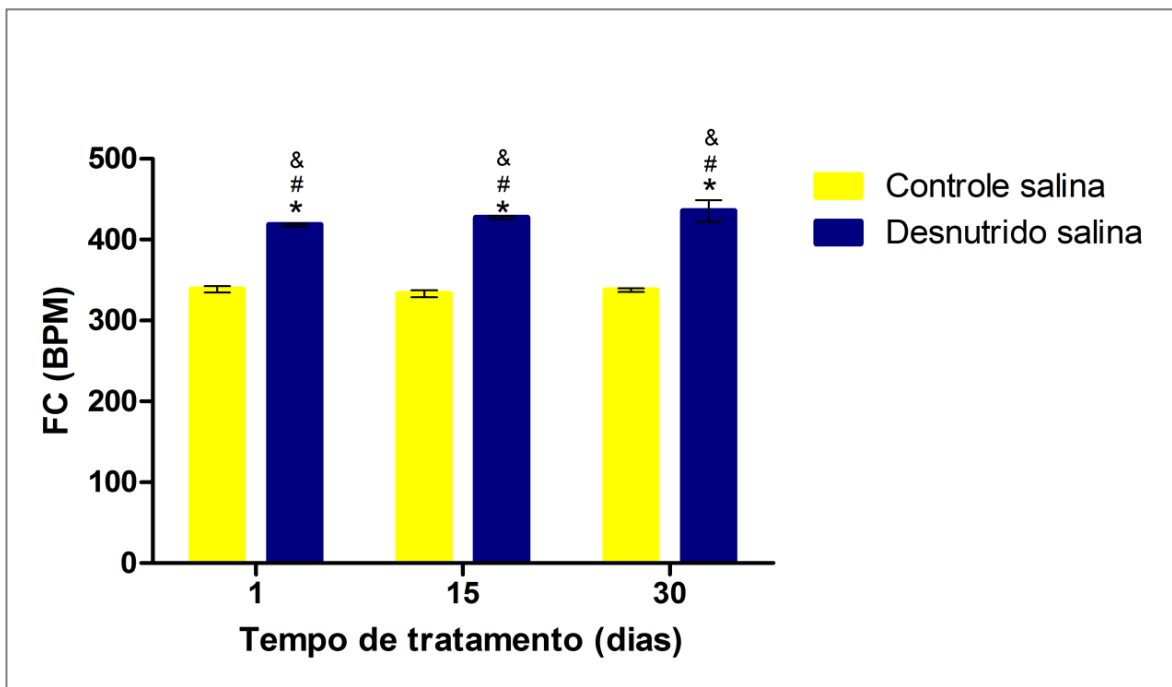


Fig. 27 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias ($P < 0,05$).

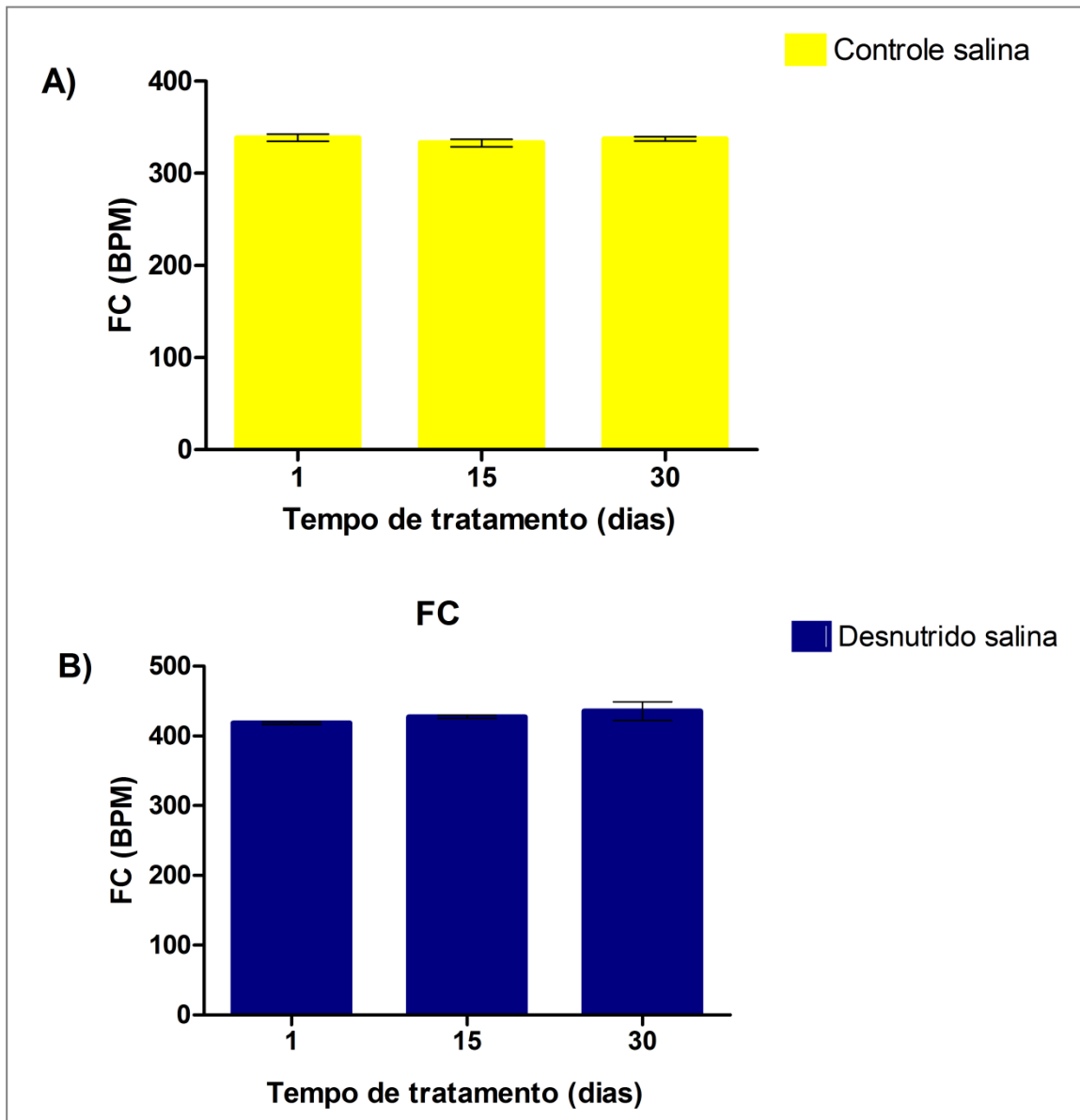


Fig. 28 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre os animais controle tratados com salina (barras amarelas) (A) e entre os animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (B) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).

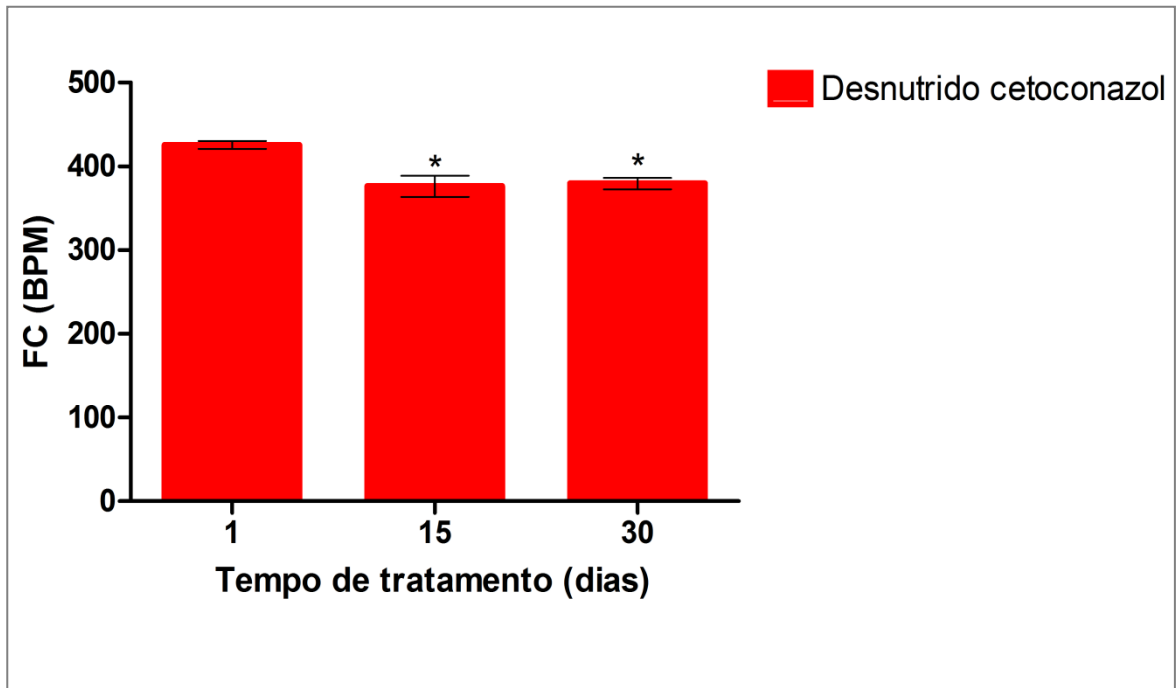


Fig. 29 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre os animais desnutridos tratados com ketoconazol (barras vermelhas) () Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com ketoconazol por 1 dia ($P < 0,05$).*

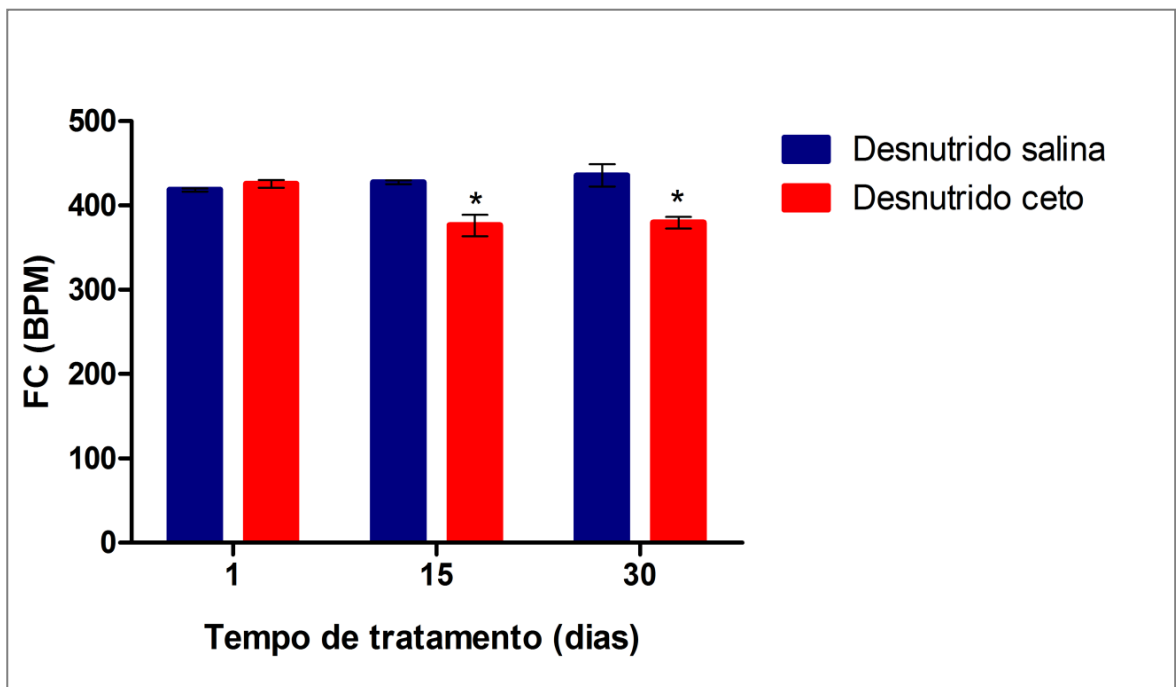


Fig. 30 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) em relação aos animais desnutridos tratados com ketoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). () Diferença significativa em relação aos grupos desnutrido salina ($P < 0,05$).*

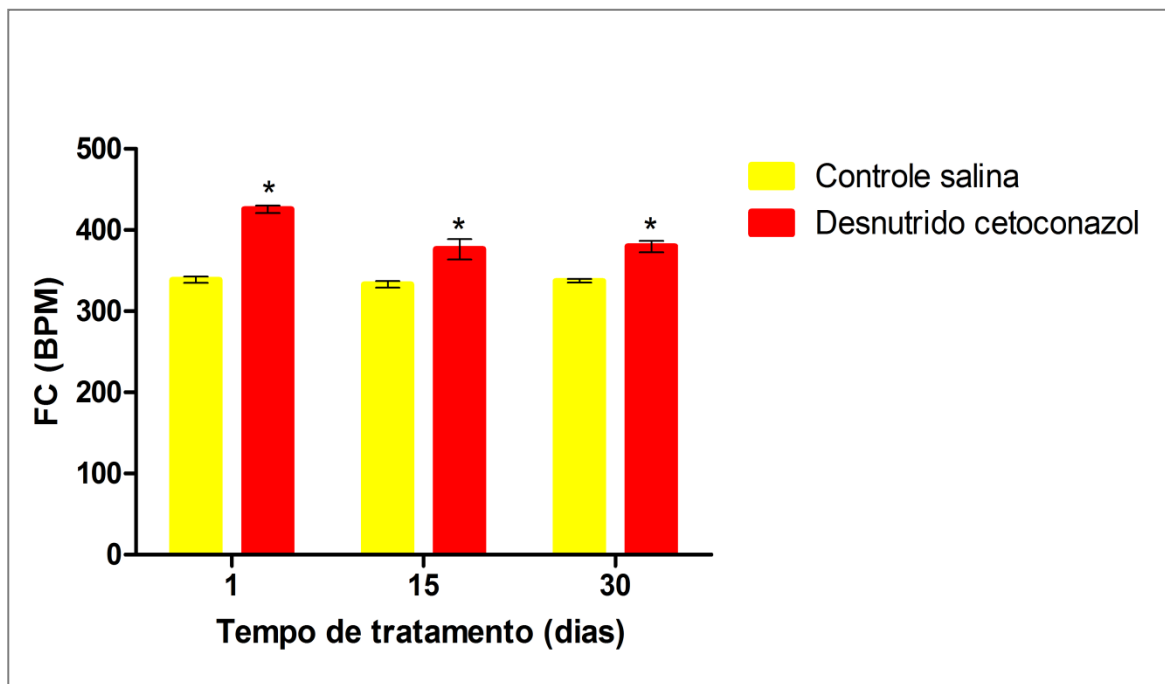


Fig. 31 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle salina ($P < 0,05$).

