

"Stress" por contenção e por baixa ingestão proteica em ratos. II. Alterações morfológicas¹

SERGIO ZUCOLOTO,² JOSÉ ALBERTO MELLO DE OLIVEIRA,³
FRANCISCO ALBERTO MOURA DUARTE,⁴ AFFONSO LUIZ FERREIRA⁵
Y JOSÉ EDUARDO DUTRA DE OLIVEIRA⁶

SUMARIO

A contenção periódica dos animais recebendo uma dieta controle resultou em menor ganho de peso corporal nesse grupo, quando comparado com aqueles que não receberam "stress" por contenção. Os animais que foram alimentados com uma dieta com baixa ingestão proteica também ganharam menos peso. O peso foi menor na associação de carência mais contenção, porém, a diferença não foi estatisticamente significativa.

Animais submetidos a "stress" por contenção e por baixa ingestão proteica apresentaram um aumento do peso cardíaco em relação ao peso corporal. Este aumento foi significativamente maior nos animais nos quais se associou a contenção mais baixa ingestão proteica. Também o grau de sofrimento da fibra cardíaca, avaliado pelo estudo histoquímico é maior nesse grupo de animais. Os pesos dos fígados não mostraram diferenças nos vários grupos. Microscopicamente houve grande esteatose difusa nos animais deficientes em proteína, porém, não apresentaram diferenças histológicas quando receberam "stress" por contenção.

No baço não se verificou alteração do peso do órgão entre os grupos. O exame microscópico exibiu pequenas alterações no grupo com baixa ingestão proteica, que foram acentuadas quando a baixa ingestão foi associada à contenção.

O peso relativo dos testículos nos animais que são contidos e com dieta controle, não apresentou alteração significativa em relação ao grupo com dieta

1. Este trabalho fez parte da Dissertação de Mestrado de Sergio Zucoloto, defendida na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), 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 Adjunto do Departamento de Morfologia da F.M.R.P. - USP.

6. Professor Titular do Departamento de Clínica Médica da F.M.R.P. - USP.

Recibido: 23-12-1974.

controle. Os animais deficientes em proteína tem significativamente menores pesos do que os grupos bem nutridos. O estudo histológico mostrou que isoladamente a contenção e a baixa ingestão protéica foram responsáveis por um atraso sexual nos animais, porém, a lesão agravou-se na associação de contenção e baixa ingestão.

INTRODUÇÃO

Várias alterações morfológicas desenvolvem em animais submetidos a estímulos alarmantes isolados, como: perda de peso (1, 2, 3); aumento de peso da adrenal e diminuição do testículo (4). Na baixa ingestão de proteína, que constitui também um estímulo alarmante (5), nota-se atrofia das glândulas supra-renais (6); diminuição do peso do baço (7), dos testículos (8); do coração (9, 10, 11); e grande esteatose hepática (7, 12).

Com o mesmo objetivo já exposto na primeira parte deste trabalho (13) procuramos agora observar as alterações de peso corporal e alterações morfológicas de diversos órgãos em animais submetidos à baixa ingestão protéica e a contenção, isolados e associados.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho analisamos as alterações de peso corporal e as alterações morfológicas do coração, fígado, baço, adrenal e testículo utilizando os mesmos grupos de animais descritos na primeira parte (13). Os mesmos foram anestesiados com éter, sacrificados e submetidos a exames necroscópicos completos. Para o estudo macro e microscópico, retiramos o coração, o fígado, o baço, as adrenais e os testículos. Os órgãos foram fixados em formal a 10%, incluídos em parafina e examinados na microscopia óptica. Utilizamos hematoxilina e eosina (HE), como corantes para todos os órgãos estudados. No fígado e testículo, além da coloração pela HE, foi utilizada a reação com ácido perídico Shiff (PAS) e no coração a reação com hematoxilina-fucsina básica - ácido pícrico (HBFP), conforme o método proposto por Lie e col. (14). Este último método nos serviu para detectar sofrimento das fibras miocárdicas.

Na análise estatística dos resultados, empregamos o mesmo modelo fatorial 2 x 2 (15, 16) descrito na primeira parte (13). Em virtude das diferenças dos pesos dos animais, os valores dos pesos dos órgãos foram corrigidos para 100 g. de peso corporal em todos os grupos.

TABELA I

Valores médios finais do peso corporal e dos pesos médios do coração, fígado, baço, adrenais, e testículos nos vários grupos (I) contenção mais baixa ingestão protéica; (II) contenção mais alimentação controle; (III) baixa ingestão protéica; (IV) alimentação controle.

