

Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica

Andréa Sanchez¹

Manoel Lima de Menezes¹

Oduvaldo Camara Marques Pereira²

Recebido em: 23/07/2002

Aceito em: 20/11/2002

SANCHEZ, Andréa; MENEZES, Manoel Lima de; PEREIRA, Oduvaldo Camara Marques. Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 15-22, 2002.

RESUMO

A síndrome de estresse é caracterizada por complexas alterações neuroendócrinas. Essas alterações, ao menos parcialmente, fazem parte de um mecanismo de ajuste dos tecidos. Assim, foram avaliados os níveis plasmáticos de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina, dopamina e L-dopa) em ratos. Os resultados mostram o aumento dos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina resultante da reação de alerta causada pela manipulação dos animais. Desta forma, é possível a obtenção de respostas alteradas em função do estresse de manipulação. Todavia, para que se possam analisar respostas fisiofarmacológicas e considerá-las como alteradas é necessário que se estabeleça uma padronização experimental rígida bem como uma resposta “controle” altamente confiável.

UNITERMOS: catecolaminas, plasma, CLAE.

INTRODUÇÃO

O sistema nervoso, juntamente com o sistema endócrino, é responsável pela maioria das funções de controle do organismo. O modo de transmissão entre os neurônios é carregado por neurotransmissores, substâncias químicas neuroativas liberadas no lado pré-sináptico da junção entre dois neurônios, a sinapse.

As catecolaminas são importantes neurotransmissores e hormônios circulantes (BENEDICT, 1987, PEREIRA, 1998).

Os neurotransmissores adrenalina, noradrenalina, dopa e dopamina são hormônios carregados que possuem propriedades de catecolaminas,

1 Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências. Departamento de Química - Bauru.

2 Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Farmacologia - Botucatu.

Endereço: UNESP, Faculdade de Ciências. Departamento de Química, Av. Eng. Edmundo C. Coube S/N. Bauru, São Paulo, Brasil, CEP-17033-360

aminas ativas contendo o composto catecol, e são sintetizados a partir da tirosina.

A complexa interação dos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e simpático-adrenal, recrutada pelo organismo como fator modulador da homeostasia resulta, basicamente, em liberação do hormônio adrenocorticotrófico da glândula hipofisária anterior, glicocorticóides do córtex adrenal, adrenalina da medula adrenal e noradrenalina das terminações nervosas simpáticas (FIGURA 1).

A avaliação das alterações fisiológicas decorrentes de diversas patologias pode ser efetuada através da quantificação (dosagem) de catecolaminas, glicocorticóides e gonadotrofinas, dentre outras (MILLS, 1985).

O conjunto dessas modificações fisiológicas é denominado como estresse ou síndrome de adaptação geral (SAG), termo cunhado por Hans Selye, o criador e pesquisador que levantou a questão.

Complexas interações estão envolvidas na regulação destes hormônios. Os glicocorticóides regulam a biossíntese de catecolaminas na medula adrenal e as catecolaminas estimulam a liberação de adrenocorticotrofina da adenohipófise (AXEROLD, 1984).

Os níveis de catecolaminas e corticosteróides podem variar de acordo com os estímulos estressogênicos como em animais empregados na experimentação científica. Desta forma, tais estímulos podem ser proporcionados pelo experimentador, o qual visa avaliar a influência de tais agentes estressogênicos. Entretanto, estes estímulos podem ser ocasionais quando as condições experimentais não são adequadamente controladas, tais como condições biotéricas e de manipulação.

Considerando-se que as alterações nos níveis plasmáticos de catecolaminas compreendem um fenômeno de repercussões fisiopatológicas muito amplas e que tais alterações hormonais que caracterizam a “síndrome de estresse” podem modificar a atividade de diversos sistemas fisiológicos e levar a fisiopatologias, torna-se relevante avaliar os níveis plasmáticos de catecolaminas em animais preservados de um modelo pré-estabelecido de estresse cujas condições experimentais variaram quanto à manipulação dos animais.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Foram utilizados ratos albinos adultos machos, Wistar, cepa UNESP, com aproximadamente 90 dias de idade, pesando cerca de 300g, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP localizado no Campus de Botucatu/SP. Os animais permaneceram no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), por um período mínimo de 10 dias, sob condições controladas de alimentação, temperatura, ruído e ciclo claro-escuro para aclimação. Estes animais foram mantidos em gaiolas coletivas, contendo 5 animais por gaiola, com livre acesso à água e alimento.

SANCHEZ, Andréa; MENEZES, Manoel Lima de; PEREIRA, Oduvaldo Camara Marques. Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 15-22, 2002.

SANCHEZ, Andréa; MENEZES, Manoel Lima de; PEREIRA, Oduvaldo Camara Marques. Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 15-22, 2002.