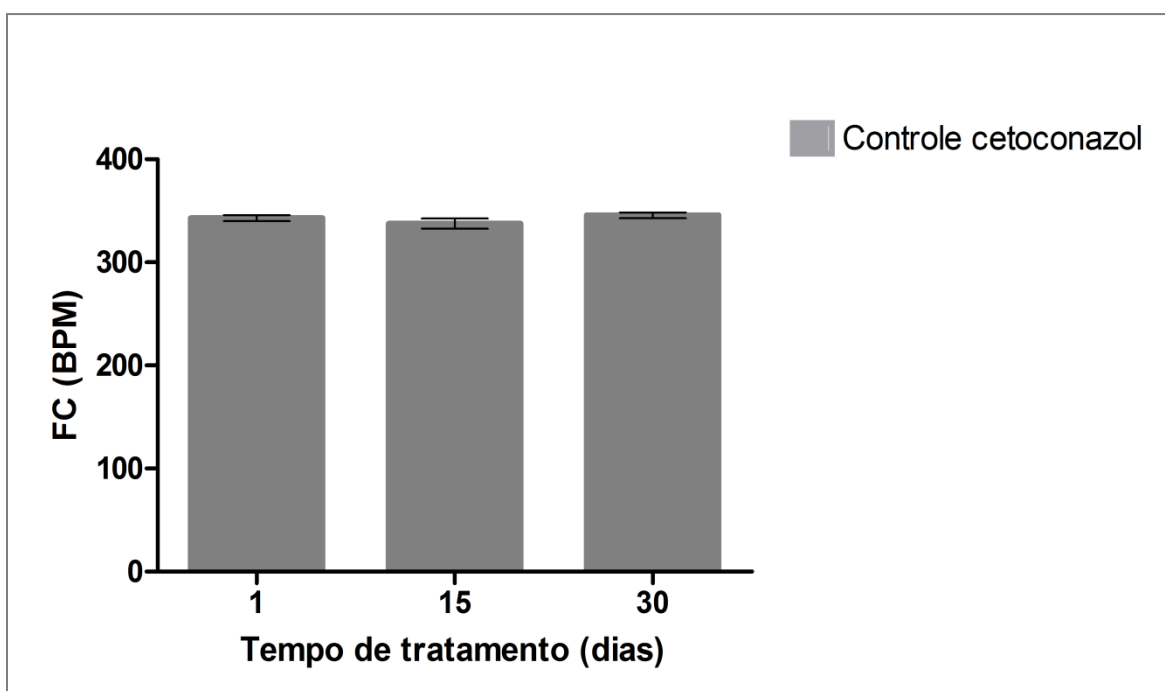


Fig. 32 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) entre os animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).

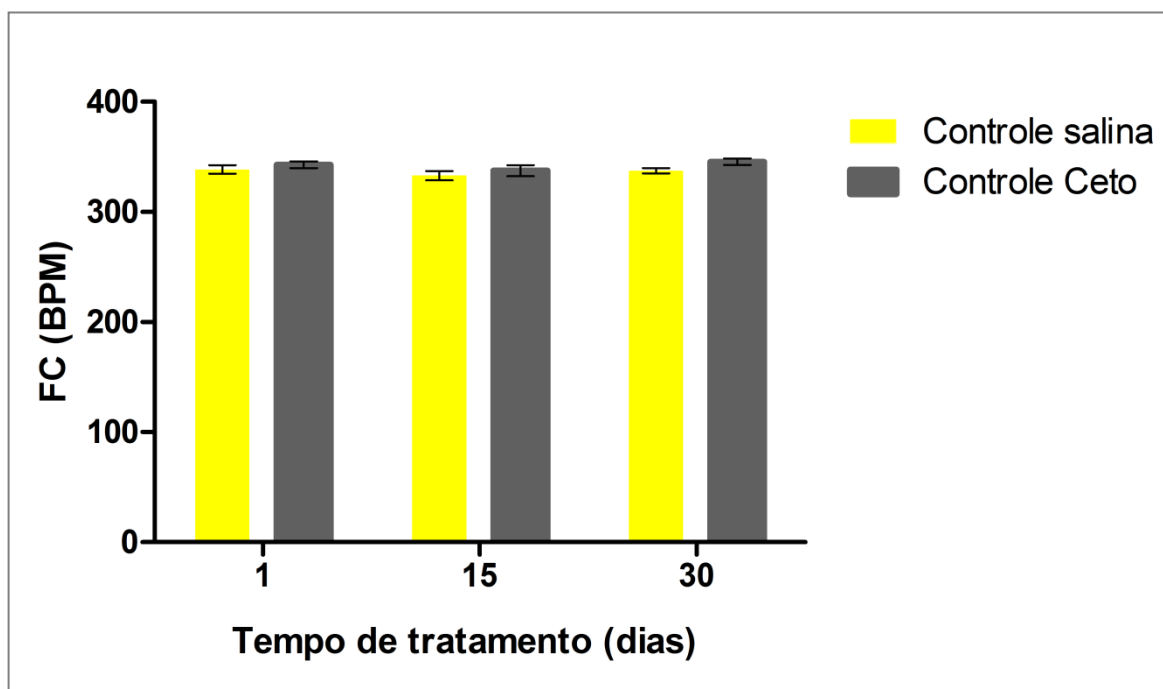


Fig. 33 - Comparação da frequência cardíaca média basal (FC) (BPM) dos animais controle tratados com salina (barras amarelas) em relação aos animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).

4.6 Efeito da desnutrição sobre a relação LF/HF e a porcentagem de participação de cada um desses espectros de variabilidade sobre o poder total na FC

Nessa etapa do trabalho, nos propusemos a analisar possíveis alterações no balanço autonômico evocadas pela desnutrição protéica pós desmame. Dessa forma, a fim de avaliar a interação entre a atividade eferente simpática e parassimpática na variabilidade do intervalo R-R, escolhemos a análise espectral por permitir a determinação da regulação autonômica de uma maneira não invasiva. Para melhor comparação de dados entre diferentes grupos de animais, foram calculadas a razão LF/HF e a porcentagem com que cada uma das bandas de frequência contribui para o poder total, sem se levar em conta a banda de VLF. De uma maneira geral, podemos observar que a desnutrição protéica provocou um aumento significativo na relação LF/HF dos animais desnutridos, independentemente deles terem sido tratados com cetoconazol ou com salina. Podemos observar, ainda, que o tratamento com cetoconazol não promoveu alteração significativa na relação LF/HF tanto nos animais desnutridos quanto nos animais controle tratados por 1, 15 ou 30 dias (Fig. 34). Continuamos a organizar os resultados separadamente, visando à melhor apresentação dos mesmos.

De uma forma geral podemos observar também que o aumento da relação LF/HF nos animais desnutridos aconteceu como consequência do aumento da participação percentual do componente LF (Fig. 35) e de uma diminuição na participação percentual do componente HF (Fig. 36) sobre o poder total nesses animais desnutridos. Também foi possível constatar que o tratamento com cetoconazol, ou o período no qual os animais receberam salina, não promoveram alteração sobre os componentes LF e HF nos grupos tratados por 1, 15 ou 30 dias. Assim como nos resultados anteriormente apresentados, tais resultados serão desmembrados a fim de promovermos uma melhor comparação entre os diferentes grupos experimentais.

Entre os animais tratados com salina, podemos observar que os animais desnutridos tratados por 1 ($0,84 \pm 0,03$ n.u.), 15 ($0,84 \pm 0,02$ n.u.) e 30 dias ($0,84 \pm 0,02$ n.u.) apresentaram relação LF/HF significativamente aumentada em relação aos animais controle também tratados com salina por 1 ($0,55 \pm 0,01$ n.u.), 15 ($0,59 \pm 0,01$ n.u.) ou 30 dias ($0,55 \pm 0,03$ n.u.) (Fig. 37A). Quando analisamos os componentes LF e HF separadamente, observamos um aumento do componente LF nos animais desnutridos tratados com salina por 1, 15 ou 30 dias em relação aos animais controle também tratados com salina pelo mesmo período (0,45 vs 0,35 n.u.; 0,46 vs 0,37 n.u.; 0,46 vs 0,36 n.u.) (Fig.37B). Conseqüentemente, observamos uma redução no componente HF dos animais desnutridos tratados com salina por 1, 15 ou 30 dias em relação aos animais controle também tratados com salina pelo mesmo período (0,55 vs 0,65 n.u.; 0,54 vs 0,63 n.u.; 0,56 vs 0,64 n.u. respectivamente) (Fig. 37C).

Quando analisamos os animais tratados com cetoconazol, podemos observar resultados semelhantes aos animais tratados com salina. Portanto, os animais desnutridos tratados por 1 ($0,89 \pm 0,02$ n.u.), 15 ($0,89 \pm 0,04$ n.u.) e 30 dias ($0,85 \pm 0,02$ n.u.) apresentaram relação LF/HF significativamente aumentada em relação aos animais controle também tratados com cetoconazol por 1 ($0,53 \pm 0,01$ n.u.), 15 ($0,58 \pm 0,02$ n.u.) ou 30 dias ($0,55 \pm 0,02$ n.u.) (Fig. 38A). Quando analisamos os componentes LF e HF separadamente, observamos um aumento do componente LF nos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 1, 15 ou 30 dias em relação aos animais controle também tratados com a droga pelo mesmo período (0,47 vs 0,35 n.u.; 0,44 vs 0,36 n.u.; 0,46 vs 0,35 n.u. respectivamente). Conseqüentemente, observamos uma redução no componente HF nos animais desnutridos tratados com salina por 1, 15 ou 30 dias em relação aos animais controle também tratados com salina pelo mesmo

período (0,53 vs 0,65 n.u.; 0,56 vs 0,64 n.u.; 0,54 vs 0,65 n.u. respectivamente) (Fig. 38 B e C).

Ainda sobre a análise da variabilidade da FC, podemos observar que nem o tratamento com cetoconazol e nem o período durante o qual os animais receberam salina foram capazes de provocar qualquer tipo de alteração na relação LF/HF, tanto nos animais desnutridos quanto nos animais controle durante o desenvolvimento do estudo (Fig. 39 A e B). Da mesma forma, quando analisamos os componentes LF e HF separadamente, não observamos alterações significativas entre os diferentes tempos de tratamento, tanto nos animais desnutridos quanto nos animais controle.

