

DESNUTRIÇÃO EXPERIMENTAL:  
RESULTADOS ANATOMO-PATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA  
ADMINISTRAÇÃO DE DIETAS HIPOPROTÉICAS A  
RATOS ALBINOS JOVENS <sup>1</sup>

MADI, K.\* & CAMPOS, S. D.\*\*

**SUMÁRIO:** Na tentativa de reproduzir experimentalmente os achados morfológicos e eletroforéticos (proteínas do soro) observados na desnutrição infantil, dois grupos de experiências foram realizados em ratos albinos jovens, submetendo-os a uma dieta pobre em proteínas (2%) por períodos de 41 a 88 dias.

O modelo experimental reproduz em linhas gerais os principais danos estruturais vistos na patologia humana, ficando num meio termo entre kwashiorkor e marasmo.

Alterações atróficas tegumentares foram assinaladas como achado tardio. O achado mais conspícuo foi metamorfose gordurosa hepática do tipo perilobular. A regeneração hepatocelular foi abortiva, aparecendo nos estágios finais das experiências ao lado dos fenômenos regressivos.

Foi possível estabelecer uma seqüência lesional nas alterações estruturais do pâncreas, desde modificações da quantidade de grânulos de zimogênio nos estágios iniciais até a atrofia acinosa acentuada, subvertendo a arquitetura do órgão, nos estágios finais.

As alterações intestinais que culminaram com o quadro de atrofia, não comparável em intensidade com a patologia humana, correspondem à diminuição da altura do epitélio mucoso, hipocelularidade da lâmina própria, criptas pequenas, pobreza em mitoses, que encurtam as vilosidades, assemelhando-se ao padrão mucoso dos chamados animais "germ-free". Além disso, os autores chamam a atenção para a intensa diminuição das células muco-secretoras ao nível do epitélio do intestino delgado e grosso.

No modelo surpreende-se também uma depleção linfo-histiocitária, representada por atrofia das placas de Peyer, diminuição das células de Kupffer, atrofia do timo e depleção linfóide ganglionar e esplênica.

O estudo bioquímico do soro revelou baixa das proteínas totais e do colesterol. A eletroforese de proteínas demonstrou acentuada baixa da fração albumina, com inversão A/G. Entre as globulinas, as frações alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub> estão aumentadas no grupo desnutrido.

Estes achados podem ser atribuídos à carência protéica, porquanto os controles utilizados, mesmo aqueles com restrição calórica, não apresentaram alterações histológicas ou hipofouminemia.

**A** reprodução experimental das alterações verificadas na desnutrição infantil iniciou-se na tentativa de obter as lesões hepáticas, usando dietas à base de farinhas ou amido (33, 71, 72).

Alguns trabalhos dizem reproduzir o Kwashiorkor (25, 26, 90) outros são mais específicos e falam em deficiência protéica (21, 38, 58, 60, 64, 73, 83, 84, 87). A maioria desses trabalhos ou se

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 24 de setembro de 1974.

\* Professor Adjunto do Departamento de Patologia da UFRJ. Chefe do Laboratório de Anatomia Patológica do IPPMG – UFRJ. Pesquisador CNPq (Proc. n.º 1398/69).

\*\* Bolsista do CNPq (Proc. n.º 7081/71) – Química da Fac. Med. da UFRF – Dis. Med. Nuclear – Dep. Radiologia.

preocupou com a esteatose hepática ou não relatava achados importantes como as lesões de pele ou de pâncreas, julgadas por DAVIES como a principal lesão de Kwashiorkor (18, 26, 27). Um dos relatos mais antigos sobre a atrofia pancreática é de FRIEDMAN e FRIEDMAN (30), que usando dieta hipoprotéica (10%) e hipergraxa (25%) produziram em ratos quadro histológico semelhante ao encontrado na desnutrição infantil. No entanto, esta dieta não é semelhante à infantil que é obviamente hipograxa.

Os trabalhos iniciais do grupo hindu, em ratos (65, 66) descrevem somente o fígado, explorando o problema dos carboidratos e seu papel associado à deficiência protéica, sugerindo que a restrição calórica "protege" o fígado, evitando a degeneração gordurosa. Posteriormente, em macacos, os mesmos autores efetuaram magníficos trabalhos (14, 19, 20, 21), dedicados principalmente às lesões intestinais e à musculatura cardíaca e esquelética. VOLK e LAZARUS (90) e LAZARUS e VOLK (50) reproduziram alterações pancreáticas em coelhos com dieta deficiente em proteínas, encontrando porém matamorfose gordurosa hepática centrolobular e eventualmente cirrose. Além disso, seu material mostra necrose pancreática, fato raramente observado em outras experiências ou na patologia humana. Fazem entretanto estudo importante com relação à microscopia eletrônica das lesões atróficas de pâncreas.

Mas é o trabalho de SIDRANSKY com proteínas vegetais (73) ou com deficiências específicas de certos aminoácidos (74) que abre caminho a um modelo de desnutrição simples e realizável em tempo significativamente curto, usando a alimentação forçada, isto é, por sonda ("forced-feeding"), e produzindo lesões em 4 a 7 dias. Seus animais apresentaram degeneração gorda hepática periportal, atrofia do pâncreas, de glândulas salivares, gastrintestinal e de algumas glândulas endócrinas. STEAD e BROCK (81) criticaram esse método por ser excessivamente artificial e, usando animais desmamados precocemente e submetidos a dieta hipoprotéica, relatam alterações das proteínas séricas compatíveis com depleção protéica, não descrevendo entretanto alterações microscópicas. PLATT e col. (59, 60) conseguiram resul-

tados semelhantes, afirmando, no entanto, que a alimentação por tubagem não consegue dar ao animal a quantidade de alimentos requerida pelo mesmo quando em regime livre. Esse grupo de investigadores tem tido maior sucesso em experiências com porcos (60) e tem usado a adição progressiva de açúcar à dieta hipoprotéica com a intenção de imitar as dietas humanas, apressando ou mesmo provocando desnutrição semelhante ao kwashiorkor (38). HILL e col. (40) e PROSPER e cols. (63) relataram recentemente, pelo método da alimentação forçada em ratos, alterações intestinais que, até 1967, tinham sido descritas somente em suínos e macacos. Com relação ao edema característico de Kwashiorkor, poucos relatos existem. KOHMAN (48) produziu edema em ratos com dieta hipoprotéica à base de cenoura dessecada suplementada com vitaminas e sais minerais. Não há infelizmente relato anátomo-patológico nesse trabalho. EDOZIEN (24) em ratos de 110-130 g conseguiu reproduzir um quadro clínico e laboratorial de desnutrição com edema, após quatro meses de dieta hipoprotéica. Este autor também apresenta alguns dados bioquímicos compatíveis com marasmo e kwashiorkor mas não descreve achados histopatológicos.

Neste trabalho descrevemos modelo experimental de deficiência protéica em ratos jovens, por meio da tubagem esofágica associada a dieta *ad libitum*, processo instituído em 2 grupos (um por 41 dias e outro por 88 dias), obtendo-se em ambos resultados que ficam num meio termo entre marasmo e kwashiorkor. (\*)

## MATERIAL E MÉTODOS

Este relato compreende dois grupos de experimentos, um com 80 ratos (Exp. 1) outro com 66 (Exp. 2). Ambos com animais dos dois sexos, com aproximadamente 30 dias de idade pesando em torno de 55-68 g.

(\*) O primeiro grupo corresponde a tese apresentada em 1970 (54), pertencendo a ela a documentação histológica aqui apresentada. Como os achados histológicos foram idênticos na segunda experiência, não foram feitas outras microfotografias.

No Exp. 1, realizado por "Walter Rood Army Institute of Research", a cepa usada foi a Carworth Farm Wistar e no Exp. 2, realizado no Departamento de Patologia da U.F.R.J. a cepa foi a Wistar do Inst. Oswaldo Cruz.

Após um dia de adaptação ao laboratório, os animais foram submetidos à tubagem esofágica sem alimento, três vezes ao dia, com agulha calibre 15, protegida por ponta em forma de baqueta de tambor. O animal é segurado pela pele do dorso do pescoço, com o polegar e o indicador tracionando a cabeça para trás com o fim de retificar a boca do esôfago. A ponta da sonda deve deslizar pela faringe e daí alcançar o esôfago, evitando-se facilmente a traquéia. Este procedimento tem por objetivo acostumar o animal à tubagem e à manipulação; foi praticado durante 10 dias nos quais se forneceu a ração comercial, biscoitos P ou MF, *ad libitum* (Quadro II). No meio deste período de adaptação, isto é, no 5.º dia, os animais foram colocados em gaiolas individuais com fundo de tela, intensificando o investigador o contato manual com os mesmos (conservando cada rato entre as mãos em concha, delicadamente, por um minuto após a tubagem). A temperatura das salas de experiências permaneceu entre 20-25°C; a pesagem dos animais foi feita semanalmente.

No fim deste período, quando o peso médio dos animais era de 102 g (Exp. 1) e 95 g (Exp. 2), foram distribuídos em grupos, iniciando-se a administração das dietas especiais (Quadros I, II e III). As dietas D1 e D2 têm no máximo 2% de proteína. A separação dos animais foi feita ao acaso e de modo a que os grupos tivessem o mesmo número de machos e fêmeas:

#### EXPERIMENTO 1

Grupo D-1 – 32 animais com a dieta D-1 alimentados três vezes ao dia por tubagem esofágica, recebendo após a última (23 horas) os biscoitos D-1 e S.

Grupo N-1 – 16 animais com dieta N-1 (normocalórica), alimentados por tubagem esofágica, três vezes ao dia, recebendo à noite os biscoitos N-1 e S.

Grupo Isob-1 – 16 animais com a dieta P, ração comercial Purina, oferecida em quantidade *reduzida*, 4 a 6 g, variando ligeiramente de modo a manter este grupo com peso paralelo (isobárico) ao do grupo D-1.

Grupo Ad Lib-1 – 16 animais com a dieta P *ad libitum*.

#### EXPERIMENTO 2

Grupo D-2 – 36 animais aos quais foi administrada a dieta D-2 por tubagem esofágica. Além disso ofereceram-lhes biscoitos Q à vontade.

Grupo Isoc-2 – 20 animais alimentados por tubagem esofágica com dieta N-2 (isocalórica em relação ao grupo D-2). Oferecida quantidade de biscoitos MF semelhante à ingerida pelo grupo D-2 ("pair-feeding").

Grupo Ad Lib-2 – 10 animais com ração comercial MF à vontade.

Os grupos *ad limitum* não sofreram intubação; a água foi oferecida a todos os grupos à vontade.

A quantidade de alimentos administrada por sonda foi calculada para corresponder à proporção de 1,1 g de dieta sólida (incluído o óleo) para cada 10 g de peso corporal. A diluição com água foi feita de modo que cada ml da mistura tivesse inicialmente 0,60 g de dieta. No Exp. 1, os grupos D-1 e N-1 receberam inicialmente a mesma quantidade (3 ml de mistura três vezes ao dia), mas conforme aumentava o peso de N-1 (dieta normal em proteína), aumentou-se também sua alimentação, isto é, esses dois grupos não são isocalóricos, pelo contrário, o N-1 é normocalórico. O grupo Isob-1 recebeu 1/3 ou mais de ração normal requerida, sendo essa quantidade visivelmente hipocalórica. No Exp. 2 houve pequena modificação, combinando-se ração sólida com a tubagem, razão pela qual, da quantidade exigida somente foram injetados 2/3, isto é, foram feitas duas tubagens ao invés de três. A quantidade inicial injetada foi de 3 ml por tubagem nos dois experimentos. No Exp. 1, três tubagens diárias foi o normal; no Exp. 2, houve uma tubagem, depois duas ao dia, voltando a uma, e por vezes interrompendo. Esta irregularidade ao número de tubagens se deveu a distúrbios do aparelho digestivo (fezes pastosas ou diarreia), conseqüentes ao acréscimo de açúcar. Na primeira experiência tais acidentes foram mais freqüentes, observando-se também hiperglicemia. Este acréscimo foi feito a partir do quinto dia no Exp. 1 e do vigésimo-quinto dia no Exp. 2, iniciando-se com cerca de 5-10% da dieta sólida e chegando a 20%.

No que concerne ao termo *isocalórico* do Exp. 2, cabe aqui uma ressalva: não é exatamente o que foi instituído pois a ração sólida (biscoito MF), apesar de oferecida na mesma quantidade que os animais do grupo D-2 ("pair feeding"), modifica a equivalência da quantidade intubada. A combinação da dieta líquida ("forced-feeding"), com a sólida, tem a função tanto de completar a quantidade intubada, insuficiente (60), quanto de testar a "fome" dos animais (os D recusam a dieta sólida após certo tempo, sem contudo recusar os biscoitos normais, se oferecidos), assim como de manter sua atividade *roedora* e de adicionar fibras para melhor digestibilidade, evitando *constipação intestinal*, provavelmente causada pelo "stress" e pelo amido. No Exp. 1, somente à noite, era oferecida pequena quantidade de biscoitos S com essa finalidade. No Exp. 2, os biscoitos foram oferecidos à vontade devido ao número pequeno de tubagem diárias.

A dieta básica (Quadro I) para os grupos D-1 e D-2 é predominantemente constituída de amido, baseada em SIDRANSKY (73). A dieta N-2 é modificação da N-1, substituindo-se na composição, a caseína por leite desnatado (Molico). Isto foi feito pela extrema dificuldade na diluição da caseína (formação de grumos), razão pela qual a N-1 tem 10% de açúcar também para

QUADRO I

	EXPERIMENTO 1 (*)		EXPERIMENTO 2	
	Dieta (D-1)	Dieta (N-1)	Dieta (D-2)	Dieta (N-2)
Amido de milho	—	—	80,0	34,5
Amido de arroz	40,0	24,0	—	—
Amido de mandioca	40,0	24,0	—	—
Caseína	—	22,0	—	—
Molico (**)	—	—	—	53,0
Mistura de Vitaminas em sacarose (Quadro III)	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura de sais (Quadro III)	4,0	4,0	4,0	2,0
Óleo vegetal (Mazola)	8,0	8,0	6,0	5,5
Celulose	3,0	3,0	—	—
Sacarose (***)	5,0-20,0	10,0	5,0-20,0	—

(\*) Rações fornecidas pela General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio, USA, 44022. Biscoitos de composição semelhante, confeccionados pela mesma firma (biscoitos D-1 e N-1), poucos usados no Exp. 1.

(\*\*) Molico, leite desnatado da Nestlé: Gordura = 1 g%; Proteínas = 36,0 g%; Lactose = 52,0 g%; Sais  $\approx$  8,0 g%; Água = 3,0 g%.

