

“Stress” por contencao e por baixa ingestao proteica em ratos. I. Alteracoes bioquímicas ¹

SÉRGIO ZUCOLOTO,² JOSÉ ALBERTO MELLO DE OLIVEIRA,³
FRANCISCO ALBERTO MOURA DUARTE ⁴ Y
JOSÉ EDUARDO DUTRA DE OLIVEIRA ⁵

SUMÁRIO

Ratos alimentados com uma dieta controle, quando submetidos a “stress” por contenção, excretam na urina, maiores quantidades de nitrogênio total, nitrogênio urêico e vitamina C. Animais recebendo uma dieta baixa em proteína excretam pela urina menores quantidades de nitrogênio total, nitrogênio urêico e ácido ascórbico, quando comparados com o grupo controle. Quando a baixa ingestão protéica mais contenção estão associadas, não se verifica aumento de excreção urinária das substâncias estudadas em relação aos animais apenas carentes.

INTRODUÇÃO

Várias situações podem levar ao “stress”, como infecções, injúrias, deficiências alimentares de todos os tipos, alterações climáticas, exercícios severos, estímulos nervosos, causas mecânicas e outras e, desencadear a síndrome geral de adaptação do organismo (1, 2). A reação diante da situação de emergência deve ser encarada como um sistema positivo de proteção do indivíduo normal contra o ambiente hostil, desenvolvendo-se dentro de certos limites fisiológicos. Contudo, circunstâncias psicológicas, sociais e econômicas da sociedade moderna podem constituir estímulos alarmantes capazes

1. Este trabalho fez parte da dissertação de mestrado de Sérgio Zucoloto, defendida na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 1974, com ajuda financeira da “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil.

2. Professor Assistente do Departamento de Patologia da F.M.R.P. (USP).

3. Professor Livre-Docente do Departamento de Patologia da F.M.R.P. (USP).

4. Professor Livre Docente do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da F.M.R.P. (USP).

5. Professor Titular do Departamento de Clínica Médica da F.M.R.P. (USP).

Recibido: 23-12-1974.

de levar o indivíduo a uma adaptação inadequada e a favorecer o aparecimento de alterações orgânicas graves.

Alguns autores estudaram a homeostase em indivíduos normais submetidos a estímulos alarmantes diversos (3, 4, 5, 6) entre eles a baixa ingestão proteica (7), estímulos estes sempre aplicados isoladamente. Desconhecemos, todavia, vários aspectos da adaptabilidade nos diversos sistemas do indivíduo, quando submetido à somatória de estímulos alarmantes, circunstância de ocorrência natural frequente. Supomos que, a associação de dois estímulos alarmantes pode levar a um desequilíbrio homeostático maior do que o provocado por fatores isolados. Isto pode ocorrer nos casos de deficiência protéica mais outro estímulo alarmante adicional. No presente trabalho relataremos o estudo da reação de alarme, através de excreções total, nitrogênio ureico e vitamina C em animais submetidos a baixa ingestão protéica e a contenção, isolados e associados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. RATOS:

Utilizamos ratos machos, da raça Wistar, pesando em média 90 g, do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP., Os ratos receberam uma dieta comercial até o início da pesquisa. A temperatura do local do experimento foi mantida em torno de 22° C.

2. TIPO DE "STRESS":

2.1. *Contenção*

Foi aplicada através de uma armação de couro, que envolveu o animal nas cinturas escapular e pélvica ficando livres a cabeça e cauda (8).

2.2. *Dieta de baixa concentração protéica*

Foi obtida com a utilização de uma dieta contendo a seguinte composição: 5% de proteínas vindas da caseína comercial, 5% de mistura salina, 1% de mistura de vitaminas, 8% de mistura de vitaminas, 8% de óleo vegetal, 1% de óleo de fígado e 80% de amido.

3. ANIMAIS CONTROLES

Os animais controles foram alimentados com uma dieta contendo: 18% de proteínas vindas da caseína comercial, 5% de mistura

salina, 1% de misturas de vitaminas, 8% de óleo vegetal e 68% de amido. As misturas de vitaminas e salina em ambos os casos foram preparadas de acôrdo com AOAC (9).