Grupos experimentais

Os grupo I e II foram compostos por ratos preservados de estresse, anestesiados com pentobarbital sódico ($50\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), tendo sido efetuada a coleta do sangue após 50 minutos de anestesia no grupo I e após 5 minutos de anestesia no grupo II.

Vale ressaltar que o tempo de metabolização das catecolaminas liberadas durante a situação de alerta é cerca de cinquenta minutos.

Coleta, estocagem e transporte do plasma sanguíneo

As amostras sanguíneas de 5 a 6mL foram coletadas em frascos heparinizados através da inserção de uma cânula na aorta abdominal. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2000 R.P.M, durante 20 minutos a 2°C , o plasma obtido foi estocado em gelo seco a -70°C .

Os frascos contendo plasma foram acondicionados em recipiente isotérmico mantendo estável a temperatura para se efetuar o transporte do plasma do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu para o Departamento de Química da Faculdade de Ciências da UNESP - Bauru.

Visando manter a estabilidade química das catecolaminas, as amostras de plasma, foram estocadas em nitrogênio líquido no Departamento de Química da Faculdade de Ciências da UNESP - Bauru.

O transporte das amostras do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da UNESP - Bauru para o Departamento da Disciplina de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina - São Paulo foi efetuado acondicionando as amostras em recipiente isotérmico contendo gelo seco a -70°C .

Dosagem de catecolaminas plasmáticas

A determinação da concentração plasmática das catecolaminas foi realizada empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (NAFFAH-MAZZACORATTI, 1992).

A separação das catecolaminas foi realizada à temperatura de 22°C , com fluxo da fase móvel ajustado em $0,80\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A fase móvel empregada foi composta por 0,02M de fosfato de sódio dibásico, 0,02M de ácido cítrico, pH 2,64, metanol a 10%, 0,12mM de EDTA sódico e $556\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido heptanossulfônico, sendo utilizado um detector eletroquímico com potencial ajustado em +0,5V.

Quando necessário, as amostras foram medidas em duplicata. Os resultados estão expressos em $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de plasma.

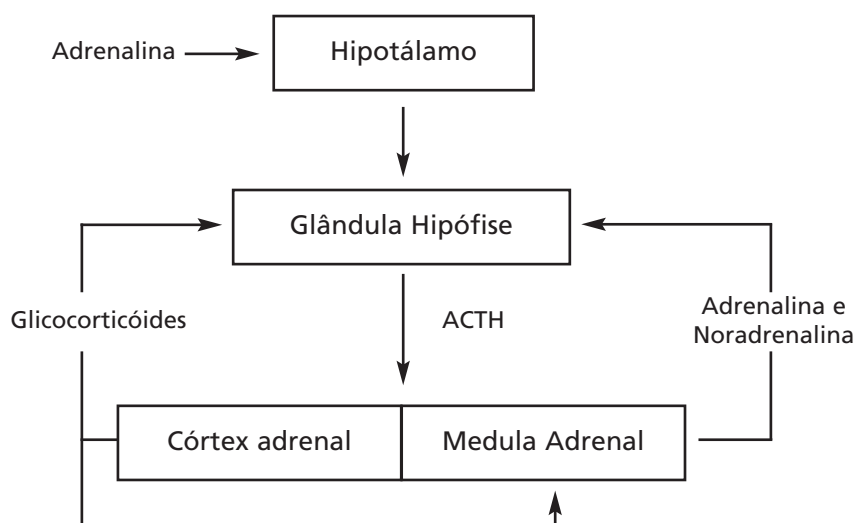


FIGURA 1: Esquema mostrando a interação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal.

RESULTADOS

O grupo I foi composto por animais preservados de qualquer condição de estresse, tendo sido efetuada a coleta do sangue após 50 minutos de anestesia, tempo necessário para a metabolização das catecolaminas liberadas na situação de alerta. Já o grupo II foi composto por animais preservados de qualquer condição de estresse, da mesma forma que o grupo Controle I, tendo sido efetuada a coleta do sangue após 5 minutos de anestesia, tempo insuficiente para a metabolização das catecolaminas.

Os resultados expressos na Tabela 1 e Figura 2, mostram o nível basal de catecolaminas e as diferenças entre os grupos.

Os valores referentes às concentrações plasmáticas de catecolaminas estão expressos em pg.mL^{-1} .

TABELA 1: Níveis plasmáticos de catecolaminas em animais dos grupos I e II.

Grupo	NA	ADR	LD	DA
I	29,05±5,63	116,26±24,87	34,64±6,35	45,54±2,23
II	50,24±8,32*	162,94±18,02*	36,24±3,84	79,77±9,27*

Valores expressos como média ± erro padrão da média de 5 experimentos por grupo.