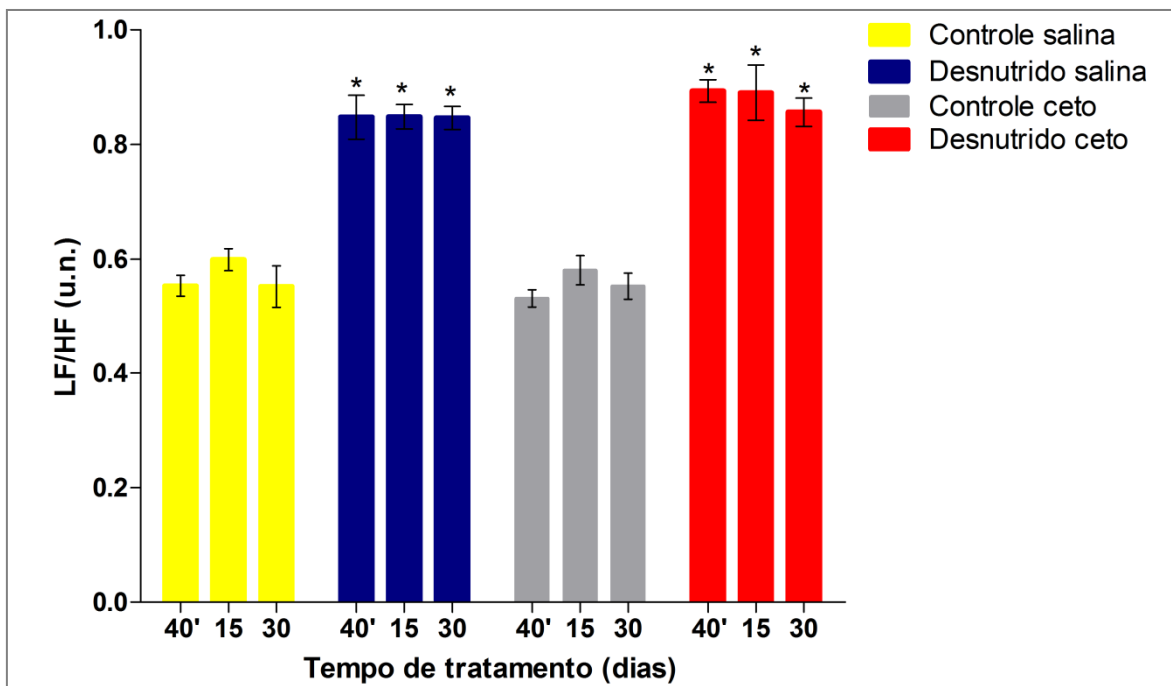


Fig. 34 - Comparação da relação LF/HF (u.n.) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e com cetoconazol. (n= 5,4,5; 3,3,3; 7,5,7; 4,5,4 respectivamente, $P < 0,05$).

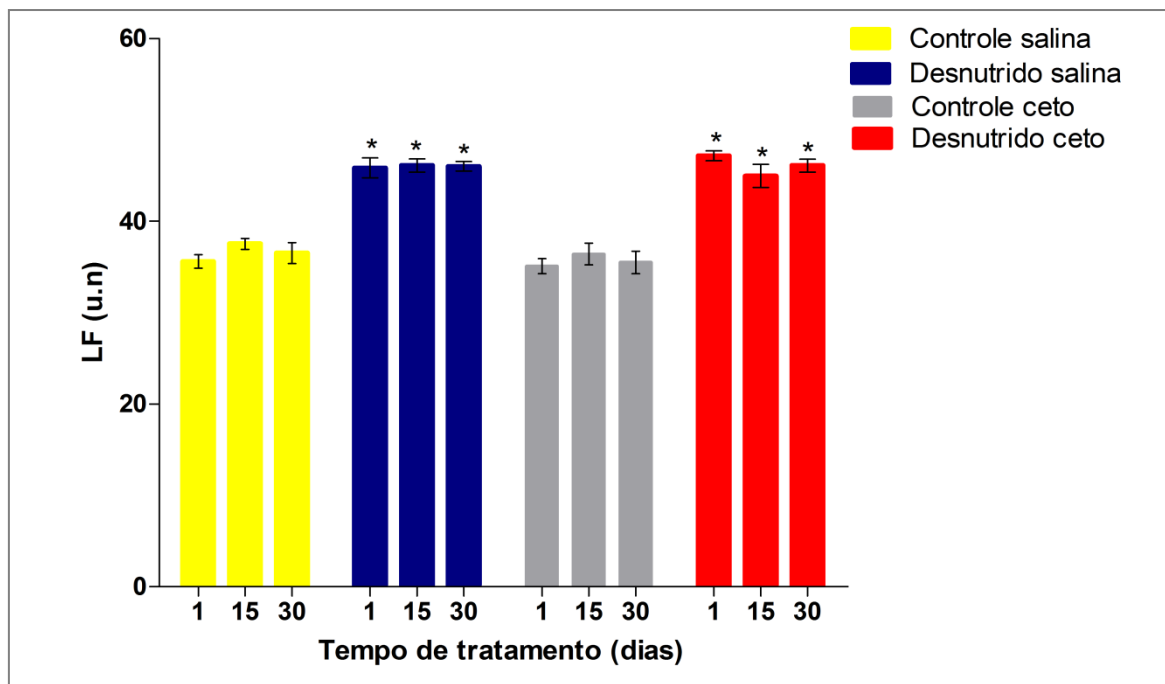


Fig. 35 - Comparação do percentual de participação do componente LF (u.n) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e com cetoconazol. (n= 5,5,5; 3,3,3; 5,5,5; 4,5,4 respectivamente, $P<0,05$).

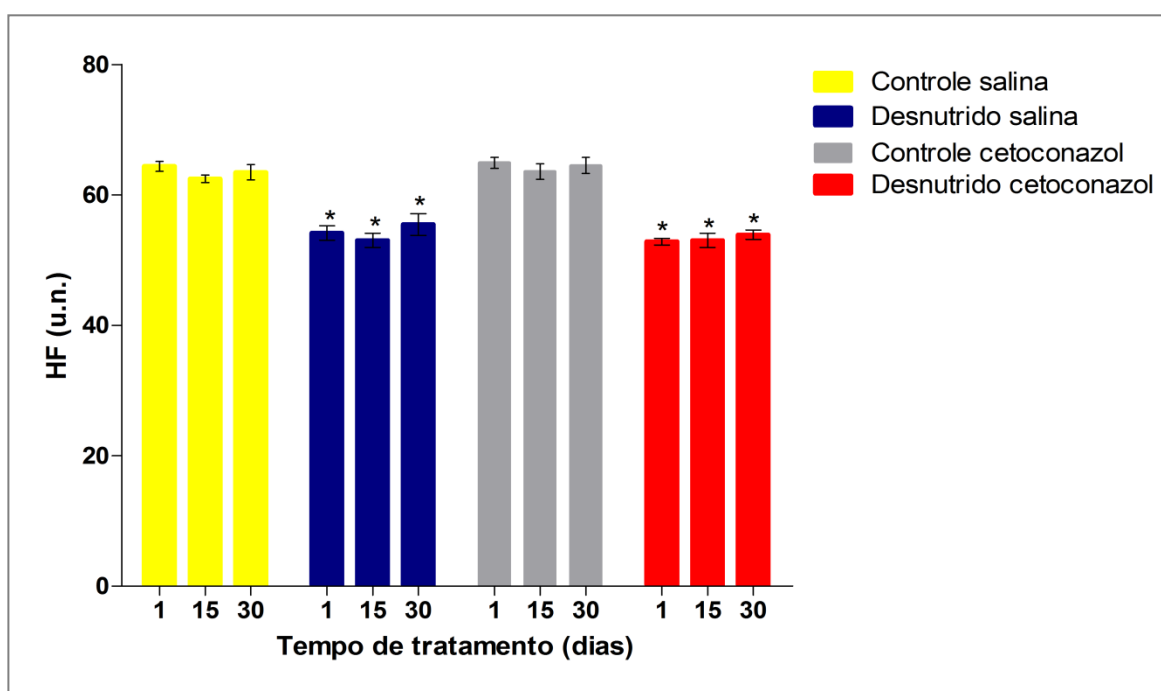


Fig. 36 - Comparação do percentual de participação do componente HF (u.n) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas), desnutridos tratados com salina (barras azuis), controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30). (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e com cetoconazol. (n= 5,5,5; 3,5,5; 5,5,5; 4,5,4 respectivamente, $P<0,05$).

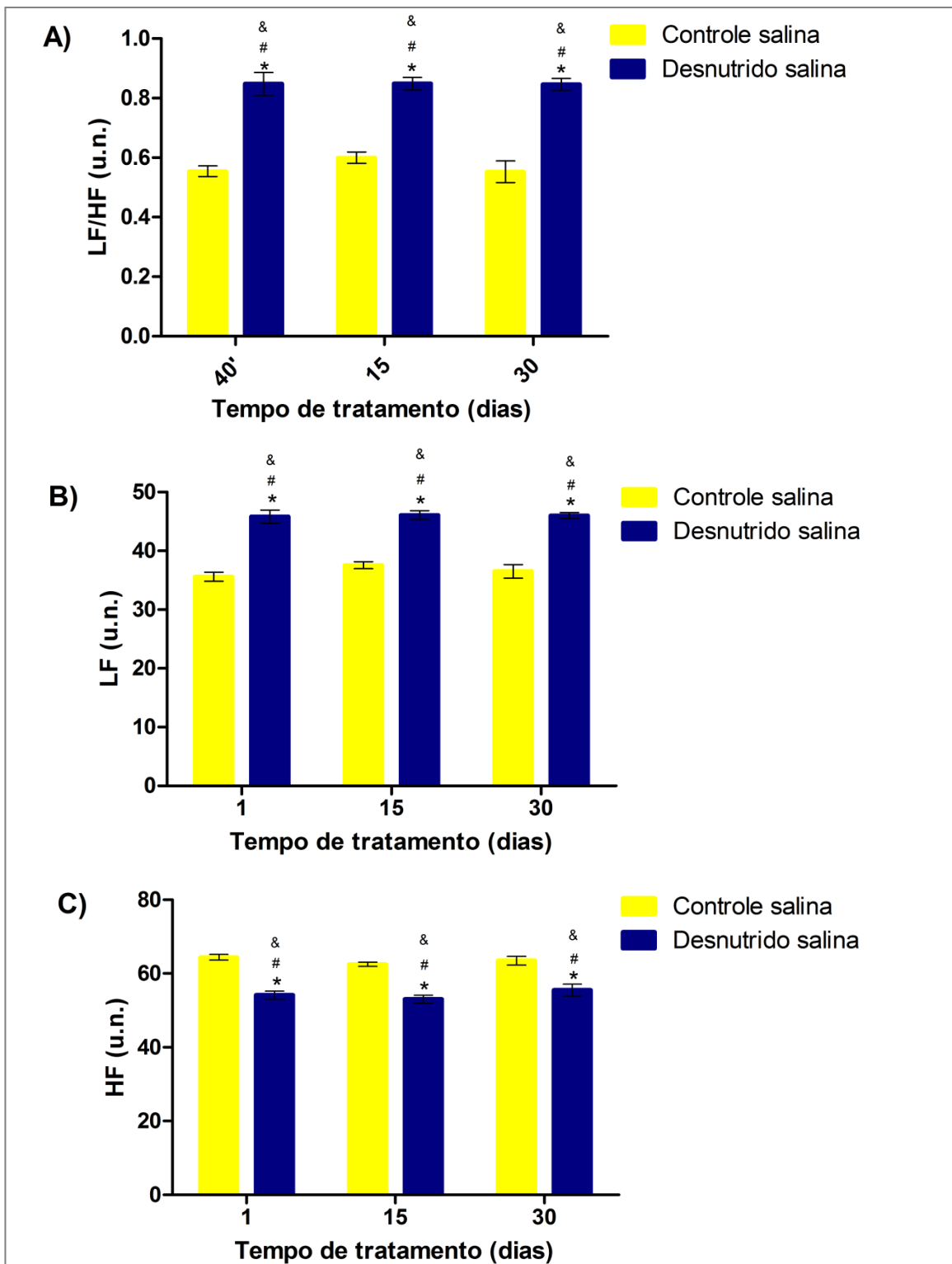


Fig. 37 - Comparação da relação LF/HF (u.n) (A) do percentual de participação do componente LF (u.n) (B) e do percentual de participação do componente HF (u.n.) (C) entre animais controle tratados com salina (barras amarelas) e animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento. (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias (A). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias (B). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com salina por 30 dias (C). ($P < 0,05$).