Grupos	Pêso corporal g \pm s	Coração mg/100g \pm s	Fígado mg/100g \pm s	Baço mg/100g \pm s	Adrenais mg/100g \pm s	Testículos mg/100g \pm s
I	60.0 \pm 5.7	521.0 \pm 102.1	522.0 \pm 32.0	245.5 \pm 46.3	43.43 \pm 6.2	511.06 \pm 197.3
II	98.0 \pm 11.8	368.5 \pm 57.0	452.0 \pm 41.5	334.6 \pm 53.0	37.65 \pm 6.7	1105.08 \pm 367.5
III	70.5 \pm 7.0	435.9 \pm 23.7	493.0 \pm 22.3	319.8 \pm 106.3	37.45 \pm 4.9	557.67 \pm 291.7
IV	115.0 \pm 16.5	358.5 \pm 37.4	425.0 \pm 18.1	313.1 \pm 92.4	24.69 \pm 2.0	1276.26 \pm 439.5

s = deavio padrão.

TABELA II

Efeitos dos tratamentos nos vários grupos (valores de F) relativos ao peso corporal médio final e pesos médios do coração, fígado, baço, adrenais e testículos. 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					
	P.corporal (g)	Coração (mg/100g)	Fígado (mg/100g)	Baço (mg/100g)	Adrenais (mg/100g)	Testículos (mg/100g)
I x II	26.95*	14.78**	< 1	3.20	3.00	82.4**
I x III	1.57	4.61*	< 1	2.24	3.21	< 1
II x IV	6.15*	< 1	2.77	< 1	15.08**	< 1
III x IV	41.19**	3.78	< 1	< 1	14.48**	120.80**

(*) $p < 0,05$

(**) $p < 0,01$

RESULTADOS

Os pesos corporais médios no final da 7ª semana de experimento e os pesos médios do coração, fígado, baço, adrenais e testículos corrigidos para 100 g. de peso corporal estão apresentados na tabela I.

1. *Pêso corporal*

Não constatamos edema subcutâneo em quaisquer dos animais alimentados com baixa ingestão protéica.

Os valores de F, nos diversos grupos, estão apresentados na tabela II. Os grupos com baixa ingestão protéica (I e III) recebendo ou não "stress" por contenção não mostram diferenças significativas entre si. Todavia, nos animais alimentados com dieta controle (grupos II e IV) a contenção provoca perda significativa do peso corporal.

2. *Pêsos de órgãos isolados:*

2.1. *Coração*

O coração nos animais do grupo I (contenção mais baixa ingestão protéica), tem maior peso relativo (mg de coração/100 g de peso corporal), em termos estatísticos, que nos do grupo III (baixa ingestão protéica) e nos do grupo II (contenção mais alimentação controle) (Tabela II).

2.2. *Fígado e baço*

O fígado apresenta superfície lisa, brilhante, amarelada e pouco amolecida à palpação nos grupos carentes em proteína (grupos I e III). Os índices em mg do fígado e mg de baço/100 g de peso corporal, não apresentam diferenças significativas nos diversos grupos experimentais (Tabela II).

2.3. *Adrenais*

Os pesos glandulares/100 g de rato, não apresentam diferenças estadísticas entre os grupos I, II e III, mas estes foram estadisticamente maiores que o índice do grupo IV (dieta controle) (Tabela II).

2.4. *Testículos*

Os índices (mg de testículo/100 g de rato) no grupo I (contenção mais baixa ingestão protéica) são estatisticamente menores em

relação ao grupo II (contenção mais alimentação controle). O mesmo ocorreu com o grupo III (baixa ingestão protéica) que é menor que o grupo IV (alimentação controle) (Tabela II).

3. *Microscopia*

Há graus variados de altearções microscópicas nos diversos grupos e nos diversos órgãos estudados.

3.1. *Coração*

O coração quando corado com HE, exhibe perda da estriação e acidofilia acentuada das fibras cardíacas nos animais com "stress" por contenção. Entretanto, este fato é mais comum na associação de contenção com a baixa ingestão protéica (grupo I). Quando utilizamos a coloração de Lie e cols. (14), encontramos quatro reações fortes para uma fraca nos animais do grupo I (Fig. 1a); nos animais do grupo II (contenção mais alimentação controle) duas reações fracas para três negativas (Fig. 1b); no grupo III (baixa ingestão protéica) reação negativa em todos os animais (Fig. 1c); e por último, no grupo IV (alimentação controle) uma reação fraca para quatro negativas. Nos animais do grupo I observam-se focos isolados de miocitolise das fibras cardíacas.

3.2. *Fígado e baço*

O fígado é sede de grande esteatose difusa nos grupos carentes em proteína, com ou sem contenção (grupos I e III) (Fig. 2). Os grupos alimentados com dieta controle não apresentam alterações histológicas dignas de nota (grupo II e IV).

