

VALORES HEMATIMÉTRICOS E CONTAGEM DE PLAQUETAS DE RATOS SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE ESTRESSE MODERADO CRÔNICO ASSOCIADO AO USO DE GH E CORTISOL¹

Elaine Gomes Vieira², João Paulo Machado³, Guilherme Vidigal Bello de Araujo², Idelvânia dos Anjos Nonato⁴, Marlene Isabel Vargas Viloria⁵, Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo⁵.

Resumo^a: *O estresse é definido como um estado de desarmonia ou homeostase ameaçada. Diversas alterações relacionadas ao estresse vêm sendo estudadas, e o fator chave parece ser a ativação que ocorre no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do estresse moderado crônico sobre a avaliação de hemácias, VCM, HCM, CHCM, hematócrito e plaquetas em ratos adultos jovens, associado à estimulação tímica ou ao tratamento com glicocorticóides. Foram utilizados 50 ratos (Rattus norvegicus, linhagem Wistar), de ambos os sexos, de 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 os valores hematimétricos e contagem de plaquetas, e o fator principal causador dessas alterações parece estar relacionado aos efeitos negativos dos glicocorticóides que são liberados durante eventos estressores contínuos.*

Palavras-chave: Cortisol, estresse, hematopoiese, hormônios.

Abstract: *Stress is defined as um state of disharmony or threatened homeostasis. Several changes related to stress has been studied and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation seems to be the key factor. The present study aimed to evaluate the chronic moderate stress effects on the evaluation of red blood cells,*

¹Parte de Tese de Doutorado defendida na Universidade Federal de Viçosa;

²Graduando do Curso de Medicina Veterinária UNIVIÇOCA E-mail: elainevieiravet@gmail.com

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

⁴Estudante de Pós Graduação Universidade Federal de Viçosa. E-mail: vania.dosanjos@gmail.com

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

MCV, MCH, MCHC, hematocrit and platelets in young adults rats, associated with thymic stimulation or/and treatment with 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. Chronic moderate stress was shown negative effects on the hematological values and platelet count. The main factor causing these changes seem to be related to the glucocorticoids negative effects, released during continuous stressful events.

Keywords: *glucocorticoids, hematopoiesis , hormones, stress.*

Introdução

O estresse é definido como um estado de desarmonia ou homeostase ameaçada. Existe um sistema que coordena as respostas adaptativas do organismo ao estresse de qualquer tipo. A ativação da resposta ao estresse durante fatores ameaçadores foge ao controle do indivíduo, podendo estar associada com disforia e, eventualmente, a doenças somáticas emocionais. As regiões de controle central do sistema de estresse estão localizados 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, 2002).

O eixo hipotálamo-hipófise-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 CRH quanto 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 (ENGLER et al., 1989). Em condições de repouso, a amplitude dos pulsos de CRH e AVP aumentam nas primeiras horas da manhã, resultando, finalmente, em picos de secreção de ACTH e cortisol na circulação geral (HORROCKS et al., 1990; CHROUSOS e GOLD, 1998). Essas variações diurnas são perturbadas pelas mudanças na iluminação, na alimentação e nos

horários de atividade, além de serem interrompidos por estresse (TSIGOS e CHROUSOS, 2002).

O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do estresse moderado crônico sobre a avaliação de hemácias, VCM, HCM, CHCM, hematócrito e plaquetas em ratos adultos jovens, associados à estimulação tímica ou ao tratamento com glicocorticoides.

Material e Métodos

Foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), de ambos os sexos, de 11 meses de idade (adultos jovens), sendo 25 machos e 25 fêmeas, adquiridos com idade entre 30 a 60 dias e mantidos no Infectório do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) da Universidade Federal de Viçosa. Foram agrupados em dez grupos de cinco animais por 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, sendo cada grupo com 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 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 e 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. Foram administrados diariamente, durante os 28 dias do experimento, 25 µg/kg de GH, por via subcutânea. Grupo V (F5 e M5): os animais pertencentes a este 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-se as normas internacionais. Esse tipo de eutanásia foi escolhido porque a utilização de medicamentos poderia alterar os resultados dos testes sorológicos imunoenzimáticos, hematológicos e imunoistoquímicos.

No perfil hematológico, avaliou-se a contagem de hemácias (Hm), hematócrito (Ht), hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio de hemácias (VGM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de plaquetas, sendo mensurado em sangue total coletado em frascos com EDTA, por venopunção, no dia da eutanásia.

Os dados obtidos nas análises hematológicas foram submetidos a 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-se 5% de significância.

Resultados e Discussão

Os resultados dos exames hematológicos foram compilados para cada parâmetro avaliado. Obteve-se um valor médio para os cinco tratamentos empregados nas fêmeas (Tabela 1) e nos machos (Tabela 2), incluindo o grupo controle.