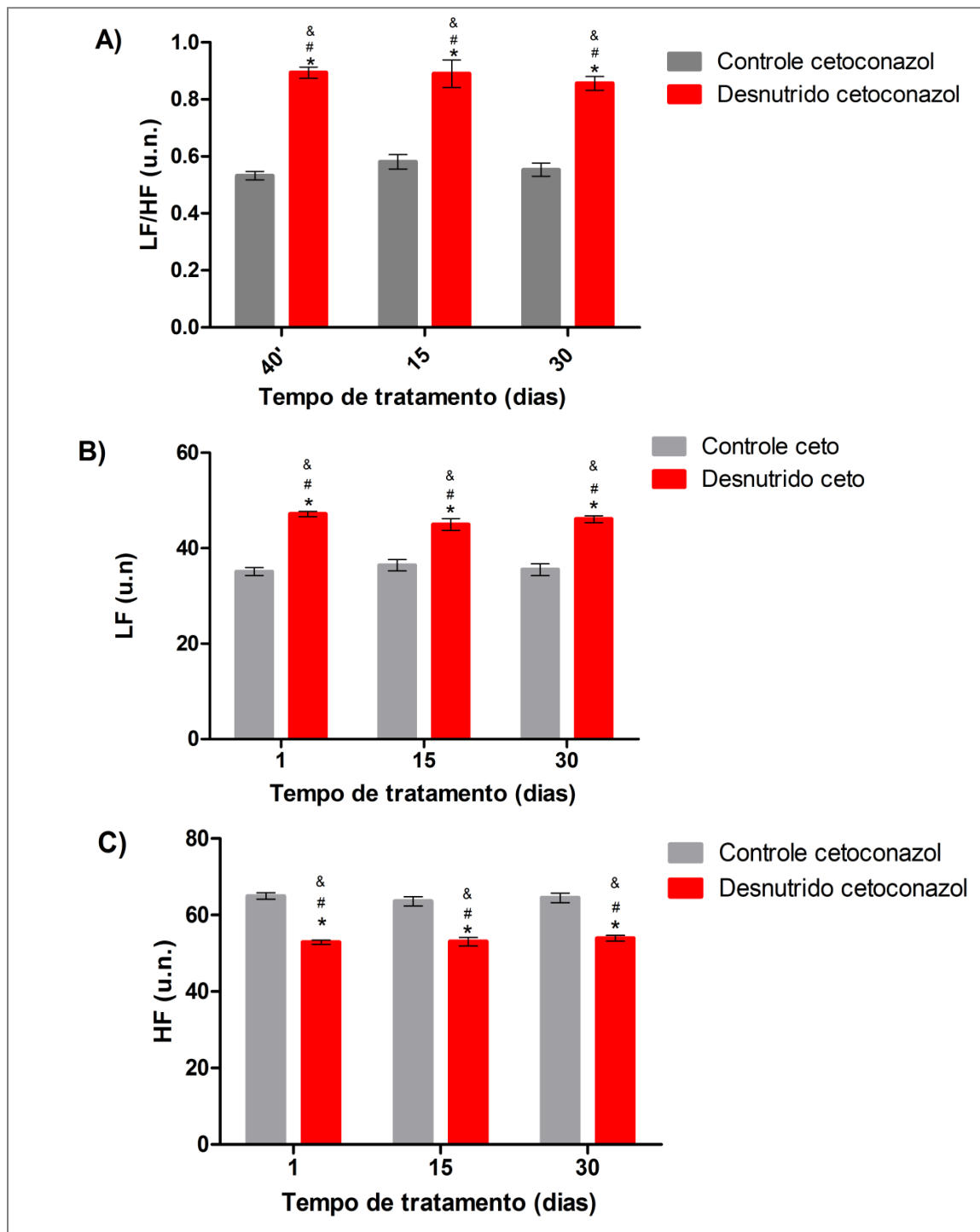


Fig. 38 - Comparação da relação LF/HF (u.n) (A) do percentual de participação do componente LF (u.n) (B) e do percentual de participação do componente HF (u.n.) (C) entre animais controle tratados com cetoconazol (barras cinzas) e animais desnutridos tratados com cetoconazol (barras vermelhas) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento. (*)Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia. (#)Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias. (&)Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias (A). (*)Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia. (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias (B). (*)Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 1 dia. (#)Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 15 dias. (&) Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com cetoconazol por 30 dias (C). (P<0,05).

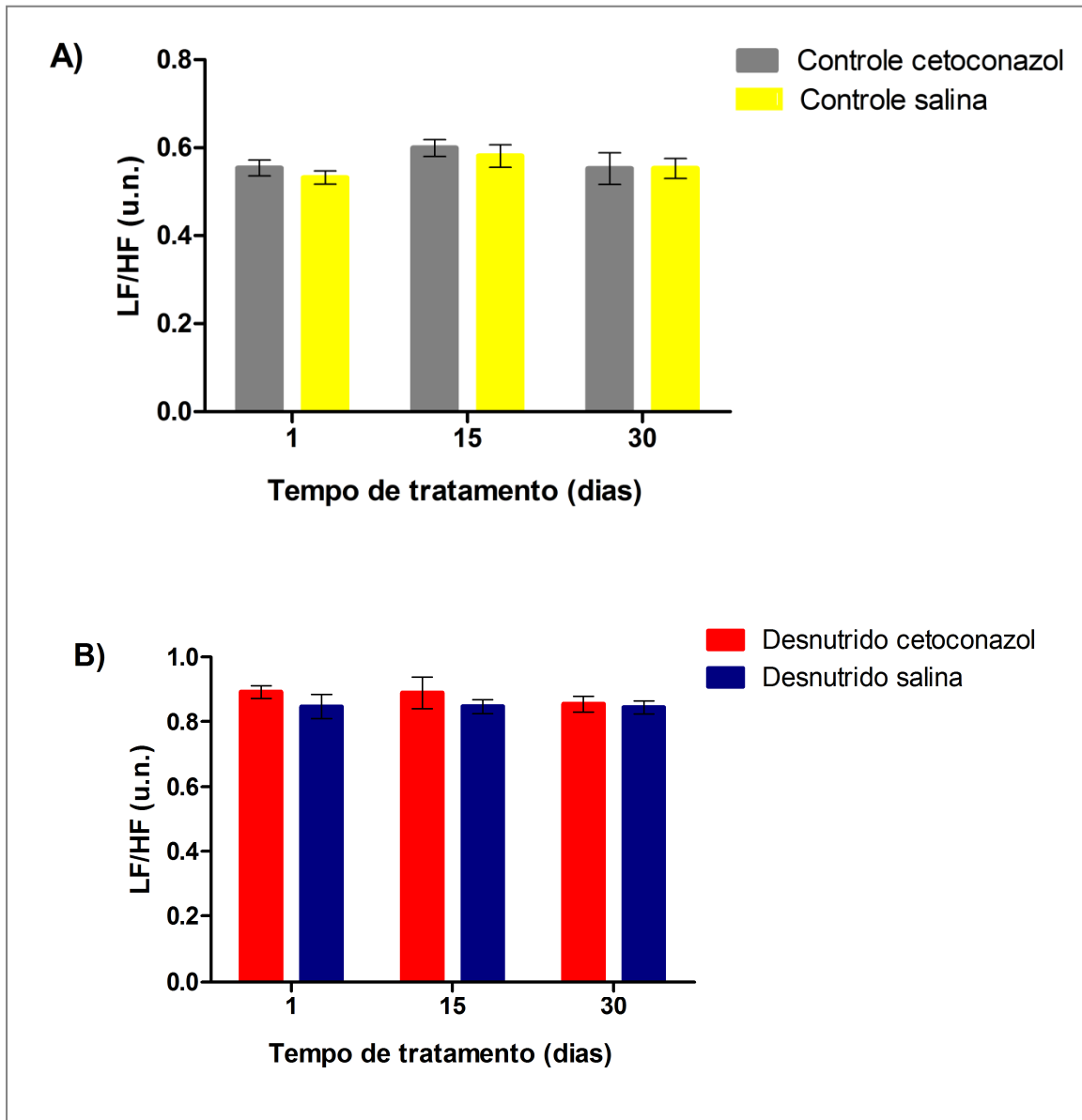


Fig. 39 - Comparação da relação LF/HF (u.n.) entre animais controle tratados com cetozonazol (barras cinzas) e animais controle tratados com salina (barras amarelas) (**A**) e animais desnutridos tratados com cetozonazol (barras vermelhas) e animais desnutridos tratados com salina (barras azuis) (**B**) ao início (1), após 15 dias (15) e após 30 dias de tratamento (30).

5 DISCUSSÃO

A desnutrição, ainda hoje, é considerada um dos problemas mais sérios de saúde pública no mundo. Estudos realizados, tanto em humanos quanto em animais, têm relatado efeitos adversos sobre a homeostase de diversos sistemas fisiológicos, dentre eles o cardiovascular (Adlard *et al.*, 1972; Barker, 1995; Brozek, 1981; Jaya Rao *et al.*, 1968). Porém, ainda estamos longe de entender por completo os danos causados por essa condição patológica, o que torna necessária a realização de novos estudos que ajudem a desvendar os malefícios causados pela desnutrição sobre o organismo. Neste intuito, o desenvolvimento de modelos experimentais que se aproximem das condições encontradas em humanos é de fundamental importância para se entender os mecanismos fisiopatológicos específicos da desnutrição.

Em nosso laboratório (LFC), utilizamos o rato como modelo animal por apresentar metabolismo acelerado, ciclo reprodutivo curto e ser de fácil manuseio. O modelo de desnutrição proposto foi baseado na redução do conteúdo protéico da dieta oferecida após o desmame de 15% para 6%, o que representa uma redução de 60% da proteína ofertada aos animais. A utilização de tal modelo de desnutrição justifica-se pela alta incidência de crianças que não têm acesso a uma alimentação adequada após o período da amamentação, na maioria devido à condição socioeconômica da família. Geralmente, a porção protéica da dieta, por apresentar um custo mais elevado, também não é consumida em quantidades adequadas, tornando-se um fator contribuinte para a desnutrição. Essa metodologia já vem sendo utilizada no LFC (Tropia *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Loss *et al.*, 2007) e assemelha-se aos métodos utilizados em outros trabalhos da literatura (Lukoyanov *et al.*, 2000; Agarwal *et al.*, 1981; Ferreira *et al.*, 2003b).

Entre os nutrientes necessários à manutenção da homeostase, pode-se destacar as proteínas, definidas como moléculas de estruturas complexas que desempenham papéis fundamentais no corpo humano (Brozek, 1965). Essas moléculas devem ser continuamente ressintetizadas pelo organismo, através da ingestão de proteínas pela dieta, nas quais veicularão os aminoácidos essenciais e os não essenciais (Rassool, 2003). Dessa forma, a desnutrição hipoprotéica nos períodos iniciais da vida do animal pode afetar a proliferação celular, acarretando prejuízo ao desenvolvimento corporal através da depleção da massa muscular e diminuição de peso (Benabe *et al.*, 1993).

No presente estudo, considerando os animais controle e os animais desnutridos tratados por 1 dia com salina como animais padrão, observamos que a desnutrição protéica pós-desmame oferecida aos animais, por um período de 35 dias, resultou em uma redução de 76% no peso corporal dos animais que consumiram essa dieta em relação aos respectivos controles (Fig. 10.1 A). A diferença de peso entre os dois grupos foi estatisticamente diferente e garante que a dieta oferecida a esse grupo foi eficiente em promover a desnutrição, uma vez que a redução do peso corporal pode ser utilizada como um indicador básico dessa condição (Sawaya A.L., 2006). A ausência de ganho de peso observada nos animais desnutridos utilizados nesse trabalho ganha respaldo na literatura sugerindo que o baixo teor protéico da dieta, provavelmente, não disponibiliza aminoácidos suficientes para que o organismo possa ter seu desenvolvimento ideal (Lucas, 1998). Outros trabalhos desenvolvidos com ratos sugerem que a associação entre a desnutrição e o peso corporal existe graças a processos adaptativos que acontecem fundamentalmente para se ajustar às condições nutricionais adversas às quais o animal está sendo submetido (Dallman *et al.*, 1999). Outros fatores característicos de um quadro de desnutrição têm sido apresentados pelo LFC e incluem baixos níveis de albumina plasmática e proteínas totais (Oliveira *et al.*, 2004; Tropicia *et al.*, 2001). Diante desses parâmetros, é possível afirmar que a dieta composta de 6 % de proteína (caseína) é eficaz na promoção de um quadro de desnutrição experimental. Podemos também observar que o tratamento com cetoconazol não promoveu nenhuma alteração no peso dos animais, tanto nos grupos controle quanto nos grupos desnutridos, independentemente do tempo de tratamento utilizado (Fig. 7B). A não influência do cetoconazol sobre o peso corporal dos animais é vista em outros estudos na literatura que também utilizaram cetoconazol em protocolos de longa duração sem observarem alteração no peso dos animais (Cohen *et al.*, 2000; Sonino, 1987).