(\*\*\*) A quantidade de açúcar de D-1 e D-2 era progressiva a partir de 5% até 20%, variando conforme o evoluir do experimento. Não foi adicionada a N-2, permanecendo em N-1 tanto para facilitar a diluição da caseína como para suporte calórico.

Obs.: 100 g da dieta geralmente necessitam de mais 80 ml de água para diluição satisfatória, ficando a mistura com cerca de 0,60 g de dieta por mililitro.

facilitar a dissolução. A mistura vitamínica também foi modificada adicionando-se vitamina E; a de sais foi a Hegsted-IV (Quadro III). A dieta do grupo *ad libitum* foi a ração comercial (P e MF).

O processo de desnutrição foi levado a termo por 41 dias no Exp. 1 sacrificando-se os animais aos 12, 23, 34 e 41 dias. No Exp. 2, o tempo de desnutrição foi prolongado para 88 dias, sendo os ratos sacrificados em 3 tempos iniciais (aos 34, 54 e 88 dias) poupando-se um último grupo que foi submetido a realimentação normal com a finalidade de verificar alterações para o lado do desenvolvimento. Este grupo foi sacrificado 136 dias após o início.

Os animais foram anestesiados com fluotano (Exp. 1) e éter (Exp. 2) depois de um jejum de 13 a 14 horas para os grupos D, N e ISO, e de 8 horas para os *ad libitum*.

Os animais foram decapitados para colher o sangue. Foi efetuada necropsia completa em todos. Os órgãos foram fixados imediatamente após a morte em solução de formol a 10%. O intestino foi fixado de maneira especial, sendo retirado do animal cortando-se o mesen-

tério em toda a sua inserção e aberto na solução fixadora. Após isso, foi estendido e fixado por alfinetes em cuba com fundo de parafina, com o fito de evitar as habituais distorções das vilosidades intestinais. Em metade dos casos, o intestino era delicadamente injetado *in situ* com fixador, logo retirado, procedendo-se como acima. Os seguintes segmentos foram examinados: duodeno, jejuno (a 20 cm do piloro), jejuno-íleo, íleo terminal, ceco, e colon transversal. No Exp. 1, pequenas porções de fígado, pâncreas e intestino foram retiradas no segundo e último dia de sacrifício e preservadas a  $-160^{\circ}\text{C}$  (com nitrogênio líquido e prévio banho em isopentano) para cortes em criostato, com a finalidade de submetê-las ao método de Oil Red O para gorduras. O material fixado em formalina foi incluído em parafina e submetido aos seguintes métodos de coloração: hematoxilina-eosina, Giemsa, Verde de Metila-Pironina, PAS e PAS-Alcian Blue.

Do soro obtido foram realizadas as seguintes dosagens bioquímicas: proteínas totais pelo método do biuret<sup>(23)</sup>; eletroforese das proteínas feitas em acetato de celulose (Cello-gel) em solução tampão de veronal

QUADRO II

BISCOITOS COMERCIAIS (Composição Fornecida pelo Fabricante)		BISCOITOS CONFECCIONADOS NO LABORATÓRIO				
P (*) Exp. 1 %	MF (**) Exp. 2 %	S (***) Exp. 1	Q (****) Exp. 2 %			
Proteína	23,0	Serragem de pinho	200 g	Quirera de milho	40,0	
Gordura	4,5	Proteína bruta (min.)	21,8	Amido	40,0	
Fibras	6,0	Extr. etéreo (min.)	3,5	Açúcar, Sol. sat. qs	Açúcar	20,0
Resíduo (carboidratos)	50,58	Matéria fibrosa (max.)	5,5			
		Matéria mineral (max.)	7,5			
		Cálcio (max.)	1,7			
		Fósforo (min.)	0,8			

(\*) Purina Lab Chow, Ralston Purina Co., St. Louis, Mo., USA.

(\*\*) Ração Comercial, Testevita, Moinho Fluminense, Rio, Est. R.J.

(\*\*\*) A serragem de pinho foi aquecida na solução saturada de sacarose e, ainda morna, misturada ao amido. A massa resultante levada à estufa a 50°C por 12 horas.

(\*\*\*\*) Os três ingredientes são amassados e levados à estufa por 24 horas a 60°C.

QUADRO III

MISTURA DE VITAMINAS EM SACAROSE Sidransky, 1960 (21) g/%		MISTURA DE SAIS – HEGSTED IV (Hegsted, D. M. et al., <i>J. Biol. Chem.</i> , 138: 459, 1941) – g/%	
Tiamina HCl	0,005	Carbonato de Cálcio	29,974
Riboflavina	0,01	Fosfato Dibásico de CA	7,493
Piridoxina HCl	0,005	Sulfato de Cobre	0,029
Pantotenato de Ca	0,04	Citrato de Ferro	2,747
Nicotinamida	0,02	Sulfato de Magnésio	10,191
Cloreto de Colina	2,0	Sulfato de Manganês	0,499
Biofina	0,0002	Iodeto de Potássio	0,079
Ácido Fólico	0,002	Fosfato Dibásico de K	32,222
Inositol	0,2	Cloreto de Sódio	16,735
Vitamina K	0,002		
Vitamina B12 (1% – triturada em manitol)	0,2		
Óleo de Fígado de Bacalhau (850/A; 85/D/g)	0,002		
Acetato de Vitamina E (seco: 250 U/g)	0,9691		
Sacarose	96,5446		

sódico (0,04 M pH 8,4 (8,24 g/l), tempo de corrida de 90 minutos e voltagem fixa de 200 volts. Os gráficos e leituras das frações foram feitos em aparelho Cello-matic<sup>(39)</sup>. A dosagem de colesterol foi feita pelo método de RAPPAPORT<sup>(88)</sup>. No Exp. 1 somente sete animais tiveram dosagens de proteínas séricas.

## RESULTADOS

A alteração mais visível foi o estacionamento da curva ponderal (Figs. 1 e 2). Como estas experiências começaram com a idade de 40 dias, as diferenças com relação ao comprimento dos animais são menores que as vistas nos seus pesos.

Com relação ao comportamento, há alterações primeiro decorrentes do isolamento individual; os ratos Isob-1 e Isoc-2 são obviamente vorazes, mas não mostram agressividade em relação ao investigador, nem rebeldia à tubagem; nos primeiros dias de tubagem, e quando há ferimento do orofaringe, a oposição à mesma é evidente; posteriormente há nítido condicionamento – e mesmo, aceitação – à tubagem. A rebeldia à manipulação pode produzir complicações decorrentes de regurgitação.

Inicialmente os animais do grupo D são agitados e instáveis, estabilizando-se com o correr da experiência e, após 2 a 3 semanas, tornam-se apáticos. Esta apatia existe também nos outros grupos porém menos acentuada. É muito bem verificada ao oferecimento da ração normal: após 30 a 40 dias os D recusam-na, configurando-se, pois, verdadeira anorexia, o que não acontece com os controles.

As alterações dos pêlos ocorrem após 30 dias. Inicialmente a pelagem é eriçada; posteriormente há perda de pêlos na região mentoniana e períneo, áreas em contínuo atrito com o chão da gaiola ou em contato com a urina e saliva (sialorréia é freqüente).

Estas alterações não foram observadas nos grupos controles (Isob, Isoc, Ad libitum). Rinite crônica, provavelmente relacionada com a tubagem, é um achado freqüente. Palidez é vista nos D após 2 a 3 semanas de dieta especial.

As alterações digestivas iniciam-se por constipação (primeiro decorrente do stress e do amido, depois por causa do amido e ou por falta de fibras) havendo fezes secas, deformadas e negras. Posteriormente, a ingestão de fibras (biscoitos S e Q) e a adição de açúcar modificam a consistência fecal.

Após 30 dias, mesmo sem adicionar mais do que 10% de açúcar, as fezes tornam-se pastosas. A diarreia franca só surge com maior quantidade de sacarose na dieta (nunca mais de 25% da dieta sem água). A diarreia melhora com a ração normal ou com a introdução de proteínas (dieta N-1 ou N-2).

A distensão gástrica pela tubagem deve ser um importante fator de "stress" podendo ser percebida no momento da tubagem. Esta é a razão de não ter sido administrada quantidade maior que 4 ml a animais com menos de 100 g.

As alterações macroscópicas dos animais desnutridos, além da diminuição de tamanho, se resumem em esteatose hepática (Fig. 3) e diminuição de panículo adiposo.

Em relação ao volume visceral, baço e timo mostram importante diminuição; no início da experiência há pequena redução do volume desses órgãos também

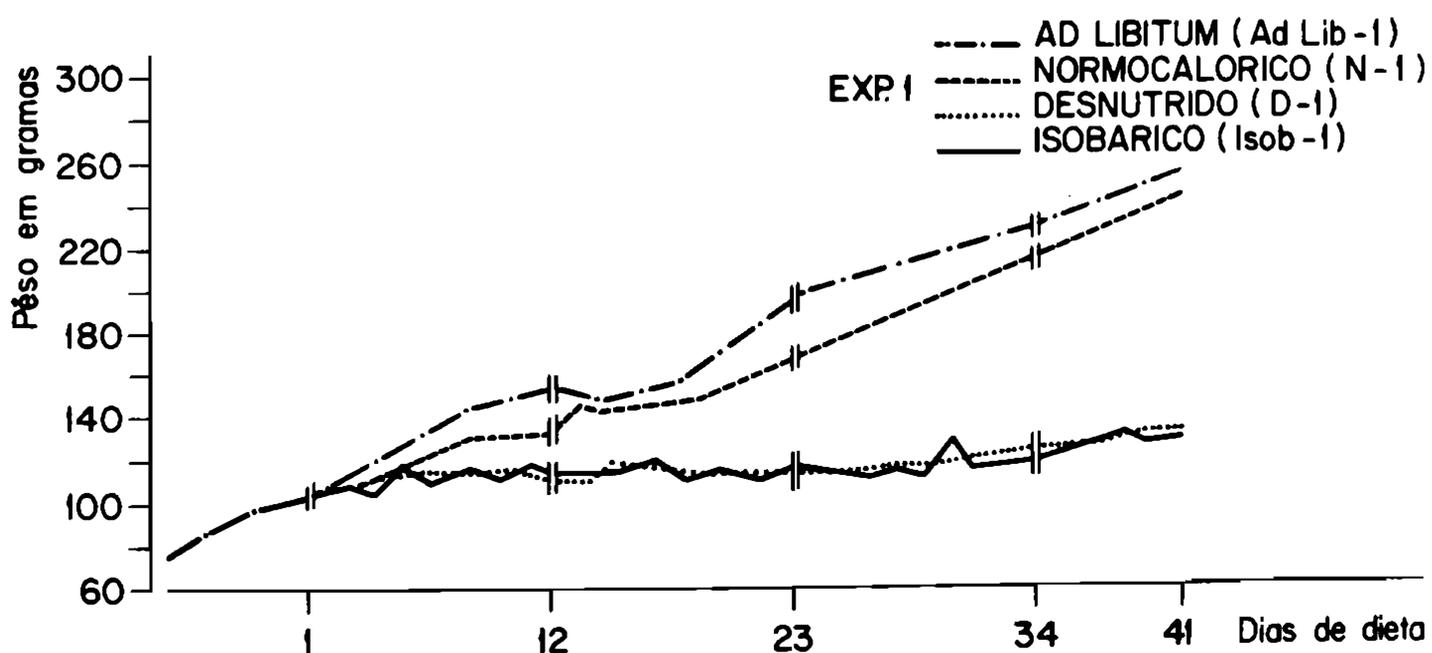


Fig. 1 – Curvas de peso do Exp. 1. Vê-se que os animais desnutridos, D-1, têm o peso estacionário aumentando ligeiramente, após os 30 dias, com o acréscimo de açúcar; com pequenas variações o grupo isobárico imita seu traçado. O normocalórico tem uma curva ligeiramente menor que o *ad libitum*; este apresenta uma depressão em torno dos 15 dias por ter sido manipulado para estudo de trânsito intestinal.

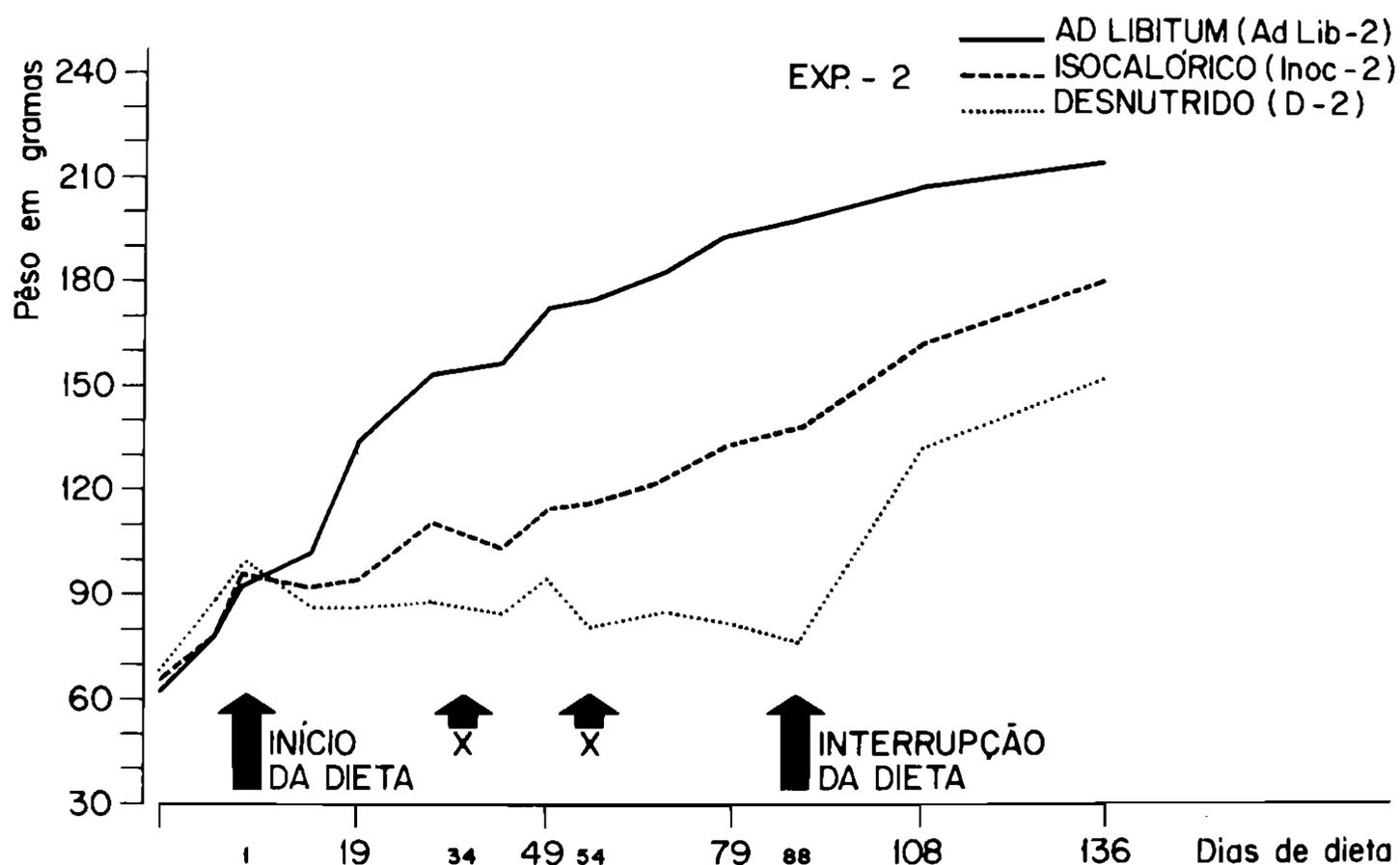


Fig. 2 – Curvas de peso do Exp. 2. Os traçados são semelhantes à primeira experiência, com a diferença de que o “isocalórico” ganha mais peso que o Isob-1 e menos que o N-1. Após a realimentação o grupo D-2 e Isoc-2 aumentam de peso, mas até 48 dias após ainda mantêm significativa diferença com o grupo Ad Lib-2.