* $p < 0.05$, ANOVA.

SANCHEZ, Andréa; MENEZES, Manoel Lima de; PEREIRA, Oduvaldo Camara Marques. Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 15-22, 2002.

SANCHEZ, An-
dréa; MENEZES,
Manoel Lima de;
PEREIRA, Odu-
valdo Camara
Marques.
Importância do
controle dos
níveis de cateco-
laminas em expe-
rimentação cientí-
fica. *Salusvita*,
Bauru, v. 21, n. 2,
p. 15-22, 2002.

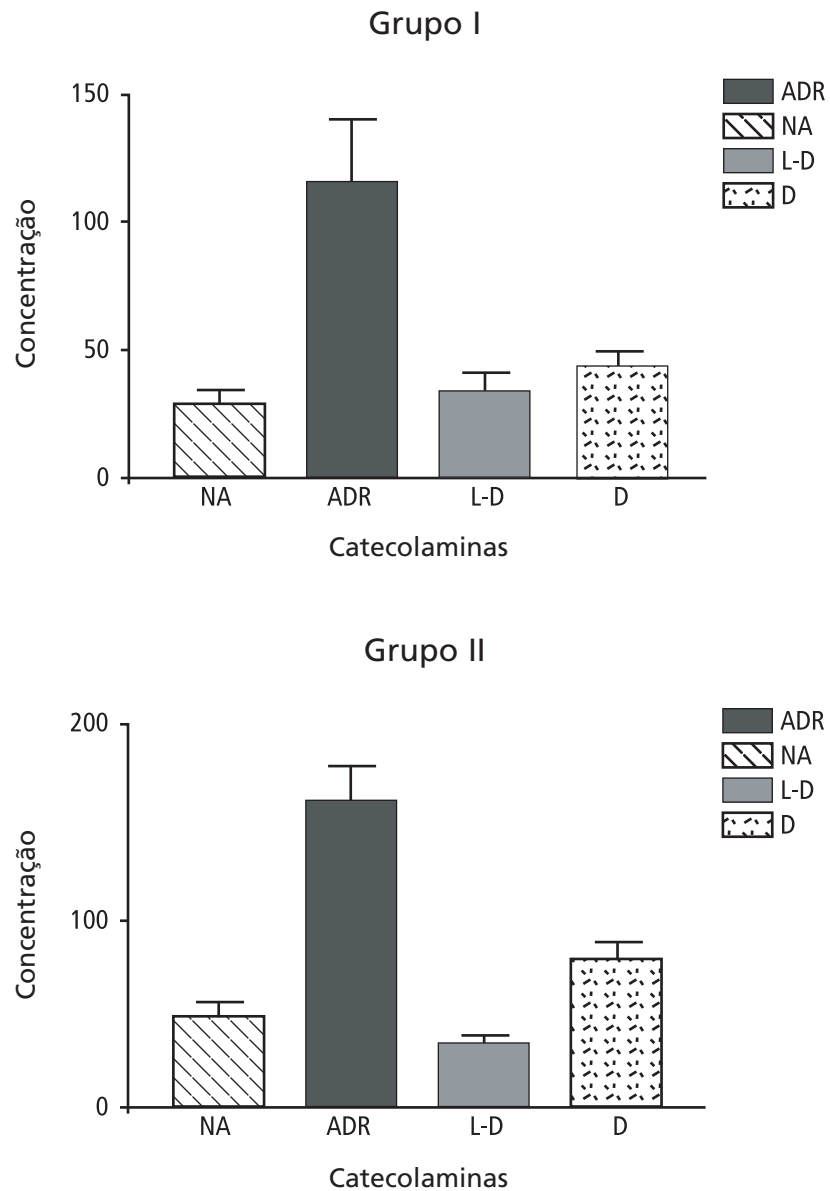


FIGURA 2: Gráficos dos níveis plasmáticos de Catecolaminas (pg.mL⁻¹), Noradrenalina (NA), Adrenalina (ADR), L-dopa (L-D) e Dopamina (D) dos indivíduos dos grupos I e II.

DISCUSSÃO

As glândulas adrenais são as principais fontes da maioria das substâncias abundantemente liberadas durante o estresse. Estas estruturas são componentes importantes, tanto do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal quanto do eixo simpático-adrenal. A glândula adrenal apresenta uma porção cortical responsável pela liberação de glicocorticóides e produtos

correlatos, em resposta ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) liberado durante situações estressogênicas. Adicionalmente, apresenta uma porção medular responsável pela liberação de catecolaminas (basicamente adrenalina), sempre que o organismo é desafiado.