Os resultados obtidos com a análise do peso da glândula adrenal, a quantidade de gotículas de colesterol presentes na glândula adrenal e a quantidade de cortisol produzido pelos animais, ficam mais plausíveis quando são analisados em conjunto. Quando comparado animais desnutridos com animais controle que foram tratados com salina, observamos um aumento significativo no PAN de tais animais desnutridos em comparação aos animais controle, independentemente do tempo em que esses animais receberam salina (Fig. 10A). Contrariando o aumento observado no peso de tal órgão, alguns estudos demonstram que a restrição alimentar crônica promove uma redução linear no crescimento corporal com

conseqüente diminuição no peso dos órgãos. Como exemplo disso, já foi demonstrado que órgãos como o fígado, intestino estomago e rins sofrem uma diminuição no seu peso diretamente proporcional à diminuição do peso corporal promovido pelo déficit nutricional (Ferrell *et al.*, 1986; Koong *et al.*, 1982). Estudos desenvolvidos no LFC, e que utilizaram metodologia semelhante à utilizada no presente trabalho, também demonstraram uma significativa diminuição no peso úmido renal (Moura, 2009) e cerebral (Oliveira *et al.*, 2004) de animais desnutridos quando comparados a animais controle. O aumento no peso da glândula adrenal observado nesse trabalho pode ter ligação direta com a quantidade de colesterol presente na glândula dos animais uma vez que, os animais desnutridos também apresentaram quantidade significativamente maior de colesterol na glândula que os animais controle (Fig. 14A). O aumento na quantidade de colesterol presente na glândula adrenal dos animais desnutridos corrobora com o aumento na produção de cortisol observado em tais animais, uma vez que o principal substrato utilizado para a bioformação do cortisol é o colesterol (Kim *et al.*, 1997) . Somado ao aumento na quantidade de colesterol presente na glândula adrenal dos animais desnutridos, tal órgão pode ter se tornado significativamente mais pesado também devido a uma possível hipertrofia alcançada pelas camadas adrenais responsáveis pela produção de cortisol. O efeito hipertrófico provocado pelo aumento da atividade da glândula adrenal também já foi observado em outros trabalhos na literatura e respalda a idéia do aumento no peso do órgão (Gamaro *et al.*, 2003; Harro *et al.*, 2001).

O aumento na produção de cortisol pelos animais desnutridos confirma a situação aversiva induzida pelo déficit alimentar empregado no trabalho, sugerindo que a desnutrição protéica pós desmame age como um estressor nutricional potencial ativando mecanismos neuroendócrinos restabelecedores da homeostase. O cortisol tem uma importância fundamental nos estados de estresse, influenciando o metabolismo celular e gerando uma mobilização de substratos energéticos necessários para a produção de respostas fisiológicas adaptativas à presença dos agentes estressores (Pacak *et al.*, 2001).

Ainda em relação ao peso da adrenal, comparamos grupos de animais desnutridos com animais controle que receberam o tratamento com cetoconazol por 1, 15 e 30 dias. O cetoconazol é um agente antimicótico com amplo espectro de atividade e baixa toxicidade, utilizado para o tratamento de uma gama de infecções fúngicas sistêmicas e superficiais (Sonino, 1987). Essa droga também é um potente inibidor da esteroidogênese adrenal e gonadal por interferir em diversos passos enzimáticos dependentes do citocromo P-450

(Loose *et al.*, 1983). O cetoconazol vem sendo utilizado com sucesso como tratamento paliativo da Síndrome de Cushing devido à sua habilidade em diminuir a produção de cortisol (Cohen *et al.*, 2000). A capacidade de inibição esteroidal conferida ao cetoconazol resulta da inibição de reações enzimáticas que acontecem dentro da glândula adrenal. A primeira reação que sofre interferência do cetoconazol é exatamente a primeira transformação enzimática sofrida pelo colesterol quando esse passa por entre as membranas mitocôndrias e sofre a ação da enzima de clivagem da cadeia lateral da molécula, a 20-22 desmolase (Sonino, 1987). Apesar de promover a inibição da esteroidogênese adrenal, logo na primeira reação enzimática, as moléculas de colesterol já estão internalizadas na glândula adrenal. Com isso, a produção de cortisol não acontece; porém a entrada das moléculas de colesterol na glândula não sofre nenhum tipo de ação da droga.

Dessa forma, quando analisamos o peso da glândula adrenal dos animais controle que receberam o tratamento com cetoconazol, observamos um aumento em tal parâmetro proporcional ao tempo de tratamento com a droga (Fig. 12A). De acordo com a contagem lipídica realizada nas adrenais dos animais controle tratados com cetoconazol podemos inferir que o aumento no peso das adrenais de tais animais aconteceu devido ao acúmulo lipídico promovido pelo tratamento com cetoconazol (Fig. 15A). Entre os animais desnutridos que receberam o tratamento com cetoconazol, a quantidade lipídica presente nas adrenais dos animais tratados por 15 dias não foi diferente da quantidade lipídica presente nas adrenais de tais animais tratados por 30 dias. Conseqüentemente, animais desnutridos tratados por 15 e por 30 dias com cetoconazol não demonstraram diferença significativa no que tange ao peso das adrenais.

A produção de cortisol nos animais desnutridos tratados com cetoconazol foi eficientemente reduzida já com 15 dias de tratamento com a droga, trazendo tais valores a um patamar similar à produção de cortisol dos animais controle tratados com salina. Nos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 30 dias, o nível de cortisol encontrado estava abaixo dos valores observados nos animais controle tratados com salina (fig. 19). A eficiência do cetoconazol em diminuir a esteroidogênese adrenal foi também observada em outros estudos da literatura com tempo de tratamento semelhante. Em um modelo de estresse provocado pelo cheiro de gato no ambiente onde os ratos estavam alojados, os animais expostos a tal situação e tratados por 14 dias com cetoconazol apresentaram níveis de corticosterona reduzidos também a níveis normais (Miettinen, 1988; Cohen *et al.*, 2000). No trabalho que serviu como

referência para a utilização do cetoconazol como inibidor da esteroidogênese adrenal no presente estudo, o tratamento com a referida droga por 14 dias também foi suficiente para reduzir os níveis de cortisol e corticosterona a valores inferiores aos níveis basais dos hormônios (Cohen *et al.*, 2000).

Apesar de mais estudos serem necessários para afirmarmos sobre o funcionamento do Eixo HPA, na literatura são encontrados relatos de que a estimulação crônica exercida pelo ACTH promove efeitos semelhantes aos observados nos nossos animais desnutridos. Dos efeitos mais relatados, podemos citar o estímulo do crescimento da adrenal, aumento do fluxo sanguíneo para a glândula e um estímulo generalizado da síntese de todas as enzimas esteroidogênicas do citocromo P450. Além desses efeitos, o ACTH ainda promove um aumento na quantidade de colesterol livre disponível para a esteroidogênese, aumentando a reserva de colesterol intracelular (Natelson *et al.*, 1987). Assim, uma vez tendo sido encontradas, no presente estudo, características que indicam a hiperativação do Eixo HPA, mais estudos seriam necessários para se afirmar tal possibilidade.

Também no presente estudo, nos propusemos a avaliar a atividade autonômica através da análise espectral da FC em animais submetidos à desnutrição protéica pós desmame. O exame da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é uma janela que permite o estudo da integridade do sistema nervoso autônomo, e vem sendo utilizada como ferramenta investigativa simples e não-invasiva direcionada à detecção e ao estudo das disfunções autonômicas cardíacas em diversas patologias (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996). Dessa forma, avaliamos a relação LF/HF, assim como o percentual com que cada uma das frequências (LF ou HF) contribuem para o poder total, de onde foi subtraído a região de baixíssima frequência (VLF). Os resultados encontrados apontaram para um predomínio da atividade simpática sobre a parassimpática nos animais desnutridos, independentemente do tipo (salina ou cetoconazol) e do tempo de tratamento (1, 15 ou 30 dias) (fig.34) utilizados. Esses achados confirmam resultados anteriores do LFC que demonstraram farmacologicamente o predomínio da atividade simpática vasomotora nesse protocolo. Em tal estudo, Tropia e cols. (2001) demonstraram uma maior queda da PAM decorrente da administração de Prazosin, bloqueador α -adrenérgico, no grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle (Tropia *et al.*, 2001). Outros trabalhos da literatura também demonstram que a desnutrição protéica promove

aumento da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática (Young *et al.*, 1985; Leon-quinto *et al.*, 1998).

O tratamento com cetoconazol e a conseqüente diminuição nos níveis séricos de cortisol não promoveu alteração alguma sobre o balanço autonômico da frequência cardíaca nos animais desnutridos tratados com a droga em relação aos animais desnutridos tratados com salina (Fig.39B) como vem sendo sugerido na literatura. Alguns estudos concluíram a ausência de tal relação, uma vez que concentrações de noradrenalina e adrenalina plasmática não são alteradas a partir da administração de cortisol, argumentando com isso contra um aumento na atividade do SNS cortisol dependente (Connell *et al.*, 1987).

Podendo estar diretamente relacionado ao aumento da atividade simpática demonstrada, observamos também um aumento nos valores de FC nos animais desnutridos tratados com salina em relação aos animais controle também tratados com salina, independentemente do tempo de tratamento. Apesar do aumento na atividade simpática ser a explicação mais plausível para o aumento da FC nos animais desnutridos tratados com salina, uma redução significativa em tal parâmetro foi observada nos animais desnutridos tratados com cetoconazol por 15 e 30 dias, em relação aos animais desnutridos tratados com salina. Essa diminuição na FC dos animais desnutridos tratados com cetoconazol acontece exatamente quando os níveis de cortisol nos animais desnutridos tratados com a droga se equipara aos valores observados nos animais controle tratados com salina, sugerindo uma influência do excesso de cortisol na elevação da FC. Apesar da significativa diminuição da FC observada nos referidos animais tratados com cetoconazol, tal parâmetro ainda apresentou-se significativamente elevado quando comparado aos animais controle tratados com salina.

Tomados em conjunto, nossos dados revelam que a privação de nutrientes, proteína, durante as fases iniciais da vida tem a capacidade de ativar mecanismos neuroendócrinos que promovem o aumento na produção do hormônio do estresse comprovando a situação adversa criada pela deficiência protéica. Podemos sugerir também que o aumento na produção de cortisol está ligado a quebra da homeostase cardíaca nos animais desnutridos por agir parcialmente no aumento da FC dos animais submetidos à desnutrição protéica. Além da participação do cortisol na alteração de tal parâmetro, somos levados a pensar também que podem existir outros mecanismos agindo no aumento na FC, sendo o aumento na atividade simpática o mecanismo mais plausível para estar sinergicamente agindo com o excesso de cortisol.

Apesar de mais estudos serem necessários para afirmarmos sobre a atividade do Eixo HPA, podemos levantar a partir desse trabalho a possibilidade da desnutrição protéica pós desmame promover uma hiperativação de tal via. Para trabalhos posteriores, seria interessante a avaliação da concentração de outros hormônios componentes do eixo HPA como o ACTH e CRF para afirmarmos ou descartar a possível hiperatividade da via.

Para a avaliação da possível interação do aumento de cortisol com aumento de atividade simpática como promotora do aumento da FC, mais estudos devem ser realizados promovendo o bloqueio farmacológico do componente simpático e da esteroidogênese adrenal concomitantemente.

Sabemos que muito ainda deve ser feito na tentativa de se elucidar os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas alterações acima mencionadas. Tal conhecimento poderia fornecer informações cruciais que levariam ao aperfeiçoamento de métodos de tratamento de distúrbios homeostáticos em pessoas submetidas à desnutrição protéica, além de contribuir com os governos de países subdesenvolvidos na adoção de políticas de saúde mais adequadas.

6 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ADLARD, B. P. ; SMART, J. L. Adrenocortical function in rats subjected to nutritional deprivation in early life. **J Endocrinol.**, v. 54, n. 1, p. 99-105, 1972.
2. AGARWAL, K. N.; PRASAD, C.;TANEJA, V. Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats. **Ann.Nutr Metab**, v. 25, n. 4, p. 228-233, 1981.
3. ALMEIDA, M.; PAIXAO, P.; FERREIRA, J.; TRABULO, M.; GIL, V.; MARQUES, T. et al. [Infectious endocarditis caused by Q fever. Apropos of a clinical case]. **Rev.Port.Cardiol.**, v. 15, n. 11, p. 799-803, 772, 1996.
4. ARMARIO, A.; LOPEZ-CALDERON, A.; JOLIN, T.;CASTELLANOS, J. M. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. **Life Sci.**, v. 39, n. 5, p. 471-475, 1986.
5. BARKER, D. J. Intrauterine programming of adult disease. **Mol.Med.Today**, v. 1, n. 9, p. 418-423, 1995.
6. BELL, J. M. ; SLOTKIN, T. A. Postnatal nutritional status influences development of cardiac adrenergic receptor binding sites. **Brain Res.Bull.**, v. 21, n. 6, p. 893-896, 1988.
7. Bello A.C.D., R. T. R. e. D. O. L. M. (2005). **Malnutrition and stress during gestation: mother and pups behavioral measures during lactation.** Temas em Psicologia da SBP 13, 34-44.
8. BENABE, J. E. ; MARTINEZ-MALDONADO, M. Dietary modification of the renin angiotensin system. **Semin.Nephrol.**, v. 13, n. 6, p. 567-572, 1993.
9. BERNARDIS, L. L.; MCEWEN, G.;KODIS, M. Body weight set point studies in weanling rats with dorsomedial hypothalamic lesions (DMNL rats). **Brain Res.Bull.**, v. 17, n. 3, p. 451-460, 1986.
10. BERTRAM, D.; BARRES, C.; CHENG, Y.;JULIEN, C. Norepinephrine reuptake, baroreflex dynamics, and arterial pressure variability in rats. **Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol**, v. 279, n. 4, p. R1257-R1267, 2000.