Fig. 3 – À esquerda, rato do grupo D-1, com 103 gramas, mostrando esteatose hepática, dilatação gástrica (pela dieta) e dilatação intestinal. À direita, rato controle, com 218 gramas; observar a coloração mais escura do fígado.

nos controles intubados, razão pela qual o “stress” não deve deixar de ser incriminado. Posteriormente o “stress” deve ser cúmplice da deprivação protéica.

Pode-se resumir o aspecto histológico dizendo que o denominador comum na desnutrição é uma atrofia celular universal: massa citoplasmática reduzida, núcleo inicialmente tumefeito, posteriormente diminuído e hiper cromático.

Este achado foi observado em todos os órgãos em maior ou menor intensidade. Os epitélios de revestimento, entretanto, são que exibem mais nitidamente tal atrofia. Na pele, além da atrofia dermo-epidérmica, há redução ou mesmo ausência de anexos (Fig. 4). No pulmão a impressão é de que os septos alveolares são mais finos; nos controles as células são maiores, de citoplasma facilmente visualizável e núcleo de contorno regular e com substância cromática mais nítida. Observa-se pobreza de pneumócitos. O epitélio brônquico e bronquiolar mostram atrofia, chegando às vezes a perder a regularidade na polarização nuclear (Fig. 5). Os glomérulos renais exibem, da mesma forma, dificuldade na identificação de citoplasma, hiper cromatismo nuclear, dando a impressão de os núcleos estarem muito juntos uns dos outros.

Ao nível do sistema muscular cardíaco e esquelético, as alterações também são a diminuição do volume das fibras sem alterações qualitativas. No sistema nervoso central, predominam a vacuolização difusa da substância branca e tumefação astrocitária além do achado, sem predileção topográfica, de neurônios com citoplasma denso e homogêneo, núcleos reduzidos e

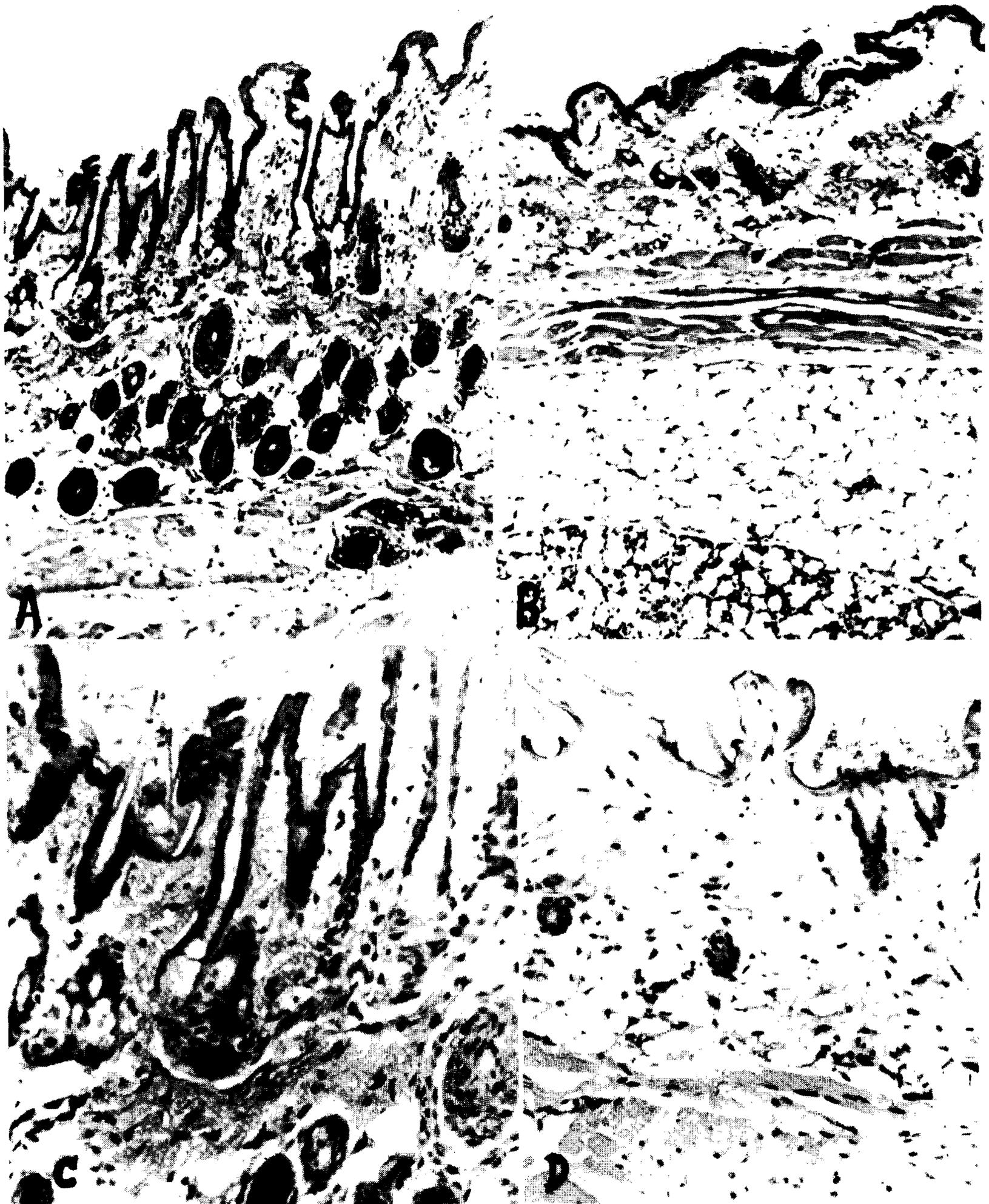


Fig. 4 – Em A e C, segmento de pele da região cervical de animal controle; em B e D, acentuada atrofia dermo-epidérmica e rarefação das estruturas anexiais. HE, 90 X e 180 X.

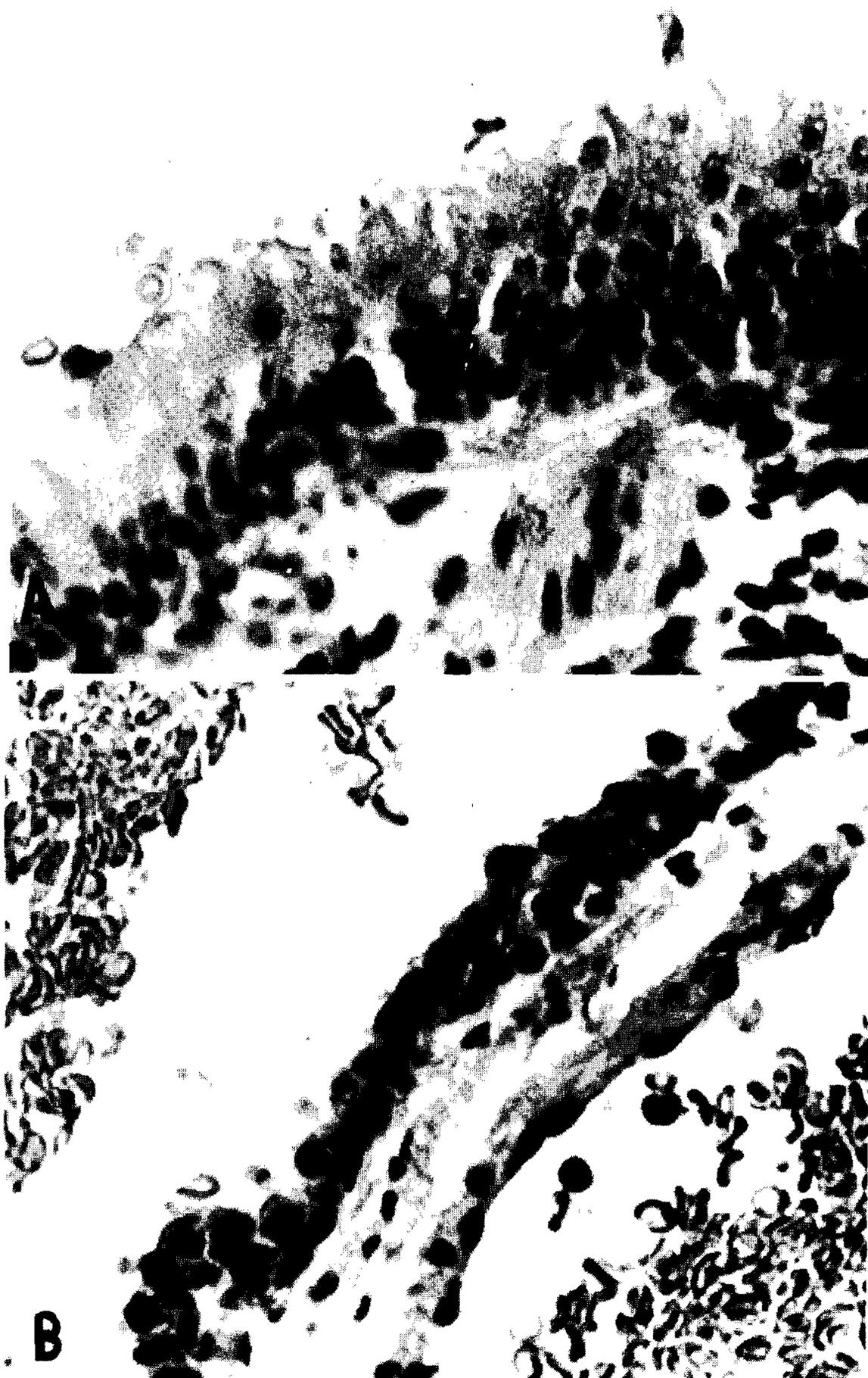


Fig. 5 – Em A, epitélio brônquico do animal controle, verificando-se células altas e a pseudo-estratificação bem representadas. Em B, pulmão de rato desnutrido do grupo D-1, fim dos 41 dias, notando-se intensa atrofia do epitélio brônquico com despolarização nuclear e escassez citoplasmática. HE; 460 X.



Fig. 6 – Em A, placa de Peyer ileal de rato controle; comparar com a atrofia folicular em animal do grupo D-1 (B); em C, timo de animal controle e em D, timo de rato do grupo D-1, exibindo atrofia; em E, baço de rato controle e, em F, baço de animal desnutrido, apresentando depleção linfóide, ao lado da diminuição de células hemopoéticas. HE; 45 x..

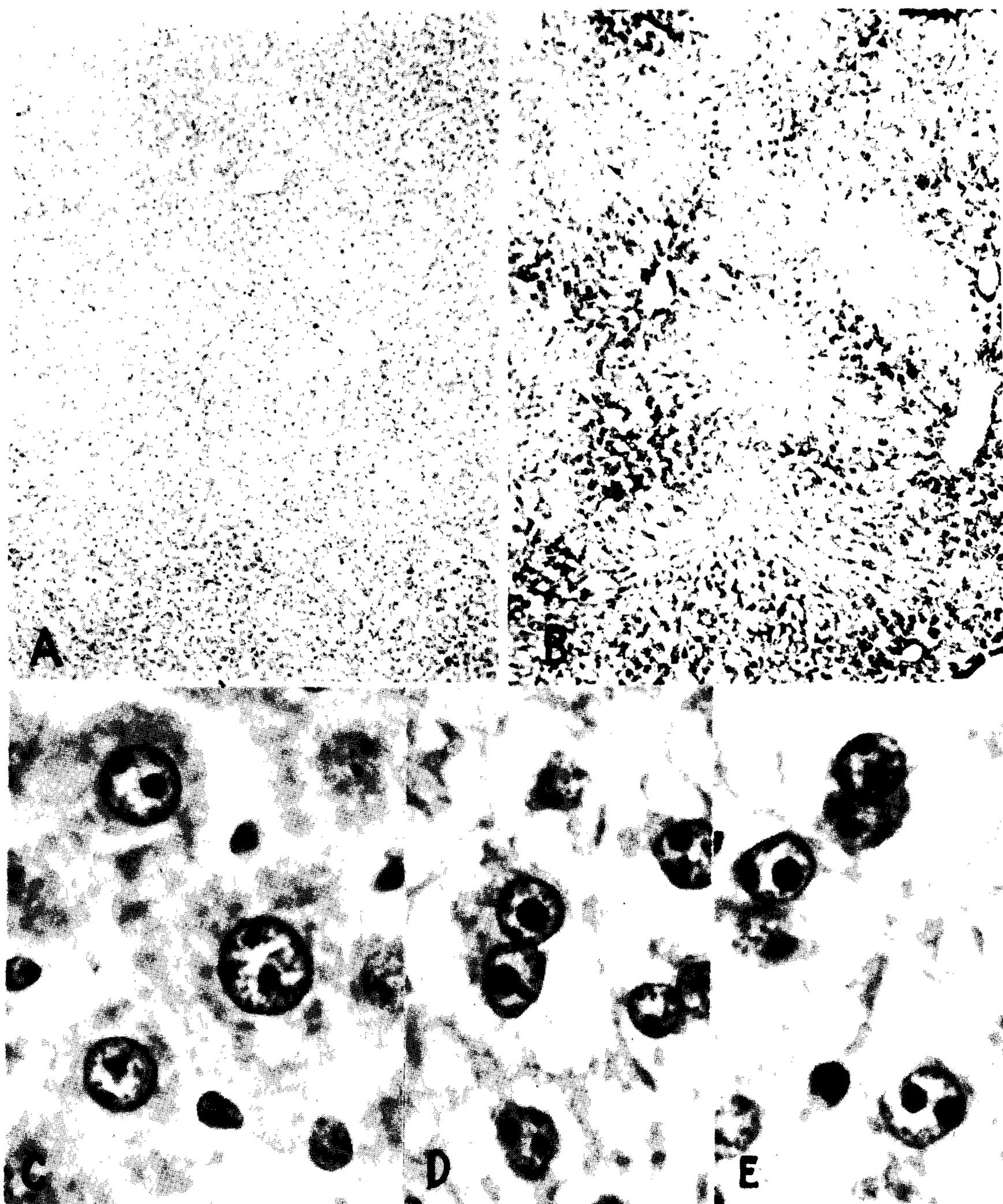


Fig. 7 — Em A e C, fígado de rato controle; em B, distribuição periportal da metamorfose gordurosa; em D e E, aspectos de vacuolização citoplasmática dos hepatócitos e hipertrofia nucleolar, com redução do diâmetro nuclear. HE e Oil Red O. 70 X e 1620 X.



