

LEUCOGRAMA DE RATOS ADULTOS JOVENS SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE ESTRESSE MODERADO CRÔNICO ASSOCIADO AO USO DE GH E CORTISOL¹

WBC OF YOUNG ADULT RATS SUBJECTED TO A CHRONIC MILD STRESS PROTOCOL ASSOCIATED TO GH AND CORTISOL¹

Guilherme Vidigal Bello de Araujo², Elaine Gomes Vieira², João Paulo Machado³, Thalita Evani Silva de Oliveira⁴, Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo⁵, Marlene Isabel Vargas Viloria⁵.

Resumo*: *O estresse é definido como um estado de desarmonia ou homeostase ameaçada. Diversas alterações relacionadas ao estresse vêm sendo estudadas e o fator chave para essa ocorrência parece ser a ativação ocorrida no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do estresse moderado crônico sobre a avaliação do leucograma e contagem diferencial de leucócitos em ratos adultos jovens, associado à estimulação tímica ou ao tratamento com glicocorticoides. Foram utilizados 50 ratos (Rattus norvegicus, linhagem Wistar), de ambos os sexos, 11 meses de idade (adultos jovens), sendo 25 machos e 25 fêmeas. Esses animais foram submetidos a protocolo de estresse com duração de 28 dias. O estresse moderado crônico mostrou ser capaz de causar efeitos negativos sobre o perfil leucocitário desses animais, e as principais alterações podem ser creditadas às quantidades de glicocorticóides que são liberados durante eventos estressores contínuos.*

Palavras-chave: *Imunodepressão, leucometria, somatropina, Wistar.*

Abstract: *Stress is defined as um state of disharmony or threatened homeostasis.*

¹Parte da Tese de Doutorado do terceiro autor;

²Graduando do Curso de Medicina Veterinária FACISA/UNIVIÇOSA E-mail: gvba93@yahoo.com.br

³Professor do Curso de Medicina Veterinária da UNIVIÇOSA E-mail: jpmvet@gmail.com

⁴Médica Veterinária – Pós Graduando em Patologia Animal – Universidade Estadual de Londrina. E-mail: thalitamvet@gmail.com

⁵Professor do Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa. E-mail: profmarleneisabel@gmail.com

*Several changes related to stress has been studied and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation seems to be the key factor. This study aimed to evaluate the effects of chronic moderate stress on the evaluation of white blood cell count and differential leukocyte count in young adult rats, associated with thymic stimulation or glucocorticoids.. Were used 50 rats (*Rattus norvegicus*, Wistar), 25 males and 25 females, 11 months old (young adults). These animals were undergo a stress protocol for 28 days. O estresse moderado crônico mostrou ser capaz de causar efeitos negativos sobre o perfil leucocitário destes animais e as principais alterações podem ser creditadas às quantidades de glicocorticóides que são liberados durante eventos estressores contínuos. Chronic moderate stress has been shown to cause adverse effects on blood leukocytes of these rats and the main changes can be credited to the amounts of glucocorticoids that are released during continuous stressful events.*

Keywords: *Imunodepression, white blood cell count, somatropin, Wistar.*

Introdução

O estresse é definido como um estado de desarmonia ou homeostase ameaçada. O sistema de estresse coordena as respostas adaptativas do organismo ao estresse de qualquer tipo (TSIGOS e CHROUSOS, 2002).

A ativação da resposta ao estresse durante fatores ameaçadores foge ao controle do indivíduo e pode estar associada com disforia e, eventualmente, doenças somáticas emocionais. As regiões de controle central do sistema de estresse estão localizadas no hipotálamo e no tronco cerebral, incluindo o hormônio liberador de corticotropina (CRH) produzido pelas células parvocelulares, o sistema arginina-vasopressina (AVP) produzido pelos neurônios do núcleo paraventricular localizados no hipotálamo e a produção de norepinefrina pelo sistema do cerúleo (sistema simpático central) (TSIGOS e CHROUSOS, 1994).