4. EXPERIMENTO

O experimento constou de 4 grupos de cinco animais, sorteados aleatoriamente entre 20 ratos e distribuídos de acôrdo com a Tabela I. Os mesmos foram mantidos em gaiolas individuais e pesados semanalmente. Os grupos I e II foram submetidos à sessões de contenção de 24 horas por semana. Os grupos III e IV não foram contidos. O experimento teve a duração de 7 semanas. Em todas as semanas, coletou-se a urina dos vários animais. Durante as coletas de urina, realizadas em coincidência com os períodos de contenção para os grupos I e II, e sem contenção para os II e IV os animais ficaram em jejum completo, porém a cada 12 horas era permitido acesso ao alimento por um espaço de duas horas, sendo logo após recolocados na situação anterior, para completar as 24 horas de coleta urinária. A urina foi recebida num frasco contendo 0,2 ml de ácido clorídrico-6N. O material empregado na coleta de urina foi feito de vidro. A separação entre as fezes e a urina foi conseguida pela passagem de lã de vidro, colocada na parte inferior dos funís. Após a coleta da urina era posta em tubo de contrífuga de fundo cônico e centrifugada a 2000 rpm, para separação de possíveis impurezas. O volume foi medido e a mesma guardada em refrigerador à temperatura de 4° C, para dosagens posteriores. Foram dosadas vitaminas C (10), nitrogênio total (11), e nitrogênio urêico (12).

TABELA I

Quadro geral dos tratamentos (5 ratos em cada grupo).

GRUPOS	CONTENÇÃO	DIETA
I	sim	deficiente em proteína
II	sim	controle
III	não	deficiente em proteína
IV	não	controle

5. ANALISES ESTATÍSTICAS

Na análise estatística dos resultados das excreções urinárias foi empregado um modelo fatorial 2 x 2 (13, 14). Em virtude das diferenças dos pesos dos animais, os valores das excreções urinárias foram corrigidos para 100 g de peso corporal em todos os grupos.

Por esta metodologia estatística foi possível comparar os efeitos entre os grupos, na seguinte ordem: I x II, I x III, II x IV e III x IV.