Fig. 8 — Em A, pâncreas de rato controle; no ângulo inferior direito, detalhe da estrutura acinar. Em B, pâncreas de rato sacrificado após os 30 dias de dieta D-1, exibindo moderada atrofia, cujos detalhes estão assinalados no ângulo inferior direito. Em C, etapa posterior (41 dias) caracterizada por atrofia com desarranjo da arquitetura acinar e figuras de cariorrexe e picnose. HE; 180 X e 460 X.

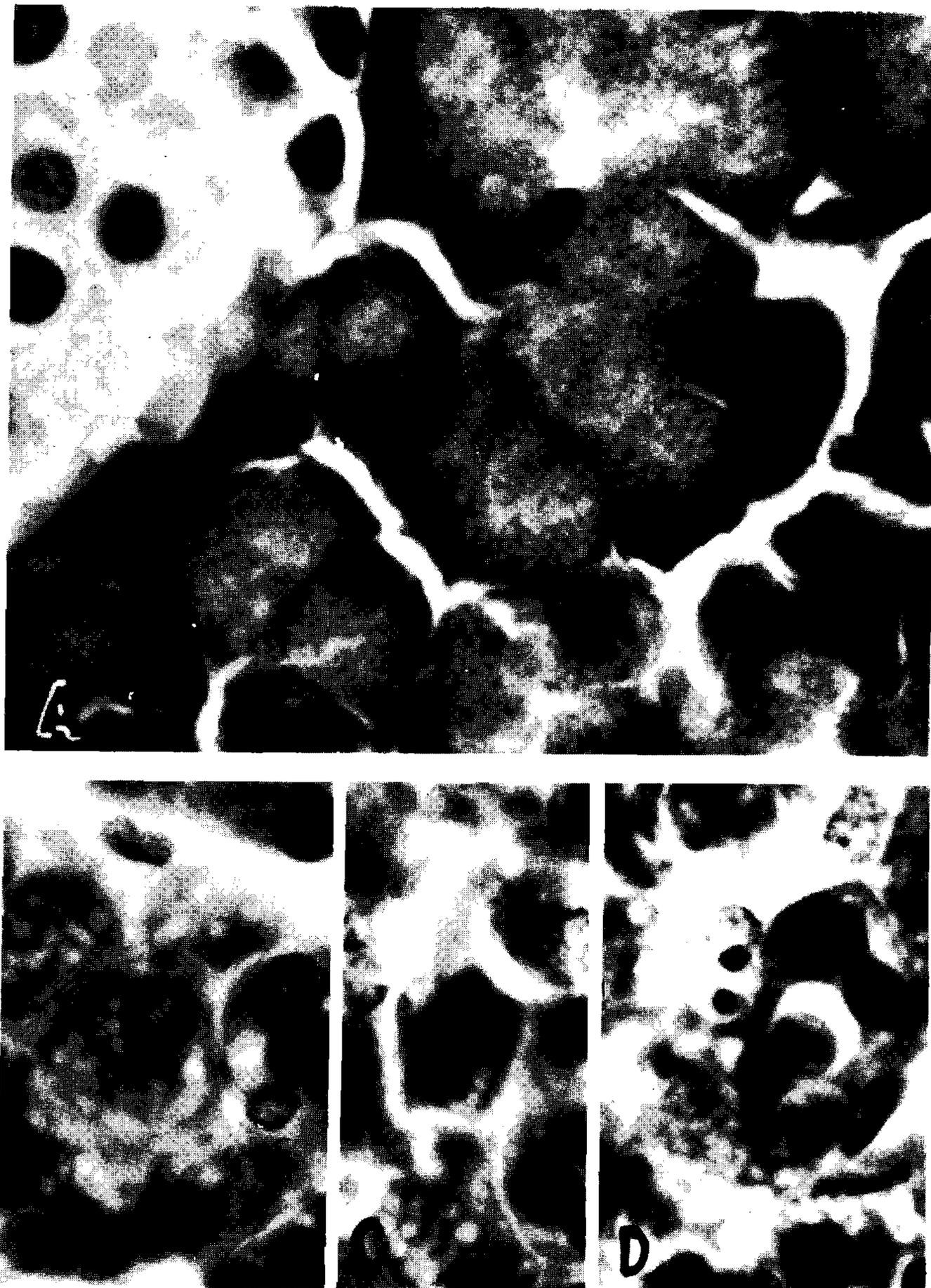


Fig. 9 – Em A, aspecto pormenorizado da estrutura acinosa de pâncreas de rato controle; em B, C e D, vários aspectos regressivos da célula acinosa: degeneração vacuolar, proeminência nucleolar, hiperchromasia nuclear, atrofia celular com picnose. HE; 1620 X.

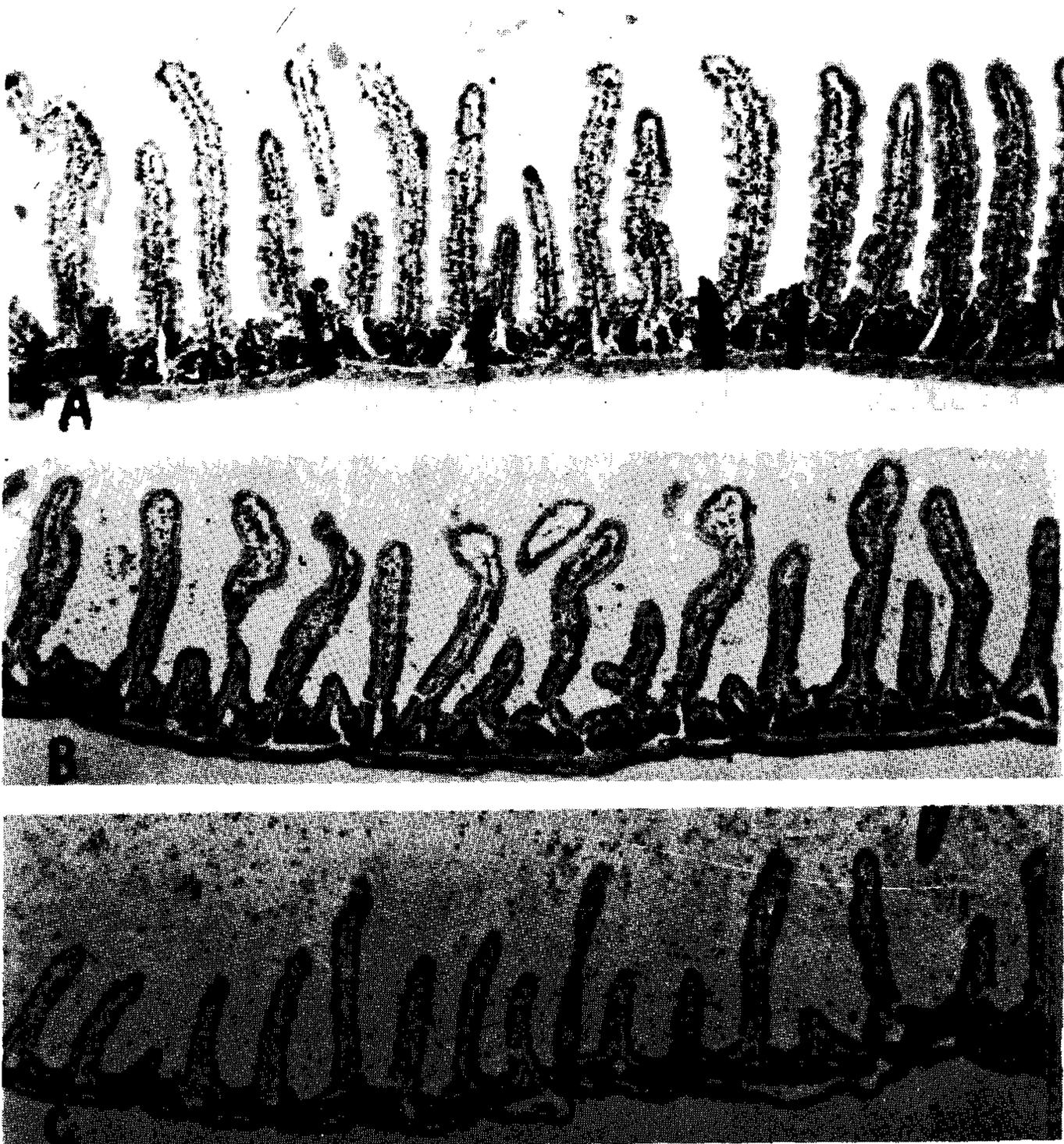


Fig. 10 – Em A, segmento jejunal de rato controle; em B, jejuno de rato com 30 dias de dieta D-1, diminuição da altura do epitélio e criptas; em C, jejuno de rato sacrificado após 41 dias dessa mesma dieta, com alterações mais acentuadas, incluindo a diminuição da altura da própria vilosidade. HE; 70 X.



Fig. 11 – Em A e C, jejuno de rato controle; em B e D, jejuno de rato do grupo D-1. As figuras ilustram detalhes das modificações assinaladas na figura anterior. HE; 180 X e 460 X.

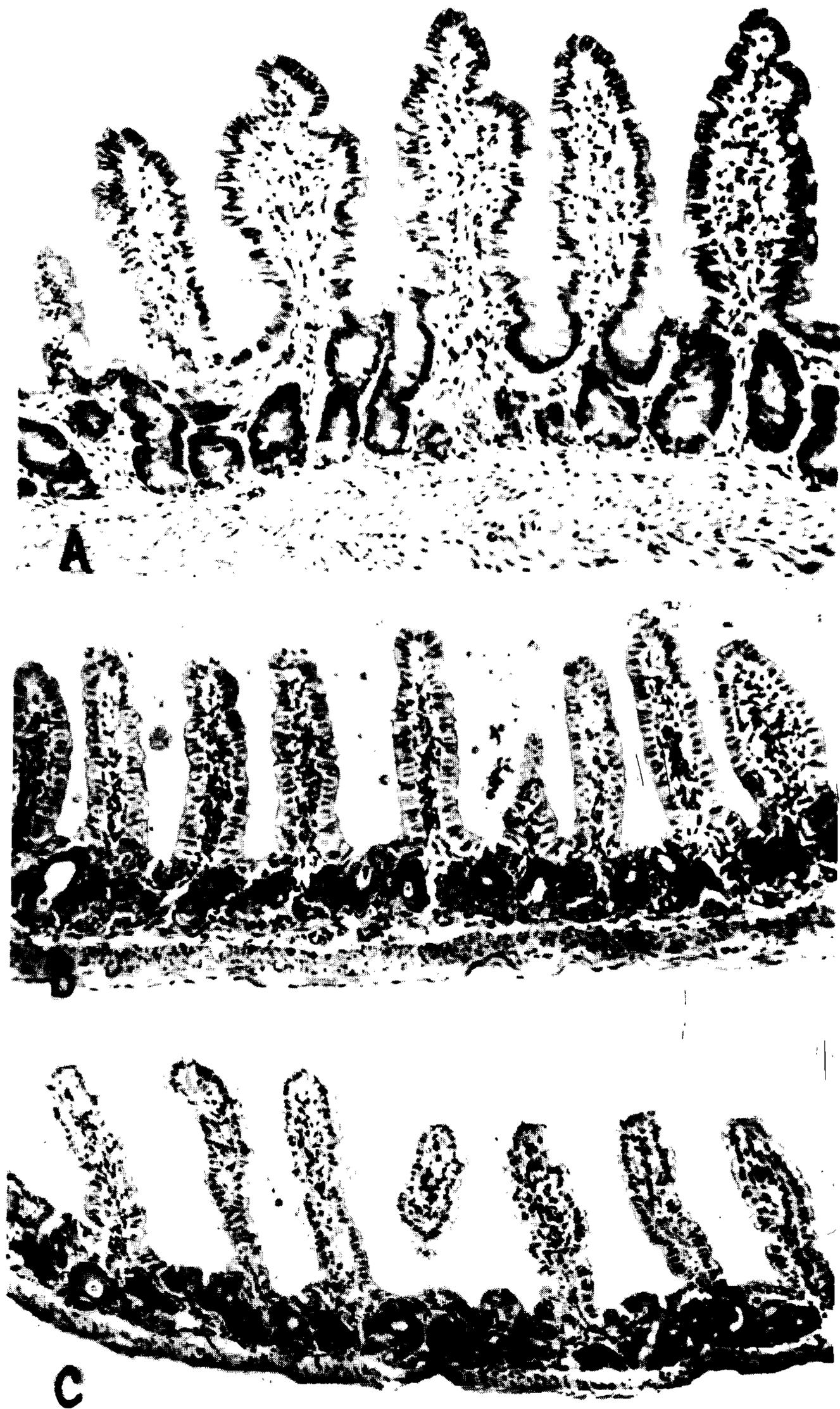


Fig. 12 – Em íleo de rato controle; em B e C, ratos do grupo D-1, no fim dos 41 dias de dieta, observando-se flagrante diminuição do número de células da lâmina própria, da altura do epitélio (C). A musculatura em B e C está reduzida em mais da metade de sua espessura habitual. HE; 180 X.