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em conjunto com o sistema simpático/adrenomedular eferente constituem os ramos efetores, através dos quais o cérebro influencia todos os órgãos do corpo durante a exposição a estímulos ameaçadores (GOLD et al, 1988). Em situações não estressantes, tanto o CRH quanto o AVP são secretados no sistema portal de forma

circadiana e pulsátil, com uma frequência de cerca de dois a três episódios de secreção por hora (TSIGOS E CHROUSOS, 1994). Em condições de repouso, a amplitude dos pulsos de CRH e AVP aumenta nas primeiras horas da manhã, resultando, finalmente, em picos de secreção de ACTH e cortisol na circulação geral (CHROUSOS e GOLD, 1998). Essas variações diurnas são perturbadas pelas mudanças em iluminação, alimentação e horários de atividade e são interrompidos por estresse (TSIGOS e CHROUSOS, 2002).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do estresse moderado crônico sobre o leucograma de ratos adultos jovens, associado à estimulação tímica ou ao tratamento com glicocorticoides.

Material e Métodos

Foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), de ambos os sexos, 11 meses de idade (adultos jovens), sendo 25 machos e 25 fêmeas, adquiridos com idade entre 30 e 60 dias, mantidos no Infectório do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) da Universidade Federal de Viçosa, agrupados em dez grupos de cinco animais em gaiolas coletivas de polipropileno (47x34x18 cm), com ração e água ad libitum em temperatura controlada (22- 24 °C) e ciclo luz/escuro de 12 horas. Cada grupo continha cinco machos ou cinco fêmeas. Os procedimentos seguiram as Normas do Comitê de Ética Para Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O protocolo consistiu de agentes estressores variados, sendo realizados quatro ciclos de sete dias de estresse durante 28 dias, seguindo a seguinte ordem: (1º) 12 horas de privação de água, durante o dia; (2º) 12 horas de privação de alimento, durante a noite; (3º) 20 minutos de imobilização; (4º) inclinação da gaiola em ângulo de 45 graus por 2 horas; (5º) diminuição da temperatura ambiente para entre 5 a 8 °C, por 2 horas; (6º) aumento da temperatura ambiente para entre 33 a 37 °C por 24 horas; (7º) manutenção da luminosidade por 24 horas; e (8º) período de isolamento por 24 horas. Esses agentes foram aplicados em diferentes tempos e dias, de forma a evitar a adaptação dos animais.

Para cada grupo, foi considerado um tratamento, sendo os seguintes

empregados: Grupo I (F1 e M1): os animais desse grupo não foram submetidos ao protocolo de estresse. Durante todo o experimento, ficaram acondicionados em sala climatizada, com controle de luz e temperatura, sem restrição alimentar. Grupo II (F2 e M2): todos os animais desse grupo foram submetidos ao esquema de estresse moderado definido na tabela 01. Grupo III (F3 e M3): além do cronograma de estresse já descrito, os animais desse grupo receberam desafio imunológico com saponina, na dose de 75µg nos dias 1º e 21 do protocolo, por via subcutânea. Grupo IV (F4 e M4): os animais desse grupo receberam, além dos tratamentos de estresse e desafio imunológico, a administração de hormônio do crescimento Somatotropina® (GH), com o objetivo de avaliar a capacidade de resposta imunológica e a proliferação celular tímica. Foi administrado diariamente, durante os 28 dias do experimento, 25 µg/kg de GH, por via subcutânea. Grupo V (F5 e M5): os animais pertencentes a esse grupo, além dos tratamentos de estresse e desafio imunológico, receberam uma dose semanal do glicocorticoide prednisona, via intramuscular, na dose de 2mg/Kg.

Após 28 dias de estresse, os animais foram submetidos a eutanásia por decaptação, respeitando as normas internacionais. No momento da eutanásia, foi coletado sangue em frascos de EDTA para avaliação do leucograma e da contagem diferencial de leucócitos, sendo avaliados os valores relativos de linfócitos, monócitos e neutrófilos.

Os dados obtidos nas análises hematológicas foram submetidos à ANOVA, seguida pelo teste de Holm-Sidak, em caso de diferença significativa. Quando não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade de variâncias, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas no programa Sigma-Plot 11.0, considerando 5% de significância.