O baço mostrou polpa vermelha congesta, nos grupos que receberam "stress" por contenção. Notamos que os folículos esplênicos são atróficos no grupo I (contenção mais baixa ingestão protéica) (Fig. 3a). Por outro lado, na baixa ingestão protéica o baço não perde a arquitetura folicular normal (Fig. 3b). Microscopicamente a imobilização não conduz a alterações dignas de nota para o lado da polpa branca dos animais bem nutridos (grupo II).

3.3. *Adrenais*

As adrenais não apresentam alterações histológicas nos diversos grupos estudados.

3.4. *Testículos*

Os testículos corados com PAS apresentam membranas basais tubulares espessadas nos animais que receberam "stress" por con-

tenção. O quadro microscópico, exibido pelo grupo I (contenção mais baixa ingestão protéica) está bastante alterado. Observa-se acentuada diminuição de luz tubular, com a espermiogênese e espermatogênese ausentes. Algumas espermatogônias descamam da parede tubular e conglomeram-se na luz (Fig. 4a). No grupo III (baixa ingestão protéica), as membranas tubulares não estão espessadas e o epitélio germinativo está parcialmente destruído (Fig. 4b). Os animais alimentados com dieta controle e recebendo "stress" por contenção semanalmente (grupo II) apresentam discretas espermiogêneses e poucas espermatídes jovens (Fig. 4c). O grau de maturação testicular do grupo controle com dieta balanceada (grupo IV) está demonstrado na mesma figura (Fig. 4d).

DISCUSSAO

1. *Pêso corporal*

Os resultados mostram que nos animais bem nutridos e submetidos à contenção perdem significativamente mais pêso corporal que os seus controles. Estes achados concordam com dados da literatura (1, 2, 3). É entretando, de importância assinalar que se esse é o comportamento ponderal dos ratos normais, os que recebem dieta de baixa concentração protéica apresentam um desenvolvimento ponderal bem inferior. Isto é de se esperar e provavelmente reflete uma consequência da adaptação baixa ingestão protéica. O que é importante ressaltar é o fato de que os animais mal nutridos, recebendo o estímulo adicional de contenção, não apresentam perda adicional do pêso corporal. Isso poderia ser esperado considerando o que se verificou nos animais normais submetidos a esse tipo de estímulo. Parece então, que o animal já submetido à baixa ingestão protéica por alterações funcionais ou defesa da sua homeostase, não agravaria o seu precário desenvolvimento ponderal, quando submetido a um estímulo alarmante adicional.

2. *Estudo de diferentes órgãos*

O pêso do coração por 100 g de pêso corporal é maior nos animais recebendo alimentação normal mais contenção, do que naqueles alimentados com dieta controle. Como nós assinalamos que os primeiros (dieta controle mais contenção) têm um desenvolvimento ponderal menor que os segundos (dieta controle), podemos inferir que a contenção é responsável por um aumento relativo do órgão.

No grupo de animais carentes o aumento relativo do pêso cardíaco em relação ao pêso corporal é ainda maior e esse aumento acentua-se nos animais carentes recebendo contenção, como estímulo adicional. Interpretamos esse fato como decorrente da tentativa de preservar o órgão em condições de manter a sua integridade e funcionabilidade. Porém quando estudamos as fibras miocárdicas com técnica histoquímica (14) encontramos alterações bastante graves. Com esta técnica notamos grande sofrimento da fibra cardíaca nos ratos com baixa ingestão protéica porém, quando associamos à contenção o comprometimento do miocárdio é evidente. Além das lesões hipoxêmicas observamos também miocitólise das fibras cardíacas.

Não encontramos alterações hepáticas microscópicas dignas de nota para os animais recebendo ou não "stress" por contenção. Os animais com baixa ingestão protéica mostram intensa esteatose hepática difusa, confirmando a literatura (7, 12). Quando associamos a baixa ingestão protéica mais "stress" por contenção, as alterações histológicas são da mesma intensidade que a deficiência protéica isolada.

O baço dos animais experimentais também não apresentam diferenças nos índices ponderais entre os vários grupos. Contudo, encontramos alterações microscópicas que consideramos de importância para serem comentadas.

A contenção, isoladamente, não produz alteração microscópica do baço nos animais, algumas são verificadas em grau reduzido nos animais de baixa ingestão protéica e mais acentuadas nos animais submetidos à associação de baixa ingestão mais contenção. Nos animais carentes a arquitetura folicular é normal, mas o número de folículos está diminuído que estamos de acôrdo com a literatura (7) e este é mais agravante na associação de estímulos.