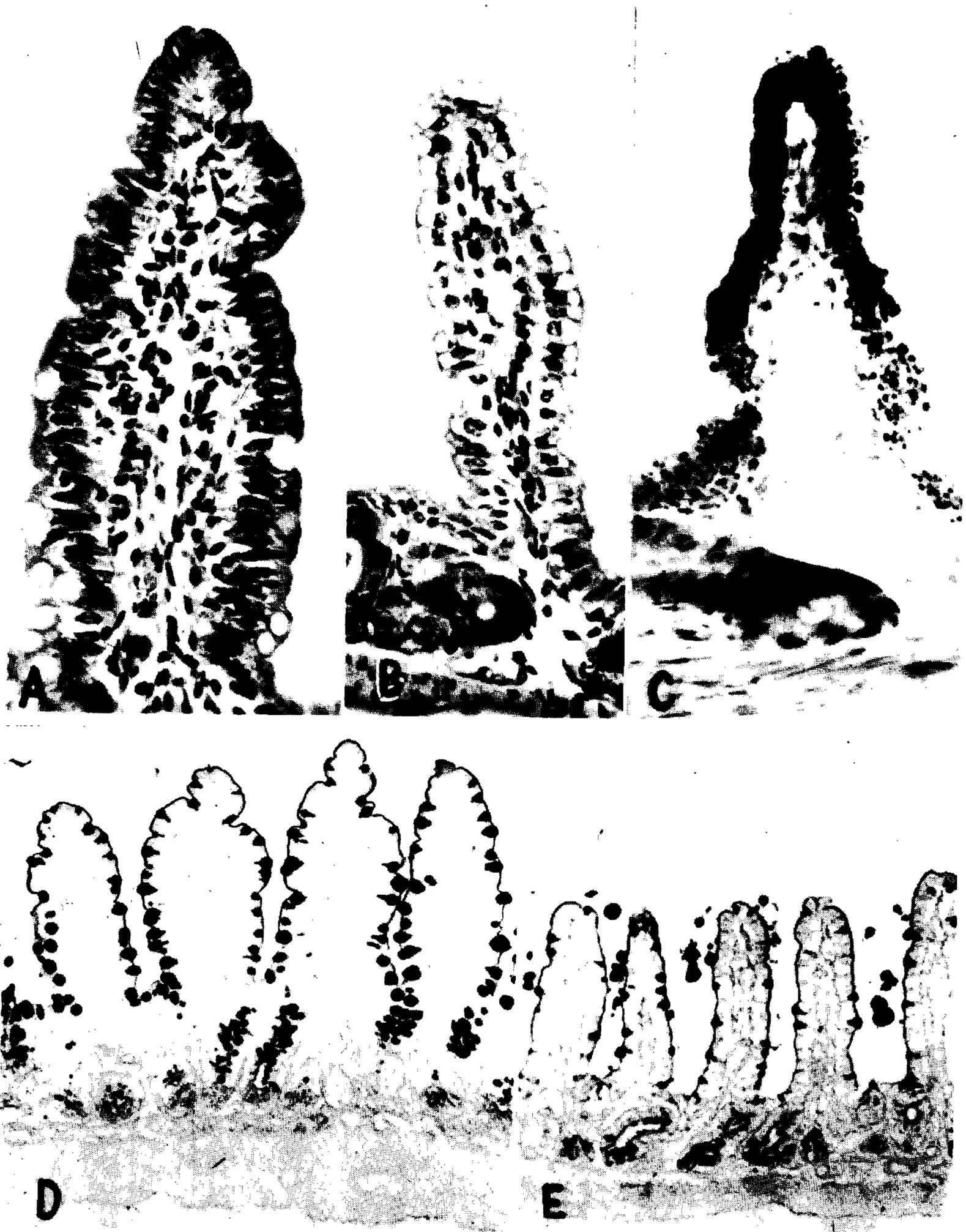


Fig. 13 — Em A, detalhe da estrutura da vilosidade ileal de rato controle; em B, vilosidade ileal de animal D-1 morto aos 41 dias, mostrando paucicelularidade da lâmina própria, diminuição da altura do epitélio e intensa vacuolização epitelial (não confundir com célula muco-secretora). Em C, o emprego de coloração especial revela a natureza lipídica da vacuolização epitelial. Em D, íleo de rato controle mostrando a exuberância de células muco-secretoras; em E, íleo de rato do grupo D-1 mostrando, no fim dos 41 dias, acentuada diminuição de células muco-secretoras. HE; Oil O; Alcian Blue-Pas. 460 X e 180 X.

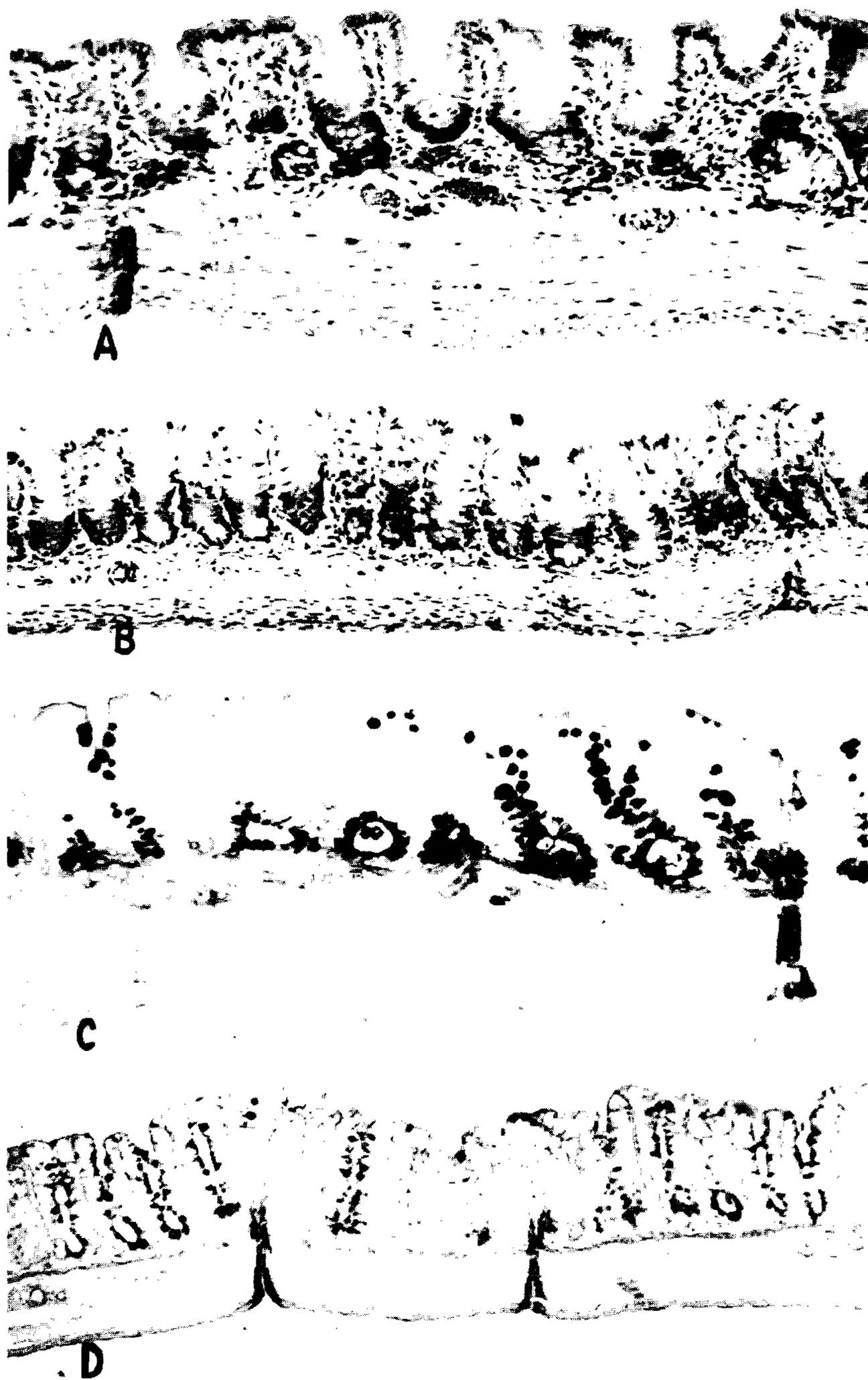


Fig. 14 — Em A e C, ceco de rato controle; em B e D, ceco de rato do grupo D-1, exibindo redução de todas as suas túnicas, e depleção de células muco-secretoras. HE; Alcian Blue-Pas. 180 C.

QUADRO IV  
Eletroforese de Proteínas (% de Frações)

TIPOS	N.º DE RATOS	ALBUMINA % $\pm \sigma$	GLOBULINAS				
			Alfa 1 $\pm \sigma$	Alfa 2 $\pm \sigma$	Beta $\pm \sigma$	Gama $\pm \sigma$	Alb./Glob.
D-2	12	28,5 $\pm$ 6,5	16,5 $\pm$ 5,5	13,5 $\pm$ 3,5	21,5 $\pm$ 6,5	20,0 $\pm$ 5,5	0,39
Isoc-2 e Ad Lib-2	20	50,2 $\pm$ 8,5	9,8 $\pm$ 2,8	7,0 $\pm$ 4,0	16,0 $\pm$ 5,3	17,0 $\pm$ 6,3	1,00

$\sigma$  = Desvio Padrão.

QUADRO V  
Proteínas Totais e Frações (g%)  
Colesterol (mg%)

TIPOS	N.º DE RATOS	P. TOTAIS g% $\pm \sigma$	ALBUMINA g% $\pm \sigma$	GLOBULINAS				COLESTEROL mg% $\pm \sigma$
				Alfa <sub>1</sub> g% $\pm \sigma$	Alfa <sub>2</sub> g% $\pm \sigma$	Beta g% $\pm \sigma$	Gama g% $\pm \sigma$	
D-2	12	4,88 $\pm$ 0,44	1,37 $\pm$ 0,20	0,83 $\pm$ 0,30	0,67 $\pm$ 0,10	1,08 $\pm$ 0,40	0,93 $\pm$ 0,30	68,0 $\pm$ 18,5
Isoc-2 e Ad Lib-2	20	6,82 $\pm$ 0,50	3,47 $\pm$ 0,70	0,65 $\pm$ 0,20	0,45 $\pm$ 0,27	1,10 $\pm$ 0,32	1,15 $\pm$ 0,45	99,5 $\pm$ 20,4
Teste "t" (Student)		P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,05

$\sigma$  = Desvio Padrão.

hipercromáticos. Todos estes achados foram verificados sem estudo quantitativo e sem tratamento especial. Foram porém, mais ou menos constantes em todos os animais dos grupos D, após o primeiro mês de dieta, e ausentes nos controles.

Histologicamente o sistema linfóide mostra pequena depleção no início da experiência em todos os grupos intubados e nítida despovoação linfocitária somente nos do grupo D após 20 a 30 dias de dieta. Os folículos linfóides são mal definidos no baço, placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos, sendo o limite corticomedular tímico difícil de visualizar; a figura 6 mostra bem essas alterações.

A esteatose hepática é do tipo perilobular, às vezes ocupando quase todo o lóbulo (Fig. 7). O Exp. 1 parece ter deixado evidente que a intensidade da degeneração gordurosa depende da maior quantidade de açúcar na dieta, tendo tal lesão sido demonstrada também no pâncreas e intestino delgado (<sup>53</sup>). Não raro a gordura pode destruir as células e apresentar os chamados cistos de HARTROFT (<sup>36, 37</sup>). Os hepatócitos mostram também alterações nucleares; no início são mais pálidos e tumefeitos; os nucléolos, às vezes únicos, são avolumados; posteriormente há hipercromatismo, mas ainda se podem ver grandes e pálidos nucléolos (Fig. 7).

O pâncreas de rato normal é abundante em grânulos de zimogênio. No desnutrido há enorme depleção destes grânulos, além de desarranjo acinar ou mesmo alterações degenerativas como vacuolização citoplasmática (gordura) (<sup>53</sup>) ou mesmo de morte celular (Figs. 8 e 9). Estas alterações são tanto mais intensas quanto maior é o tempo de desnutrição e a adição de açúcar. Não foram observadas alterações das ilhotas de Langerhans que difiram da diminuição do volume citoplasmático e pequena hipercromasia nuclear. Nos grupos Isob e Isoc, foi verificada discreta depleção zimogênica focal em alguns animais.

Com relação aos intestinos além da diminuição do comprimento da vilosidade e da atrofia epitelial, verifica-se grande diminuição das células da lâmina, melhor vista no íleo, conferindo ao animal desnutrido um intestino semelhante ao dos animais "germ-free" (<sup>1</sup>) (Figs. 10, 11, 12 e 13).

As alterações do epitélio — aqui é onde melhor se nota a atrofia citoplasmática — são a diminuição da altura celular, citoplasma às vezes denso, núcleo que de alongado passa a ovóide ou arredondado, com contornos irregulares e hipercromatismo (Fig. 11). No PAS nota-se diminuição de espessura e irregularidade da bordadura estriada. Às vezes as células do topo vilositário são francamente cubóides; não raramente notam-se mitoses quase a essa altura. Saliente-se que as alterações atróficas não se restringem ao epitélio, e sim, que toda a parede sofre semelhante processo, muito bem visto pela delgadeza das capas musculares. No íleo terminal e intestino grosso observa-se acentuada diminuição em número e tamanho das células mucíparas

tanto na superfície como ao nível das criptas (Figs. 13 e 14). O muco que cobre a mucosa ao nível da luz é igualmente reduzido.

Os controles (Isob, Isoc e Ad libitum) assim como os D sacrificados aos 136 dias, após 48 dias, após 48 dias em realimentação normal, não apresentam alterações histológicas. Este último grupo somente mostra atraso estado ponderal (Fig. 2).

O estudo bioquímico de sete animais do Exp. 1, foi confirmado pelo maior número de animais estudados no Exp. 2. Neste, o soro de 12 desnutridos e 20 controles (Isoc e Ad libitum) foi examinado. Encontrou-se uma proteína total média baixa para os D ( $4,88 \pm 0,44$  g%) e nos níveis normais ( $6,82 \pm 0,50$  g%) para os controles (Quadros IV e V, Fig. 15).

O perfil eletroforético dos dois grupos revela uma acentuada diminuição da percentagem de albumina entre os desnutridos,  $28,5 \pm 6,5\%$ , para uma percentagem de  $50,2 \pm 8,5\%$  nos controles. As globulinas acham-se aumentadas no grupo D-2. Foram obtidas pela eletroforese cinco frações, embora alguns autores citam somente quatro (<sup>67</sup>).

No número de amostras ensaiadas, embora pequeno, aplicando-se o teste de STUDENT (<sup>79</sup>) a gamaglobulina foi a fração que apresentou diferença menor entre os dois grupos. Quando aplicado aos valores absolutos das frações, não só a gama, mas também a betaglobulina não apresenta diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), enquanto que as proteínas totais, albumina e globulinas alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub>, mostram-se significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A relação Albumina/Globulina apresentou-se alterada nos ensaios realizados, havendo inversão entre os desnutridos ( $A/G = 0,39$ ).

O colesterol foi menor entre os D ( $p < 0,05$ ). Encontrou-se um colesterol médio de  $68,0 \pm 18,5$  mg% para estes, enquanto que para os controles, um valor médio de  $99,5 \pm 20,4$  mg% (<sup>35</sup>) (Quadro V e Fig. 15).