Resultados e Discussão

As fêmeas dos tratamentos F1, F2, F3 e F4 (Tabela 1) e os machos dos tratamentos M2, M3, M4 e M5 apresentaram leucopenia (Tabela 2). Os machos controle (M1) apresentaram os maiores valores relativos de linfócitos. Esses dados sugerem que o estresse crônico pode causar efeito negativo sobre a

leucometria de ratos. Rosmond (2005) relata que os glicocorticóides liberados durante o estresse têm efeito inibitório sobre as unidades formadoras de colônia da medula óssea

Em M4 foi observada neutrofilia. No entanto, no momento da necropsia para coleta de órgãos, verificou-se que esses animais apresentavam pneumonia. Entretanto, as fêmeas também apresentavam pneumonia e esse evento não foi observado. Os tratamentos F5 e M5 apresentaram linfopenia, evidenciando, apenas nas fêmeas, o efeito linfopênico do glicocorticoide exógeno. Em estudo realizado por Sördeholm et al. (2002) sobre os efeitos do estresse crônico no intestino dos ratos, foi observado aumento no número de neutrófilos e células mononucleares aumentadas, e a teoria mais provável é de que a aderência ou penetração bacterina nas células epiteliais intestinais possa provocar aumento dessas células para sintetizar quimiocinas específicas.

Tabela 1: Resultados das médias por tratamento para os diferentes parâmetros hematológicos avaliados nas fêmeas.

Parâmetro	Valores de referência	Médias obtidas por grupo				
		F1	F2	F3	F4	F5
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4 – 12*	3,1	3,5	3,0	2,9	4,4
Linfócitos (%)	40 – 82*	55	51	66	67	43
Monócitos (%)	0 – 8*	0,6	1,1	0,6	4,4	6,3
Neutrófilos (%)	10 – 45*	29,7	29	22,6	27,1	35,1

*Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2004).

Tabela 2: Resultados das médias por tratamento para os diferentes parâmetros hematológicos avaliados nos machos.

Parâmetro	Valores de referência	Médias obtidas por grupo				
		M1	M2	M3	M4	M5
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4 – 12*	4,5	3,2	3,6	3,6	3,9
Linfócitos (%)	40 – 82*	76	53	60	17	25
Monócitos (%)	0 – 8*	1,7	2,8	3,8	6,0	3,5
Neutrófilos (%)	10 – 45*	21,6	33,9	27,7	65,9	26

*Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2004).

Ao se avaliar individualmente cada parâmetro (leucometria, contagem de linfócitos, de monócitos e de neutrófilos), não foram encontradas diferenças

significativas tanto entre os tratamentos do mesmo sexo quanto entre os dois sexos. Porém, o estresse moderado crônico mostrou ser capaz de causar efeitos negativos sobre o perfil leucocitário de ratos adultos jovens. As principais alterações podem ser creditadas às quantidades de glicocorticóides que são liberados durante eventos estressores contínuos. French et al. (2002) relatam que o cortisol pode impedir a proliferação leucocitária na medula óssea, a sua maturação em órgãos linfoides e também a recirculação linfocitária, por inibir a diapedese.

Referências Bibliográficas

ALLIOTTE, T.; TIRÉ, C.; ENGLER, G.; PELEMAN, J.; CAPLAN, A.; VAN, M. M.; INZÉ D. An Auxin-Regulated Gene of *Arabidopsis thaliana* Encodes a DNA-Binding Protein. **Plant Physiol**; 89 (3):743-52, 1989 Mar.

DEUSTER, P. A.; PETRIDES, J. S.; SINGH, A.; LUCCI, E. B.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. High intensity exercise promotes escape of adrenocorticotropin and cortisol from suppression by dexamethasone: sexually dimorphic responses. **J Clin Endocrinol Metab**; 83 (9): 3332-8, 1998 Sep.

FRENCH, R.A.; BROUSSARD, S.R.; MEIER, W.A.; MINSHALL, C.; ARKINS, S.; J. F.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. **Endocrinology**. v.143. n.2. p.690-699. 2002.E

GOLD, P. W.; GOODWIN, F.; CHROUSOS, G. P. **Clinical and biochemical manifestations of depression: relationship to the neurobiology of stress**. New England Journal of Medicine. v. 7, p. 319-348, 1988.

ROSMOND, R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1-10, 2005.

SÖDERHOLM, J.D.; YANG, P.C.; CEPONIS, P. VOHRA, A.; RIDDELL, R.; SHERMAN, P.M.; PERDUE, M.H. Chronic stress induces mast cell-dependent

bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. **Gastroenterology**. v. 123, n. 4, p. 1099-1108, 2002.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Physiology of the hypothalamic– pituitary–adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**. v. 23, p. 451– 466, 1994.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G, P. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**. v. 53 p. 865– 871, 2002.