

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE ACÚSTICO DE ALTA FREQUÊNCIA
NO BALANÇO NITROGENADO DE RATOS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ELAINE GUARALDO e aprovada pela Comissão Julgadora em 01.10.96 Campinas, 01 de outubro de 1996

Prof. Dr. JAIME AMAYA-FARFÁN
Presidente da Banca



ELAINE GUARALDO
NUTRICIONISTA

JAIME AMAYA FARFAN
ORIENTADOR

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição

1996

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan

(orientador)



Prof. Dr. Gilberto de Assunção Fernandez

(membro)



Prof.^a Dr.^a Regina Célia Spadari-Bratfish

(membro)

Prof.^a Dr.^a Débora de Queiroz Tavares

(membro)

Campinas, 01 de outubro de 1996

**À Luzia Lavanholi pelo apoio, incentivo,
dedicação e, principalmente, pelo exemplo.**

AGRADECIMENTOS

- Ao CNPq pela bolsa concedida no decorrer do curso;
- À Roche e a Fleishman (Rodrigues Pinto Gelatina) que cederam a mistura vitamínica e a gelatina, respectivamente;
- À Thorton Inpec Eletrônica Ltda. pelas informações técnicas;
- Ao Serviço de Segurança do Trabalho (UNICAMP) pelas informações e pelo empréstimo do decibelímetro;
- Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan pela orientação segura ao longo das dificuldades;
- Ao Prof. Dr. Gilberto de Assunção Fernandez, pela valiosa contribuição e sugestões na elaboração deste trabalho;
- À Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares pelo apoio concedido através do empréstimo de materiais e equipamentos;
- À Judite Guimarães Lapa (FEA), Roberto César Stahl (Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental), Laurione Cândido Oliveira (Laboratório de Fisiologia Clínica do H.C. de Campinas) e Carla de Marco Greggi (FEA) pelo apoio técnico;
- À Eliete de Carvalho Leite (Laboratório de Ensaaios Biológicos) e Prof^a Dr^a.Erna Vogt de Jong pelo auxílio com os animais experimentais;
- Aos amigos Cecília, Ruth, Luis, José Eduardo, Roberto, Paulo e Cíntia por tornarem as dificuldades mais amenas;
- Às Prof^{as}., M.Sc.s. Lusiele G. Mateucci e Franceli Guaraldo pelo apoio na execução do trabalho;
- Ao Engenheiro Agrônomo, M.Sc, Fábio de Almeida Domingues pelo incentivo, paciência e auxílio na confecção deste trabalho;
- À Prof^a. Luzia Lavanholi, pela revisão ortográfica;

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. HISTÓRIA E CONCEITO DE "STRESS"	3
2.2 - O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL	5
2.3 - O METABOLISMO DOS GLÍCIDES, LÍPIDES E PRÓTIDES NO ESTRESSE.....	10
2.4 - O ESTÍMULO SONORO	14
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 - MATERIAL	20
4.1.1 - Animais	20
4.1.2 - Rações.....	20
4.1.3 - Reagentes para as determinações químicas	24
4.2 - MÉTODOS	24

4.2.1 - <i>Determinações Químicas</i>	24
4.2.1.1 - Nitrogênio.....	24
4.2.1.2 - Corticosterona sérica	24
4.2.2. - <i>Ensaio Biológico</i>	25
4.2.3 - <i>Estresse Acústico</i>	26
4.2.4. - <i>Coleta de sangue</i>	26
4.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 - EFEITO DO ESTRESSE NO BALANÇO DE NITROGÊNIO (NITROGÊNIO INGERIDO, NITROGÊNIO FECAL E NITROGÊNIO URINÁRIO)	29
5.2 - CONSUMO ALIMENTAR	35
5.3 - PESO CORPORAL.....	38
5.4 - CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA SÉRICA	44
5.5 - COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS	48
6. CONCLUSÃO.....	50
7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMAS PESQUISAS	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

INDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1. FORMULAÇÃO DAS DIETAS UTILIZADAS NO ENSAIO BIOLÓGICO.....	21
TABELA 2. MISTURA VITAMÍNICA AIN-76.....	22
TABELA 3. MISTURA SALINA AIN-76.....	23
TABELA 4. VALORES MÉDIOS DE NITROGÊNIO INGERIDO, NITROGÊNIO FECAL E NITROGÊNIO URINÁRIO EM FUNÇÃO DO NÍVEL PROTÉICO E DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO ESTRESSE ACÚSTICO	30
TABELA 5. VALORES MÉDIOS DE BALANÇO NITROGENADO EM FUNÇÃO DO NÍVEL PROTÉICO E DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO ESTRESSE ACÚSTICO	33
TABELA 6. MÉDIAS DE CONSUMO ALIMENTAR NOS SETE DIAS DE ENSAIO EM FUNÇÃO DO NÍVEL PROTÉICO E DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO ESTRESSE ACÚSTICO.....	36
TABELA 7. NÍVEIS DE CORTICOSTERONA SÉRICA NOS ANIMAIS DA CATEGORIA CONTROLE E NOS SUBMETIDOS A ESTRESSE ACÚSTICO NO INÍCIO E NO FINAL DO ENSAIO.....	45
FIGURA 1. EVOLUÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS CONTROLE DURANTE O PERÍODO TESTE.....	39
FIGURA 2. EVOLUÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS SUBMETIDOS A ESTRESSE ACÚSTICO DURANTE O PERÍODO TESTE.....	40
FIGURA 3. VALORES MÉDIOS DE GANHO DE PESO CORPORAL DURANTE O PERÍODO TESTE.....	41

RESUMO

A avaliação nutricional de novos alimentos ou de novos componentes alimentares em animais experimentais é um procedimento rotineiro nos laboratórios biológicos assumindo que quaisquer condições ambientais desconhecidas ou fora de controle vão afetar, igualmente, tanto os animais experimentais como os controle. O objetivo deste trabalho foi de verificar se a estimulação sonora de alta frequência (40 kHz, 60 a 66 dB) poderia significar um estresse importante em ratos submetidos a um balanço nitrogenado de sete dias. Quatro grupos de seis ratos Wistar cada, recém desmamados, foram adaptados a dietas de alto teor protéico/boa qualidade protéica (18% de caseína - Dieta I), baixo teor protéico (5% de caseína - Dieta II), baixa qualidade protéica (18% de gelatina - Dieta III) e aprotéica (Dieta IV), e foram estimulados diariamente por uma hora, durante o período de ensaio (7 dias). Os parâmetros ganho de peso corporal, ingesta alimentar, balanço nitrogenado e concentração sérica de corticosterona dos grupos acima foram comparados com seus controles, os quais não receberam o estímulo ultrassônico. Nenhuma diferença no ganho de peso corporal foi observado entre os grupos experimentais e seus controles. No entanto, o consumo alimentar diminuiu em todos os grupos expostos ao ultrassom, mas as diferenças foram significativas apenas para as dietas II (diminuição de 26%) e III (diminuição de 33%) do grupo estressado. Com relação ao balanço de nitrogênio, foi encontrada diminuição de 13% para a dieta de alto teor protéico/boa qualidade protéica, enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para as dietas com quantidade deficiente de proteína e para as dietas desbalanceadas (grupos II, III e IV). Este resultado foi consistente com o aumento de 134% nos níveis de corticosterona dos animais alimentados com a dieta I, e com a resposta pouco acentuada dos animais alimentados com dietas deficientes em proteína ou desbalanceadas. Os resultados sugerem que embora branda, a estimulação ultrassônica como as produzidas por geradores, condicionadores e exaustores são capazes de induzir estresse, cujos efeitos poderiam ser medidos em termos de ingesta alimentar, balanço alimentar e nível de hormônios esteróides no sangue; sendo este estresse mais pronunciado nos animais que consomem as dietas de boa qualidade.

ABSTRACT

Nutritional evaluation of new foods or new food ingredients with experimental animals is routinely performed in our laboratory facilities assuming that whatever environmental conditions that are left, knowingly or otherwise, out of control will affect both experimental and control animals alike. The purpose of the present work was to verify if high frequency (40 kHz, 60 a 66 dB) sound stimulation should signify any considerable stress to rats undergoing a seven-day nitrogen-balance test. Four groups of six growing Wistar rats each, which had been adapted to either high-quality/high-protein (18% casein, diet I), low protein (5% casein, diet II), poor quality protein (18% gelatin, diet III) and no protein (diet IV) were stimulated daily for one hour, for the duration of the assay (seven days). The parameters body-weight gain, feed intake, nitrogen balance and serum concentration of corticosterone of the above were compared with those of parallel control groups, that did not receive the ultrasonic stimulation. No difference in body-weight gain was noticed between the experimental groups and their controls. Nevertheless, food consumption decreased for all groups exposed to ultrasound, but differences were significant only for diets II (26% down) and III (33% down), under stress. Regarding the nitrogen balance, a decrease of 13% was found for the high-quality, high-protein diet, while no significant differences were observed for the protein-deficient or imbalanced (groups II, III and IV) diets. This finding was consistent with the increase of 134% in the corticosterone levels of the animals feeding on diet I, and the flat response of the animals feeding on the protein deficient or imbalanced diets. The results suggest that although mild, ultrasonic stimulation, such as that produced by power generators, air conditioners and exhaust hoods, is capable of inducing stress in the Wistar rat, whose effects could be measured in terms of food intake, nitrogen balance and steroid hormone levels in the blood. The stress is more pronounced in animals consuming the high quality diets.

1. INTRODUÇÃO

A palavra "stress" tem sido acrescentada ao nosso vocabulário do dia-a-dia significando mais uma das doenças modernas.

Segundo a OIT (Organização Internacional do Trabalho, 1992) o estresse "está se tornando um fenômeno global, que atinge todos os países, muitas categorias de trabalhadores, famílias e a sociedade em geral" e "seu custo para o indivíduo, para a indústria e para a sociedade é grande e crescente". Por esse motivo, muitos países estão investindo em programas de prevenção e combate ao estresse.

O estresse é toda força ou estímulo externo de intensidade acima do tolerável pelo indivíduo, incluindo tanto estímulos físicos como ruído, exposição a calor ou frio, dor, choque, estados de exaustão, infecção, cirurgias, desnutrição, etc.; quanto os psicológicos, como medo, tensão, ansiedade, morte em família, etc. provocando reações fisiológico-bioquímicas que trazem consequências profundas no desempenho orgânico, inclusive de ordem nutricional, especialmente quando o fator é de ação prolongada, conhecidas como "estado de estresse"

Uma das principais fontes de estresse ambiental é o ruído, que expõe vários trabalhadores de indústrias, aeroportos, entre outros, a conviverem diariamente com níveis sonoros de alta intensidade. O estresse vai além do ambiente de trabalho como resultado da vida nos grandes centros urbanos. Por exemplo, somos submetidos ao barulho de tráfego urbano e aéreo, construção civil além dos ruídos provenientes de eletrodomésticos, música alta, etc. cuja exposição prolongada pode provocar perda de audição e outros transtornos físicos, como os cardiovasculares (ROSENBERG, 1991) e os psicológicos (IVANOVICH et al., 1994; MELAMED & GREEN, 1991) diminuindo a produtividade e aumentando o risco de acidentes de trabalho. São

necessárias mais pesquisas para esclarecer se o ruído por si só é responsável por estas alterações ou se a ele se somam outros estresses ambientais (HORVATH & BEDI, 1990).

Da mesma maneira, o ruído ambiental, muitas vezes não intencional, pode representar um fator de agressão a animais de laboratório causando alterações fisiológicas e comportamentais e, até, comprometendo o resultado final dos experimentos (MILLIGAN et al., 1993) .

No campo da nutrição experimental, os fatores de estresse externo se somam de uma forma variável e imprevisível, aos fatores do estresse nutricional gerados pelo próprio experimento. Esses fatores externos, entretanto, não são levados em conta, sendo seus efeitos, no resultado final do experimento, desprezados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *História e conceito de "Stress"*

O conceito de estresse é relativamente recente e data do início deste século. O médico e cientista austríaco Hans Selye (1907-1982) é considerado o pioneiro no assunto, não por que tenha sido o único a observar alterações características provenientes de agressões ao organismo, mas, sem dúvida, foi o pesquisador que primeiramente descreveu e teceu uma teoria a respeito do tema. Em uma de suas publicações (1976), cita vários autores do século passado que, assim como ele, observaram características da "Síndrome de estar doente", termo dado pelo próprio Selye. Sua publicação inicial foi em 1936, num artigo de três páginas, publicado na revista Nature (SELYE, 1936 citado por SELYE, 1976) onde descreveu suas observações em ratos submetidas a estímulos nocivos agudos. Após essa publicação, pesquisas de diversos autores foram adicionadas e, atualmente o Index Medicus mostra centenas de trabalhos.

Em sua prática médica, Selye já havia observado que pacientes sofrendo de diversas patologias apresentavam sinais e sintomas em comum como a perda de peso e de apetite e a expressão "doente". Mais tarde, em experimentos com animais, Selye observou uma tríade de sintomas em ratos submetidos a injeção de extratos ovarianos de gato: córtex adrenal aumentado, atrofia tímico-linfática e úlcera gastrointestinal. Esta reação foi chamada de GAS (General Adaptation Syndrome).