As alterações morfológicas encontradas nos testículos dos animais nos parecem de grande importância em relação às possíveis repercussões que possam ter na reprodução. Os animais que só foram imobilizados semanalmente e alimentados com dieta controle, não exibem diferenças estatisticamente significantes no pêso relativo de seus testículos comparados com o grupo que não recebeu contenção. Porém, o estudo microscópico demonstra um atraso da espermatogênese, pois eles apresentam raras espermáticas, ao contrário dos ratos controles em plena atividade sexual. Esses dados concordam com a literatura (4; 17) e o "stress" é responsável por um retardo do desenvolvimento sexual. Os animais com baixa ingestão de proteína mostram uma diminuição significativa dos pêsos de seus

testículos em relação aos animais com alimentação controle. O estudo microscópico desses órgãos, apresentam grande atraso sexual, porém, com algumas espermátides jovens. As alterações acentuam-se quando os animais de baixa ingestão protéica recebem "stress" por contenção. Nossos achados em relação à deficiência protéica são semelhantes aos dados de literatura (8). Parece nos um fato novo e de maior importância, termos encontrado além do mesmo grau de redução ponderal, lesões microscópicas maiores e mais acentuadas do testículo, nos animais submetidos a baixa ingestão protéica mais contenção. Portanto, o "stress" por contenção ou por baixa ingestão protéica afeta o desenvolvimento sexual dos animais, mas a associação dos dois estímulos tem efeitos somatórios agravantes que, sem dúvida, podem afetar a atividade reprodutiva dos animais.

As alterações morfológicas observadas no coração, baço e testículo na associação de baixa ingestão protéica e contenção nos parecem de grande importância, pois os efeitos são agravados pela ação dos dois estímulos. Essa associação é possível de ser encontrada na vida prática e isto pode tornar-se importante para explicar reações diferentes de indivíduos, bem ou mal nutridos, frente a estímulos alarmantes adicionais.