11. BROZEK, J. Nutrition and body composition. **Bordens.Rev.Nutr.Res.**, v. 26, n. 3, p. 31-43, 1965.
12. _____. Nutrition, brain, and behavior: introduction. **Prog.Clin.Biol.Res.**, v. 77, p. 371-382, 1981.
13. CHEN, W. Q.; ZHAO, X. L.; HOU, Y.; LI, S. T.; HONG, Y.; WANG, D. L. et al. Protective effects of green tea polyphenols on cognitive impairments induced by psychological stress in rats. **Behav.Brain Res.**, v. 202, n. 1, p. 71-76, 2009.
14. COHEN, H.; BENJAMIN, J.; KAPLAN, Z.;KOTLER, M. Administration of high-dose ketoconazole, an inhibitor of steroid synthesis, prevents posttraumatic anxiety in an animal model. **Eur.Neuropsychopharmacol.**, v. 10, n. 6, p. 429-435, 2000.
15. CONNELL, J. M.; WHITWORTH, J. A.; DAVIES, D. L.; LEVER, A. F.; RICHARDS, A. M.;FRASER, R. Effects of ACTH and cortisol administration on blood pressure, electrolyte metabolism, atrial natriuretic peptide and renal function in normal man. **J Hypertens.**, v. 5, n. 4, p. 425-433, 1987.
16. DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; BHATNAGAR, S.; BELL, M. E.; CHOI, S.; CHU, A. et al. Starvation: early signals, sensors, and sequelae. **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p. 4015-4023, 1999.
17. DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; CASCIO, C. S.; DARLINGTON, D. N.; JACOBSON, L.;LEVIN, N. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. **Recent Prog.Horm.Res.**, v. 43, p. 113-173, 1987.
18. DE ROOIJ, S. R.; PAINTER, R. C.; PHILLIPS, D. I.; OSMOND, C.; MICHELS, R. P.; BOSSUYT, P. M. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adults who were prenatally exposed to the Dutch famine. **Eur.J Endocrinol.**, v. 155, n. 1, p. 153-160, 2006.
19. de Sousa, F. C. & Miranda-Neto, M. H. (2007). **DESNUTRIÇÃO: INTER-RELAÇÕES ENTRE OS ASPECTOS CELULARES E SOCIAIS.** ArqMudi.2007;11(1):41-8 .
20. EGWIM, P. O.; CHO, B. H.;KUMMEROW, F. A. Effects of postnatal protein undernutrition on myelination in rat brain. **Comp Biochem.Physiol A Comp Physiol**, v. 83, n. 1, p. 67-70, 1986.
21. ELIA, M. Hunger disease. **Clin.Nutr.**, v. 19, n. 6, p. 379-386, 2000.

22. ELIAS, P. C.; ELIAS, L. L.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. **J Endocrinol.**, v. 180, n. 2, p. 297-302, 2004.
23. EUKER, J. S.; MEITES, J.; RIEGLE, G. D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, p. 85-92, 1975.
24. FERREIRA, F.; FILIPUTTI, E.; ARANTES, V. C.; STOPPIGLIA, L. F.; ARAUJO, E. P.; DELGHINGARO-AUGUSTO, V. et al. Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. **J Nutr**, v. 133, n. 3, p. 695-699, 2003a.
25. _____. Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. **J Nutr**, v. 133, n. 3, p. 695-699, 2003b.
26. FERRELL, C. L. ; KOONG, K. J. Influence of plane of nutrition on body composition, organ size and energy utilization of Sprague-Dawley rats. **J Nutr**, v. 116, n. 12, p. 2525-2535, 1986.
27. FUXE, K.; WIKSTROM, A. C.; OKRET, S.; AGNATI, L. F.; HARFSTRAND, A.; YU, Z. Y. et al. Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. **Endocrinology**, v. 117, n. 5, p. 1803-1812, 1985.
28. GAMARO, G. D.; MANOLI, L. P.; TORRES, I. L.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochem.Int.**, v. 42, n. 2, p. 107-114, 2003.
29. GOMIDE, J. M. C. **Participação do sistema renina-angiotensina no controle da pressão arterial de ratos submetidos a uma desnutrição protéica.** 2007. 2007. Dissertação de mestrado
30. GREENBERG, D. B. Clinical Dimensions of Fatigue. **Prim.Care Companion.J Clin Psychiatry**, v. 4, n. 3, p. 90-93, 2002.
31. HAMMER, F. ; STEWART, P. M. Cortisol metabolism in hypertension. **Best.Pract.Res.Clin Endocrinol.Metab**, v. 20, n. 3, p. 337-353, 2006.
32. HAN, E. S.; LEVIN, N.; BENGANI, N.; ROBERTS, J. L.; SUH, Y.; KARELUS, K. et al. Hyperadrenocorticism and food restriction-induced life extension in the rat:

- evidence for divergent regulation of pituitary proopiomelanocortin RNA and adrenocorticotrophic hormone biosynthesis. **J Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.**, v. 50, n. 5, p. B288-B294, 1995.
33. HARRO, J.; TONISSAAR, M.; ELLER, M.; KASK, A.; ORELAND, L. Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. **Brain Res.**, v. 899, n. 1-2, p. 227-239, 2001.
 34. JACOBSON, L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation. **Endocrinol.Metab Clin North Am**, v. 34, n. 2, p. 271-92, vii, 2005.
 35. JAYA RAO, K. S.; SRIKANTIA, S. G.; GOPALAN, C. Plasma cortisol levels in protein-calorie malnutrition. **Arch.Dis.Child**, v. 43, n. 229, p. 365-367, 1968.
 36. KIM, Y. C.; ARIYOSHI, N.; ARTEMENKO, I.; ELLIOTT, M. E.; BHATTACHARYYA, K. K.; JEFCOATE, C. R. Control of cholesterol access to cytochrome P450_{scc} in rat adrenal cells mediated by regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 10-20, 1997.
 37. KOONG, L. J.; NIENABER, J. A.; PEKAS, J. C.; YEN, J. T. Effects of plane of nutrition on organ size and fasting heat production in pigs. **J Nutr**, v. 112, n. 8, p. 1638-1642, 1982.
 38. LENNQUIST, S. Urinary excretion of hydroxyprolines in man under the influence of cold. **Scand.J Clin Lab Invest**, v. 35, n. 2, p. 103-107, 1975.
 39. LEON-QUINTO, T.; MAGNAN, C.; PORTHA, B. Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. **Endocrinology**, v. 139, n. 8, p. 3382-3389, 1998.
 40. LESAGE, J.; BLONDEAU, B.; GRINO, M.; BREANT, B.; DUPOUY, J. P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. **Endocrinology**, v. 142, n. 5, p. 1692-1702, 2001.
 41. LOCHS, H.; ALLISON, S. P.; MEIER, R.; PIRLICH, M.; KONDRUP, J.; SCHNEIDER, S. et al. Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, definitions and general topics. **Clin.Nutr.**, v. 25, n. 2, p. 180-186, 2006.

42. LOOSE, D. S.; KAN, P. B.; HIRST, M. A.; MARCUS, R. A.; FELDMAN, D. Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P450-dependent enzymes. **J Clin Invest**, v. 71, n. 5, p. 1495-1499, 1983.
43. LOSS, I. O.; FERNANDES, L. G.; MARTINS, C. D.; CARDOSO, L. M.; SILVA, M. E.; DIAS-DA-SILVA, V. J. et al. Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. **Life Sci.**, v. 81, n. 11, p. 944-950, 2007.
44. LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **J Nutr**, v. 128, n. 2 Suppl, p. 401S-406S, 1998.
45. LUCAS, S. R.; COSTA SILVA, V. L.; MIRAGLIA, S. M.; ZALADEK, G. F. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. **Pediatr.Nephrol.**, v. 11, n. 6, p. 719-723, 1997.
46. LUKOYANOV, N. V. ; ANDRADE, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. **Behav.Brain Res.**, v. 112, n. 1-2, p. 85-97, 2000.
47. MARQUEZ, C.; NADAL, R.; ARMARIO, A. Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. **Behav.Brain Res.**, v. 168, n. 1, p. 13-22, 2006.
48. MARTI, O. ; ARMARIO, A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. **Int.J Dev.Neurosci.**, v. 16, n. 3-4, p. 241-260, 1998.
49. MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KARANTH, S.; RETTORI, V. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. **Braz.J Med.Biol.Res.**, v. 33, n. 10, p. 1121-1131, 2000.
50. MIETTINEN, T. A. Cholesterol metabolism during ketoconazole treatment in man. **J Lipid Res.**, v. 29, n. 1, p. 43-51, 1988.
51. MOURA, M. R. **Avaliação Temporal da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia de Cauda em Ratos Submetidos à Desnutrição Protéica e a Hipertensão de Goldblatt (2R-1C)**. 2009. 2009. Dissertação de mestrado
52. MOURI, T.; ITOI, K.; TAKAHASHI, K.; SUDA, T.; MURAKAMI, O.; YOSHINAGA, K. et al. Colocalization of corticotropin-releasing factor and

vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v. 57, n. 1, p. 34-39, 1993.

53. NATELSON, B. H.; CREIGHTON, D.; MCCARTY, R.; TAPP, W. N.; PITMAN, D.; OTTENWELLER, J. E. Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. **Physiol Behav.**, v. 39, n. 1, p. 117-125, 1987.
54. ODERMATT, A. Corticosteroid-dependent hypertension: environmental influences. **Swiss.Med.Wkly.**, v. 134, n. 1-2, p. 4-13, 2004.
55. OLIVEIRA, E. L.; CARDOSO, L. M.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E.; DUN, N. J.; COLOMBARI, E. et al. A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. **Nutr Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 201-205, 2004.
56. OMS. Manejo da desnutrição grave: Um manual para profissionais de saúde de nível superior (médicos, enfermeiros, nutricionistas, e outros) e suas equipes de auxiliares. 1999.
57. PACAK, K. ; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr.Rev.**, v. 22, n. 4, p. 502-548, 2001.
58. PEDROSA, M. L. ; MORAES-SANTOS, T. Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats. **Braz.J Med.Biol.Res.**, v. 20, n. 3-4, p. 331-338, 1987.
59. PIRPIRIS, M.; YEUNG, S.; DEWAR, E.; JENNINGS, G. L.; WHITWORTH, J. A. Hydrocortisone-induced hypertension in men. The role of cardiac output. **Am J Hypertens.**, v. 6, n. 4, p. 287-294, 1993.
60. RASSOOL, G. H. Expert report on diet, nutrition and prevention of chronic diseases. **J.Adv.Nurs.**, v. 43, n. 6, p. 544-545, 2003.
61. REDDY, P. V.; DAS, A.; SASTRY, P. S. Quantitative and compositional changes in myelin of undernourished and protein malnourished rat brains. **Brain Res.**, v. 161, n. 2, p. 227-235, 1979.
62. REIS, F. M.; RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, J. A.; MACHADO, L. J.; GUERRA, R. M.; REIS, A. M.; COIMBRA, C. C. Plasma prolactin and glucose alterations induced by surgical stress: a single or dual response? **Exp.Physiol**, v. 83, n. 1, p. 1-10, 1998.