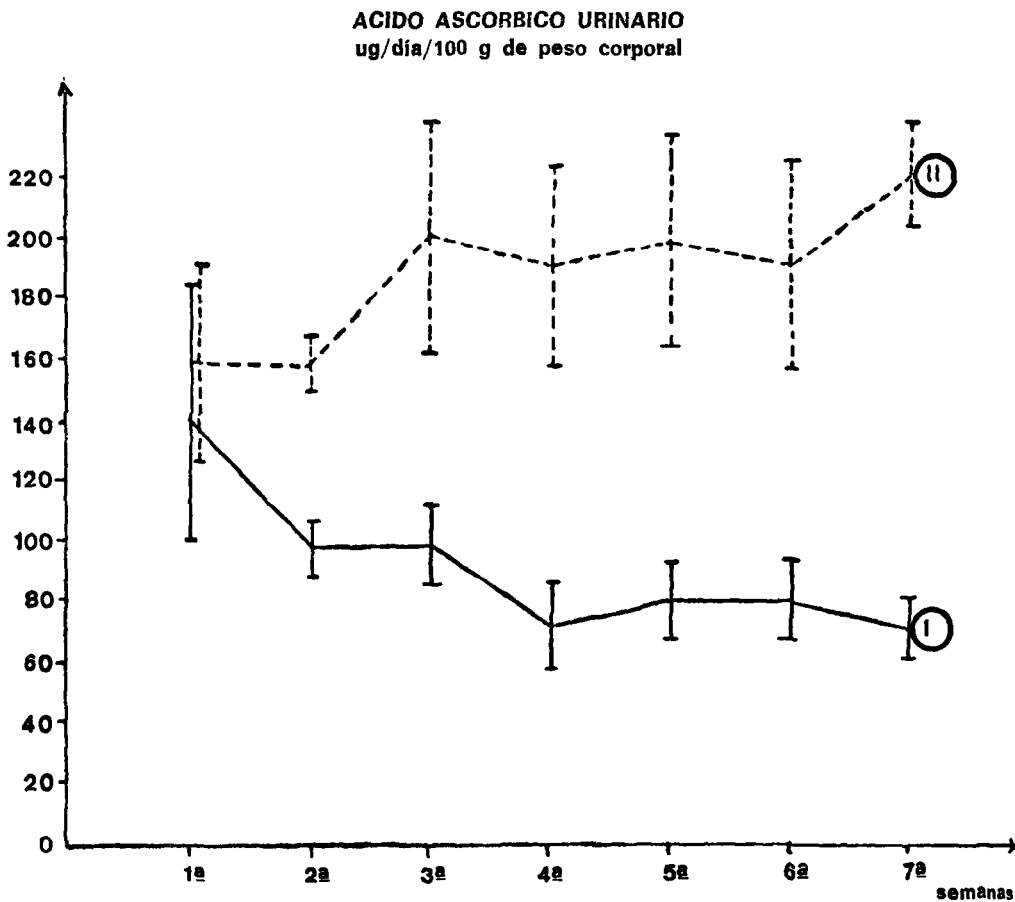


Gráfico I: Excreções urinárias médias de ácido ascórbico de semana em semana nos grupos I (contenção mais baixa ingestão proteica) e II (contenção mais alimentação controle).

TABELA II

Excreções médias urinárias de nitrogênio total, nitrogênio uréico e ácido ascórbico com seus respectivos desvios padrões nos diversos grupos: (I) contenção mais baixa ingestão protéica; (II) contenção mais alimentação controle; (III) baixa ingestão protéica; (IV) alimentação controle.

	Grupos	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana	7ª semana
Nitrogênio total (mg/dia/100g)	I	50 ± 19(5)*	61 ± 13(5)	40 ± 11(5)	30 ± 10(5)	34 ± 9(5)	27 ± 5(5)	21 ± 5(3)
	II	55 ± 19(4)	77 ± 31(5)	74 ± 28(5)	51 ± 21(4)	50 ± 18(4)	45 ± 13(4)	45 ± 12(3)
	III	41 ± 12(5)	27 ± 9(5)	38 ± 4(5)	20 ± 7(5)	21 ± 7(5)	34 ± 4(5)	15 ± 3(3)
	IV	53 ± 9(5)	37 ± 6(5)	42 ± 7(5)	38 ± 6(5)	39 ± 15(5)	44 ± 11(5)	27 ± 10(4)
Nitrogênio uréico (mg/dia/100g)	I	39 ± 15(5)	52 ± 5(5)	34 ± 9(5)	24 ± 7(5)	28 ± 5(5)	21 ± 4(5)	9 ± 2(3)
	II	45 ± 17(4)	59 ± 23(3)	53 ± 8(4)	45 ± 20(4)	43 ± 15(4)	39 ± 12(4)	26 ± 12(3)
	III	28 ± 5(5)	22 ± 8(5)	32 ± 2(5)	15 ± 5(5)	19 ± 5(5)	29 ± 3(5)	10 ± 2(3)
	IV	41 ± 6(5)	31 ± 4(5)	35 ± 7(5)	32 ± 5(5)	32 ± 13(5)	37 ± 11(5)	16 ± 7(4)
Ácido ascórbico (ug/dia/100g)	I	140 ± 82(5)	96 ± 16(5)	97 ± 27(5)	72 ± 27(5)	75 ± 23(5)	76 ± 25(5)	70 ± 20(4)
	II	159 ± 65(4)	157 ± 60(4)	199 ± 75(5)	189 ± 66(4)	188 ± 68(4)	191 ± 69(4)	217 ± 32(4)
	III	35 ± 6(4)	64 ± 32(5)	115 ± 39(5)	92 ± 52(3)	71 ± 28(4)		101 ± 58(2)
	IV	46 ± 28(5)	88 ± 33(5)	134 ± 20(5)	112 ± 60(5)	141 ± 74(5)		96 ± 21(4)

* O algarismo entre parênteses significa o número de dosagens que fornece os valores médios.

TABELA III

Excreções médias finais urinárias de nitrogênio total, nitrogênio urêico, ácido ascórbico com seus desvios padrões nos diversos grupos: (I) contenção mais baixa ingestão protéica; (II) contenção mais alimentação controle; (III) baixa ingestão protéica; (IV) alimentação controle.