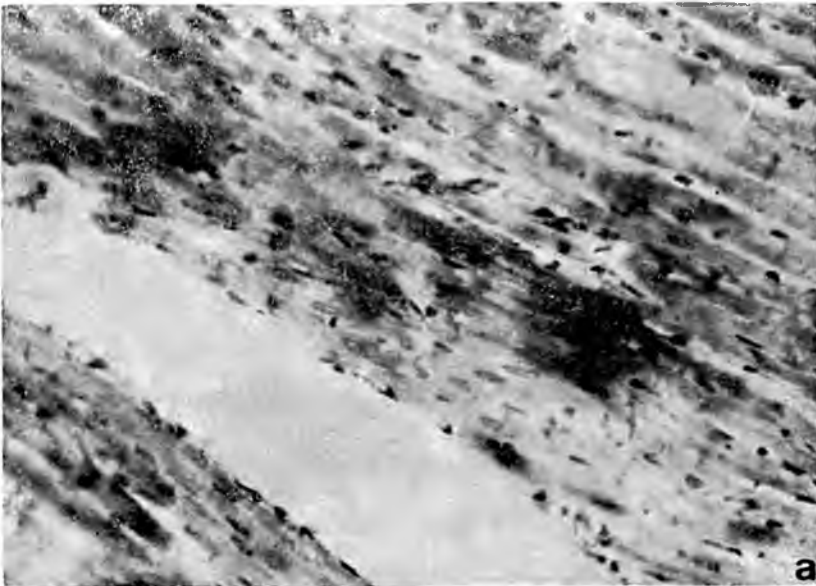


Figura 1-a

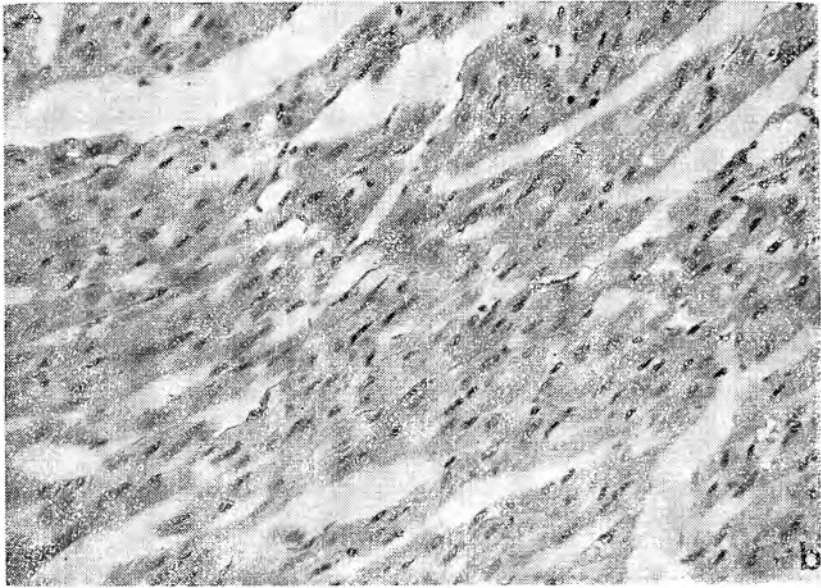


Figura 1-b

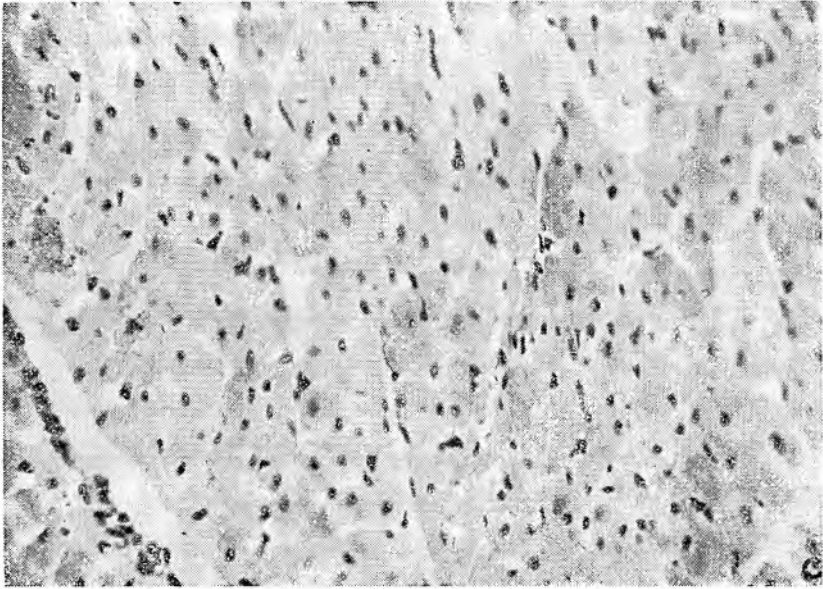


Figura 1-c

FIG. 1: Coração de rato: a. contensão mais baixa ingestão protéica - reação forte; b. contensão mais alimentação controle - reação fraca; c. baixa ingestão protéica - reação negativa. A. - 120 x. ABFP.

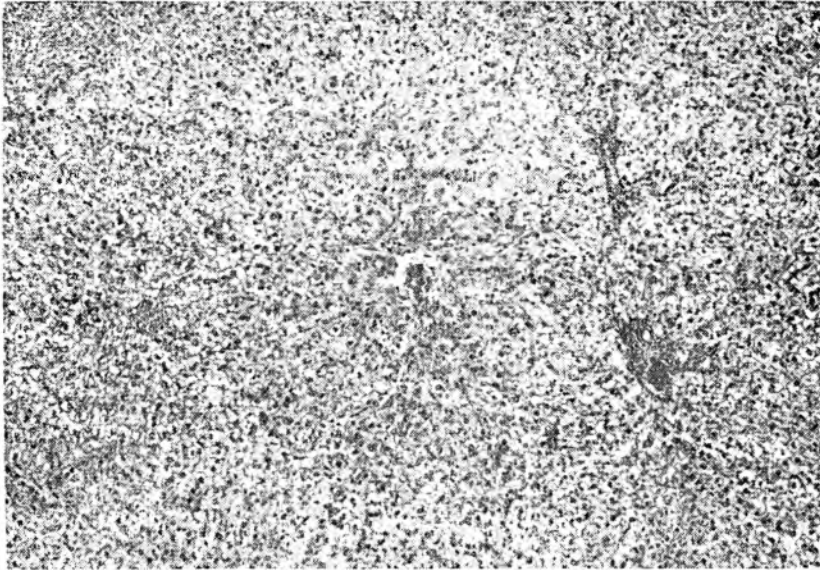


Figura 2

FIG. 2: Fígado de rato: animal que recebeu "stress" por contenção e dieta deficiente em caseína. Nota-se grande esteatose difusa. A. 25 x. HE.