De acordo com Selye (1946), a Síndrome Geral de Adaptação é dividida em três estágios:

a) Reação de alarme (fase aguda): *“É a somatória dos fenômenos sistêmicos não específicos resultantes de uma exposição rápida a um estímulo para o qual o organismo não está quantitativamente e qualitativamente adaptado”*; isto é, é a reação inicial ao agente estressor, e onde há predominância de resposta nervosa pela ativação do sistema nervoso simpático, através de descarga dos hormônios adrenalina e noradrenalina, além dos glicocorticóides.

b) Estágio de resistência (fase crônica): *“É a somatória das reações sistêmicas não específicas resultantes de uma exposição prolongada para o qual o organismo adquiriu adaptação como resultado de exposição contínua ao estímulo”*. Se o animal resistir à fase de alarme passa então à fase de resistência onde o organismo se adapta à presença do agente estressor e a glândula adrenal passa a secretar glicocorticóides em menor quantidade em resposta aos estímulos vindos da hipófise e hipotálamo.

c) Estágio de exaustão: *“É a somatória das reações sistêmicas que finalmente se desenvolvem, como resultado de uma exposição muito prolongada ao estímulo para o qual a adaptação tinha sido desenvolvida, mas que não pode mais ser mantida”*. Se a exposição ao agente estressor continua ou é muito intensa esta adaptação pode ser rompida dando início à fase de exaustão, e o animal pode morrer.

Assim, o estresse é a resposta orgânica a qualquer tipo de estímulo extraordinário - seja por sua intensidade ou duração - que altere os limites normais da homeostase orgânica. Ao contrário do que possamos pensar, sem ele o organismo poderia entrar em falência por falta de um alarme geral que resulte no fornecimento de uma solução definitiva à ultrapassagem dos limites dos mecanismos homeostáticos.

Embora a resposta não seja específica aos tipos de estresse, a natureza e magnitude da resposta depende de uma série de variáveis que vão desde a intensidade do estímulo agressor até as diferenças individuais de quem o recebe. Por isso,

organismos diferentes percebem um fator de estresse em graus diferentes (McEWEN & STELLAR, 1993).

Essas diferenças na forma de perceber estímulos são atribuídas a predisposições genéticas, estágio biológico de desenvolvimento e história individual de cada um, ou seja, características biológicas e psicológicas. Essas características individuais vão levar a diferenças na susceptibilidade ao estresse (McEWEN & STELLAR, 1993).

Seja qual for a razão, se a homeostase falha por “adaptação” inadequada ao agente estressor, este mecanismo se traduzirá em respostas biológicas chamadas “Doenças da Adaptação” (SELYE, 1946), tais como asma, diabetes, câncer, infecções virais, desordens gastrointestinais, etc. e envolvem mecanismos neurais, endócrinos e imunes (McEWEN & STELLAR, 1993).

2.2 - O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

A relação entre o hipotálamo e a hipófise não provém somente da proximidade anatômica dada pela ligação através do pedúnculo hipofisário, mas também do funcionamento interligado de ambos.

A hipófise, também chamada de glândula pituitária, é controlada pelas secreções provenientes do hipotálamo. Tudo se inicia a partir de um estímulo (interno ou externo) proveniente do sistema nervoso, que alcança o hipotálamo induzindo a síntese de hormônios liberadores e inibidores. Estes são sintetizados nos corpos celulares dos neurônios hipotalâmicos, percorrem os axônios e são armazenados nas terminações nervosas, situadas na neurohipófise ou na eminência mediana. Uma vez estimulado o hipotálamo, os hormônios são liberados das terminações nervosas

diretamente na hipófise posterior ou então, liberados na eminência mediana e absorvidos pelos capilares do sistema porta hipotálamo-hipofisário para serem transportados até hipófise anterior (RUSKIND & MARTIN, 1989 ; BERNE & LEVY, 1990).

Entre os hormônios liberadores ou inibidores , destacam-se: THR (hormônio liberador da tireotrofina), CRH (hormônio liberador da corticotrofina), GHRH (fator liberador do hormônio de crescimento), somatostatina (hormônio inibidor do hormônio de crescimento), LHRH (hormônio liberador do hormônio luteinizante), PIF (fator inibidor da prolactina) e PRF (fator liberador da prolactina). A hipófise, sob o estímulo dos mesmos, sintetiza hormônios tróficos, cujo papel nas funções fisiológicas se dará pelo estímulo direto nos tecidos/órgãos alvo, ou pelo estímulo de outras glândulas. Os hormônios secretados pela hipófise são o GH (hormônio de crescimento), ACTH (hormônio adenocorticotrófico), LH (hormônio luteinizante), TSH (hormônio tireoestimulante), prolactina - secretados pela adenohipófise - e o ADH (hormônio antidiurético) e oxitocina - que são sintetizados no hipotálamo mas são secretados pela neurohipófise (WILSON & FOSTER, 1992).

Alguns destes hormônios liberadores do hipotálamo não controlam somente a secreção de um único hormônio hipofisário como é o caso do TRH que estimula a secreção de tireotrofina e de prolactina; a somatostatina que além de inibir o GH pode também inibir a secreção de tireotrofina e prolactina (BERNE & LEVY, 1990).

No final deste eixo temos as glândulas supra-renais (ou adrenais), situadas na parte superior dos rins, que produzem, principalmente, adrenalina e em menor quantidade noradrenalina , em resposta aos estímulos do simpático, e corticosteróides em resposta aos estímulos hormonais da hipófise. A secreção dos corticoesteróides é controlada pelo CRH, que por sua vez, estimula a liberação de ACTH que ao alcançar as adrenais estimula as zonas fasciculada e reticular do córtex a secretarem principalmente glicocorticóides, embora também estimule discretamente a produção de

mineralocorticóides (pela zona glomerular) e hormônios sexuais. O ACTH age ligando-se a receptores específicos na superfície celular do córtex adrenal promovendo a conversão do colesterol a pregnenolona, um dos compostos intermediários da síntese dos hormônios esteróides. Entre as ações do ACTH neste processo estão a ativação, estimulação e regulação da síntese enzimática envolvida na formação destes compostos (SIMPSON & WATERMAN, 1989).

Resumindo, a partir de estímulos provenientes do sistema nervoso, o hipotálamo produz CRH que induz a secreção de ACTH e que, por sua vez, leva à produção de glicocorticóides, os chamados hormônios do estresse.

Entre os glicocorticóides temos a predominância do cortisol ou corticosterona dependendo da espécie animal em questão. No caso de ratos, a corticosterona é o principal glicocorticóide secretado e, no homem, o cortisol (BERNE & LEVY, 1990).

A secreção do CRH pelo hipotálamo, seguida de todo mecanismo descrito acima, segue uma dinâmica ditada, primeiramente pelo ritmo circadiano natural de cada espécie. No homem, tanto o ACTH quanto o cortisol atingem seu pico pela manhã, caindo ao longo do dia e no rato os níveis plasmáticos se mostram menores no começo da manhã até cerca de 11:00 horas, depois do que começam a aumentar atingindo seu pico por volta das 17:00 horas (DUNN et al., 1972). No homem, este ciclo estaria ligado principalmente ao período sono/vigília e às atividades sociais, enquanto que em animais o ciclo luz/escuridão seria responsável pelo ritmo secretório destes hormônios (HALE & REES, 1989). O segundo fator responsável seria o estímulo de um agente estressor a nível hipotalâmico.

Em condições normais, a regulação dos níveis de glicocorticóides é feita através de feedback negativo, onde o próprio cortisol/corticosterona inibe a produção de CRH, a nível hipotalâmico e de ACTH a nível hipofisário. No entanto, no estresse,

este mecanismo pode estar alterado e seu estímulo se superpõe ao ritmo circadiano e ao mecanismo de feedback negativo (DALLMAN & JONES, 1973).

Assim, temos um aumento circulante de glicocorticóides em situações de estresse. No entanto, outros hormônios estão ligados à resposta ao estímulo, tais como os mineralocorticóides e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), LH (hormônio luteinizante), FSH (hormônio foliculo-estimulante), prolactina, ACTH e AMP cíclico, entre outros.

O uso desses marcadores depende da sua sensibilidade como indicador do estado de estresse.

As catecolaminas, aumentadas nestas situações, são consideradas bons índices humorais porque são sensíveis principalmente à intensidade da agressão sofrida. NATELSON et al. (1981) submeteu animais ao estresse agudo por choque em crescentes intensidades, e encontrou aumento uniforme à intensidade do choque da adrenalina e noradrenalina. No entanto, um problema observado pelos autores foi o aumento da variabilidade das respostas ao redor da média, dificultando a detecção exata da magnitude do estresse.

A prolactina, também usada por ser um índice sensível, parece refletir melhor a sensibilidade para o estresse agudo do que para o crônico (KANT et al., 1983, 1987).

Os glicocorticóides, como a corticosterona nos animais experimentais, são considerados como um bom índice de avaliação de estresse, mostrando valores plasmáticos alterados tanto na forma aguda quanto crônica, em estímulos comprovadamente agressivos como a imobilização, choque e o esforço de corrida. KANT et al. (1983); HENNESSY et al. (1979) e PITMAN et al. (1988) também validam o uso deste hormônio como índice de avaliação ao estresse.

Em função do exposto, vamos considerar neste trabalho a corticosterona para avaliação e comparação do estresse entre os grupos.

Um dos obstáculos para análise dos perfis hormonais e sua consequente resposta, são as diferenças encontradas nas concentrações plasmáticas, decorrentes do tipo, intensidade, tempo e número de exposições, além dos intervalos entre esses estressores. A exposição múltipla de um mesmo estímulo pode alterar a resposta humoral, na medida em que parece haver um mecanismo de adaptação ao estímulo. De uma maneira geral, a repetição a determinado agente estressor leva a uma resposta hormonal menor a cada sessão. Entretanto, essas observações não são compartilhadas por outras pesquisas como a de PITMAN et al., (1988) que avaliaram a resposta hormonal da corticosterona (definida como a diferença dos níveis pré-estresse e pós-estresse) em ratos submetidos a 60 minutos de contenção por imobilização das patas ou por restrição de movimentos em tubos. No primeiro grupo, o hormônio se habituou parcialmente até o sétimo dia, principalmente em função dos altos níveis basais; porém ainda havia grande resposta ao estresse. No segundo grupo, cujo estressor é considerado menos severo, não houve adaptação hormonal mesmo após 21 dias de repetição. Os níveis basais (ou anteriores às sessões de estresse) apresentaram-se crescentes, quando comparados aos níveis pós estresse, que se mantiveram constantes, mas altos.

KANT et al. (1987) mostrou que exposição a várias intensidades de choque durante 14 dias consecutivos, manteve altos os níveis plasmáticos de corticosterona durante os primeiros 7 dias, retornando aos valores normais somente no 14º. dia. O mesmo autor (1983), usando vários modelos de estresse (frio, imobilização, corrida, choque), com exposição de 15 minutos por 10 dias, não encontrou níveis elevados do hormônio entre as sessões de estresse, mas após as sessões, os níveis eram elevados, mostrando a não adaptação.

A controvérsia entre os resultados ressaltam a dificuldade de definir o estresse crônico como a elevação dos glicocorticóides durante ou entre a exposição ao estresse (PITMAN et al., 1988).

Uma possível explicação seria o tempo de intervalo entre as exposições, responsável pela volta aos níveis basais do hormônio, como observado por DE SOUZA & VAN LOON (1982) que analisaram os níveis de corticosterona após uma ou múltiplas sessões de restrição - por 2 minutos - e observaram que estes tendiam a se adaptar, se o intervalo entre os estímulos era de 30 ou 60 minutos; mas aumentando o intervalo para 90 minutos, o hormônio voltava aos níveis iniciais; isto é, assemelhava-se às concentrações encontradas após o primeiro estímulo (agudo). Os autores sugerem que a inibição da resposta da corticosterona a subsequentes estresses ocorre se os seus níveis ainda não tiverem retornado ao normal.

2.3 - O METABOLISMO DOS GLÍCIDES, LÍPIDES E PRÓTIDES NO ESTRESSE

Um dos estresses mais estudados tem sido os provocados por traumas e cirurgias, onde observamos alterações hormonais como aumento das catecolaminas, GH e glucagon; diminuição de hormônios tireoideanos e de insulina, com pouca alteração de TSH, FSH, LH. Em relação aos glicocorticóides há correlação entre sua concentração e o grau de injúria sofrido (WEISSMAM, 1990).

Nessas situações ocorrem alterações nutricionais como consequência das perturbações metabólicas induzidas pela agressão. Os mecanismos envolvidos nessas mudanças são bastante complexos já que abarcam uma série de interações endócrinas, que por sua vez vêm alterar o metabolismo glicídico, lipídico e protídico; Os hormônios de contra regulação - cortisol, catecolaminas e glucagon - aumentados nessas situações, desempenham papel importante neste quadro.

Em relação ao metabolismo dos carboidratos, principalmente duas vias estão estimuladas: a glicogenólise e gliconeogênese, que vão preferencialmente fornecer a energia necessária ao corpo. Esta última vai utilizar como substratos certos aminoácidos, lactato, piruvato e glicerol. É interessante notar que a despeito do aumento das necessidades energéticas no estresse, observa-se um quadro conjunto de hiperglicemia (devido à estimulação das duas vias) e hiperinsulinemia, causado por certa resistência periférica à insulina. Os hormônios da contraregulação são, em parte, responsáveis por essas alterações: as catecolaminas e o glucagon estimulam tanto a glicogenólise quanto a gliconeogênese, ao passo que o cortisol estimula principalmente esta última, além de bloquear a ação da insulina no tecido adiposo e muscular.

Como a captação e utilização da glicose está prejudicada, o fornecimento de energia virá também da oxidação lipídica, que estará aumentada tanto pela ação do glucagon e adrenalina, quanto do cortisol que potencializa a ação desses hormônios. Somando-se a estas respostas hormonais, a mediação de substâncias como as interleucinas (IL-1 e 6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) no estresse infeccioso ou cirúrgico, tem despertado grande interesse (DELARUE, 1990 ; WEISMAN, 1990).