## DISCUSSÃO

Combinando duas formas de dieta hipoprotéica, uma líquida, intubada, e outra sólida, tentou-se reproduzir em ratos jovens as lesões e algumas alterações bioquímicas encontradas na desnutrição infantil.

As curvas de peso verificadas, são flagrantes em mostrar o estacionamento ponderal. Quanto ao tamanho dos mesmos, não houve diferenças tão exageradas como em relação ao peso, provavelmente porque os animais já tinham alcançado, com 100 gramas, um comprimento que daí em diante não aumentaria tanto se comparado com o que acontece nos primeiros trinta

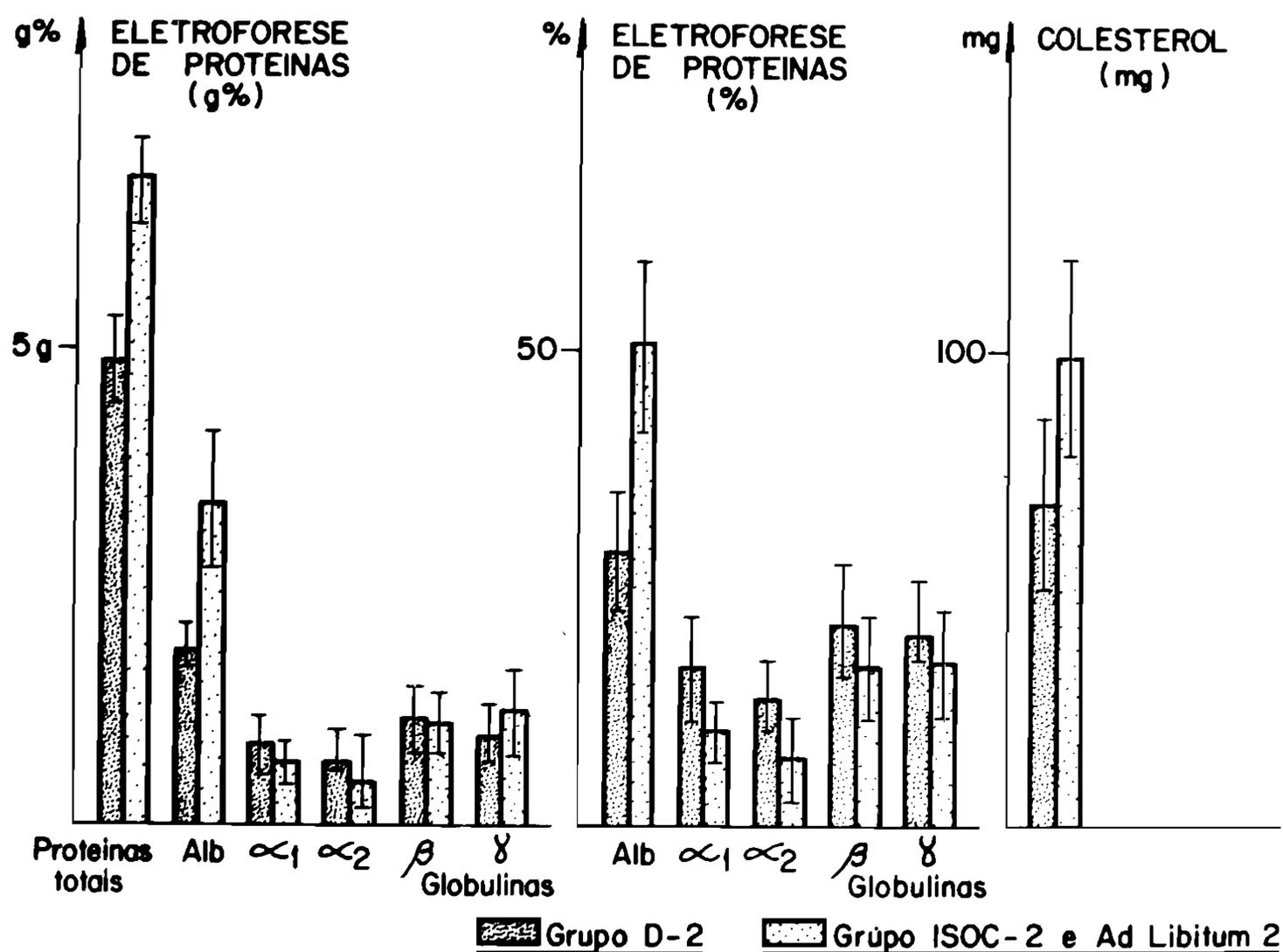


Fig. 15 – Gráficos demonstrando baixa das proteínas totais do soro, principalmente às custas da fração albumina e pequenas variações nas  $\beta$ -globulinas. A dosagem do colesterol sérico também mostra baixa nos desnutridos.

dias de vida. O atraso no desenvolvimento pode, no entanto, ser comprovado indiretamente pelo peso (<sup>3</sup>).

O emprego da dieta por intubação esofágica tem por função contornar os problemas relativos ao “apetite” do roedor. Em trabalhos preliminares, usando-se o modelo clássico de desnutrição experimental, isto é, oferecendo-se a ração *ad libitum*, empregando-se controles “isocalóricos (“pair feeding”)), poucas lesões foram encontradas, sendo às vezes inexistentes, resumindo-se em alterações de tamanho, discretas, ou emagrecimento. Os relatos da literatura usando esse processo, também são pobres em dados morfológicos (<sup>81</sup>, <sup>84</sup>). Nesse tipo de experiência os animais recusam a dieta colocada na gaiola e morrem precocemente, raramente apresentando lesões pancreáticas ou intestinais atribuíveis à deficiência protéica.

SPECTOR (<sup>78</sup>), citando MITCHELL, diz: se um animal em equilíbrio alimentar (um animal bem nutrido) é submetido a um “stress” nutricional, como o suprimento inadequado ou

excessivo de um ou mais nutrientes essenciais, este animal reagirá de modo a minimizar, até onde puder, ou a desfazer inteiramente os efeitos desse “stress” nutricional. E, uma das primeiras e mais comuns adaptações de que o animal lança mão, não importando qual o tipo de deficiência, é reduzir a ingestão. Experiências, acentua SPECTOR, com a pretensão de estudar o efeito específico e o papel de um determinado nutriente, devem evitar as complicações inerentes à redução total de nutrientes, que só irá acontecer quando o animal recusar a ração. O uso do “forced feeding” bloqueia esse mecanismo de adaptação e evita a inanição. STEAD e BROCK (<sup>81</sup>) tentaram evitar esse mecanismo de adaptação utilizando animais numa fase em que o mesmo ainda não se formou.

Ao nos basearmos no trabalho de SIDRANSKY (<sup>73</sup>), que usou uma dieta muito semelhante à das crianças com kwashiorkor, mas suplementada com sais minerais, vitaminas e gordura, alargamos o período de experimentação para 20, 40 e depois para 88 dias. Sidransky descreve

deficiência aguda de proteínas: a desnutrição infantil é de caráter crônico, por mais que a síndrome de kwashiorkor possa aparecer em prazo relativamente curto, provocada por infecção ou diarreia (8, 12).

Esse método, por outro lado, traz alguns inconvenientes: a boca, os dentes, as glândulas salivares ficam marginalizados; o rato é frequentemente surpreendido roendo o arame das gaiolas; a dieta tem que ser em resíduos ou grumos para escoar pela agulha ou sonda, que deve ser muito fina para os ratos jovens; e, principalmente, é introduzido na experiência o "stress" produzido pela tubagem. Às vezes ao chegar a hora da tubagem, com a entrada do investigador na sala, os animais agitam-se e salivam com abundância. As glândulas salivares não são aqui apresentadas, por julgarmos que foram influenciadas pelo desuso. Provavelmente a quantidade de alimento intubado não se equipara à ração normal ingerida pelo rato *ad libitum*. O fato de os animais roerem o arame da gaiola deveria ser interpretado também como fome. Por esta razão introduziu-se no modelo o oferecimento de biscoitos com a mesma constituição da dieta intubada (biscoitos D-1 e N-1). No entanto os animais recusavam-nos, por serem deficientes ou não apropriados ao seu "paladar". Os biscoitos de serragem ou quirera de milho com amido e açúcar em parte sanaram esse defeito do método, pois enquanto a atitude do animal era de recusa, sua ingestão era satisfatória nos primeiros 10-15 dias, havendo rejeição dos mesmos após esse período — aceitando, entretanto, os biscoitos normais (N-1, P ou MF). Posteriormente (em torno de 30 dias), quando se instalava verdadeira anorexia, até estes últimos eram parcialmente recusados.

Outra razão que nos levou a confeccionar com serragem ou milho tais biscoitos, foi a constipação crônica que os animais de nossas experiências prévias costumavam apresentar. Inicialmente, a constipação intestinal parece estar ligada ao "stress" e à dieta (34) mas, posteriormente, com a adaptação, é quase que somente a dieta a responsável. Rica em amido e pobre em resíduos, é obviamente uma comida obstipante.

Com os biscoitos S e Q as fezes aumentam de tamanho, são mais regulares em forma e número, de menor consistência e ligeiramente úmidas, isto é, cíbalos normais (com pequena diferença para o grupo D, que não apresenta revestimento dos cíbalos por muco). No 13.º dia do Exp. 1, com jejum prévio, efetuamos o estudo de trânsito gastrintestinal por meio de um corante dado por intubação pela manhã. Os resultados não foram conclusivos, pois foi usada uma solução diferente da dieta, tendo o grupo Ad Lib-1 de ser intubado, ocasionando-se-lhe assim, um "stress" a que não estava submetido. Apesar deste teste estar prejudicado, houve evidência de atraso do trânsito intestinal em todos os grupos. A osmolaridade das soluções das dietas D e N foi medida e estava ligeiramente maior que a do plasma, isto é, facilmente ajustável pelo intestino.

Com relação aos controles, algumas diferenças entre o Exp. 1 e o Exp. 2 devem ser esclarecidas. No Exp. 1 foi utilizado o controle isobárico (Isob-1) para substituir o clássico isocalórico, pois com o oferecimento da ração sólida à noite, torna-se difícil medir a quantidade de alimento ingerido. No Exp. 1, além deste grupo, foi usado um controle normocalórico (N-1) com a intenção de verificar os efeitos produzidos pelo "stress" da tubagem, controle este abandonado no Exp. 2. Neste, o Isoc-2 corresponde aos animais intubados com dieta normal em proteína e suplementada com ração comercial (MF) em quantidade semelhante à ingerida pelos D-2. Na Fig. 1, vê-se que o grupo N-1 tem um peso ligeiramente menor que o grupo *ad libitum* e, na Fig. 2, verifica-se que apesar de caloricamente deficientes, os Isoc-2, têm peso maior que os D-2.

Em nossa experiência os controles isobárico e "isocalórico" têm funcionado a contento, são relativamente resistentes e não apresentam lesões semelhantes às dos animais desnutridos.

O contato manual sistemático após a tubagem foi usado para "acalmar" o rato após a mesma. Este processo parece surtir resultado. Com base em prévias experiências, conseguimos que os animais desnutridos se tornassem menos sensíveis à dilatação gástrica, demonstrando menor agitação após a tubagem.

O acréscimo gradativo da sacarose ao longo da experiência teve a finalidade de utilizar um dos mecanismos conhecidos como desencadeantes de kwashiorkor, isto é, uma dieta pobre em proteínas mas *relativamente alta* em hidratos de carbono (38, 41, 52, 60, 70, 92, 93). Há referências de que as crianças com kwashiorkor têm certa intolerância aos açúcares, relacionada com deficiências das dissacaridases, provavelmente conseqüentes às alterações do epitélio intestinal (5, 13, 62). Outros autores (53, 63), em experimentação animal, não encontraram alterações das dissacaridases em ratos desnutridos. Contudo, o padrão lesional da mucosa obtido nesses trabalhos é muito discreto quando comparado ao encontrado em patologia humana.

O aparecimento do kwashiorkor está ligado a eventos importantes como a diarreia, que pode muito bem relacionar-se com a intolerância aos açúcares, bem como a infecções intestinais. Apesar de os trabalhos experimentais em ratos não evidenciarem deficiência das dissacaridases, o exagero de açúcar na dieta leva os animais à diarreia. Nas experiências apresentadas aqui houve discretos episódios diarreicos, curados com diminuição de açúcar e dos biscoitos S ou Q, ou com a administração de dieta normoprotéica.

A dieta usada teve a intenção de ser exclusivamente deficiente em proteínas, contendo sais minerais e vitaminas em quantidades adequadas assim como óleo vegetal, diferindo um pouco das dietas das crianças desnutridas que são também hipograxas. Além disso tais crianças apresentam deficiências vitamínicas associadas, mas que não desejamos acrescentar ao modelo, restringindo-nos à deficiência protéica. Tivemos em vista os problemas que poderiam advir das alterações de equilíbrio osmótico, da motilidade gastrintestinal e de sua flora (61) conseqüentes a uma dieta anormal, assim como não desconhecemos certas inter-relações existentes entre o metabolismo protéico e o aproveitamento ou síntese de certas vitaminas (11, 68). Nas experiências aqui apresentadas não constatamos sinais de deficiências vitamínicas, embora não fossem dosados os níveis de vitaminas no soro.

Ao compararmos nossos resultados com o que a literatura refere de danos estruturais na

desnutrição protéica (5, 6, 7, 16, 17, 18, 28, 31, 57, 70, 85, 89, 91, 92, 95), mesmo desprezenciosamente poderíamos apontar achados coincidentes. Assim, em linhas gerais, sem nos atermos a detalhes de patogenia, apontaríamos as alterações de pele e fâneros, a metamorfose gordurosa de fígado, a atrofia pancreática, as modificações da mucosa intestinal e a atrofia linfóide, como pontos básicos de aproximação entre os achados experimentais e a patologia humana.

As alterações cutâneas na desnutrição protéica têm sido vinculadas às deficiências associativas, particularmente às vitamínicas ou à deficiência de magnésio e outros minerais (70, 89). Os trabalhos de SULLIVAN e cols. (82), associando deficiências vitamínicas e minerais, não esclarecem o mecanismo das lesões dérmicas encontradas na desnutrição protéica; por outro lado, a reprodução de lesões de pele em experiências com deficiência de proteína é pobre em relatos (26, 27). Por esta razão, achamos que nosso modelo contribui com mais uma alteração, pelo menos nesta espécie animal, na tentativa de aproximação com a doença humana.

Como seria de esperar, ao lado da atrofia dérmica foi encontrada, de maneira conspícua, escassez de panículo adiposo e do volume muscular, configurando a atrofia de fibra descrita em macacos (14).