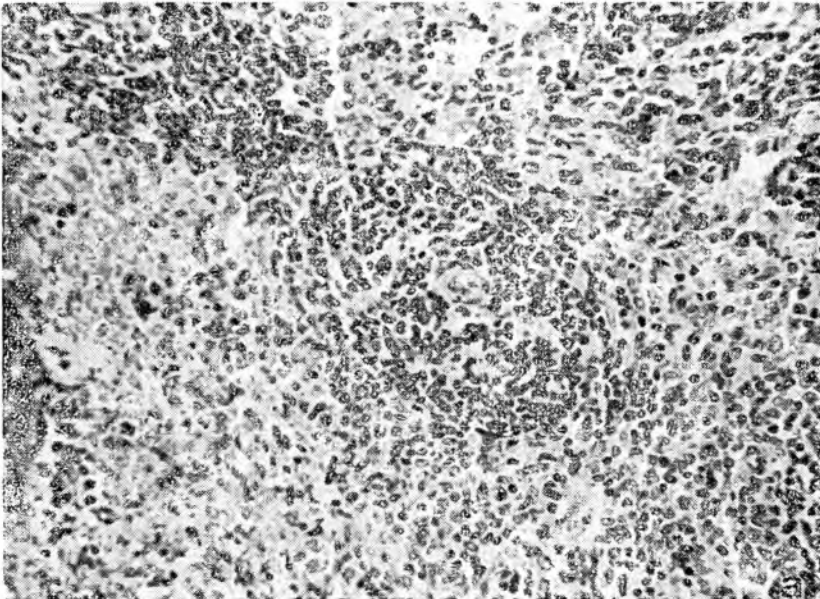


Figura 3-a

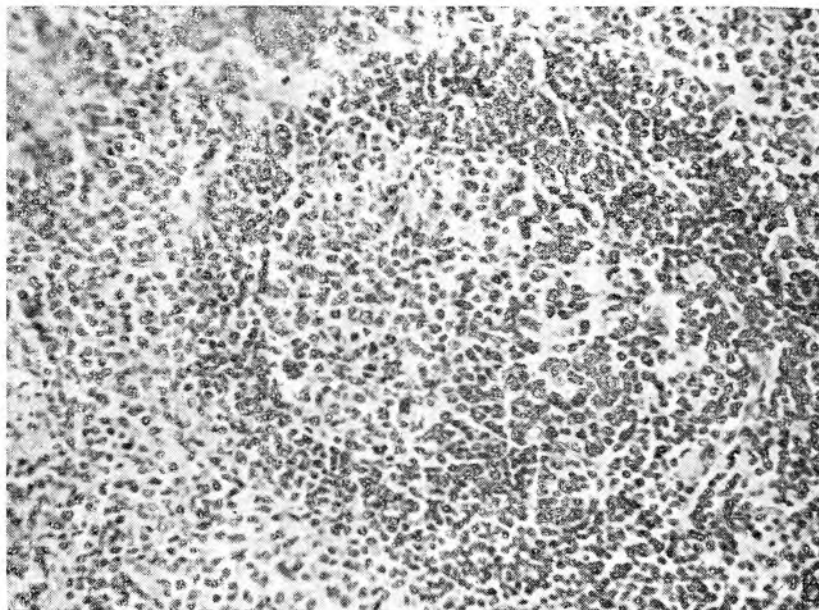


Figura 3-b

FIG. 3: Baço de rato: a. contensão mais baixa ingestão protética folículos atróficos; b. baixa ingestão protética - folículos normais. A. 120 X. HE.