Os aminoácidos que servem de substrato à gliconeogênese provêm principalmente da proteólise muscular, ocasionando grande perda nitrogenada. O balanço nitrogenado negativo observado nestes casos se deve ao fato do catabolismo superar a síntese de proteínas. KINNEY & ELWYN (1983) citam pesquisas que mostram que nas lesões severas, assim como nas queimaduras e sepsis, há aumento tanto na taxa de síntese quanto de catabolismo protéico, mas esta síntese pode estar em taxas inferiores à da quebra. As perdas nitrogenadas nestes casos parecem ser provenientes principalmente dos músculos. A rápida perda de peso que acontece no catabolismo das cirurgias está associada a um aumento das perdas nitrogenadas, consistente com a perda de massa muscular e capacidade de trabalho muscular. Nos primeiros dias, esta perda de peso pode ser predominantemente de água corpórea, mas

acima de duas ou três semanas, as perdas são de proteínas, gorduras e água. As perdas são tanto maiores quanto maior for a duração e a severidade da lesão (SCHILLER et al., 1979) e tendem a se normalizar na fase de recuperação. O perfil alterado dos hormônios contribui para o catabolismo aumentado: a insulina que teria efeito anti proteólise e pró síntese protéica tem sua secreção ou atividade diminuída pelos hormônios que se opõem à sua ação como os glicocorticóides e o glucagon (WEISSMAM, 1990; DELARUE et al., 1990).

Em função do quadro descrito acima, observa-se geralmente balanço nitrogenado negativo, como observado por SHAW et al. (1987) e SCHILLER et al. (1979), onde pacientes com diferentes graus de estresse cirúrgico excretavam grandes quantidades de creatinina e nitrogênio, e GIESECKE et al. (1994), que encontraram aumento do catabolismo protéico de tecido muscular estriado devido ao estresse anestésico.

O catabolismo protéico não se instala somente para prover as necessidades energéticas. Os aminoácidos mobilizados do músculo esquelético são captados pelo fígado com a finalidade de produzir certos tipos de proteínas de defesa (“acute phase proteins”) estimuladas pelos glicocorticóides, IL e TNF. Portanto, a despeito da alta degradação protéica observada nessa fase, a síntese não está suprimida, mas é superada pelo catabolismo, levando ao balanço nitrogenado negativo. O’KEEFE & SENDER (1974) chegam mesmo a sugerir que a resposta catabólica ao estresse cirúrgico envolvem principalmente uma queda na síntese, sem aumento rápido de proteólise.

Se o organismo reagir adequadamente ao estresse, ele se adaptará à agressão e entrará em fase catabólica adaptativa e o balanço de nitrogênio não se torna tão negativo, e quando o estímulo agressor for afastado, gradativamente o indivíduo reverterá este quadro.

Na desnutrição protéico-energética e protéica (Marasmo e Kwashiorkor), considerada um estresse metabólico, observa-se diminuição do gasto energético como forma de adaptação à baixa ingesta alimentar. No momento em que ela não pode ser mais mantida, os depósitos gordurosos são mobilizados, seguidos dos tecidos musculares como forma de assegurar aminoácidos para fornecimento de energia. O déficit de ingesta protéica leva à diminuição na síntese muscular e visceral, além de intensificar o turnover aminoacídico, negativando o balanço de nitrogênio. Notamos alterações hormonais tais como: diminuição das concentrações de insulina, hormônio tireoídiano T3 e gonadotrofinas; hormônio do crescimento normal ou aumentado; adrenalina normal a aumentada ; e glicocorticóides aumentados (TORÚN & VITERI, 1988). A adição de um fator de estresse, que inicialmente conduz a um balanço negativo, é seguida de uma segunda fase onde o organismo tende a se adaptar às agressões através da diminuição do gasto energético basal e até mesmo da diminuição da perda nitrogenada.

FERNANDEZ et al. (1993), observaram que pacientes desnutridos submetidos a cirurgia apresentavam gasto energético pós operatório menor e fator de estresse para excreção nitrogenada (excreção pós estresse / excreção pré operatória) apenas levemente aumentada em relação a pacientes em bom estado nutricional, o que pode ser entendido como um mecanismo adaptativo na deficiência nutricional crônica.

ZUCOLOTO et al. (1975) pesquisaram a excreção de nitrogênio total e uréico em ratos submetidos a estresse por contenção (24 horas por semana - 7 semanas) alimentados com dietas normais ou deficientes em proteínas e observaram que em animais alimentados com quantidades normais de proteínas, a adição do estresse aumentava a excreção desses parâmetros, o que não ocorria naqueles com dietas deficientes. Isso mostra que o estatus nutricional protéico influi na resposta a estímulos estressantes.

YOKOGOSHI et al. (1990) também em experimentos com animais, testaram o efeito do estresse por suspensão (hipocinesia) por um período de 10 dias, sobre a excreção de nitrogênio uréico e fecal em relação à diferentes concentrações protéicas na dieta (5, 10, 20, 40 e 60 %), encontrando balanço nitrogenado negativo apenas nos dois primeiros dias para todos os grupos com exceção dos alimentados com 60% de caseína; Gradualmente a excreção nitrogenada se positivava, sendo esses valores dependentes dos níveis protéicos oferecidos. Outros indícios de estresse foram, entretanto, observados como a perda de peso e o aumento das adrenais.

A dificuldade de comparação entre os experimentos se deve à diversidade das condições experimentais como já citado anteriormente. Em vista disto e da falta de dados existentes para o estímulo sonoro nosso intuito foi o de fornecer mais dados a esse tipo de estresse e de comparar a resposta induzida por ele.

2.4 - O Estímulo Sonoro

O estudo do estresse acústico ganhou interesse há mais de 50 anos em função do aumento à exposição de ruídos, tanto provenientes de ambientes de trabalho quanto de ruídos ambientais dos grandes centros urbanizados. Ele pode ser considerado um fator de estresse para o homem como mostrou ARGUELLES et al. (1962), que observou aumento de corticosteróide plasmático em indivíduos expostos a 63 ou 93 dB principalmente, em frequências de 10.000 Hz.

O estresse acústico parece causar várias alterações metabólicas. ANITESCO et al. (1973) estudaram trabalhadores que haviam sido submetidos, nos últimos 5-10 anos, a intensidades de 82 a 86 dB, intercaladas com picos de 102 dB e frequência 10.000 Hz, 2 horas por dia, observando um aumento das perdas urinárias de potássio e

de excreção de noradrenalina. ANDRÉN et al. (1979) relataram alterações hemodinâmicas com intensidades de som de 95 dB tais como aumento da pressão arterial e da pressão diastólica, embora estas retornem ao normal após 10 minutos de interrupção do ruído.

O estresse agudo pode interferir com o desempenho na execução de tarefas que dependem de informações, ao passo que o crônico pode alterar a memória e a atenção. Por este motivo, o estresse acústico pode estar associado a acidentes de trabalho e à diminuição na produtividade (SMITH, 1990). Segundo GLASS & SINGER (1972), mesmo que haja adaptação ao ruído, ele pode prejudicar a execução de tarefas assim como o comportamento humano, podendo apresentar efeitos cumulativos, muitas vezes observáveis meses após o estímulo inicial. Além disso ele afeta a tolerância a sons posteriores.

Em animais experimentais, os ruídos podem ser igualmente agressivos. SCHIMIDT et al. (1989) relata aumento nos índices de epinefrina plasmática e comportamento agressivo em ratos (90 dB/40 Khz - por 1 minuto/12 vezes por hora) e HRUBES & BENES (1965) observam aumento de excreção de catecolaminas (95 dB - 4 dias/semana durante 11 semanas) nesses animais. BORREL et al. (1980) também relatam aumento nos níveis séricos de corticosterona com estímulos sonoros de 110 dB, 500 Hz por 15 minutos durante 11 dias em que permaneceram elevados até o quinto dia.

GEBER et al. (1966) mostraram que não apenas os estímulos sonoros de alta intensidade, mas também os de intensidade moderada 68-71 dB alteravam parâmetros hematológicos tais como a contagem de eosinófilos e/ou bioquímicos como a concentração de ácido ascórbico das adrenais. Mesmo após 21 dias de experimento observavam-se alterações como o aumento do peso e da concentração de ácido ascórbico das adrenais e o aumento do colesterol sérico. FRIEDMAN et al. (1967) também observaram que o ruído (som contínuo - 102 dB ou som intermitente -

114 dB por períodos de 1 minuto) resulta em elevação de lípides séricos por cerca de 21 dias. ARMARIO et al. (1983), ao contrário de outros autores, afirmam que o ruído (85 dB) aplicado de forma crônica em ratos (4h/dia - 21 dias) não é um estressor potente, já que a perda de peso dos animais foi leve e não houve alteração no peso dos vários órgãos analisados.

NAYFIELD & BESCH (1981) em experimento com ratos submetidos a estímulo de 107 db por períodos de 30 minutos durante 2,5 horas, num total de 5 dias, observaram aumento de peso das adrenais, eosinopenia e leucocitose, além de comportamento alterado, demonstrando que este tipo de agressão é um estressor. SACKLER et al. (1959) expuseram ratos a 1 ou 5 minutos de estímulo sonoro de 110dB/ 375-500 cps e observaram aumento das adrenais, e alteração no peso de outros órgãos.

DOYLE et al. (1977) encontraram comprometimento no desenvolvimento dos ossos longos, avaliados pela diminuição do comprimento e massa/comprimento. Porém, estes dados são de difícil comparação, uma vez que os autores não caracterizam o estímulo sonoro aplicado.

JURTSHUR et al. (1959) relatam redução dos níveis de glutathiona sanguínea em ratas expostas a estímulos sonoros de intensidade 100 ± 5 dB e frequência 120 Hz, 5 minutos por dia, durante 15 dias, ou 1 minuto por dia durante 11 dias. Posteriormente PYE (1984) mostrou que estímulos de 120 dB a 20 kHz por períodos de 3'25" a 30 minutos causavam danos auditivos em cobaias, principalmente nos intervalos de exposição mais curtos.

Outro parâmetro sensível para avaliação de estresse seria o ganho de peso corporal dos animais experimentais, que nestes casos, estaria diminuído, segundo relatam vários autores SACKLER et al. (1959), HRUBES & BENES (1965),

NAYFIELD & BESCH (1981) o que sugere que o estímulo acústico representa realmente um estresse.

Enquanto a maioria das pesquisas já demonstrou os efeitos estressantes do ruído, devemos considerar que estes se apresentam dentro do limite audível para o homem (20 Hz - 20.000 kHz). No entanto, muitos animais experimentais como os roedores, possuem sensibilidade auditiva acima desta faixa, isto é, são sensíveis a ultrassons. Em ratos, por exemplo, a faixa de maior sensibilidade parece se concentrar em torno de 30 - 40 kHz (BROWN & PYE, 1975; CLOUGH, 1982). Essa sensibilidade se deve ao fato desses animais se utilizarem dos sons de alta frequência na comunicação, em diversas situações tais como: interação mãe-cria (KLINT & ANDERSON, 1994), luta, agressividade, acasalamento (BELL, 1974; GAMBLE, 1982) e até mesmo no estresse onde animais submetidos a um estímulo agressor transmitem-no aos animais próximos (PITMAN et al., 1988).

Portanto, sons nesta faixa de frequência podem significar estresse aos animais experimentais.

PETERSON (1968) observou, por exemplo, danos no sistema auditivo de cobaias submetidos a frequências de 10 a 40 kHz. ZONDER & TAMARI (citado por MILLIGAN et al., 1993) mostraram diminuição de fertilidade e produtividade em ratos expostos a 50-80 kHz/80-90dB/por quatro dias, enquanto SALES (1991) descreveu redução no comportamento locomotor de ratos expostos a ultrassons naturais - 22kHz - e artificiais - 38kHz. CIURZYNSKA et al.(1994) induziram úlcera gástrica em ratos expostos a frequências de 17 - 24 kHz durante 24 horas. Além das alterações fisiológicas, é possível que haja prejuízo na comunicação desses animais quando em ambientes ricos de sons de alta frequência (GAMBLE, 1982)

Devemos considerar, também que estes sons podem passar despercebidos nos laboratórios de ensaio biológico uma vez que estão fora da faixa audível pelo homem. SALES et al.(1988) demonstraram que muitos equipamentos presentes nesses locais podem produzir sons audíveis e não audíveis ou somente não audíveis, dificultando sua detecção. MILLIGAN et al.(1993) sugerem que as atividades humanas são importante fonte de sons e ultrassons e alertam que o ambiente acústico dos animais de laboratório, pode representar uma variável não controlável, afetando respostas fisiológicas e/ou comportamentais desses animais e, portanto, alterando a validade dos trabalhos científicos.

Uma vez que os efeitos do ultrassom não foram totalmente explorados, este trabalho pode contribuir para futuras pesquisas na área.

3. OBJETIVOS

Em virtude da possível relevância dos estímulos sonoros na fisiologia do rato, este trabalho objetivou:

- 1) Verificar se o estímulo sonoro de alta frequência resulta em estresse aos animais submetidos a condições de ensaio biológico nutricional através da análise da corticosterona sérica, do ganho de peso corporal e do consumo alimentar.
- 2) Avaliar qualquer efeito deste estímulo no balanço nitrogenado de ratos expostos a diferentes níveis de proteína na dieta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material

4.1.1 - Animais

Foram utilizados 48 ratos machos, Linhagem Wistar, recém desmamados (22 dias), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram divididos em dois grupos: controle e estresse com pesos médios de $56 \pm 4,6$ g e $65 \pm 4,8$ g, respectivamente. Cada grupo foi dividido em 4 subgrupos de 6 ratos cada, que receberam rações de diferentes composições.