As lesões encontradas ao nível do fígado foram progressivas, proporcionais ao tempo de experiência, isto é, à intensidade da carência e provavelmente ao aumento de carboidrato na dieta. Isto se explica pela constatação de esteatose perilobular no grupo sacrificado aos doze dias no Exp. 1 e pelo comportamento total do lóbulo visto após 1 mês ou mais de tratamento. Em nossas experiências prévias, quando sacrificamos animais com dois a três dias de dieta especial, a alteração inicial era tumefação dos hepatócitos da periferia lobular, com redução do componente basofílico citoplasmático (RNA). Posteriormente, pequenas gotículas de gordura aparecem, progredindo para vacúolos maiores constituindo, em alguns casos, cistos de Hartroft. Grande quantidade de glicogênio pode ser demonstrada pelo PAS nas células onde a gordura ainda não ocupou completamente o citoplasma, ou em áreas do lóbulo hepático

ainda relativamente preservadas. A par dos fenômenos degenerativos assinalados, constituem um achado importante as alterações morfotintoriais dos hepatócitos representadas pela exuberância nucleolar, sobretudo nos estágios iniciais, sugerindo alterações da síntese protéica, como esboço de regeneração, muito embora as figuras de mitose fossem em menor número, ao compararmos com os controles. Não nos preocupamos nestes trabalhos, em determinar o índice mitótico; entretanto, a literatura refere um atraso na divisão celular em deficiência protéica (20); UMAÑA defende a idéia de que a deficiência protéica produz um aumento na proporção de poliploidia nuclear no fígado, como um reflexo do aumento do conteúdo médio de DNA por núcleo. A poliploidia precoce parece representar parte de um mecanismo na adaptação, e não apenas um efeito secundário da deficiência de aminoácidos (87).

A degeneração gordurosa do fígado tem sido atribuída, no kwashiorkor, à deficiência protéica, embora não se saiba o "quantum" de lesão hepática que pode ser atribuído a essa deficiência isoladamente, admitindo-se que certas vitaminas e fatores lipotrópicos também ficariam sem efeito com a baixa protéica, isto é, não seriam aproveitados (65). Trabalhos mais recentes indicam que o acúmulo de triglicerídios no fígado seria conseqüente à falta de proteína de transporte (12, 49), constatando-se baixa de triglicerídios, fosfolipídios e colesterol séricos. Em nossos animais somente foi dosado o colesterol, sempre baixo nos desnutridos. Talvez o glicogênio observado em excesso ao nível do fígado, não seja mobilizado pela diminuição de glicose-6-fosfatase (22, 53, 64, 76), sendo transformado em gordura.

Em linhas gerais, em que pese a observância dos fenômenos degenerativos caracterizados primordialmente pela esteatose, o quadro regenerativo foi sempre abortivo, e está em consonância com os trabalhos de SIDRANSKY e FARBER (74). A preferência topográfica da metamorfose gordurosa pelas porções peripor-tais tem sido referida na deficiência protéica global e em deficiências isoladas de determinados aminoácidos (2, 73, 74).

Os demais participantes da arquitetura hepática não exibem alterações dignas de nota, exceção feita à diminuição do número de células de Kupffer.

Nas lesões pancreáticas, o padrão progressivo dos fenômenos degenerativos assumiu uma feição peculiar, permitindo a análise de sua evolução. Nos estágios iniciais observou-se uma degranulação dos ácinos; posteriormente se fizeram presentes, em variável espectro, as alterações características do processo degenerativo, isto é, a vacuolização citoplasmática fina (positiva para gordura), a cariorrexe e picnose. Em torno de 30-40 dias não foram incomuns os achados de retração e desnutrição acinar. No pâncreas, tal como no fígado, as células nobres exibiram nos estágios iniciais, núcleos vesiculosos, de maior diâmetro, e nucléolos proeminentes. As alterações pancreáticas têm sido consideradas como essenciais no quadro geral da desnutrição (18), mesmo porque é um órgão onde a avaliação da depleção protéica é flagrante: os grânulos de zimogênio constituem estruturas primordialmente protéicas. A atrofia pancreática, ao lado das alterações hepáticas, constitui o mais importante critério na caracterização histológica de um modelo experimental de deficiência protéica.

Nosso interesse centralizou-se ao nível do trato intestinal, sobretudo pela escassez de referências bibliográficas em relação à espécie animal aqui utilizada. As citações de que temos conhecimento referem as alterações intestinais isoladamente, não relatando modificações hepatopancreáticas (40) ou, como TAKANO (84), descrevendo experiências sem lesão ao nível do fígado e pâncreas, e graves lesões intestinais que interpretamos como enterite aguda conseqüente à inanição.

O quadro anatômico intestinal, quer no kwashiorkor, quer no marasmo, tem sido descrito como de padrão espruiforme (5, 9, 16, 80). As tentativas de reprodução experimental de tais lesões conseguem graus discretos de atrofia, que não chegam a configurar a gravidade do quadro infantil (19, 20, 40). Em nossas experiências, tivemos a oportunidade não só de reproduzir esses graus discretos de atrofia intestinal, como também de realçar a depleção celular da

lâmina própria e do tecido linfóide, somente referida em patologia humana em 1951 por GILLMAN e GILLMAN (32).

Após um mês de dieta, as alterações intestinais são mais acentuadas, constatando-se diminuição da altura do epitélio, com cuboidização moderada; despovoamento da lâmina própria, encurtamento das criptas — alterações estas que propiciam um quadro de atrofia discreta das vilosidades. Esta atrofia vilositária não é a mesma encontrada nas crianças com kwashiorkor e marasmo, uma vez que não altera seriamente a relação cripta/vilosidade e, como referimos acima, a lâmina própria dos ratos desnutridos apresenta-se extremamente pobre de células. Os autores indianos (19 20 64) têm estudado excelentemente as lesões intestinais em macacos, asseverando que na patologia intestinal do kwashiorkor experimental há atrofia de todos os planos histológicos, sem, contudo, configurar o quadro usualmente descrito na malabsorção intestinal.

Em relação à bordadura estriada, como já foi dito, há redução e irregularidade, alterações estas também verificadas por um dos autores ao nível da microscopia eletrônica (54).

Outra alteração importante em nosso material, observado tanto no intestino delgado como no grosso, foi a conspícua depleção de células muco-secretoras. Este fato não tem sido valorizado em patologia humana (55), sobretudo quando se recorda o papel protetor do muco e suas implicações no metabolismo dos microrganismos intestinais. Foi observada também, mas não de modo constante, nos casos mais severos, vacuolização do epitélio do íleo (positiva para gordura), constituindo esse achado, não referido na literatura humana e experimental, motivo de especulação futura (Fig. 13).

Ao nível das placas de PEYER, que foram examinadas sistematicamente em todos os casos, importante grau de atrofia folicular foi detectada. A depleção linfóide encontrada no intestino, acrescida da diminuição de células de KUPFFER, da atrofia tímica, da depleção linfóide ganglionar e esplênica, configura um quadro geral de deficiência linfo-histiocitária que pode estar ligada ou à hipoproteinemia ou ao "stress" conseqüente ao método usado.

Experiências outras (43) demonstraram quadro semelhante em ratos, inclusive com defeito na formação de anticorpos, embora os achados na patologia humana sejam contraditórios.

Com relação às alterações bioquímicas, nossos achados confirmam tanto os índices conhecidos em crianças (12, 15, 56, 70, 85, 94) como em animais (4, 25, 60, 81, 94) isto é, a grande baixa de albumina sérica indicando deficiência protéica. Quanto às globulinas — alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub> aumentadas, com beta e gama sem variações significativas — as interpretações ficam prejudicadas por não termos examinado o soro dos animais em diversas fases do processo deprivativo. A taxa globulínica normal ou ligeiramente aumentada em nossos animais desnutridos ao lado da depleção linfóide, sugere que as alterações imunológicas do desnutrido estejam ligadas mais ao setor celular que ao humoral, conforme os achados de SMYTHE e cols. (75) em crianças (10, 42).

Esse achado histológico também foi confirmado por nós em crianças falecidas por desnutrição e doenças infecciosas (55). Estas, entretanto, mascaram freqüentemente o quadro mórbido, dificultando uma avaliação mais acurada das modificações no sistema linfóide.

Em verdade, as alterações vistas nos outros órgãos e sistemas, também sofrem as conseqüências de associações mórbidas, uma vez que a desnutrição constitui um complexo de deficiência alimentar, infecção e miséria.

#### SUMMARY

Using a low protein diet (approximately 2%), two experiments were performed trying to reproduce the morphologic and electrophoretic (serum proteins) findings known to occur in infantile malnutrition. The model shows in young albino rats the major lesions seen in humans, standing between kwashiorkor and marasmus.

The consequence of the diet is well seen by the stationary body weight. Atrophic dermal lesions were seen after 30 days. The most striking lesion was a perilobular fatty liver. Hepatocellular regeneration was abortive

appearing in the final stages with regressive changes.

It was possible to establish a gradation of pancreatic changes, from small zymogenic degranulation in the beginning to severe acinar atrophy after 30 days of diet, with subversion of its normal frame.

The intestinal changes which ended in atrophy not comparable with that of humans, correspond to reduction in height of the mucous epithelium, hypocellularity of the lamina propria, small crypts, decreased number of mitoses, shortening of the villi giving them a resemblance of the "germ free" animals mucosal pattern. Besides this, the authors call attention for the important decrease in size and number of the goblet cells in the ileum and in the large bowel.

The model also shows a lympho-histiocytic depletion, seen by the atrophy of Peyer's patches, decrease of Kupffer cells, thymic, lymph node and spleen lymphoid depletion.

The biochemical study of the serum, has revealed a low total protein and cholesterol. The electrophoretic study has shown a decrease of albumin, with A/G inversion. Alfa<sub>1</sub> and Alfa<sub>2</sub> globulins were increased in the deprived animals, while Beta and Gama did not show significant difference.

These findings may be attributed to protein deficiency because the control groups, even those with caloric restriction, have not presented lesions or changes of the serum proteins.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – ABRAMS, G. D.; BAUER, H. & SPRINZ, H., 1963, Influence of the normal Flora on mucosal morphology and cellular renewal on the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Invest.*, 12: 355-364.
- 2 – ADAMSTONE, F. B. & SPECTOR, H., 1950, Tryptophan deficiency in the rat: histologic changes induced by forced feeding of an acid-hydrolysed casein diet. *Arch. Path.* 49: 173, 184.
- 3 – ALMEIDA, M. O. & MADI, K., 1970, Estudos dos efeitos de uma dieta hipoprotéica em vários parâmetros de crescimento na tíbia de ratos jovens. "Trabalhos dos Laboratórios de Anatomia Patológica e Patologia Geral da Faculdade de Medicina do Porto". Ed. Centro de Estudos de Alta Cultura XXVII: 31-41.
- 4 – A. ASEHKENASY, 1965, Changements quantitatifs des fractions électrophorétiques des protéines sériques après privation de protéines alimentaires ou de certains acides aminés chez de le Rat mâle. *J. Physiol. Paris*, 57: 540-541.
- 5 – BARBEZAT, G. O.; BOWIE, M. D.; KASCHULA, R. O. C. & HANSEN, D. L., 1967, Studies on the small intestine mucosa of children with protein calorie malnutrition. *S. Afr. Med. J.* 41: 1031-1036.
- 6 – BARBEZAT, G. O., 1967, The exocrine pancreas and protein calorie malnutrition. *S. Afr. Med. J.* 41: 84.
- 7 – BARROS COELHO, R.; COUTINHO-ABATH, E.; BARBOSA, A. V.; LIRA, V. J. P. R.; MAGALHÃES F.º, A.; MONTENEGRO, D.; BARBOSA, J. M.; MELO, S. A. & VALENÇA, T., 1963, Aspectos etiopatogênicos e morfológicos da síndrome pluricarenal da infância no Recife, Brasil. *Rev. Bras. Malar. Doenças Trop.* 15: 67, 129.
- 8 – BHATTACHARYYA, A. K.; MANDAL, J. N. & SANYAL, S. N., 1964, Diarrhoea in Kwashiorkor and marasmus. *Bull. Calcutta Sch. Trop. Med.* 12: 94-96.
- 9 – BOWIE, M. D.; BRINKMAN, G. L. & HANSEN, J. D. L., 1963, Diarrhoea in protein caloric malnutrition. *Lancet*, 2: 550, 551.
- 10 – BROWN, R. E. & KATZ, M., 1966, Failure of antibody production to yellow fever vaccine in children with kwashiorkor. *Trop. Geogr. Med.*, 18: 125, 128.
- 11 – CAMPBELL, J. A., 1964, Dietary factors affecting vitamin requirements. *Proc. Nutr. Soc.*, 23: 31, 38.
- 12 – CARVALHO, J. M., 1967, Correlação proteino-lipídica na desnutrição infantil. *O Hospital* 72: 991, 1009.
- 13 – CARVALHO, J. M., 1967, As dissacaridasas e a intolerância congênita adquirida aos açúcares. *J. Pediatr. Rio*, 32: 61, 85.
- 14 – CHAUHAN, S.; NAYAK, N. C. & RAMALINGASWAMI, V., 1965, The heart and skeletal muscle in experimental protein malnutrition in Rhesusmonkeys. *J. Path. Bact.*, 90: 301, 309.
- 15 – COHEN, S. & HANSEN J. D. L., 1962, Metabolism of albumin and gama globuline in Kwashiorkor. *Clin. Sci.*, 23: 351, 359.