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

Parâmetros e referências	Médias obtidas por grupo				
	F1	F2	F3	F4	F5
Hem $10^6/\text{mm}^3$ (7,2 – 16*)	9,5	8,5	7,0	6,7	7,7
Ht % (43,39**)	51,94	40,6	37,17	32,34	46,86
VCM fL (58,78***)	53,0	53,2	51,5	50,2	54,6
HCM pg (20****)	16,4	16,2	16,4	19,1	18,3
CHCM g/dL (29,71**)	31,2	31,5	31,5	37,5	31,9
Plaquetas $10^3/\text{mm}^3$ (650****)	388	289	335	666	626

*Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2004); **CARVALHO *et al.*, 2009; ***MORETI *et al.*, 2006; ****CASTELLO BRANCO *et al.*, 2011.

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

Parâmetros e referências	Médias obtidas por grupo				
	M1	M2	M3	M4	M5
Hem $10^6/\text{mm}^3$ (7,2 – 16*)	8,8	8,7	9,1	7,4	8,5
Ht % (43,39**)	43,90	46,4	45,1	37,56	41,60
VCM fL (58,78***)	50,0	49,5	49,8	51,33	50,2
HCM pg (20****)	15,85	15,9	16,1	17,1	16,1
CHCM g/dL (29,71**)	31,95	32,0	32,2	33,7	32,5
Plaquetas $10^3/\text{mm}^3$ (730****)	810	722	818	472	779

*Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2004); **CARVALHO *et al.*, 2009; ***MORETI *et al.*, 2006; ****CASTELLO BRANCO *et al.*, 2011.

Os valores do volume corpuscular médio (VCM) de F5 apresentou-se significativamente maior que F4, porém, nos machos, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA [$p < 0,001$]; Hom-Sidak). Os valores da concentração corpuscular média de hemoglobina (CHCM) mostrou diferença significativa entre F4 e F1 e entre F4 e F2 (Kruskal-Wallis [$p = 0,001$]; Dunn's), sendo F4 significativamente superior aos demais.

Não foram encontradas diferenças significativas, tanto entre os tratamentos do mesmo sexo quanto entre os dois sexos, para os parâmetros HCM e contagem de plaquetas. Os valores obtidos para HCM, apesar de menores que aqueles de referência, podem representar os valores normais dos ratos do biotério da UFV; além disso, é possível que estes variem dependendo do tipo de técnica ou mesmo do aparelho empregado (MORETI *et al.*, 2006; CASTELLO BRANCO *et al.*, 2011).

Apesar de CARVALHO *et al.* (2009) terem observado que diferenças na média de cada variável entre os sexos é um achado normal mesmo em animais saudáveis, foram verificadas diferenças na resposta ao estresse entre machos e fêmeas para hematócrito e VCM. O estresse moderado crônico mostrou ser capaz de causar efeitos negativos sobre os valores hematimétricos e contagem de plaquetas, e o fator principal causador dessas alterações parecem estar relacionadas aos efeitos negativos dos glicocorticóides que são liberados durante eventos estressores contínuos. Por outro lado, o hormônio do crescimento mostrou ser um antagonista dos efeitos negativos dos glicocorticóides. Tresguerres *et al.* (2008) demonstraram os efeitos negativos

dos hormônios sobre o metabolismo durante o envelhecimento de ratos e a forma de antagonizar esses efeitos por meio de terapias hormonais.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir que os glicocorticóides liberados durante o estresse crônico influenciam negativamente a hematopoiese, sendo essa influência variável entre os sexos ou até mesmo entre indivíduos. Ao extrapolar esses dados para humanos, é possível sugerir que os efeitos deletérios do estresse são muito variáveis de um indivíduo para o outro ou, até mesmo, a forma como cada indivíduo reage frente aos agentes estressores diários pode ser crucial ao surgimento de doenças sanguíneas.

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.

CARVALHO, G.D.; MASSENO, A.P.B.; ZANINI, M.S.; ZANINI, S.F.; PORFÍRIO, L.C.; MACHADO, J.P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres.** v. 56, n. 1, p. 051-057, 2009.

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.

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.

HORROCKS, P.M.; JONES, A.F.; RATCLIFFE, W.A.; HOLDER, G.; WHITE, A.; HOLDER, R.; RATCLIFFE, J.G.; LONDON, D.R. Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty-four hours in normal males and females. **Clinical Endocrinology**. v. 32, p.127-134, 1990.

TRESGUERRES, J.A.F.; KIREEN, R.; TRESGUERRES, A. F.; BORRAS, C.; VARA, E.; ARIZNAVARRETA, C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. V. 108. p. 318-126. 2008.

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