Devido a impossibilidade de realizar o experimento conjuntamente, cada grupo ocupou o laboratório de ensaios biológicos em épocas distintas.

4.1.2 - Rações

Foram utilizados quatro tipos de ração cuja composição seguiu as proporções descritas na Tabela 1.

As rações foram isocalóricas, manipulando-se as quantidades de carboidratos para tanto. Dessa forma, as dietas controle foram compostas de caseína comercial (dieta I) e a dieta aprotéica (IV) teve sua composição centesimal igualada as dietas teste, pela substituição de sua fração protéica por carboidratos.

TABELA 1 - Formulação das dietas utilizadas no ensaio biológico.

INGREDIENTES	% (g) nas Dietas			
	I	II	III	IV
Caseína comercial	18,0	5,0	-	-
Gelatina	-	-	18,0	-
DL- Metionina	0,3	0,3	0,3	0,3
Celulose	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de Milho "Mazola"	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura Salina AIN- 76	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica- AIN- 76	1,0	1,0	1,0	1,0
Bitartarato de Colina	0,2	0,2	0,2	0,2
Carboidratos: mistura de milho("Maizena") açúcar refinado ("União") na proporção de 50%: 15%		q.s.p.		100

TABELA 2 - Mistura vitamínica AIN-76.

<i>Vitamina</i>	<i>Quantidade por quilograma de mistura</i>
Tiamina.HCl, mg	600
Riboflavina, mg	600
Piridoxina.HCl, mg	700
Ácido nicotínico ^a , g	3
D-Pantotenato de cálcio, g	1,6
Ácido fólico, mg	200
D-Biotina, mg	20
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂), mg	1
Retinil palmitato ou acetato (Vit. A)	+b
DL- α -tocoferil acetato (Vit. E)	+c
Colecalciferol (Vit. D ₃), mg	2,5 ^d
Menaquinona (Vit. K) ^e , mg	5,0
Sacarose, q.s.p., g	1000,0

a - ou Nicotinamida

b - Como pó estabilizado para prover 400.000 UI de atividade de vitamina A ou 120.000 equivalentes de retinol.

c - Como pó estabilizado para prover 5.000 UI de atividade de vitamina E.

d - 100.000 UI. Pode ser na forma de pó.

e - Menadiona.

TABELA 3 - Mistura mineral AIN-76.

<i>Ingrediente</i>	<i>g/kg de mistura</i>
Fosfato de cálcio dibásico (CaHPO_4)	500,0
Cloreto de sódio (NaCl)	74,0
Citrato de sódio monohidratado ($\text{K}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	220,0
Sulfato de potássio (K_2SO_4)	52,0
Óxido de magnésio (MgO)	24,0
Carbonato manganoso (43-48% Mn)	3,5
Citrato férrico (16-17% Fe)	6,0
Carbonato de Zinco (70% ZnO)	1,6
Carbonato cúprico (53-55% Cu)	0,3
Iodato de potássio (KIO_3)	0,01
Selenito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,01
Sulfato de cromo-potássio $\langle \text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O} \rangle$	0,55
Sacarose, q.s.p.	1000,0

4.1.3 - Reagentes para as determinações químicas

4.1.3.1 - Nitrogênio : ácido sulfúrico concentrado, catalisador ($K_2SO_4 + CuSO_4 + Se$), Hidróxido de Sódio a 50%, ácido bórico a 2%, indicador fenolftaleína, ácido clorídrico a 0,02 N.

4.1.3.2 - Corticosterona : Primeira fase: etanol puro (extração) e tampão Tris (diluição); Segunda Fase: tampão Tris, corticosterona, corticosterona marcada (3H - corticosterona), anticorpo anticorticosterona (SIGMA, C 8784), carvão dextran.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Determinações Químicas

4.2.1.1 - Nitrogênio

O nitrogênio para o cálculo da concentração protéica da caseína, gelatina, rações e material biológico coletado (fezes e urina) foi determinado pelo método semimicrokjeldahl (A.O.A.C., 1975). O Balanço Nitrogenado foi obtido pela fórmula: Balanço Nitrogenado = Nitrogênio Ingerido - Nitrogênio Excretado (fezes + urina) (PIKE & BROWN, 1984).

4.2.1.2 - Corticosterona sérica

As concentrações séricas de corticosterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIE), como parâmetro do grau de estresse dos animais (KANT et

al., 1983). Este método baseia-se na competição entre um antígeno “frio” (quantidade variável) e um antígeno radioativo ou “quente” (quantidade fixa) em se ligar a um anticorpo específico presente em quantidade fixa. Neste caso o antígeno foi a corticosterona - presente no soro dos animais em quantidade desconhecida, que competiu com a corticosterona marcada com “trítio” (^3H) pelo sítio de ligação do anticorpo anticorticosterona.

A primeira fase do RIE constituiu-se da extração da corticosterona plasmática, seguida de sua diluição. Na segunda fase, adicionou-se o anticorpo anticorticosterona (Sigma Chemical Company), seguindo-se incubação por 30 minutos e adição da corticosterona marcada. Após incubação durante a noite, colocou-se carvão ativado para precipitar as formas livres do hormônio e fez-se a leitura da radioatividade do complexo formado, em contador de radiação β (Beckman Liquid Scintillation Systems - LS 5000 TD).

A interpretação dos resultados foi feita através de curva padrão, manipulada nas mesmas condições que as amostras, e que relaciona radiação (cpm) e concentração de corticosterona em ng/ml. As concentrações dos padrões foram 2,5; 5,0; 10,0; 50,0 e 250 ng/ml.

4.2.2. - Ensaio Biológico

O experimento foi realizado em duas fases: a primeira utilizou 24 animais como grupo controle e a segunda 24, estes últimos submetidos ao estresse acústico.

Ao final do experimento do grupo controle, o grupo sob estresse já se encontrava no biotério para o início do tempo de adaptação, de modo a encurtar a duração total do experimento e sem coincidir com as sessões de estresse.

Os ratos recém desmamados foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, em condições ambientais controladas ($t = 22 \pm 2$ °C, umidade relativa 70%, ciclo luz/escuridão 12/12 h (6:00/18:00 h), ventilação adequada), permanecendo oito dias em fase de adaptação ao biotério. Água e ração comercial ("NUVILAB" - Purina) foram fornecidas sem limitação. Antes de iniciados os testes, houve uma fase adicional de adaptação à ração de dois dias.

O ensaio consistiu de balanço nitrogenado de sete dias, durante o qual houve coleta de sangue (no primeiro e no último dia), fezes e urina (diariamente) e foram controlados o peso e o consumo alimentar de cada animal.

4.2.3 - Estresse Acústico

Para o segundo grupo de animais, procedeu-se ao estresse em sessões diárias de 60 minutos durante o balanço nitrogenado, das 7:45 as 8:45 h, por meio de um ultrassonicador modelo THORNTON T4, 110/220 volts, frequência de 40 kHz, distando da estantes dos animais de 121 cm. A intensidade do ruído (Sound Level Pressure) foi de 62 a 66 dB Escala A, enquanto que o ruído ambiental de fundo foi de 60 dB medidos por Decibelímetro (Simpson - model 886 - Sound Level Meter type 2).

4.2.4. - Coleta de sangue

Para a coleta de sangue utilizou-se o mesmo procedimento nos dois grupos.

Para as análises de corticosterona, foram coletadas duas amostras de sangue de cada animal, sendo uma no início e outra no final do período teste.

A quantidade de sangue colhida não ultrapassou os 10% do peso total do animal (cada 100 g de peso animal correspondem a 5,8 ml de sangue). A coleta se iniciava às 9:00 h e nunca ultrapassava as 11:00 h para evitar alterações hormonais devidas ao ritmo circadiano (DUNN et al., 1972).

Os ratos eram retirados um a um de suas gaiolas, transferidos à sala de aquecimento, onde eram colocados individualmente em caixa de madeira previamente aquecida com lâmpada de 100 watts, permanecendo por 1,5 minutos. Em seguida eram retirados da caixa, envoltos em flanela e transferidos à sala de coleta.

Para a coleta de sangue, a cauda dos animais era levemente umedecida com algodão embebido em solução contendo EDTA a 0,05% (para evitar a coagulação rápida do sangue) e uma pequena parte da ponta da cauda (± 1 mm) era seccionada com lâmina afiada e o sangue colhido em tubos cônicos. Os tubos eram previamente marcados com a quantidade desejada de sangue a ser coletada. O corte era rápido e preciso para evitar dor e, portanto, minimizar o estresse.

O tempo de coleta foi de 3 minutos, em média, sendo escolhido após verificação de que os níveis de corticosterona permaneciam inalterados até 4 minutos de manipulação do animal (LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 1989).

Após a retirada do sangue, os animais eram colocados em gaiolas individuais, cujo fundo era recoberto por folhas plásticas para evitar a perda de material biológico e transferidos para sala de repouso, até que se desse a coleta do último rato. Esse procedimento era realizado para evitar a comunicação entre eles por meio de vocalização e/ou ferormônios (PITMAN et al., 1988) e, assim, não permitir estresse entre aqueles que não haviam sofrido a coleta.

Tomou-se o cuidado de permitir que somente uma pessoa retirasse os animais da sala de repouso e os levasse à sala de aquecimento, transferindo-os para a sala de coleta, onde outras pessoas faziam a coleta do sangue. Este procedimento visou evitar que o cheiro de sangue das coletas anteriores estressasse os próximos animais.

O sangue coletado foi centrifugado em centrífuga DAMON/IEC DIVISION-IEC UV CENTRIFUGE a 2000 rpm por 10 minutos e o soro armazenado em freezer a uma temperatura de -15 °C até o momento das análises de RIE.

Para a aleatorização do experimento, a primeira coleta foi realizada seguindo-se a ordem numérica crescente dos animais (rato nº 1 ao nº 24) e a última coleta em ordem decrescente (rato nº 24 ao nº 1).

4.3 - Análise Estatística

Usou-se a análise de variância e para a comparação entre os grupos o Teste de Tukey com significância de 95%. Quando necessário, os resultados foram transformados em logarítimo para permitir a análise estatística de valores com alta variabilidade. Foi utilizado o sistema SANEST - Sistema de Análise Estatística para análise dos dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - EFEITO DO ESTRESSE NO BALANÇO DE NITROGÊNIO (NITROGÊNIO INGERIDO, NITROGÊNIO FECAL E NITROGÊNIO URINÁRIO)

A Tabela 4 mostra os valores de nitrogênio ingerido, fecal e urinário. A concentração de nitrogênio ingerido aumenta conforme aumentou o nível protéico da dieta, tanto no grupo controle quanto no grupo estresse. Excetuou-se a dieta III, que não diferiu da dieta I na quantidade mas, na qualidade protéica, onde a baixa qualidade levou a um menor consumo para todos os grupos dentro das categorias controle e estresse. A comparação entre os dois grupos mostra que o estímulo acústico levou à diminuição na ingesta de nitrogênio, mas com diferença significativa apenas para o grupo III. As diferenças observadas foram consequência do consumo alimentar diminuído, uma vez que os animais experimentais mantidos na dieta com caseína 5% (deficiente em proteína) e gelatina 18% (proteína desbalanceada) reduziram sua ingesta quando submetidos ao ultrassom. Este tópico será abordado com mais detalhes no item "Consumo Alimentar".

A excreção fecal nitrogenada foi maior para os grupos consumindo o nível mais alto de proteína na dieta, tanto para os grupos controle quanto para os estresse. Notamos que o efeito do estresse foi o de diminuir esses valores, mas não o suficiente para provocar uma diferença significativa. Excetuou-se, novamente, o grupo consumindo gelatina (dieta III), o qual mostrou diferença em relação ao seu controle.

A excreção de nitrogênio urinário também aumentou em função do aumento da proteína na dieta. Porém, para o grupo controle consumindo a dieta III, essa excreção se mostrou significativamente maior em razão da baixa qualidade da proteína da ração.

Tabela 4 - Valores médios (\pm Desvio Padrão) de nitrogênio fecal, nitrogênio urinário e nitrogênio ingerido em função do nível protéico e da presença ou ausência de estresse acústico

DIETAS	Nitrogênio ingerido (g)		Nitrogênio Fecal (g)		Nitrogênio Urinário (g)	
	Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
I (cas. 18%)	2,90 ^{a,1} $\pm 0,47$	2,68 ^{a,1} $\pm 0,36$	0,13 ^{a,1} $\pm 0,03$	0,11 ^{a,1} $\pm 0,01$	0,27 ^{a,1} $\pm 0,17$	0,40 ^{a,1} $\pm 0,15$
II (cas. 5%)	0,67 ^{b,1} $\pm 0,10$	0,49 ^{b,1} $\pm 0,14$	0,08 ^{b,1} $\pm 0,02$	0,055 ^{b,1} $\pm 0,02$	0,08 ^{ab,1} $\pm 0,04$	0,12 ^{b,1} $\pm 0,02$
III (gel. 18%)	1,72 ^{c,1} $\pm 0,42$	1,16 ^{c,2} $\pm 0,17$	0,09 ^{b,1} $\pm 0,03$	0,05 ^{b,2} $\pm 0,02$	0,55 ^{c,1} $\pm 0,24$	0,27 ^{ab,2} $\pm 0,13$
IV (aprot.)	0,00	0,00	0,04 ^{c,1} $\pm 0,01$	0,03 ^{b,1} $\pm 0,00$	0,05 ^{c,1} $\pm 0,02$	0,11 ^{b,1} $\pm 0,03$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

Médias seguidas de números diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

Os resultados representam a média para seis animais

Como descrito na metodologia, a gelatina foi a fonte protéica utilizada para compor a dieta III e esta é deficiente no aminoácido essencial triptofano o que torna a dieta desbalanceada. Quando há baixa concentração de um aminoácido no sangue, outros aminoácidos não podem ser utilizados convenientemente pelo organismo para a síntese protéica e aqueles não utilizados são desaminados e oxidados, conduzindo a perdas nitrogenadas pela urina, o que explica os valores diferenciados obtidos. Além disso, o triptofano é precursor da niacina, importante no metabolismo dos prótidos, lípides e glícides, de maneira que os requerimentos desta vitamina estão associados à quantidade de triptofano dietético. No grupo submetido ao estresse, a mesma tendência se confirma, isto é, há aumento de nitrogênio urinário segundo a proteína dieta. No entanto, nesta situação, o grupo III não mostra níveis de excreção diferenciados, igualando-se aos valores dos grupos consumindo as dietas I, II e IV.