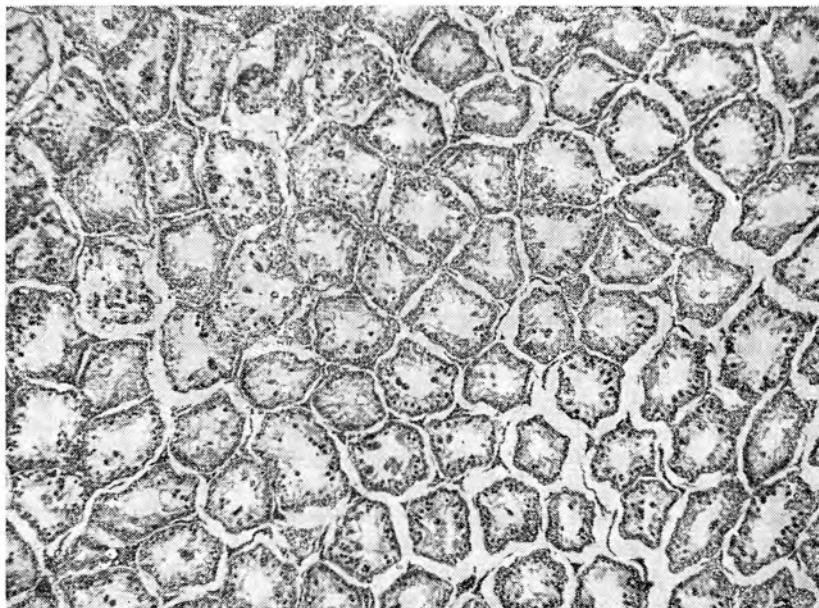


Figura 4-a

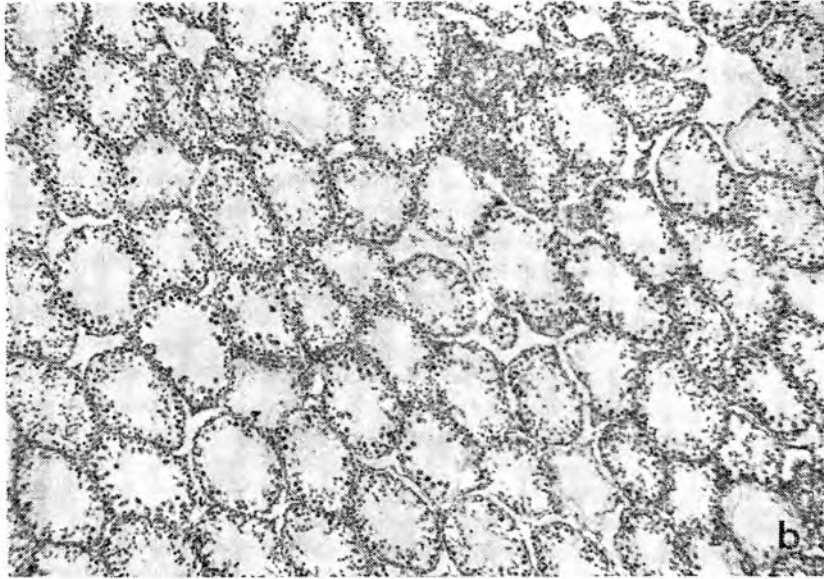


Figura 4-b

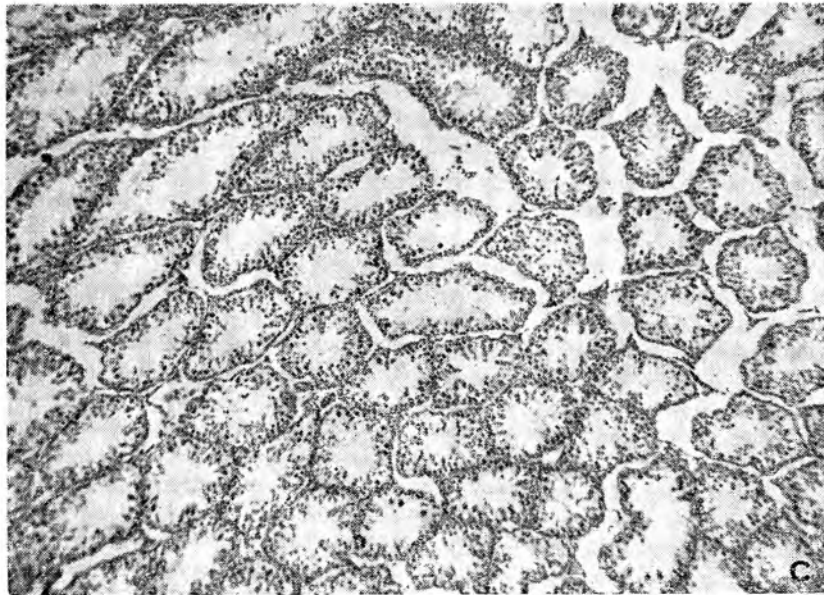


Figura 4-c

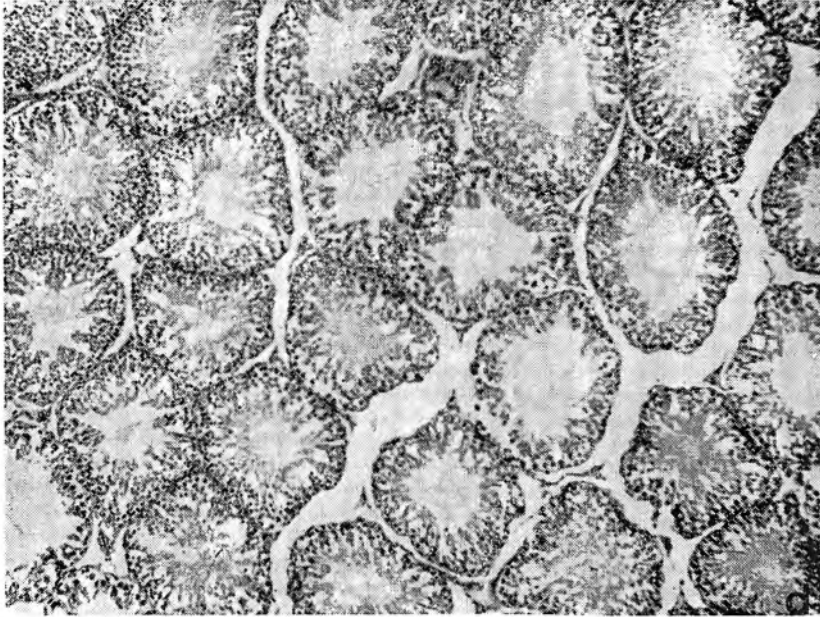


Figura 4-d

FIG. 4: Testículo de rato: a. contensão mais baixa ingestão protéica - destruição total do epitélio germinativo; b. baixa ingestão protéica - epitélio germinativo parcialmente destruído; c. contensão mais alimentação controle - discreta espermiogênese e poucas espermatídes jovens; d. alimentação controle - arquitetura normal. A. 30 X. HE.