- 16 – COOK, G. C. & LEE, F. D., 1966, The jejunum in kwashiorkor. *Lancet*, 2: 1263, 1267.
- 17 – DAVIES, J. N. P., Kwashiorkor. In: "Liver injury". Memória da IX Conferência celebrada na cidade de Nova York, abril, 27-28, 1950. pág. 151, sob os auspícios da Fundação Josiah Macy Jr.
- 18 – DAVIES, J. N. P., 1948, The essential pathology of Kwashiorkor. *Lancet*, 1: 317, 320.
- 19 – DEO, M. G. & RAMALINGASWAMI, V., 1974, Absorption of Co 58 labeled Cyanocobalamin in protein deficiency. *Gastroenterology* 46: 167, 174.
- 20 – DEO, M. G. & RAMALINGASWAMI, V., 1965, Reaction of the small intestine to induced protein malnutrition in Rhesus monkeys: a study of cell population kinetics in the jejunum. *Gastroenterology*, 49: 150, 157.
- 21 – DEO, M. G.; SOOD, S. K. & RAMALINGASWAMI, V., 1965, Experimental protein deficiency. *Arch. Path.*, 80: 14, 23.
- 22 – DURBIN, P. A. J.; HEARD, C. R. C. & PLATT, B. S., 1960, Glycogen and G-6-Pase in the liver of normal and protein deficient pigs. *Proc. Nutr. Soc.*, 19: XXXV.
- 23 – DITTENBRANDT, M., 1948, Application of the Weichselbaum biuret reaction to the determination of protein. *Amer. J. Clin. Path.*, 18: 439, 441.
- 24 – EDOZIEN, J. C., 1968, Experimental Kwashiorkor and marasmus. *Nature* 220: 917-919.
- 25 – ENWONWU C. O. & SREEBNY, L. M., 1970, Experimental protein-caloric malnutrition in rats. *Exp. Mol. Path.*, 12: 332, 353.
- 26 – FOLLIS, R. A. JR., 1957, A kwashiorkor-like syndrome observed in monkeys. *Proc. Soc. Ep. Biol. Med.*, 96: 523, 528.
- 27 – FOLLIS, R. A. JR., 1958, Studies on a syndrome resembling kwashiorkor occurring in monkeys fed corn. *Tr. A. Am. Physicians*, 71: 110, 118.
- 28 – FOLLIS, R. A. JR., 1958, Deficiency Diseases. C. C. Thomas, Springfield, Illinois.
- 29 – FOLLIS, R. A. JR., 1966, Starvation and calorie-protein malnutrition In "Principles of Internal Medicine", 5a Ed. T. R. Harrison et als. pag. 358-362. McGraw Hill, Inc.
- 30 – FRIEDMAN, S. M. & FRIEDMAN, C. L., 1946, The effects of low protein diet on the structure of the pancreas. *Can. M. A. J.*, 55: 15, 16.
- 31 – GILLMAN, J. & GILLMAN, T., 1945, Structure of the liver in pellagra. *Arch. Path.* 40: 239, 263.
- 32 – GILLMAN, J. & GILLMAN, T., 1951, Perspectives in Human Nutrition. Grune & Stratton. N. York.
- 33 – GILLMAN, J.; GILLMAN, T.; MANDELSTAM, J. & GILBERT, C., 1945, The production of severe hepatic injury in rata by the prolonged feeding of maize-meal porridge (mealie-paps) and sour milk. *Brit. J. Exp. Path.* 26: 67, 81.
- 34 – HAASE, H. B., 1963, Tempo de trânsito gastrointestinal em ratos. Padronização de um método. *O Hospital*, 64: 737, 756.
- 35 – HANSEN D. L.; LORENZEN, A. J.; MORRIS, A.; AHRENS, R. & WILSON, J., 1967, Effects of fat intake and exercise on serum cholesterol and body composition of rats. *Amer. Journal of Phy.* n.º 2 Vol. 213: 347, 351.
- 36 – HARTROFT, W. S. & RIDOUT, J. H., 1951, Pathogenesis of the cirrhosis produced by choline deficiency. Escape of lipid from fatty hepatic cysts into the biliary and vascular systems. *Am. J. Path.*, 27: 951, 968.
- 37 – HARTROFT, W. S. & SELLERS, E. A., 1952, The dissolution of fatty cysts in precirrhotic and cirrhotic livers of choline deficient rats treated with lipotropic factors. *Am. J. Path.* 28: 387, 399.
- 38 – HEARD, C. R. C.; PLATT, B. S. & STEWART, R. J. C., 1958, The effects on pigs of a low protein diet with and without additional carbohydrate. *Proc. Nutr. Soc.*, 17: XLI, XLII.
- 39 – HEER E. E. & MARGUI A. R., 1971, Electro e immunoeleetroforesis. Manual de Laboratorio e interpretaciones fundamentales. Gumersindo F. Fernandez, Argentina.
- 40 – HILL, R. B. JR; PROSPER, J.; HIRSHFIELD, J. S. & KERN, F. JR., 1968, Protein starvation and the small intestine. I. The growth and morphology of the small intestine in weanling rats. *Exp. Molec. Path.* 8: 66, 74.
- 41 – JELLIFE, D. B.; BRAS. G. & STUART, K. L., 1954, Kwashiorkor and marasmus in Jamaican infants. *West Indian Med. J.*, 3: 43.
- 42 – KEET, M. P. & THOM. H., 1969, Serum immunoglobulins in kwashiorkor *Arch. Dis. Child.* 44: 600, 603.
- 43 – KENNEY, M. A.; RODERUCK, C. E.; ARNRICH, L. & PIEDAD, F., 1968, Effect of protein deficiency on the spleen and antibody formation in rats. *J. Nutrition*, 95: 173, 178.

- 44 – KENNEY M. A., MAGEE J. L., PIEDAD, P. F., 1970, Dietary Amino Acids and Immune Response in Rats. *J. Nutr.*, **100**: 1063, 1072.
- 45 – KIRSCH, R. E.; BROCK, J. F. & SAUNDERS, S. J., 1968, Experimental protein-calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **21**: 820-826.
- 46 – KIRSCH, RE; SAUNDERS S. J. & BROCK J. F., 1968, Animal models and human protein-calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **21**: 1225, 1228.
- 47 – KIRSCH, R. E.; SAUNDERS, S. J. & BROCK, J. F., 1968, Amino-Acids transport in experimental protein-calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **21**: 1302, 1305.
- 48 – KOHMAN, E. A., 1920, The experimental production of edema as related to protein deficiency. *Am. J. Physiol.*, **51**: 378, 405.
- 49 – KUMAR, V.; DEO, M. G. & RAMALINGASWAMI, V., 1972, Mechanism of fatty liver in protein deficiency. An Experimental study in rhesus monkey. *Gastroenterology* **62**: 445-451.
- 50 – LAZARUS, S. & VOLK, B. W., 1964, Electron microscopy and histochemistry of rabbit pancreas in protein malnutrition (experimental kwashiorkor). *Am. J. Path.*, **44**: 95, 103.
- 51 – MC CANCE, R. A. & WIDDOWSON, E. M., 1966, Protein Deficiencies and calorie deficiencies. *Lancet*, **II**: 158-159.
- 52 – MACDONALD, I., 1959, Some evidence that a relative dietary excess of carbohydrate is an important aetiological factor in kwashiorkor. *Proc. Nutr. Soc.*, **19**: VII.
- 53 – MADI, K.; JERVIS, H.; ANDERSON, P. R. & ZIMMERMAN, M. R., 1970, A protein deficient diet: effect on liver, pancreas, stomach and small intestine of the rat. *Arch. Path.* **89**: 38, 52.
- 54 – MADI, K., 1970, Contribuição à confecção de um modelo experimental de deficiência protéica. Tese, UFRJ. Rio de Janeiro.
- 55 – MADI, K., 1973, À guisa de errata: "Morfologia da Desnutrição" *Bol. Inst. Puer. Ped. M. Gesteira*, **29**: 69, 71.
- 56 – MARCONDES, E., 1971, Desidratação e Desnutrição em Pediatria. Ed. Sarvier, S. Paulo.
- 57 – NICOLAEFF, L., 1923, Influence de L'inanition sur la morphologie des organes infantiles. *Press Méd.*, **31**: 1007, 1009.
- 58 – PLATT, B. S., 1958, Protein malnutrition – a note on nomenclature. *Proc. Nutr. Soc.* **17**: XL, XLI.
- 59 – PLATT, B. S.; HALDER, K & DOELL, B. H., 1962, Pathology of acute experimental protein malnutrition in the force fed rat. *Proc. Nutr. Soc.*, **21**: VI, VII.
- 60 – PLATT, B. S.; HEARD, C. R. C. & STEWART, R. J. C., 1964, Experimental protein calorie deficiency. In "Mammalian Protein Metabolism", vol. II, pag. 445-521, Ed. A. N. Munro e J. B. Allison, Academic Press, New York.
- 61 – PORTER, J. R. & RETTGER, F., 1940, Influence of diet on the distribution of bacteria in stomach, small intestine and cecum of the white rat. *J. Infect. Dis.*, **66**: 104, 110.
- 62 – PRINSLOO, J. G.; WITTMANN, W.; PRETORIUS, P. S.; KRUGER, H. & FELLINGHANS, S., 1969, Effects of different sugars on diarrhoea of acute kwashiorkor. *Arch. Dis. Child.*, **44**: 593, 599.
- 63 – PROSPER, J.; MURRAY, R. L. & KERN, F. JR., 1968, Protein atarvation and the small intestine. II. Disaccharidase activities, *Gastroenterology*, **5**: 223, 228.
- 64 – RAMALINGASWAMI, V., 1964, Perspectives in protein malnutrition. *Nature (London)* **201**: 546, 551.
- 65 – RAMALINGASWAMI, V.; SRIRAMACHARI, S. & PATWARDHAN, V. N., 1954, Liver injury in protein malnutrition. *Indian J. Med. Sci.* **8**: 433, 441.
- 66 – RAMALINGASWAMI, V.; SRIRAMACHARI, S. & PATWARDHAN, V. N., 1958, The effect of calorie restrition on the liver injury in protein and choline deficiencies in the rat. *Indian. J. Path Bact.*, **1**: 104, 112.
- 67 – RIBEIRO, L. P., MITIDIERI E. & AFFONSO O. R., 1958, Eletroforese em papel e métodos relacionados. *Serviço Gráfico do IBGE, Rio de Janeiro*, pg. 105.
- 68 – RICHTER, C. P. & BARELARE, B. JR., 1939, Further observation on the carbohydrate, fat and protein appetite of vitamin B deficient rats. *Am. J. Physiol.*, **127**: 199, 210.
- 69 – RICHTER, C. P. & CAMPBELL, KH., 1940, Iaste thresholds and taste preferences of rats for five common sugars. *J. Nutr.*, **20**: 31-46.
- 70 – SCRIMSHAW, N. S.; BEHAR, M.; ARROYAVE, G.; VITERI, F. & TEJADA, C., 1956, Characteristics of kwashiorkor (síndrome pluri-carencial de 1.<sup>a</sup> infância). *Fed. Proc.*, **15**: 977, 985.

- 71 – SHILS, M. E.; FRIDLAND, I. & STEWART, W. B., 1954, Rapid development of portal liver in rats consuming various plant materials. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87: 473, 476.
- 72 – SHILS, M. E. & STEWART, W. B., 1954, Development of portal fatty liver in rats on coron diets; response to lipotropic agents *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 85: 298, 303.
- 73 – SIDRANSKY, H., 1960, Chemical pathology of nutritional deficiency induced by plant proteins. *J. Nutr.*, 71: 387, 395.
- 74 – SIDRANSKY, H. & FARBER, E., 1958, Chemical pathology of acute aminoacid deficiencies. I. Morphologic changes in immature rats fed threonine or histidine-devoid diets. *Arch. Path.*, 66: 119, 134.
- 75 – SMYTHE, P. M. BERETON – STILES, G. G. GRACE., H. J.; MAFOYAUE, A. SCHONLAND, M. COOVADIA, H. M.; LOENING, W. E., PARENT, M. A. & VOS, G. H., 1971, Thymolymphatic deficiency and Depression of cellmediated immunity in Protein-Calorie malnutrition. *Lancet*, 2: 939-43, oct.
- 76 – SRIRAMACHARI, S. & RAMALINGASWAMI, V., 1953, Liver changes in kwashiorkor. *Indian J. Pediatrics*, 20: 1.
- 77 – SOLIMANO, G.; BURGESS, E. A. & LEVIN, B., 1957, Protein-Calorie malnutrition: effect of deficient diets on enzyme levels of jejunal mucosa of rats. *Brit. J. Nutr.*, 21: 55, 68.
- 78 – SPECTOR, H., 1948, The metabolic interrelationship between tryptophan, pyridoxine and nicotinic acids; forced-feeding studies in rats. *J. Biol. Chem.*, 173: 659, 676.
- 79 – SPIEGEL, R. M., 1972, – Estatística – Coleção Schaum – Ed. Mc. Graw Hill do Brasil Ltda., pg. 310.
- 80 – STANFIELD, J. P.; HUTT, M. S. R. & TUNNICLIFFE, R., 1965, The intestinal biopsy in kwashiorkor. *Lancet*, 2: 519, 523.
- 81 – STEAD, R. H. & BROCK, J. F., 1972, Experimental Protein-Calorie malnutrition: Rapid Induction of Protein Depletion signs in early-weaned rats. *J. Nutr.*, 102: 1357-1366.
- 82 – SULLIVAN, M. & EVANS, V. J., 1945, Nutritional dermatoses in rats; vitamin A deficiency superimposed on vitamin B complex deficiency. *Arch. Dermat. & Syph.*, 51 17, 25.
- 83 – SVOBODA, D.; GRADY, H. & HIGGINSON, J., 1966, The effects of chronic protein deficiency in rats. III. Biochemical and ultrastructural changes. *Lab. Invest.*, 15: 731, 749.
- 84 – TAKANO, J., 1964, Intestinal changes in protein deficient rats. *Exp. Molec. Path.* 3: 224, 231.
- 85 – TROWELL, H. C.; DAVIES, J. N. P. & DEAN, R. F. A., 1954, Kwashiorkor. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London.
- 86 – UMAÑA, R. & TEJADA, C., 1965, Reproducción en la rata blanca de algunas características de la desnutrición proteino-calórica humana. *Arch. Venez. Nutr.*, 16: 33, 51.
- 87 – UMAÑA, R., 1967, The effect of protein deficiency on the distribution of nuclear volumes in preparations of rat liver nuclei. *Canad. J. Biochem.*, 45: 1185, 1189.
- 88 – VINCENT, D., Dosage rapide direct de la cholestérolémie – La Presse Medicale pg. 2085 – Dec. 1960.
- 89 – VITERI, F.; BÉHAR, M. & ARROYAVE, G., 1964, Clinical aspects of protein malnutrition. In “Mammalian Protein Metabolism”. Ed. A. N. Mumro e J. B. Allison, *Acad. Pres. New York, Cap. 22*, pp. 523-568.
- 90 – VOLK, B. W. e LAZARUS, S. S., 1960, Rabbit pancreas in protein malnutrition (experimental kwashiorkor) and after cortisone administration. *Am. J. Path.*, 37: 121, 135.
- 91 – WATERLOW, J. C., 1948, Fatty liver Disease in infants in the British West Indies. Med. Res. Council, Spec. Rep. Series n.º 263. London, Her Majesty's Stationery Office.
- 92 – WATERLOW, J. C., BRAS, G. & DE PASS, E., 1957, Further observations on the liver, pancreas and kidney in malnourished infants and children. II. The gross composition of the liver. *J. Trop. Pediat.*, 2: 189-198.
- 93 – WATERLOW, J. C., 1959, Protein nutrition and Enzyme changes in man *Fed. Proc.* 18: 1143, 1153.
- 94 – WATERLOW, J. C.; CRAVIETTO, J. & STEPHEN J. M. L., 1960, Protein malnutrition in man. *Adv. Prot. Chem.* Academic Press Inc. (London) Ltd., pg. 131-238.
- 95 – WILLIAMS, C., 1933, A nutritional disease of childhood associated with maize diet. *Arch. Dis. Child.*, 8: 423-433.