Comparando-se o grupo controle e o grupo estresse, observamos que os valores de excreção nitrogenada para as dietas I, II e IV estão aumentados para grupo estresse sem, no entanto, diferir estatisticamente dos controles. Embora muitos autores tenham encontrado aumento de perdas nitrogenadas em função de situações de estresse (SHILLER et al., 1979; SHAW, et al., 1987; GIESECKE et al., 1994), FERNANDEZ et al. (1993) encontraram efeito do estresse cirúrgico na excreção urinária de nitrogênio (excreção pré-operatória/ excreção pós-operatória), o qual não foi significativo entre pacientes nutridos e desnutridos; isto é, a excreção de nitrogênio urinário aumentou após a cirurgia, mas o aumento não foi significativo entre os pacientes desnutridos. ZUCOLOTTO et al. (1974), trabalhando com ratos Wistar alimentados com os mesmos teores protéicos utilizados por nós - 18 e 5% de caseína - observaram que o estresse por contenção aumentava significativamente a excreção de nitrogênio total e nitrogênio uréico nos animais com caseína 18%; mas naqueles com baixa ingesta protéica o estresse adicional da contenção não foi suficiente para modificar o quadro de excreção urinária. Em nosso trabalho, o aumento não estatisticamente diferente, pode ser devido

ao menor tempo de experimento (7 dias) contra as 7 semanas utilizadas, ou mesmo pela menor severidade do estresse aplicado no estudo.

Comparando-se os grupos da dieta III entre si, notamos que a excreção de nitrogênio urinário foi significativamente inferior para os animais com estresse, o que pode ser explicado como uma tentativa do organismo de se proteger frente à adição de duas agressões: a dieta e o estresse acústico. Esta reação de adaptação foi descrita por SELYE (1946, 1976) como The General Adaptation Syndrome (G.A.S.) tendo como uma de suas fases a de adaptação (ou resistência), que consiste em um mecanismo de defesa onde o organismo tenta retornar às suas funções habituais adaptando seu funcionamento para, na medida do possível, conviver com o estressor. Assim, a fim de adaptar-se aos dois tipos de estresse a que foram submetidos, os animais consumindo a dieta III tentaram reter a maior quantidade possível de nitrogênio, através da diminuição de sua excreção pela urina numa típica reação de adaptação. O aumento da prática de coprofagia é mais um possível mecanismo disponível para o rato, como meio de atenuar o impacto metabólico deixado por uma dieta desbalanceada ou deficiente em algum nutriente (ROGERS, 1979).

A Tabela 5 mostra os valores do balanço nitrogenado para os grupos controle e estresse. Como podemos observar, em ambos os grupos, a dieta foi fator importante no balanço nitrogenado e, como era esperado, este foi inversamente proporcional à quantidade de nitrogênio oferecido nas dietas. As dietas contendo gelatina, levaram a um balanço de nitrogênio menor que os grupos consumindo 5% de caseína, mostrando que não só a quantidade mas também a qualidade da proteína na dieta foi um fator limitante na resposta animal. Sabe-se que fatores como o estado fisiológico, a ingesta calórica e a composição da dieta influem no balanço nitrogenado (PIKE & BROWN, 1980). Uma vez que as dietas foram isocalóricas, apenas a quantidade e qualidade protéica das rações podem ter afetado os valores de balanço do grupo controle. O único grupo a mostrar valores negativos foi o grupo aprotéico. Ao considerarmos o

Tabela 5 - Valores médios (\pm Desvio Padrão) de balanço nitrogenado em função do nível protéico e da presença ou ausência de estresse acústico.

DIETAS	Balanço Nitrogenado (g)	
	CONTROLE	ESTRESSE
I (cas. 18%)	2,50 ^{a,1} $\pm 0,37$	2,17 ^{a,2} $\pm 0,26$
II (cas. 5%)	0,51 ^{b,1} $\pm 0,11$	0,32 ^{b,1} $\pm 0,12$
III (gel. 18%)	1,08 ^{c,1} $\pm 0,62$	0,85 ^{c,1} $\pm 0,04$
IV (aprot.)	- 0,09 ^{d,1} $\pm 0,03$	- 0,14 ^{d,1} $\pm 0,03$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

Médias seguidas de números diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

Os resultados representam a média para seis animais.

fator estresse como interferente no balanço nitrogenado, podemos notar que todos os grupos submetidos ao estresse acústico apresentaram valores inferiores ao grupo controle, embora apenas o grupo com caseína 18% apresentasse diferença significativa, principalmente em função das perdas nitrogenadas pela urina .

É também sabido que qualquer fator de estresse significativo, tanto físico (ex. infecções) quanto psicológico (ex. medo, ansiedade), resulta no aumento da excreção nitrogenada, podendo levar a um balanço negativo em indivíduos mais susceptíveis (PELLET & YOUNG, 1980), e de acordo com a severidade do estresse. Esta perda provém principalmente da quebra de proteína muscular mediante ação dos glicocorticóides e catecolaminas, os quais são aumentados nas situações de estresse. Esses fatores, além de promoverem o catabolismo protéico, inibem a ação da insulina nos tecidos periféricos. Esta resistência à insulina leva à quebra de proteínas para utilização como fonte energética e excreção concomitante de nitrogênio pela urina. No entanto, ao se adicionar mais um fator de agressão, o organismo tende a se adaptar com a diminuição destas perdas (TORÚN & VITERI, 1988; ZUCOLOTTO et al., 1974) através da redução da degradação protéica e síntese de uréia (TORÚN & VITERI, 1988). É o que se observou na Tabela 5 com os valores de balanço nitrogenado para os grupos alimentados com as dietas II, III e IV, por não diferirem estatisticamente de seus controles. A mesma conclusão foi estendida para o grupo que se alimentou da dieta I, cujo valor embora menor, não chegou a atingir valores inferiores a zero.

Trabalhos como os de YOKOGOSHI et al. (1990) também mostram esta adaptação no metabolismo protéico; os autores encontraram valores de balanço nitrogenado negativos apenas nos dois primeiros dias de estresse por hipocinesia em ratos alimentados com 5, 10, 20 e 40% de caseína, sendo que a partir do terceiro dia, os valores se tornavam positivos e se mantinham positivos até o final do experimento de dez dias.

Com base nos dados apresentados, conclui-se que, embora a excreção de nitrogênio urinário/fecal e de nitrogênio ingerido mostrassem valores diferenciados para os grupos submetidos a estresse, somente os animais bem nutridos responderam significativamente aos estímulos agressivos do ultrassom. Os outros grupos provavelmente reagiram de forma a se ajustarem à associação de dois estímulos estressantes, se adaptando para manter o equilíbrio homeostático. Experiências biológico-nutricionais de curta duração (sete dias) com ratos Wistar em crescimento, portanto, estariam sujeitas a erro inerente provocado por fontes emissoras de ultrassom, por razão do impacto nos grupos controle. Grupos experimentais com estresse nutricional, entretanto, podem mostrar reação mínima, não sendo possível a anulação do efeito do ultrassom como um erro sistemático.

5.2 - CONSUMO ALIMENTAR

O consumo de ração (Tabela 6) foi proporcional à quantidade e qualidade da proteína oferecida. Assim, observamos que os animais do grupo controle e estresse têm sua ingestão diminuída com a redução da porcentagem protéica (dieta II e IV) ou com a oferta de uma proteína incompleta (dieta III). Em ambos os grupos podemos notar que o consumo das dietas III e IV foram similares em função da composição da dieta III que é de baixo valor nutricional.

Essas diferenças de consumo são esperadas uma vez que os animais experimentais regulam sua ingestão em função da quantidade protéica da ração (PETERS & HARPER, 1985) ou mesmo do desbalanço aminoacídico desta proteína, provavelmente associado a alterações na concentração de aminoácidos no plasma e no cérebro (PENG et al., 1972). Em especial à dieta III, sabemos que o triptofano,

TABELA 6 - Médias de consumo alimentar (\pm Desvio Padrão) nos sete dias de ensaio em função do nível protéico da dieta e da presença ou ausência de estresse acústico.

DIETAS	CONSUMO ALIMENTAR (g)	
	Controle	Estresse
I (cas. 18%)	102,17 ^{a,1} \pm 16,6	94,37 ^{a,1} \pm 12,62
II (cas. 5%)	87,65 ^{a,1} \pm 13,14	64,87 ^{b,2} \pm 17,99
III (gel. 18%)	53,24 ^{b,1} \pm 12,72	35,8 ^{c,2} \pm 5,28
IV (aprot.)	51,42 ^{b,1} \pm 11,65	38,59 ^{c,1} \pm 10,25

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

Médias seguidas de números diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

Os resultados representam a média para seis animais

aminoácido ausente na gelatina, é precursor de substâncias como a serotonina, estando este neurotransmissor associado à baixa ingesta alimentar (ASHLEY et al, 1979).

Quanto à influência do estresse no consumo alimentar dos animais, podemos notar uma diminuição em todos os grupos, mas a diferença estatística se observa apenas nos animais com caseína 5% e gelatina 18%. Inesperadamente os grupos com caseína 18% e aptotéico não apresentaram diferença significativa. Os fatores que levaram a um consumo similar de ração nos grupos I e IV em relação aos seus controles são desconhecidos, uma vez que a literatura tem mostrado alteração no apetite de animais submetidos a estresse.

MORITA & NAKANO (1982), usando modelo de estresse por contenção, 4 horas/dia, durante 1, 3, 10 ou 14 dias, observaram prejuízo no consumo alimentar de ratos alimentados com 25% de caseína. As diferenças de consumo foram : 47% no 3º dia, 33% no 8º e 27% no 11º dia, mostrando a magnitude do efeito e a tendência à adaptação do animal. YOKOGOSHI et al.(1990) e TAKASE et al.(1991) encontraram diminuição aproximada de 35% na ingesta alimentar de ratos estressados por contenção (10 dias) com relação ao controle, consumindo dieta com 20% de caseína. Em nosso estudo, a redução foi de 7,5% (dieta I), 26%(dieta II), 33%(dieta III) e 25%(dieta IV).

Outros tipos de estresse como o choque também diminuem o consumo alimentar conforme observado por ARMARIO et al., (1988) e por KANT et al.(1987) que notaram diminuição de consumo de ração até o sétimo dia, retornando ao normal ao fim do 14º dia.

Especificamente em relação ao estresse acústico, outros trabalhos têm mostrado alterações na ingesta ; SACKLER et al. (1959) que aplicou som com intensidade de

110 dB, por 1 minuto durante 11 dias ou 75 minutos em períodos de 5 minutos, por 21 dias, encontrou redução no consumo alimentar, embora os autores não referissem as quantidades consumidas. NAYFIELD & BESCH (1981) que submeteram ratos a 105 - 110 dB; 1,5 horas/dia por 5 dias, relataram diminuição significativa na ingesta alimentar no terceiro dia de estresse, e que gradativamente retornou ao normal até o quinto dia embora ao final do experimento os animais estressados tenham consumido quantidade maior de ração, talvez para compensar a redução inicial. Entretanto, o aumento de consumo alimentar também foi observado na associação de estresse acústico (90 dB) e estresse por pressão na cauda (15 minutos cada), durante 6 dias (WILSON & CANTOR, 1983).

Assim, podemos observar que os animais conseguem se adaptar mais rapidamente a esse tipo de estresse, que possivelmente é menos severo que o da contenção. Em nosso experimento é possível que tenha havido alguma redução de consumo durante o período teste assim como relatou NAYFIELD & BESCH (1981) e por este motivo não tenha sido detectado no final do estudo; no entanto, o motivo pelo qual apenas dois grupos permaneceram com baixa ingesta não é claro.

5.3 - PESO CORPORAL

A evolução ponderal e o ganho de peso dos animais durante a fase experimental são mostrados nas Figuras 1-2 e 3 respectivamente.