63. REUL, J. M.; VAN DEN BOSCH, F. R.; DE KLOET, E. R. Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. **J Endocrinol.**, v. 115, n. 3, p. 459-467, 1987.
64. SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocr.Rev.**, v. 13, n. 2, p. 329-380, 1992.
65. SARUTA, T. Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. **Hypertens.Res.**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 1996.
66. SATO, C.; SATO, S.; TAKASHINA, H.; ISHII, H.; ONOZUKA, M.; SASAGURI, K. Bruxism affects stress responses in stressed rats. **Clin Oral Investig.**, 2009.
67. Sawaya A.L. (2006). *Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional.*
68. SAWAYA, A. L.; GRILLO, L. P.; VERRESCHI, I.; DA SILVA, A. C.; ROBERTS, S. B. Mild stunting is associated with higher susceptibility to the effects of high fat diets: studies in a shantytown population in Sao Paulo, Brazil. **J Nutr**, v. 128, n. 2 Suppl, p. 415S-420S, 1998.
69. SCHEUER, D. A. ; BECHTOLD, A. G. Glucocorticoids potentiate central actions of angiotensin to increase arterial pressure. **Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol**, v. 280, n. 6, p. R1719-R1726, 2001a.
70. SCHEUER, D. A. ; MIFFLIN, S. W. Glucocorticoids modulate baroreflex control of renal sympathetic nerve activity. **Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol**, v. 280, n. 5, p. R1440-R1449, 2001b.
71. SONINO, N. The use of ketoconazole as an inhibitor of steroid production. **N.Engl.J Med.**, v. 317, n. 13, p. 812-818, 1987.
72. SUTOO, D. ; AKIYAMA, K. Neurochemical changes in mice following physical or psychological stress exposures. **Behav.Brain Res.**, v. 134, n. 1-2, p. 347-354, 2002.
73. TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THENORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North

- American Society of Pacing and Electrophysiology. **Eur.Heart J**, v. 17, n. 3, p. 354-381, 1996.
74. TATLI, M.; GUZEL, A.; KIZIL, G.; KAVAK, V.; YAVUZ, M.;KIZIL, M. Comparison of the effects of maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats. **Brain Res.**, v. 1156, p. 21-30, 2007.
 75. TONKISS, J.; TRZCINSKA, M.; GALLER, J. R.; RUIZ-OPAZO, N.;HERRERA, V. L. Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry. **Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 108-114, 1998.
 76. TROPIA, F. C.; CARDOSO, L. M.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E.; HAIBARA, A. S.; MORAES, M. F. et al. Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. **Nutr Neurosci.**, v. 4, n. 2, p. 99-107, 2001.
 77. TSIGOS, C. ; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom.Res.**, v. 53, n. 4, p. 865-871, 2002.
 78. VERAGO, J. L.; GRASSI-KASSISSE, D. M.;SPADARI-BRATFISCH, R. C. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. **Braz.J Med.Biol.Res.**, v. 34, n. 9, p. 1197-1207, 2001.
 79. VIEIRA, M. A. ; DE LIMA, R. A. [Children and adolescents with chronic disease: living with changes]. **Rev.Lat.Am Enfermagem.**, v. 10, n. 4, p. 552-560, 2002.
 80. WALKER, B. R. Glucocorticoids and cardiovascular disease. **Eur.J Endocrinol.**, v. 157, n. 5, p. 545-559, 2007.
 81. WHO. (2007). **World Health Organization. Nutrition.** 3-8-2009.
 82. WINICK, M. ; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **J Nutr**, v. 89, n. 3, p. 300-306, 1966.
 83. WOODWARD, C. A.; HUTCHISON, B.; NORMAN, G. R.; BROWN, J. A.;ABELSON, J. What factors influence primary care physicians' charges for their services? An exploratory study using standardized patients. **CMAJ.**, v. 158, n. 2, p. 197-202, 1998.

84. YOUNG, J. B.; KAUFMAN, L. N.; SAVILLE, M. E.;LANDSBERG, L. Increased sympathetic nervous system activity in rats fed a low-protein diet. **Am J Physiol**, v. 248, n. 5 Pt 2, p. R627-R637, 1985.

7 APÊNDICE

Peso corporal (g)

CONTROLE							DESNUTRIDO					
Cetoconazol							Cetoconazol			Salina		
Animal	1	15	30	1	15	30	1	15	30	1	15	30
1	270	280	298	275	281	287	65	69	70	70	68	72
2	278	282	287	280	280	288	68	70	67	68	69	68
3	269	287	285	279	286	290	69	68	69	65	72	70
4	259	289	295			286	65	72	70			
5	271		298			286		70	71			
6	279		285									
Média±	271	284	291	278	282	287	66	69	69	67	69	70
							*	*	*	*	*	*

Tabela III – Peso corporal dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle.

CONTROLE							DESNUTRIDO					
Cetoconazol							Cetoconazol			Salina		
Animal	1	15	30	1	15	30	1	15	30	1	15	30
1	5.4	9.3	12.2	5.9	6.6	6.9	24.3	28.1	34.7	17.8	22.3	24.0
2	5.7	8.9	10.1	6.5	6.5	6.0	24.8	28.8	32.3	18.9	21.8	26.6
3	5.4	7.9	11.9	6.6	7.3	5.4	19.1	36.9	28.8	23.8	23.0	19.5
4	8.0	9.8	9.7				22.7	28.6	25.5			
									24.5			
							23.5	31.2	29.5	20.5	22.1	23.4
								*	*	*	*	*

Tabela IV – Peso da glândula adrenal normalizado com o peso corporal dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. (*) Diferença significativa em relação aos grupos controle. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia.

Perfil lipídico das adrenais

CONTROLE							DESNUTRIDO					
	Cetoconazol			Salina			Cetoconazol			Salina		
Animal	1	15	30	1	15	30	1	15	30	1	15	30
1	13.3	15.6	20.9	14.8	13.9	12.0	11.8	20.3	20.6	10.0	10.1	8.9
2	12.1	14.9	21.3	11.9	12.4	14.0	11.4	18.6	20.2	8.7	8.5	8.9
3	13.8	17.5	20.3	11.3	12.5	14.1	12.4	18.3	21.2	7.8	8.9	7.4
4	13.5		17.5			15.6		20.0	19.7			
5	14.9		25.0				11.8	19.3	20.4	8.8	9.2	8.4
6	10.7		20.4					*	*	*	*	*
Média	13.1	16.2	21.8	13.5	13.6	14.2						
	#	#										

Tabela V – Quantidade de lipídeo presente nas adrenais dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. () Diferença significativa em relação aos grupos controle. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia*

Cortisol sérico (µg/dL)

CONTROLE							DESNUTRIDO					
	Cetoconazol			Salina			Cetoconazol			Salina		
Animal	1	15	30	1	15	30	1	15	30	1	15	30
1	2.9	1.0	0.5	2.8	2.5	2.6	15.5	2.6	1.0	5.9	4.1	7.3
2	2.4	2.0	0.9	1.5	2.4	2.0	6.9	1.0	0.5	5.8	4.5	4.1
3	2.8	0.9	1.7	1.9	1.2	2.2	7.3	2.4	0.3	6.0	6.6	5.0
4	0.4	1.9	1.3	2.0	2.9	2.3	7.8	1.4	0.8	3.2	6.8	5.9
5		1.5	1.2	2.5	3.8	2.5	7.4	2.2	1.0	3.8	6.5	6.1
Média	2.1	1.3	0.2	2.1	2.5	2.3	8.9	1.9	0.7	4.9	5.7	5.6
		*	*				*	*		*	*	*

Tabela VI – Produção de cortisol dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. () Diferença significativa em relação aos grupos controle salina*

PAM (mmHg)

CONTROLE						
Animal	Cetoconazol			Salina		
	1	15	30	1	15	30
1	113	133	115	105	108	112
2	110	91	105	112	111	107
3	112	109	112	111	101	108
4	114	118	106	107	107	100
5	113	103	124	117	117	109
Média	112	111	112	108	109	107

DESNUTRIDO						
	Cetoconazol			Salina		
	1	15	30	1	15	30
111	103	110	104	106	105	
112	121	105	100	105	107	
110	100	104	108	104	110	
104	109	109				
	113					
Média	109	109	107	104	105	107

FC (bpm)

CONTROLE						
Animal	Cetoconazol			Salina		
	1	15	30	1	15	30
1	0.59	0.62	0.49	0.50	0.61	0.54
2	0.55	0.66	0.59	0.59	0.57	0.54
3	0.52	0.55	0.52	0.51	0.56	0.68
4	0.47	0.53	0.49	0.58	0.64	0.51
5	0.55	0.50	0.65	0.56		0.46
6	0.49	0.61	0.51			
	0.51		0.59			
Média	0.52	0.58	0.55	0.55	0.59	0.55

DESNUTRIDO						
	Cetoconazol			Salina		
	1	15	30	1	15	30
417	370	392	418	432	461	
438	392	390	415	425	431	
427	416	374	422	425	415	
420	342	363				
	362					
Média	425	376	379	418	427	435
	*	* #	* #	*	*	*

Tabela VIII – Frequência cardíaca média dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. () Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e controle tratados com cetoconazol. (#) Diferença significativa em relação ao grupo desnutrido tratado com cetoconazol por 1 dia.*

LF/HF (u.n.)

CONTROLE						
	Cetoconazol			Salina		
Animal	1	15	30	1	15	30
1	336	346	345	335	320	332
2	338	336	348	340	330	345
3	348	347	342	351	345	334
4	340	319	355	340	332	340
5	352	339	338	327	338	336
Média	342	337	345	338	333	337

DESNUTRIDO					
Cetoconazol			Salina		
1	15	30	1	15	30
0.94	0.77	0.80	0.81	0.89	0.81
0.88	0.93	0.88	0.92	0.83	0.88
0.84	0.88	0.82	0.80	0.82	0.83
0.89	0.81	0.91			
	1.04				
0.89	0.89	0.85	0.84	0.84	0.84
*	*	*	*	*	*

Tabela IX – Relação LF/HF dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. () Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e com cetoconazol.*

CONTROLE						
	Cetoconazol			Salina		
Animal	1	15	30	1	15	30
1	0.37	0.38	0.33	0.33	0.37	0.37
2	0.33	0.39	0.37	0.37	0.37	0.35
3	0.34	0.35	0.34	0.34	0.36	0.35
4	0.32	0.34	0.33	0.37	0.36	0.40
5	0.35	0.33	0.39	0.36	0.39	0.33
Média	0.35	0.36	0.35	0.35	0.37	0.36

DESNUTRIDO					
Cetoconazol			Salina		
1	15	30	1	15	30
0.48	0.43	0.44	0.44	0.47	0.45
0.46	0.48	0.46	0.48	0.45	0.46
0.45	0.46	0.45	0.44	0.45	0.45
0.47	0.44	0.47			
	0.41				
0.47	0.44	0.46	0.45	0.46	0.46
*	*	*	*	*	*

Tabela X – Participação do componente LF dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. () Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e com cetoconazol.*

HF (u.n.)

CONTROLE							DESNUTRIDO					
Animal	Cetoconazol			Salina			Cetoconazol			Salina		
	1	15	30	1	15	30	1	15	30	1	15	30
1	0.62	0.61	0.66	0.66	0.62	0.62	0.51	0.53	0.55	0.55	0.53	0.55
2	0.64	0.60	0.62	0.62	0.62	.64	0.53	0.54	0.53	0.51	0.54	0.53
3	0.65	0.64	0.65	0.65	0.63	0.64	0.54	0.53	0.54	0.55	0.53	0.61
4	0.67	0.65	0.66	0.62	0.63	0.59	0.52	0.55	0.52		0.55	0.54
5	0.64	0.66	0.60	0.63	0.60	0.66		0.48			0.48	0.52
Média	0.64	0.63	0.64	0.64	0.62	0.63	0.52	0.53	0.53	0.54	0.53	0.55
							*	*	*	*	*	*

Tabela XI – Participação do componente HF dos animais controle e desnutridos tratados com cetoconazol ou salina. ()
Diferença significativa em relação aos grupos controle tratados com salina e com cetoconazol.*

Kit cortisol (Pag.1-7)



IMMULITE[®] 2000

Cortisol

SIEMENS

Siemens Medical Solutions Diagnostics

IMMULITE® 2000 Cortisol

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE 2000 Analyzer — for the quantitative measurement of cortisol (hydrocortisone, Compound F) in serum, as an aid in the clinical assessment of adrenal status.

Catalog Number: **L2KCO2** (200 tests),
L2KCO6 (600 tests)

Test Code: **COR** Color: **Dark Pink**

CDC Analyte Identifier Code: 1032

CDC Test System Identifier Code: 10418

CLIA Complexity Category: Moderate

Summary and Explanation

Cortisol (hydrocortisone, Compound F) is the most abundant circulating steroid and the major glucocorticoid secreted by the adrenal cortex. Physiologically effective in anti-inflammatory activity and blood pressure maintenance, cortisol is also involved in gluconeogenesis, calcium absorption and the secretion of gastric acid and pepsin.

As an indicator of adrenocortical function, measurement of blood cortisol levels is useful in the differential diagnosis of Addison's and Cushing's disease, hypopituitarism, and adrenal hyperplasia and carcinoma.⁴

A variety of stimulation and suppression tests — ACTH Stimulation, ACTH Reserve, Dexamethasone Suppression — can supply supportive information on adrenocortical function.^{4,5,6}

Anomalous cortisol concentrations have been shown to exist in patients with acute infections, severe pain, diabetes mellitus or heart failure, and in women either pregnant or on estrogen therapy. In addition, certain virilizing syndromes and iatrogenic conditions raise other naturally occurring steroid levels to high (nonphysiologic) concentrations that may interfere with assaying cortisol directly, unless a highly specific antiserum is used.

Principle of the Procedure

IMMULITE 2000 Cortisol is a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay.

Incubation Cycles: 1 × 30 minutes.

Specimen Collection

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Icteric or grossly contaminated samples may give erroneous results.

Centrifuging serum samples before a complete clot forms may result in the presence of fibrin. To prevent erroneous results due to the presence of fibrin, ensure that complete clot formation has taken place prior to centrifugation of samples. Some samples, particularly those from patients receiving anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. IMMULITE 2000 Cortisol has not been tested with all possible variations of tube types.

Volume Required: 10 µL serum.

Storage: 7 days at 2–8°C, or 3 months at –20°C.⁸

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C. Dispose of in accordance with applicable laws.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Kit cortisol (Pag.3-7)

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Chemiluminescent Substrate: Avoid contamination and exposure to direct sunlight. (See insert.)

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

Components are a matched set. Labels on the inside box are needed for the assay.