SUMMARY

Stress due to immobilization and low protein intake in rats. II. Morphologic alterations.

The periodic immobilization of the animals receiving a control diet resulted in a smaller weight gain than in controls. The animals fed a protein deficient diet gained also less weight as compared to controls. The association of the deficiency and the stress of immobilization further decreases the weight gain, but the differences were not significant.

The animals submitted to restraint or protein deficiency stress showed an increase in their heart weight in relation to body weight. This increase is more significant when immobilization and protein deficiency were associated. The degree of cardiac muscle fibers damage was also found more pronounced in this group of animals, when analysed through histochemical methods. Liver weight was not found different in the animals submitted to the experimental program. Histological examination of this organ showed fatty infiltration in the protein deficient animals. The picture was not found to be aggravated when the animals were further stimulated by the restraint mechanism.

Spleen weight was found to be similar in all groups. Histological study of the protein deficient group showed small lesions, that were increased when the deficiency was associated to immobilization.

The relative testis weight of the restraint animals receiving the control diet was found to be similar to the animals not immobilized. The protein deficient animals have significantly smaller testis weight than the well nourished group. The histologic study showed that restraint or protein deficiency are responsible for a sexually retarded animal, but the lesions increased with the association of restraint and deficiency.

BIBLIOGRAFIA

1. Tadakoro, Y. Nutrition under abnormal environment. 1. Influence of vibration upon protein metabolism. *Jab. J. Nutrition* 1963, **21**: 148-151.
2. Friedman, S. B. and Ader, R. Parameters relevant to the experimental production of stress in the mouse. *Psychosom. Med.* 1965, **27**: 27-30.
3. Pfeiffer, C. J. The physiologic effects restricted activity in the rat. Stress effects of chronic restraint. *Exp. Med. Surg.* 1967, **25**: 201-217.
4. Selye, H. The physiology and pathology of exposure to stress. *Acts. Inc. Montreal, Canada*, 1950.
5. Lamy, M., Lamott, M. and Lamotte-Barrillon, S. La denutrition: Clinique, Biologie, Therapeutique. G. Doin, Paris, 1948 (cit. por Selye, 1950).
6. Zubiran, S. and Gomez-Mont, F. Endocrine disturbance in chronic human malnutrition. *Vitamins and Hormones*, 1953, **11**: 97-132.
7. Deo, M. G., Sood, S. K. and Ramalingaswami, V. Experimental protein deficiency (pathological features in the rhesus monkey). *Arch. Path.* 1965, **80**: 14-23.
8. Widdowson, C. M. and Cowen, J. The effect of protein deficiency and calorie deficiency on the reproduction of rats. *Br. J. Nutr.* 1972, **27**: 85-95.

9. Scrimshaw, N. S., Behar, M., Arroyave, G., Tejada, G., and Viteri, F. Kwashiorkor in children and its response to protein therapy. *J. A. M. A.* 1957, **164**: 555-561.
10. Chauhan, S., Naryak, N. C. and Ramalingaswami, V. The heart and skeletal muscle in experimental protein malnutrition in rhesus monkeys. *J. Path. Bacth.* 1965, **90**: 301-309.
11. Reindorp, S. and Whitehead, R. G. Malnutrition and heart size. *Nature* 1970, **227**: 404-406.
12. Endonwu, C. O. and Sreebny, S. C. Studies of hepatic lesions of experimental protein-caloria malnutrition in rats and immediate effects of refeeding on adequate protein diet. *J. Nutrition* 1971, **101**: 501-514.
13. Zucoloto, S., Mello de Oliveira, J. A., Moura Duarte, F. A. e Dutra de Oliveira, J. E. "Stress" por contenção e por baixa ingestão proteica em ratos. I. Alterações bioquímicas. *Arch. Latinoamer. Nutr.* **25**: 375-384, 1975.
15. Yates, F. The principles of orthogonality and confounding in replicated experiments. *J. Agr. Sci.* 1933, **23**: 108-145. (cit. por Steel e col., 1960).
16. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. Principles and procedures of statistics. Analysis of variance III: factorial experiments. McCraw-Hill Book Company, Inc. New York, Toronto, Londo, 1960.
17. Platt, B. S. and Stewart, R. J. C. Experimental-protein calorie deficiency: histopathological changes in the endocrine glands of pigs. *J. Endocr.* 1967, **38**: 121-143.