O ganho de peso dos animais controle e estresse mostrou-se diretamente proporcional ao consumo de suas respectivas dietas o que, por sua vez, está ligado à composição das mesmas. Para os animais que consumiram as rações compostas de 18% de caseína, o ganho médio de peso foi de aproximadamente 5 g/dia nas três

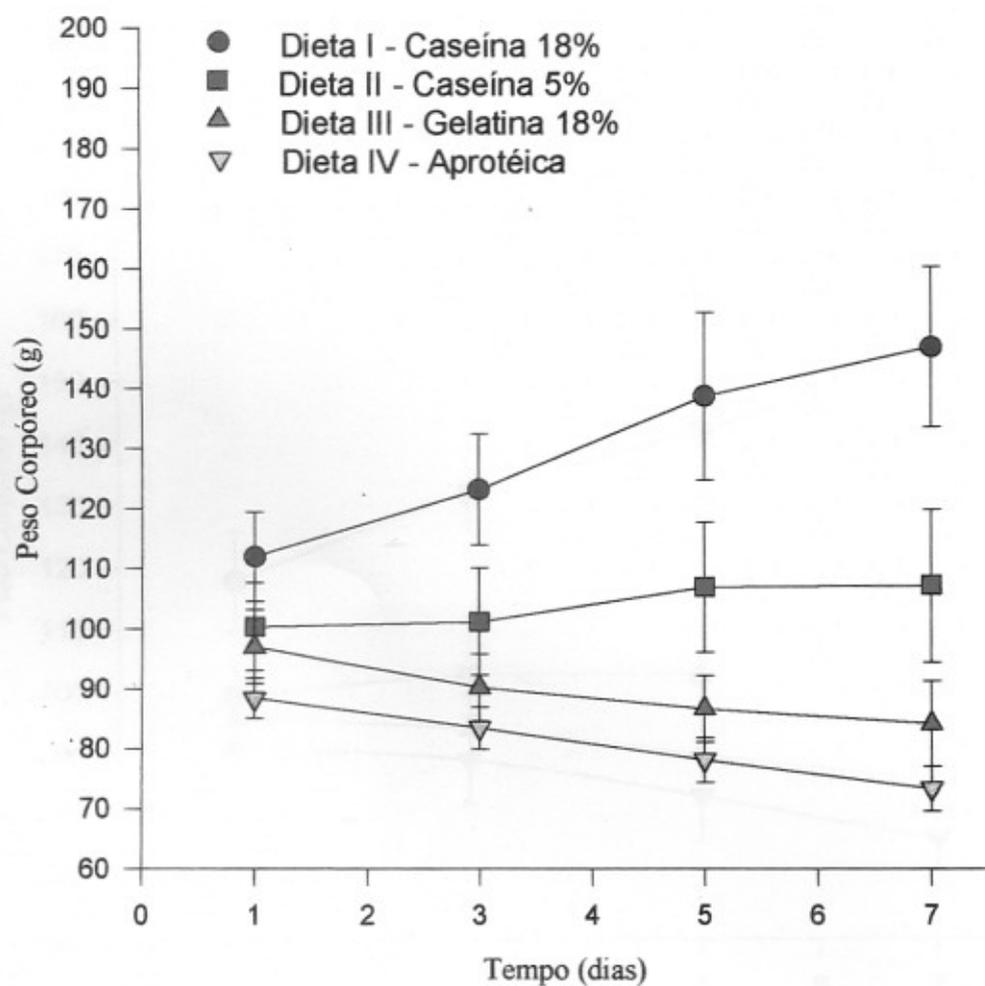


FIGURA 1 - Evolução ponderal dos animais controle durante o período teste.

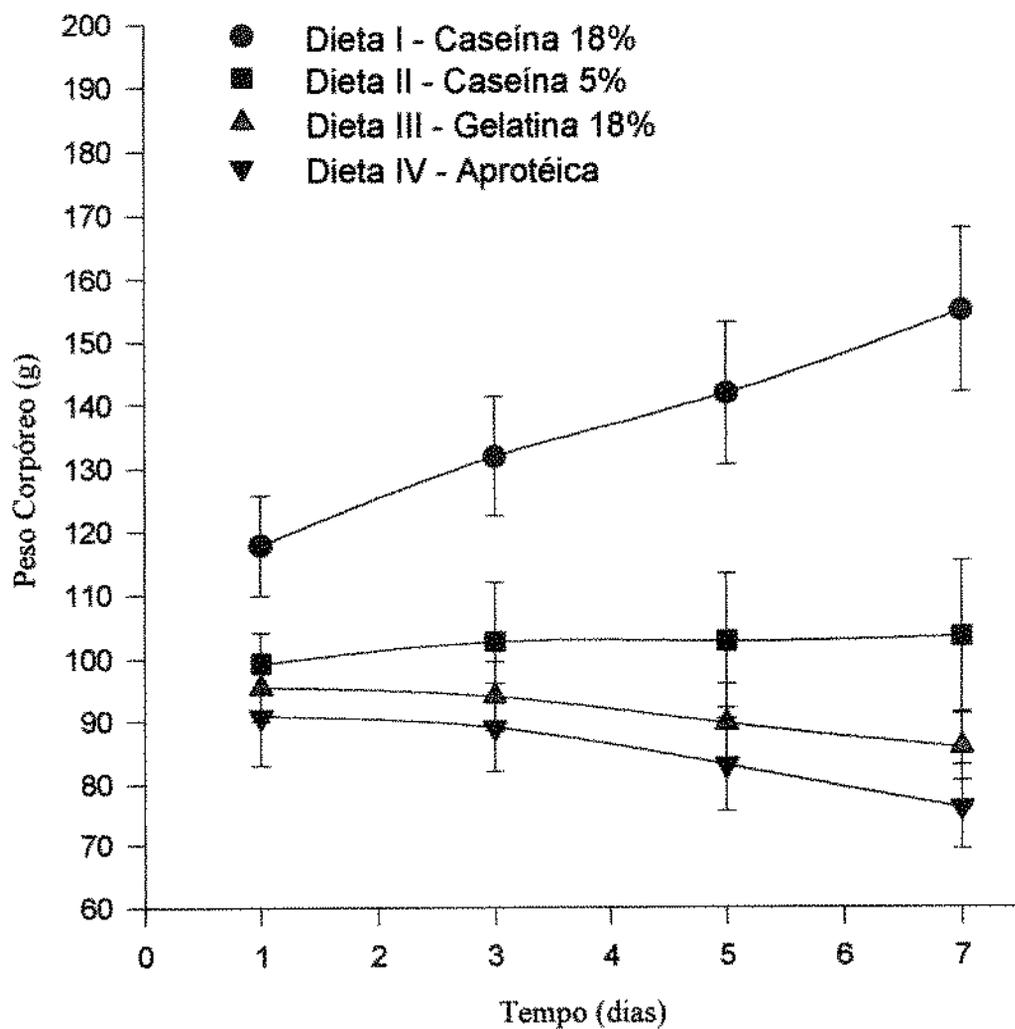


FIGURA 2 - Evolução ponderal dos animais submetidos a estresse acústico durante o período teste.

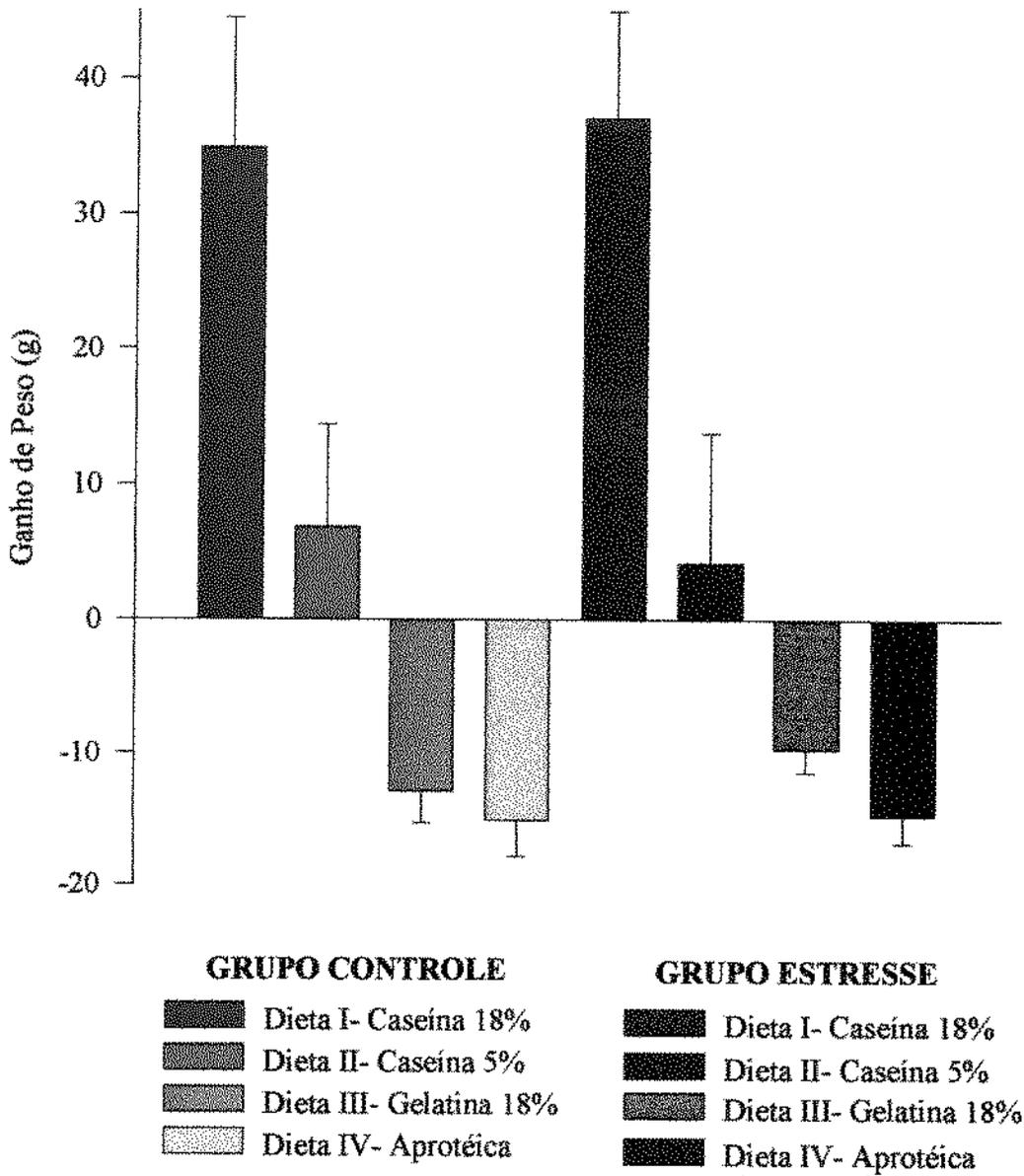


FIGURA 1 - Valores médios (\pm Desvio Padrão) de ganho de peso durante o período teste.

primeiras semanas após o desmame, estando de acordo com estudos realizados por PLAU-VIEIRA (1992). Podemos observar que o perfil de crescimento (Figuras 1 e 2) dos animais alimentados com as dietas III e IV foram similares, devido à associação de uma proteína de baixo valor nutricional incapaz de sustentar o crescimento dos animais, e da carência de niacina, cujo precursor, o triptofano, é o aminoácido limitante da gelatina.

No entanto, o peso corporal dos ratos estressados não diferiu dos controles para todas as dietas analisadas. Mesmo a evolução ponderal não mostrou crescimento diferenciado durante o período teste para os animais submetidos ao ultrassom.

Diminuições de peso nas situações de estresse podem decorrer da baixa ingesta alimentar e/ou do catabolismo protéico aumentado. Nestes experimentos, porém, os animais que mostraram redução significativa de consumo (dietas II e III) tiveram ganho de peso equivalente ao registrado pelo grupo consumindo a dieta I que, por sua vez, apresentaram diminuição significativa do balanço nitrogenado. Nenhum dos três grupos, entretanto, diminuiu sua taxa de ganho de peso significativamente, mesmo constatando-se uma pequena queda no consumo alimentar (Figura 3). Esses resultados diferem de trabalhos encontrados na literatura para outros tipos de estresse, como o de choque (3 segundos/ 2 horas/ 3, 4, 7, 10 dias) (OTTENWELLER et al., 1992); contenção ou hipocinesia que, ao final de 10 dias, levou à redução significativa de peso (YOKOGOSHI et al, 1990; TAKASE et al, 1991) e imobilização (MORITA & NAKANO, 1982), que também levou a expressiva redução de peso a partir do terceiro dia, permanecendo até o 14º dia. Entretanto, PITMAN et al., (1988) mostraram que ratos sob contenção leve e severa mantiveram ganho de peso similar aos controles até sexto dia, diminuindo até o 21º dia.

Em relação ao estresse produzido por som, os resultados são variados em função das variadas condições experimentais. Assim, SACKLER et al (1959)

encontraram redução de 14% para 1 minuto de estresse durante 11 dias e de 19% para 75 minutos de estresse por 21 dias (ambos a 110 dB, 375-500 Hz), sendo esta redução de peso significativa apenas nestas últimas condições. HRUBES & BENES (1965) também registraram diminuição significativa durante e após experimento utilizando 95 dB - 6 horas/ 4 dias por semana - durante 2 ou 4 semanas. NAYFIELD & BESCH (1981) encontraram ganho de peso reduzido em 15% (107 dB - 1,5 hora/5 dias) durante 11 dias. Já trabalhos como o de ARMÁRIO et al. (1983) observaram que o estresse acústico crônico provocava um leve decréscimo no crescimento com alterações significativas apenas a partir da 3ª semana ou mesmo nenhuma modificação no ganho de peso dos animais submetidos a 85 dB - 4 horas/dia - 28 dias (ARMÁRIO et al., 1984).

Enquanto a maioria dos trabalhos mostram redução de peso para animais estressados, ARMÁRIO et al. (1988) encontraram aumento no ganho de peso para ratos com imobilização prévia, mesmo tendo consumido menor quantidade de ração; também PRITCHETT et al.(1978) observaram peso significativamente maior para os animais submetidos a estresse sonoro (110 dB/ 30 segundos a cada 6 minutos - durante 28 dias) embora estes autores não tenham apresentado dados sobre consumo alimentar.