Cortisol Bead Pack (L2CO12)

With barcode. 200 beads, coated with polyclonal rabbit anti-cortisol. Stable at 2–8°C until expiration date.

L2KCO2: 1 pack. **L2KCO6:** 3 packs.

Cortisol Reagent Wedge (L2COA2)

With barcode. 11.5 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to cortisol in buffer, with preservative. Stable at 2–8°C until expiration date.

L2KCO2: 1 wedge. **L2KCO6:** 3 wedges.

Before use, tear off the top of the label at the perforations, without damaging the barcode. Remove the foil seal from the top of wedge; snap the sliding cover down into the ramps on the reagent lid.

Cortisol Adjustors (LCOL, LCOH)

Two vials (Low and High), 3 mL each, of cortisol in processed human serum, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

L2KCO2: 1 set. **L2KCO6:** 2 sets.

Before making an adjustment, place the appropriate Aliquot Labels (supplied with the kit) on test tubes so that the barcodes can be read by the on-board reader.

Kit Components Supplied Separately

Multi-Diluent 1 (L2M1Z)

For the on-board dilution of high samples. One vial of concentrated (ready-to-use) processed, normal human serum, containing undetectable to low levels of cortisol, with preservative. Stable at 2–8°C

for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

L2M1Z: 25 mL.

Barcode labels are provided for use with the diluent. Before use, place an appropriate label on a 16 × 100 mm test tube, so that the barcodes can be read by the on-board reader.

L2M1Z: 3 labels.

L2SUBM: Chemiluminescent Substrate

L2PWSM: Probe Wash

L2KPM: Probe Cleaning Kit

LRXT: Reaction Tubes (disposable)

L2ZT: 250 Sample Diluent Test Tubes (16 × 100 mm)

L2ZC: 250 Sample Diluent Tube Caps

CON6: Tri-level, multi-constituent control

Also Required

Distilled or deionized water; test tubes; controls.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE 2000 Operator's Manual.

See the IMMULITE 2000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

Recommended Adjustment Interval:
4 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or serum pools with at least two levels (low and high) of cortisol.

Expected Values

The following reference ranges have been reported in the literature for circulating cortisol levels and for the results of stimulation and suppression tests.

Kit cortisol (Pag.4-7)

Diurnal Variation	<i>a.m.</i> : 5 – 25 µg/dL (138 – 690 nmol/L) ^{1,8,9} <i>p.m.</i> : Approximately half of <i>a.m.</i> values
ACTH Stimulation	Over twice (usually 3 to 5 times) basal values ^{4,5}
ACTH Reserve	Below basal (control) values ^{5,6}
Dexamethasone Suppression	Below basal (control) values for the screening, low-dose and high-dose tests ^{4,5}

Consider these limits as *guidelines* only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitations

Circulating cortisol results may be falsely elevated in samples obtained from patients being treated with prednisolone or prednisone (converted to prednisolone *in vivo*). Caution must therefore be exercised with cortisol determinations for patients undergoing therapy with these and structurally related synthetic corticosteroids.

Heterophilic antibodies in human serum can react with the immunoglobulins included in the assay components causing interference with *in vitro* immunoassays. [See Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products can demonstrate this type of interference potentially causing an anomalous result. These reagents have been formulated to minimize the risk of interference; however, potential interactions between rare sera and test components can occur. For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed in µg/dL. (Unless otherwise noted, all were generated on serum samples collected in tubes without gel barriers or clot-promoting additives.)

Conversion Factor:

µg/dL × 27.59 → nmol/L

Calibration Range: 1 to 50 µg/dL
(28 to 1,380 nmol/L).

The assay is traceable to an internal standard manufactured using qualified materials and measurement procedures.

Analytical Sensitivity: 0.20 µg/dL
(5.5 nmol/L).

Precision: Samples were assayed in duplicate over the course of 20 days, two runs per day, for a total of 40 runs and 80 replicates. (See "Precision" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three cortisol solutions (100, 185, and 380 µg/dL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The antibody is highly specific for cortisol. (See "Specificity" table.)

Although some steroids exhibit slight crossreactivity, their normal physiological concentrations are low compared to cortisol, hence they will not significantly interfere with the assay. There is, however, an observed crossreactivity of approximately 62% with prednisolone which must be considered for patients undergoing this therapy. Since prednisone is converted to prednisolone *in vivo*, caution must be exercised with cortisol determinations for patients undergoing either therapy.

Bilirubin: Samples spiked with 100 and 200 mg/L of conjugated and unconjugated bilirubin were analyzed. Bilirubin may interfere with the assay, causing elevation of values. (See "Bilirubin" table.)

Hemolysis: Presence of hemoglobin in concentrations up to 384 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: Presence of triglycerides in concentrations up to 3,000 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Method Comparison 1: The assay was compared to IMMULITE Cortisol on 97 samples. (Concentration range: approximately 2 to 50 µg/dL. See "Method Comparison 1" graph.) By linear regression:

Kit cortisol (Pag.5-7)

(IML 2000) = 0.92 (IML) + 0.07 µg/dL
r = 0.990

Means:
17.3 µg/dL (IMMULITE 2000)
18.8 µg/dL (IMMULITE)

Method Comparison 2: The assay was compared to Coat-A-Count (RIA) Cortisol on 97 samples (Concentration range: approximately 2 to 50 µg/dL. See "Method Comparison 2" graph.) By linear regression:

(IML 2000) = 0.98 (CAC) - 0.83 µg/dL
r = 0.983

Means:
17.3 µg/dL (IMMULITE 2000)
18.5 µg/dL (Coat-A-Count)

References

1) Foster L, Dunn R. Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. *Clin Chem* 1974;20:365. 2) Farmer R, Pierce C. Plasma cortisol determinations: radioimmunoassay and competitive protein binding compared. *Clin Chem* 1974; 20:411. 3) Ruder H, et al. A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. *J Clin Endo Metab* 1972;35:219. 4) Rothfeld B, ed. Plasma Cortisol. In: Nuclear medicine in vitro. 1974:120. 5) Murphy B, et al. Clinical studies utilizing a new method for the serial determination of plasma corticoids. *J Canad Med Assoc* 1964;90:775. 6) Sparks R. Measurement of serum 11-deoxycortisol and cortisol after metyrapone. *Ann Intern Med* 1971;75:717. 7) Kowalski A, Paul W. A simple extraction procedure for the determination of free (unconjugated) cortisol in urine by radioimmunoassay. *Clin Chem* 1979;25:1152. 8) Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. 9) Wilson JD, Foster DW, editors. Williams textbook of endocrinology. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1985.

Technical Assistance

In the United States, contact Siemens Medical Solutions Diagnostics Technical Services department.

Tel: 800.372.1782 or 973.927.2828

Fax: 973.927.4101. Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Siemens Medical Solutions Diagnostics is certified to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Precision (µg/dL)

	Mean ³	Within-Run ¹		Total ²	
		SD ⁴	CV ⁵	SD	CV
1	3.3	0.20	6.1%	0.27	8.2%
2	8.5	0.44	5.2%	0.58	6.8%
3	18	0.95	5.3%	1.3	7.2%
4	26	1.6	6.2%	1.9	7.3%
5	31	2.3	7.4%	2.9	9.4%

Linearity (µg/dL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8 ⁵	11	—	—
	4 in 8	5.6	5.5	102%
	2 in 8	2.8	2.8	100%
	1 in 8	1.5	1.4	107%
2	8 in 8	18	—	—
	4 in 8	8.5	9.0	94%
	2 in 8	4.5	4.5	100%
	1 in 8	2.2	2.3	96%
3	8 in 8	22	—	—
	4 in 8	12	11	109%
	2 in 8	6.2	5.5	113%
	1 in 8	2.9	2.8	104%
4	8 in 8	41	—	—
	4 in 8	20	21	95%
	2 in 8	10	10	100%
	1 in 8	4.9	5.1	96%
5	8 in 8	>50	—	—
	4 in 8	26	—	—
	2 in 8	12	13	92%
	1 in 8	5.9	6.5	91%

Kit cortisol (Pag.6-7)

Specificity			Recovery (µg/dL)			
Compound ¹	µg/dL Added ²	% Cross reactivity ³	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
Aldosterone	1,000	0.1%	1	8.89	—	—
Androstenedione	10,000	ND	A	13.7	13.5	102%
Betamethasone	1,000	ND	B	16.7	17.7	94%
Corticosterone	400	1.2%	C	28.2	27.5	103%
Cortisone	400	1.0%	2	12.4	—	—
11-Deoxycorticosterone	400	ND	A	18.1	16.8	108%
11-Deoxycortisol	100	1.6%	B	23.0	21.0	109%
21-Deoxycortisone	500	0.2%	C	33.7	30.8	109%
Dexamethasone	500	ND	3	14.3	—	—
DHEA-SO ₄	10,000	ND	A	16.5	18.6	89%
Estriol	100	ND	B	24.2	22.8	106%
Estrone	500	0%	C	33.0	32.6	101%
Fluticasone	22	ND	4	15.0	—	—
17α-Hydroxyprogesterone	400	0.2%	A	17.9	19.3	93%
Methotrexate	100	ND	B	25.1	23.5	107%
Methylprednisolone	200	22%	C	33.3	33.3	100%
	100	25%	5	19.3	—	—
Prednisolone	8	62%	A	22.1	23.3	95%
Prednisone	16	6.1%	B	26.8	27.6	97%
Pregnanediol	2,000	0%	C	39.0	37.3	105%
Progesterone	400	ND				
Spirolactone	1,000	ND				
Tetrahydrocortisone	400	0%				
Triamcinolone	5,000	0.023%				
	501	ND				

ND: Not detectable.⁴

Bilirubin (µg/dL)					
Unspiked ³	Conjugated ¹		Unconjugated ²		
	100 mg/L	200 mg/L	100 mg/L	200 mg/L	
1	4.2	4.0	3.9	4.1	4.5
2	8.8	8.8	9.1	9.4	9.7
3	13.0	13.4	14.3	13.6	15.1
4	18.8	18.6	19.6	22.1	22.0
5	28.3	28.0	29.8	28.9	29.3

Method Comparison 1:

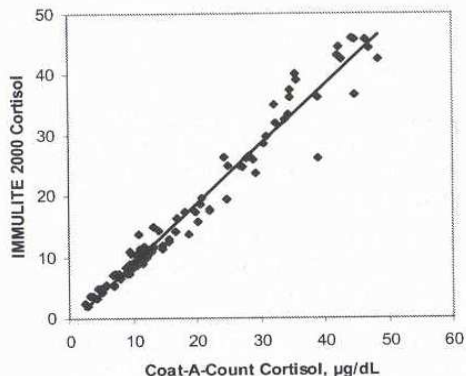
(IML 2000) = 0.92 (IML) + 0.07 µg/dL
r = 0.990

6

IMMULITE 2000 Cortisol (PIL2KCO-21, 2008-11-12)

Kit cortisol (Pag.7-7)

Method Comparison 2:



$$(IML 2000) = 0.98 (CAC) - 0.83 \mu\text{g/dL}$$

$$r = 0.983$$

Deutsch. Precision: ¹Intra-Assay, ²Gesamt, ³Mittelwert, ⁴SD (Standardbereich), ⁵CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachten (B), ³Erwarten (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachten (B), ³Erwarten (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesezte Menge, ³% Kreuzreaktivität, ⁴NN: Nicht nachweisbar. **Bilirubin.** ¹konjugiertes, ²unkonjugiertes, ³ohne Zugabe von. **Method Comparison.** Cortisol: Cortisol.

Español. Precision: ¹Intraensayo, ²Total, ³Media, ⁴DS, ⁵CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E, ⁵8 en 8. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³% Reacción cruzada, ⁴ND: no detectable. **Bilirubin.** ¹conjugada, ²no conjugado, ³No sobrecargadas. **Method Comparison.** Cortisol: Cortisol.

Français. Precision: ¹Intraessai, ²Total, ³Moyenne, ⁴SD, ⁵CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴% O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴% O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Réaction croissée%. ⁴ND: non détectable. **Bilirubin.** ¹conjuguée, ²non-conjuguée, ³Pur. **Method Comparison.** Cortisol: Cortisol.

Italiano. Precision: ¹Intra-serie, ²Totale, ³Media, ⁴SD (Deviazione Standard), ⁵CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴% O/A, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴% O/A. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Percentuale di Crossreattività, ⁴ND: non determinabile. **Bilirubin.** ¹coniugata, ²non coniugata, ³Semplice, senza aggiunte. **Method Comparison.** Cortisol: Cortisol.

Português. Precision: ¹Entre-ensaios, ²Total, ³Média, ⁴Desvio padrão, ⁵Coefficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E, ⁵8 em 8. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade

IMMULITE 2000 Cortisol (PIL2KCO-21, 2008-11-12)

adicionada, ³Percentagem de reacção cruzada, ⁴ND: não detectável. **Bilirubin.** ¹conjugada, ²não-conjugada, ³Não adicionada. **Method Comparison.** Cortisol: Cortisol.

7