Grupos	Nitrogênio total (mg/dia/100g)	Nitrogênio urêico (mg/dia/100g)	Ácido ascórbico (mg/dia/100g)
I	37,47 ± 14,24	29,76 ± 13,64	89,54 ± 25,09
II	56,79 ± 13,47	44,39 ± 8,58	186,00 ± 21,32
III	27,98 ± 9,79	21,96 ± 7,98	79,49 ± 29,06
IV	40,04 ± 7,71	32,07 ± 7,93	103,18 ± 34,51

TABELA IV

Efeitos dos tratamentos nos diversos grupos experimentais (valores de F) com relação à excreções médias finais de nitrogênio total, nitrogênio urêico e vitamina C. Grupos: (I) contenção mais baixa ingestão protéica; (II) contenção mais alimentação controle; (III) baixa ingestão protéica; (IV) alimentação controle.

Comparação entre os grupos	Valores de F		
	Nitrogênio total	Nitrogênio urêico	Vitamina C
I x II	9.69**	7.02**	46.84**
I x III	2.34	2.00	<1
II x IV	7.28**	4.99*	34.53**
III x IV	3.77	3.35	2.82

(*) $p < 0,05$

(**) $p < 0,01$

RESULTADOS

Os valores médios e os desvios padrões obtidos de semana em semana para as excreções de nitrogênio total, nitrogênio ureico e vitamina C estão na Tabela II. As médias finais para cada grupo e os respectivos desvios padrões estão na Tabela III. O estudo estatístico analisa apenas as médias finais destas excreções durante todo o experimento. Os valores de F para testes e significância estatística nas médias finais urinárias estão mostrados na Tabela IV.

A excreção de nitrogênio total, de nitrogênio urêico e vitamina C do grupo I (contenção mais baixa ingestão protéica) não difere estatisticamente do grupo III (baixa ingestão protéica) e do grupo IV (alimentação controle). O grupo II (contenção mais alimentação controle) excreta quantidades significativamente maior de nitrogênio total, nitrogênio urêico e vitamina C do que os grupos I (contenção mais baixa ingestão protéica) e IV (alimentação controle).

Vemos pelo Gráfico I, que as quantidades médias da excreção de vitamina C na urina tendem a diminuir a cada semana nos animais do grupo I (contenção mais baixa ingestão protéica). Nos animais do grupo II (contenção mais alimentação controle) as excreções médias de ácido ascórbico tendem a aumentar a medida que transcorre o experimento.

DISCUSSAO

Os resultados mostram níveis de excreções urinárias de nitrogênio total e nitrogênio ureico nos animais com alimentação normal e submetidos ao "stress" por contenção maiores que os demais grupos, confirmando dados da literatura (3, 4, 5). Ao contrário, os animais com baixa ingestão protéica (grupo III) tiveram as menores excreções de nitrogênio total e nitrogênio ureico. Isto é de se esperar, pois o organismo que recebe baixa ingestão protéica tende a adaptar o metabolismo de acôrdo com o conteúdo de proteína ingerida (15). Considerando a baixa ingestão protéica, como estímulo alarmante (7), somado à contenção, também tiveram níveis de excreções nitrogenadas que não diferem estatisticamente do grupo que recebe dieta deficiente em proteína (grupo III). Esse fenômeno pode ser explicado como adaptação do organismo, conservando ao máximo as proteínas nele existentes. Para que isto aconteça é necessário diminuir a atividade dos hormônios catabólicos. Sabemos que os hormônios adrenais participam do catabolismo pro-

têico (17) e a quantidade de vitamina C pela urina nos serviu como parâmetro de atividade do eixo hipófise-adrenal (18). Assim tivemos aumento da excreção de ácido ascórbico nos ratos normais com contenção, confirmando dados da literatura (2, 19), todavia os animais com baixa ingestão protéica o comportamento em relação à vitamina C é diferente. Eles excretam menos vitamina na urina quando comparados com os animais alimentados com dieta controle. Isso pode ser interpretado como uma menor síntese de vitamina pelo animal com dieta baixa em proteína ou um funcionamento inadequado do eixo hipófise-adrenal (16). Adição do estímulo de contenção aos animais com baixa ingestão protéica não é capaz de aumentar a excreção urinária de ácido ascórbico em relação aos animais que recebem apenas dieta com baixa concentração de caseína.