Parece claro que a alteração de peso varia em função da intensidade, do tempo e da duração do estímulo sonoro. Possivelmente o tipo de estresse utilizado em nosso estudo, assim como sua duração não foi suficiente para observar mudanças perceptíveis durante um ensaio de balanço de sete dias.

Portanto, quanto a este índice, não houve diferença entre os animais controle e os animais experimentais, embora durante a Fase de Resistência (sessão 2.1) o peso corporal possa mostrar estabilidade (SELYE, 1946) enquanto outros parâmetros como o peso aumentado das adrenais mostrem indícios evidentes de estresse (SELYE, 1946; SACKEL et al, 1959).

5.4 - CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA SÉRICA

Os valores médios iniciais e finais de corticosterona sérica, apresentados na Tabela 7, foram usados como parâmetro para avaliar o grau de estresse dos animais.

Analisando a categoria dos animais controle, observamos que houve ampla variação inicial entre os grupos, principalmente entre o grupo II e os restantes cujo valor hormonal foi menor, embora a mesma não tenha sido estatisticamente significativa. Foi interessante notar a tendência, mesmo não sendo significativa a nível de 5%, a aumentar os níveis do hormônio conforme aumentou a restrição protéica quantitativa ou qualitativa da dieta; essa provável tendência poderia estar relacionada com a afirmação de TORUN & VITERI (1988) e LEAKEY (1994) no sentido de que as restrições energéticas e protéico-energéticas podem aumentar os níveis de corticosterona sérica. De qualquer forma, os desbalanços da dieta são um tipo de estresse alimentar.

Os animais submetidos ao estímulo acústico mostraram diferenças após a primeira sessão de estresse, significativas apenas entre os grupos I e II. Surpreendentemente, entretanto, os níveis de hormônio destes animais foram similares aos valores iniciais apresentados por seus pares não estressados. Isto indica que a primeira exposição ao ultrassom não resultou em estresse detectável pelo indicador corticosterona .

Comparando-se os valores finais com os iniciais dos grupos submetidos ao estresse, observamos que a concentração hormonal dos animais alimentados com as dietas II, III e IV evoluiu para níveis significativamente maiores na sessão final, indicando que o estímulo com ultrassom é capaz de induzir um efeito significativo no sistema hormonal apenas naqueles animais submetidos a dietas hipoprotéicas e/ou com

Tabela 7 - Níveis de corticosterona sérica (\pm Desvio Padrão) nos animais da categoria controle e nos submetidos a estresse acústico no início e no final do ensaio.

DIETA	CORTICOSTERONA SÉRICA (ng/ml)			
	Controle		Estresse	
	Inicial	Final	Inicial	Final
I (cas. 18%)	138,05 ^{a,A,1} \pm 83,20	85,17 ^{a,A,1} \pm 37,47	138,42 ^{a,A,1} \pm 33,11	324,35 ^{a,A,2} \pm 247,48
II (cas. 5%)	56,59 ^{a,A,1} \pm 50,26	110,31 ^{a,A,1} \pm 96,64	48,44 ^{b,A,1} \pm 39,88	176,72 ^{a,B,1} \pm 245,98
III (gel. 18%)	104,55 ^{a,A,1} \pm 37,87	157,54 ^{a,A,1} \pm 77,37	99,52 ^{ab,A,1} \pm 79,43	224,58 ^{a,B,1} \pm 94,80
IV (aprot.)	128,91 ^{a,A,1} \pm 85,43	186,85 ^{a,A,1} \pm 69,34	121,06 ^{ab,A,1} \pm 163,14	266,07 ^{a,B,1} \pm 73,07

Médias seguidas de:

- Letras minúsculas, comparam as colunas dos grupos ao nível de 5% pelo teste de Tukey.
- Letras maiúsculas, comparam as linhas dentro dos grupos ao nível de 5% pelo teste de Tukey.
- Números na mesma linha, comparam o valor inicial e final da categoria estresse, com seu correspondente na categoria controle ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os resultados representam a média para quatro ou cinco animais

desbalanço aminoacídico. O aumento da corticosterona do grupo caseína 18% (dieta I) não foi considerado significativo, contrariamente ao observado com o valor do balanço nitrogenado.

É aceito que a exposição repetida a estímulos estressantes leva à adaptação, o que se reflete em resposta hormonal diminuída frente ao agente agressor. A intensidade do estresse é um dos fatores que podem determinar a ocorrência da adaptação, sendo que estímulos mais fortes mantêm a resposta hormonal, independentes do número de sessões (PITMAN et al., 1990; NATELSON et al., 1988). O intervalo entre as sessões também é fator importante (DE SOUZA & VAN LOON, 1982) assim como a duração e a frequência do estresse aplicado. Por essas razões encontramos na literatura respostas hormonais diversas frente ao estresse crônico: resposta hormonal diminuída em apenas quatro dias (MURISON et al., 1986); resposta aumentada durante sete primeiros dias com diminuição até o 14º dia (KANT et al., 1986). Respostas aumentadas num período de oito dias (PITMAN et al., 1990); por dez dias (KANT et al., 1983); por dez dias e ainda mantidas por mais três dias após o término do estresse (OTTENWELLER et al. 1992). Também se relatou o caso de dosagem aumentada durante sete dias em ensaio de restrição e 21 dias para contenção física (PITMAN et al., 1988). Em relação ao estímulo sonoro, DE BOER et al. (1988) encontraram resposta hormonal diminuída à exposição sucessiva (100 dB/30 minutos) assim como ARMARIO et al. (1984) (85 dB/ 28 dias) enquanto que BORRELL et al. (1980) encontraram adaptação a 100 dB/ 11 dias somente a partir do sexto dia de estresse alcançando adaptação completa no 11º dia. No presente estudo, pode observar-se que, ao cabo de sete exposições diárias ao ultrassom, houve atenuação estatística da resposta hormonal apenas para o grupo com a melhor dieta, enquanto que para os demais não houve adaptação. Note-se que houve uma larga faixa de variação nos níveis de hormônio encontrados nos animais dos grupos com a melhor proteína (dietas I e II), a qual foi responsável pelo mascaramento da reação de alguns dos animais do grupo I. Portanto, nossos resultados estão de acordo com a maioria dos trabalhos

citados, no sentido de que, num período de sete dias já pode notar-se uma adaptação ao estímulo estressor.

Para os animais estressados consumindo a dieta I , o valor final da corticosterona não foi significativamente maior do que no início. Isto pode ter sua explicação na alta variação dos valores em torno da média. Estas amplas diferenças hormonais na resposta ao estresse são encontradas na literatura (VOGEL & JENSH, 1988; NATELSON et al., 1988) e se devem a predisposições físicas e psicológicas que individualizam a maneira de se perceber um estímulo (McEWEN & STELLAR, 1993). NATELSON et al., 1988 chegam mesmo a classificar os animais em “low responders” e “high responders” para posterior análise.

Já comparando as concentrações finais de corticosterona entre os animais controle e os submetidos a estresse, encontraremos valores aumentados para esta última categoria sem, no entanto, as mesmas serem significativas, exceto para o grupo I, que difere de seu controle.

Através dos dados analisados, podemos concluir que os animais experimentais (estressados) apresentaram resposta ao estímulo acústico empregado, sem mostrar adaptação orgânica ao estresse, se comparados aos valores hormonais iniciais; porém, a pequena diferença entre os valores finais dos animais controle e aqueles sob estresse sugerem que o estímulo aplicado foi brando ou que algum outro fator não percebido pelos pesquisadores , pode ter afetado o grupo controle, elevando os níveis hormonais de corticosterona e tornando-os similares aos níveis do grupo exposto ao estresse.

5.5 - COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS

Embora o comportamento dos animais submetidos ao estresse tenha sido observado, mas não quantificado, foi possível perceber algumas alterações que contrastaram com a dos animais controle.

Uma vez iniciada a seção de estresse, os animais mostraram-se ativos, correndo agitadamente nas gaiolas. Após alguns minutos adotaram um estado de alerta, permanecendo imóveis mas visivelmente afetados pelo som em atitude de rejeição ao barulho ambiental, permanecendo assim até o término da sessão (60 minutos). Esse comportamento diferiu daquele dos animais controle que se mantiveram calmos durante todo o período do ensaio biológico. No entanto, o comportamento alterado foi observado para os animais bem nutridos, pois os animais com dietas deficientes permaneceram aparentemente calmos, exibindo uma reação de defesa passiva frente ao som. Essas alterações foram observadas principalmente nos 3-4 primeiros dias das sessões, mas tenderam a desaparecer nos dias subsequentes.

A alteração de comportamento diante de um estímulo agressor foi relatada em estudos utilizando estresse acústico (NAYFIELD & BESCH, 1981; DE BOER et al., 1988; SCHMID et al., 1989) e outros tipos de estresse como o choque (PITMAN et al., 1990).

Embora a alteração no comportamento tenha sido observada somente nos primeiros dias de apresentação do estímulo, sabemos, através da análise dos valores hormonais obtidos, que os animais não se adaptaram completamente ao estresse sonoro imposto o suficiente para não ser detectada a elevação da corticosterona no sétimo dia. Isto se deve ao fato dos mecanismos de adaptação do eixo adrenal serem diferentes dos da adaptação comportamental.

É evidente que a alteração do quadro comportamental seguiu uma evolução diferente da observada com os parâmetros consumo alimentar e balanço nitrogenado. É importante salientar, entretanto que, enquanto o quadro comportamental é resposta a um estímulo de duração relativamente curta, a ingesta alimentar e o balanço são efeitos de maior abrangência, assim como, a determinação dos níveis do hormônio mostra apenas os pontos inicial e final do ensaio. Isso deixa ver a possibilidade de que os animais melhor nutridos, apesar de mostrarem uma reação momentânea mais clara do que os mal nutridos, tiveram a capacidade também de se adaptar externa e hormonalmente a um estímulo de duração relativamente curta.

6 . CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais aqui utilizadas, podemos concluir que o estímulo acústico de frequência ultrassônica:

- Representou estresse aos animais experimentais analisados segundo os resultados da concentração de corticosterona sérica, se estes valores forem comparados aos valores iniciais;
- Não alterou a evolução do peso corporal, mas alterou parcialmente o consumo alimentar dos animais experimentais. Uma vez que as concentrações hormonais mostraram que houve estresse, podemos presumir que a avaliação do estresse depende da variável analisada;
- Diminuiu o balanço de nitrogênio dos animais alimentados com a dieta que fornecia 18% de caseína sugerindo, portanto, que o animal bem nutrido reage ao estresse enquanto os alimentados com dietas deficientes mostraram um tipo de tolerância ou adaptação passiva ao agente agressor. Assim o ultrassom, como variável não controlada, pode afetar o resultado final de um experimento biológico;

7 . SUGESTÕES PARA PRÓXIMAS PESQUISAS

- Acompanhar por maior espaço de tempo as possíveis alterações causadas por esta fonte de estresse, assim como avaliar outras variáveis tais como o tamanho das adrenais e a formação de úlceras gastrointestinais, que são considerados bons indicadores de estresse;
- Identificar a presença de fontes de ultrassom dentro e fora dos locais de experimento biológico, inclusive visando melhorar futuros projetos de construção de biotérios;
- Estudar o efeito de outras deficiências nutricionais ou características composicionais da dieta, verificando quais são relevantes na resposta animal frente ao estresse.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- AIN - Standards for Nutricional Studies Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. **Journal of Nutrition**. Philadelphia, v.107, n.7, p.1340-1348, 1977.
- ANDRÉN, L.; HANSSON, L.; BJÖRKMAN, M; JONSSON, A.; BORG, K.O. Hemodynamic and hormonal changes induced by noise. **Acta Medica Scandinavica**, Stockholm, v. 625, p.13-18, 1979.
- ANITESCO, C.; BUBUIANO, E.; CONTULESCO, A. Interaction des catécholamines etudes électrolytes dans le traumatisme sonore-vibratoire industriel. **Archives des Maladies Professionnelles de Medicine du Travail et de Sécurité Sociale (Paris)**, Paris, v. 34, n.9, p. 503-510, 1973.
- ARGUELLES, A.A.; IBEAS, D.; OTTONE, J.P.; CHEKHERDEMIAN, M. Pituitary-adrenal stimulation by sound of different frequencies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v.22, p.846-852, 1962.
- ARMARIO, A.; MONTERO, J.L.; PIA-GIRIBERT, T. VIVAS, C.; BALASH, J. Effects of chronic noise or water restriction on weight of body and organs in the rat. **Revista Espanhola de Fisiologia**, Pamplona, v.39, n.3, p. 267-270, 1983.
- ARMARIO, A.; MONTEIRO, J. L.; BALASCH, J. Sensitivity of corticosterone and some metabolites available to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.37, n.4, p. 559-561, 1986.