A análise conjunta dos dados sobre as excreções urinárias de nitrogênio total, nitrogênio urêico e vitamina C, demonstra que, o animal bem nutrido responde a estímulos alarmantes tipo contenção, de maneira diferente dos animais submetidos a uma dieta baixa em proteína. Aqueles aumentam as excreções nitrogenadas e de vitamina C pela urina, enquanto na baixa ingestão de proteína há uma diminuição destes produtos nitrogenados e da vitamina. O estímulo adicional de contenção não é suficiente para modificar o quadro urinário nos animais de baixa ingestão protéica.

SUMMARY

Stress due to immobilization and low protein intake in rats. I. Biochemical alterations.

Rats fed a control casein diet, when exposed to immobilization, loose more nitrogen, urea and vitamin C in urine. Animals receiving a protein deficient diet excrete less nitrogen, urea and ascorbic acid in urine than their controls. When protein deficiency and immobilization are associated, there is not an increase on the urinary excretion of those substance compared to the deficient animals.

BIBLIOGRAFIA

1. Selye, H. The physiology and pathology of exposure to stress. Acts. Inc. Montreal, Canada, 1950.
2. Selye, H. The general adaptation syndrome and the disease of adaptation. *Am. J. Med.* 1951, 10: 549-554.
3. Cuthbertson, D. P. and Munro, H. N. XV. The relationship of carbohydrate metabolism to protein metabolism. I. The role of total dietary carbohydrate and of surfeit carbohydrate in protein metabolism. *Biochem. J.* 1939, 33: 128-142.
4. Long, C. N. H., Katzin, B. and Fry, E. G. Adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinology* 1940, 26: 309-344.

5. Munro, H. N. and Cumming, M. C. Nitrogen metabolism after fracture. **Nature**: 1948, **161**: 560-561.
6. Gordon, J. E. and Scrimshaw, N. S. Infections disease in the malnourished. **Med. Clin. N. A.** 1970, **54**: 1495-1508.
7. Lamy, M., Lamotte, M. and Lamotte-Barrillon, S. La denutrition: Clinique, Biologie, Therapeutique. G. Doin, Paris, 1948 (cit. por Selye, 1950).
8. Zucoloto, S. e Mello de Oliveira, J. A. Estudo experimental dos efeitos de estímulos alarmantes em ratos. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.** 1972, **5**: 171-179.
9. Association of Official and Agricultural Chemists. Official methods of analysis, Ed. by Horwitz, W. Washington USA., the edition, 1965.
10. Roe, J. H. and Kuether, C. A., The determination of ascorbic acid in whole blood and urine though the 2,4 dinitrophenylhydrazine derivat of dehydro ascorbic acid. **J. Biol. Chem.** 1943, **147**: 399-407.
11. Ma, T. S. and Zuazaga, G. Microkalydahl determination of nitrogen. A new indicator and improved rapid method. **J. Ind. Eng. Chem.** 1942, **14**: 280-282.
12. Gentzkow, C. J. and Masen, S. H. An accurats method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem.** 1942, **143**: 531-544.
13. Yates, F. The principles of orthogonality and confounding in replicated experiments. **J. Agr. Sci.** 1933, **23**: 108-145. (cit. por Steel e col., 1969).
14. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. Principles and procedures of statistics. Analysis of variance III: factorial experiments. McGraw-Hill Book Companr, Inc. New York, Toronto, London, 1960.
15. Waterlow, J. C. and Alleyne, G. A. O. Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last ten Years Pub. in "Advances in Protein Chemistry" vol. 25. Academic Press. Inc. New York and London, 1971.
16. Srebnick, H. H. and Nelson, M. M. Anterior pituitary function in male rats deprived of dietary protein. **Endocrinology** 1962, **70**: 723-730.
17. McLean, P. and Gurney, M. W. Effect of adrenalectomy and of Growth Hormone on Enzymes Concerned with Urea Synthesis in rat liver. **Biochem. J.** 1963, **87**: 96-104.
18. Pirani, C. L. Review relation of vitamin C to adrenocortical function and stress phenomen. **Metabolism**, 1952, **1**: 197-222.
19. Osler, H. L., Kretchmar, A. L. and Batheill, F. H. Effect of whole body x-irradiation on ascorbic acid of rat tissues. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 1953, **84**: 470-473.