- ARMARIO, A.; HIDALGO, J.; GIRALT, M. Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. **Neuroendocrinology**, Oxford, v.47, p. 263-267, 1988.
- ARMARIO, A.; CASTELLANOS, J.M.; BALASCH, J. Adaptation of anterior pituitary hormones to chronic noise stress in male rats. **Behavioral and Neural Biology**, New York, v.41, p. 71-76, 1984.
- ASHLEY, D.V.M.; COSCINA, D.V.; ANDERSON, H. Selective decrease in protein intake following brain serotonin depletion. **Life Sciences**, Philadelphia, v.24, n.11, p. 973-984, 1979.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Biological evaluation of protein quality. In: **Official Methods of Analysis**, 12th ed., 1975, p.857. A.O.A.C. Washington, D.C.
- BELL, R. Ultrasound in small rodents: arousal-produced and arousal-producing. **Developmental Psychobiology**, New York, v.7, n.1, p. 39-42, 1974.
- BERNE, R.M. & LEVY, M.N. Hipotálamo e hipófise. In: _____ ; _____ (eds) **Fisiologia**. 2ª ed. Guanabara, 1990. cap.52, p.714-743.
- BORRELL, J.; TORRELAS, S.; GUAZA, C.; BORRELL, S. Sound stimulation and its effects on the pituitary-adrenocortical function and brain catecholamines in rats. **Neuroendocrinology**, Oxford, v.31, p.53-59, 1980.
- BROWN, A.M. & PYE, J.D. Auditory sensitivity at high frequencies in mammals. **Advances in Comparative Physiology and Biochemistry**, New York, v.6, p.1-73, 1975.

- CIURZYNSKA, G.; DZIERZKOWSKA, J.; MASLINSKI, S. Gastric cytoprotective activity of endogenous 5-HT. **Journal of Physiology and Pharmacology**, London, v.45, n.4, p. 517-532, 1994.
- CLOUGH, G. Environmental effects on animals used in biomedical research. **Biological Review**, Cambridge, v.57, p. 487-523, 1982.
- DALLMAN, M.F. & JONES, M.T. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. **Endocrinology**, Baltimore, v.92, n.5, p. 1367-1375, 1973.
- DE BOER, S.F.; SLANGEN, J.L.; VAN DER GUGTEN, J. Adaptation of plasma catecholamine and corticosterone responses to short-term repeated noise stress in rats. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.44, p. 273-280, 1988.
- DELARUE, J.; COUET, C.; CONSTANTS, T.; LAMISSE, F. Modifications des métabolismes énergétique, glucidique, protéique et lipidique au cours de l'agression aiguë. **Gastroenterologique, Clinique Biologique**, Paris, v.14, p. 41-50, 1990.
- DE SOUZA, E.B. & VAN LOON, G.R. Stress induced inhibition of the plasma corticosterone response to a subsequent stress in rats: a nonadrenocorticotropin-mediated mechanism. **Endocrinology**, Baltimore, v.110, p.23-33, 1982.
- DOYLE, W.J.; KELLEY, C.; SIEGEL, M.I. The effects of audiogenic stress on the growth of long bones in the laboratory rat. **Growth**, Lakeland, v.41, n.3, p.183-189, 1977.

- DUNN, J.; SCHEVING, L.; MILLET, P. Circadian variation in stress-evoked increases in plasma corticosterone. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.223, n.2, p.402-406, 1972.
- FERNANDEZ S.; KURPAD A. V.; KILPADI, A. B.; SHETTY, P. S. Resting energy expenditure and nitrogen loss after surgery in chronically undernourished patients. **World Journal of Surgery**, Bruxelles, v.17, n.1, p. 80-84, 1993.
- FRIEDMAN, M.; BYERS, S.O.; BROWN, A.E. Plasma lipid response of rats and rabbits to an auditory stimulus. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.212, p.1174-1175, 1967.
- GAMBLE, M.R. Sound and its significance for laboratory animals. **Biological Review**, Cambridge, v.57, p.395-421, 1982.
- GEBER W. F.; ANDERSON T.A.; VAN DYNE, B. Physiologic responses of the Albino rat to chronic noise stress. **Archives of Environmental Health**, Washington, v.12, p.751-754, 1966.
- GIESECKE, K.; KLINGSTEDT, C.; LJUNGQUISTO, O.; HAGENFELDT, L. The modifying influence of anaesthesia on postoperative protein catabolism. **British Journal of Anaesthesia**, London, v.72, n.6, p. 697-699, 1994.
- GLASS, D.C. & SINGER, J.E. Behaviour after effects of unpredictable and uncontrollable aversive events. **American Scientist**, New Haven, v.60, p.457-465, 1972.
- GOULD, W.J. & SULLIVAN, R.F. Noise. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.216, p.17 - 29, 1973.

- HALE, A.C. & REES, L.M. **ACTH and related peptides** In: DeGROOT, L.J. et al. (eds.): *Endocrinology*. vol 2. New York. W.B.Saunders Company, 1989, p.363-391.
- HARBUZ, M.S. & LIGHTMAN, S.L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.134, n.3, p. 327-339, 1992.
- HENNESSY, M.B.; HEYBAVH, J.P.; VERNIKOS, J.; SEYMOUR, L. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.22, n.5, p. 821-825, 1979.
- HORVATH, S.M. & BEDI, J.F. Heat, cold, noise and vibration. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v.74, n.2, p. 515-525, 1990.
- HRUBES, V. & BENES, V. A study on the effect of repeated noise in rats. **Activitas Nervosa Superior (Praha)**, Praha, v.7, p.165-169, 1965.
- JURTSHUR, P.; WELTMAN, A.S.; SACKLER, A.M. Biochemical responses of rats to auditory stress. **Science**, Washington, v.129, p. 1424-1425, 1959.
- KANT, G.J.; BUNNELL, B. N.; MOUGEY, E.H.; PENNINGTON, L.L.; MEYERHOFF, J.L. Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, corticosterone and Growth hormone in male rats. **Pharmacology Biochemistry & Behaviour**, Fayetteville, v.18, n.6, p. 967-971, 1983.
- KANT, G. J.; LEU, J.R.; ANDERSON, S.M.; MOUGEY, E.H. Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.40, n.6, p.775-779,1987.

- KINNEY, J.M. & ELWYN, D.H. Protein metabolism and injury. **Annual Review Nutrition**, v.3, p. 433-466, 1983.
- KLINT, T. & ANDERSON, G. Ultrasound vocalization is not related to corticosterone response in isolated rat pups. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v.47, n.4, p.947-950, 1994.
- LEAKEY, E.A.; CHEN, S.; MANJGALADZE, M.; TURTURRO, A.; DUFFY, P.H.; PIPKIN, J.L.; HART, R.W. Role of glucocorticoids and "caloric stress" in modulating the effects of caloric restriction in rodents. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.719, p.171-194, 1994.
- LÓPEZ-JIMÉNEZ, M.; VALENÇA, M.M.; MOREIRA, A.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Ether and immobilization stress effects on pituitary adrenal function in hemidecorticate rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.22, n.6, p.779-782, 1989.
- McEWEN, B.S. & STELLAR, E. Stress and individual. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.153, p. 2093-2101, 1993.
- MILLIGAN, S.R.; SALES, G.D.; KHIRNYKH, K. Sound levels in rooms housing laboratory animals: an uncontrolled daily variable **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.53, n.6, p.1067- 1076, 1993 .
- MORITA, A. & NAKANO, K. Effect of chronic immobilization stress on tissue distribution of vitamin A in rats fed a diet with adequate vitamin A.. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.112, p. 789-795, 1982.

- MURISON, R.; OVERMIER, J.B.; SKOGLUND, E.J. Serial stressors: prior exposure to a stressor modulates its later effectiveness on gastric ulceration and corticosterone release. **Behavioral and Neural Biology**, New York, v.45, p. 185-195, 1986.
- NATELSON, B.H.; TAPP, W.N.; ADAMUS, J.E.; MITTLER, J.C.; LEVIN, B.E. Humoral indices of stress in rats. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.26, n.6, p. 1049-1054, 1981.
- NATELSON, B.H.; OTTENWELLER, J.A.C.; PITMAN, D.; McCARTY, R.; TAPP, W.N. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.43, n.1, p. 41-46, 1988.
- NAYFIELD, K.C. & BESCH, E.L. Comparative responses of rabbits and rats to elevated noise. **Laboratory Animal Science**, Cordova, v.31, n.4, p. 386-390, 1981.
- O.I.T.: Preventing stress at work. **Conditions of Work Digest**, Geneva, v.11, n.2, p.1-270, 1992.
- O'KEFE, S.J.D. & SENDER, P.M. "Catabolic" loss of body nitrogen in response to surgery. **Lancet**, Minneapolis, v.2, p. 1035-1037, 1974.
- OTTENWELLER, J.E.; SERVATIUS, R.J.; TAPP, W.N.; DRASTAL, S. D.; BERGEN, M.T.; NATELSON, B.H. A chronic stress state in rats: effect of repeated stress on basal corticosterone and behaviour. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.51, n.4, p. 689-698, 1992.

- PELLET, P.L. & YOUNG, V.R. ed. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo, The United Nations University, cap. 5, Part I, p.58-75, 1980.
- PENG, Y.; TEWS, J.K.; HARPER, A.E. Amino acid imbalance, protein intake, and changes in rat brain and plasma amino acids **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.222, n.2, p. 314-321, 1972.
- PETERS, J.C. & HARPER, A.E. Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.115, p. 382-398, 1985.
- PETERSON, E.A. High frequency and ultrasonic overstimulation of the Guinea pig ear. **The Journal of Auditory Research**, v.8, p. 43-61, 1968.
- PIAU-VIEIRA, C. **Avaliação da qualidade nutricional e microbiológica de ração autoclavável para ratos e camundongos de biotério livres de patógenos específicos (SPF)**. Campinas, 1992. 157p. Tese (mestre em Ciência da Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
- PIKE, R.L. & BROWN, M.L. **Nutrition: an integrated approach**. New York, Macmillan, 3ª. ed. Cap. 23, p. 736-794, 1984. 1068 pp.
- PITMAN, D.L.; OTTENWELLER, J.E.; NATELSON, B.H. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. **Physiology & Behaviour**, Elmsford, v.43, n.1, p.47-55, 1988.

- PITMAN, D.L.; OTTENWELLER, J.E.; NATELSON, B.H. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. **Behavioral Neuroscience**, Washington, v.104, p. 28-36, 1990.
- PRITCHETT, J.F.; BROWDER, M.L.; CALDWELL, R.S.; SARTIN, J.L. Noise stress *in vitro* adrenocortical responsiveness to ACTH in wild cotton rats, *Sigmodon hispidus*. **Environmental Research**, New York, v.16, p. 29-37, 1978.
- PYE, A. The effect of short noise exposures in the Guinea Pig. **Archives of Otorhinolaryngology**, v.240, n.2, p.107-114, 1984.
- RISKIND, P.N. & MARTIN, J.B. **Functional anatomy of the hypothalamic-anterior pituitary complex** In: DeGROOT, L.J. et al. (eds.): **Endocrinology**. vol 2. New York. W.B.Saunders Company, 1989, p.97-107.
- ROGERS, A.E. Nutrition. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R. & WEISBROTH, S.H., ed. **The laboratory rat vol. I. Biology and diseases**. Orlando, Academy Press Inc., p.123-152, 1979.
- ROSENBERG, J. Jets over Labrador and Quebec: noise effects on human health **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v.44, n.7, p. 869-875, 1991.
- SACKLER, A.M.; WELTMAN, A.S.; BRADSHAW, M.; JURTSCHUCK, J. Endocrine changes due to auditory stress. **Acta Endocrinologica**, Copenhagen, v.31, p.405-418, 1959.
- SALES, G.D. The effect of 22 kHz calls and artificial 38 kHz signals on activity in rats. **Behavioral Process**, Amsterdam, v.24, p.83-93, 1991.

- SALES, G.D.; WILSON, K.J.; SPENCER, K.E.V.; MILLIGAN, S.R. Environmental ultrasound in laboratories and animal houses: a possible cause for concern in the welfare and use of laboratory animals. **Laboratory Animals**, Essex, v.22, p.369-375, 1988.
- SCHIMID, P.; HOREJSI, R.C.; MLEKUSCH, W.; PALETTA, B. The influence of noise stress on plasma epinephrine and its binding to plasma protein in the rat. **Biomedica Biochemica Acta**, Berlin, v.48, n.7, p. 453-456, 1989.
- SCHILLER, W.R.; LONG, C.L.; BLAKEMORE, W.S. Creatinine and nitrogen excretion in seriously ill and injured patients. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, Chicago, v.149, p.561-566, 1979.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, London, v.138, p.32, 1936. Apud: SELYE, H. **Stress in health and Disease**, Sydney, Butherworth, 1976.
- SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **Journal of Clinical Endocrinology**, Baltimore, v.6, p.117-230, 1946.
- SELYE, H. **Stress in health and Disease**, Sydney, Butherworth, 1976.
- SHAW, J.H.F.; WILDBORE, M.; WOLFE, R.R. Whole body protein kinetics in severely septic patients - the response to glucose infusion and Total Parenteral Nutrition. **Annals of Surgery**, Baltimore, v.205, n.3, p. 288-294, 1987.
- SIMPSON, E.R. & WATERMAN, M.R. Steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex and its regulation by adrenocorticotropin. In: DeGROOT, L.J. et al. (eds.): **Endocrinology**, New York: W.B. Saunders Company, 1989. vol 2, p.1543-1556.

ZONDER, B.; TAMARI, I. *Effects of auditory stimuli on reproduction. In:* WOLSTENHOLME, G.E.W.; O'CONNOR, M., (eds.) *Effects of external stimuli on reproduction. Ciba Foundation Study No 26. London: J & A Churchill; 1967, p.4-19. Apud: Physiology & Behaviour, Elmsford, v.53, n.6, p.1067- 1076, 1993 .*

ZUCOLOTO, S.; OLIVEIRA, J.A.M.; DUARTE, F.A.M.; OLIVEIRA, J.E.D. "Stress" por contenção e por baixa ingestão protéica em ratos. I. Alterações bioquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Caracas, v.25, n.4, p.375-384, 1975.*