Desta forma, as glândulas adrenais representam partes integrantes dos mecanismos neuroendocrinológicos do estresse. Vale ressaltar que a liberação de catecolaminas pelas glândulas adrenais é provocada por impulsos nervosos, via fibras simpáticas que inervam essa estrutura (SCHEURINK et al., 1989, FERRARESE et al., 1993). Ainda, a adrenalina proveniente das adrenais modula a liberação das catecolaminas a partir das terminações nervosas adrenérgicas, via adrenoceptores pré-sinápticos. Nessas terminações, a adrenalina pode ainda ser captada e posteriormente ser liberada como co-transmissor (FERRARESE et al., 1993, SCHEURINK et al., 1989, COOPS et al., 1993).

Chama-se de estressor qualquer estímulo capaz de provocar o aparecimento de um conjunto de repostas orgânicas, mentais, psicológicas e/ou comportamentais relacionadas com mudanças fisiológicas, que acabam resultando em hiperfunção da glândula adrenal e do sistema nervoso autônomo simpático. Desta forma, os resultados obtidos quanto aos níveis plasmáticos de catecolaminas mostram que os níveis de adrenalina e noradrenalina no grupo II apresentam-se elevados em relação ao grupo I, caracterizando a presença do estado de alerta decorrente da manipulação dos animais no momento da anestesia.

A elevação dos níveis plasmáticos de catecolaminas pode ser considerada como a principal alteração neuroendocrinológica decorrente de uma situação de estresse. Desta forma, a manipulação bem como o procedimento anestésico aos quais os animais foram submetidos, apresenta-se como uma forma de estresse.

Vários trabalhos se desenvolvem buscando a análise das alterações fisiológicas decorrentes de diferentes modelos de estresse. Todavia, para que se possam analisar tais respostas e considerá-las como alteradas é necessário que se estabeleça uma padronização experimental rígida bem como uma resposta “controle” altamente confiável.

Devemos considerar os níveis plasmáticos de catecolaminas do Grupo I como sendo o mais próximo ao basal, porém os valores obtidos no grupo II podem ser considerados como os valores de referência para possíveis comparações entre animais submetidos a uma situação de estresse.

O estresse emocional causa liberação de adrenalina pela medula adrenal e a atividade física leva a liberação de noradrenalina da terminação nervosa do sistema nervoso simpático (SCHEURINK et al., 1989). Assim, em situações de estresse induzido por imobilização forçada, onde há predomínio do componente emocional, foram demonstradas elevações nas concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina (KVETNANSKY et al., 1993).

Houve alterações significativas entre os grupos apenas quanto aos níveis plasmáticos de dopamina, noradrenalina e adrenalina, mostrando a presença dos componentes físico e emocional do estresse. Todavia, os níveis plasmáticos de L-dopa se manteve em ambos os grupos, assim in-

SANCHEZ, Andréa; MENEZES, Manoel Lima de; PEREIRA, Oduvaldo Camara Marques.

Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 15-22, 2002.

SANCHEZ, Andréa; MENEZES, Manoel Lima de; PEREIRA, Oduvaldo Camara Marques. Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 15-22, 2002.

fere-se que tal neurotransmissor não participe das alterações avaliadas durante o estresse.

Segundo Bispo e Pereira (1994), o estresse é um fenômeno de repercussões fisiopatológicas muito amplas e devemos considerá-lo sempre ao utilizar animais para experimentação científica. Ainda, tais autores salientam a importância de se controlar as condições experimentais, bem como a manutenção e manejo de animais em biotério.

CONCLUSÃO

A elevação nos níveis plasmáticos de catecolaminas encontradas no grupo II se deve a situação de alerta que ocorre por ocasião da manipulação dos animais. Os animais dos grupos II podem ser empregados como fator de comparação com outros grupos experimentais nos quais objetiva-se testar a influência do estresse.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à FAPESP (Processo 98/05510-5) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AXEROLD, J. RESINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, v. 224, p. 452-59, 1984.
2. BENEDICT, C. R. simultaneous measurement of urinary and plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine, dihydroxyphenylalanine, and dihydroxyphenylacetic acid by coupled-column high-performance liquid chromatography on C₈ and C₁₈ stationary phases. *J. Chromatogr.*, v. 385, p. 369-375, 1987.
3. BISPO, D. L. N.; PEREIRA, O. C. M. Importância do conhecimento das alterações reduzidas pelo estresse, em animais domésticos. *Interciência*, v. 19, p. 72-74, 1994.
4. COOPES, R. P. et al. Strong activation of vascular prejunctional α_2 - adrenoceptors in freely moving rats by adrenaline release as a co-transmitter. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 243, p. 273-279, 1993.
5. FERRARESE, C. et al. Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor: a possible link between stress, anxiety and the immune system. *Psychoneuroendocrinology*, v. 18, p. 3-22, 1993.
6. KVETNANKY, R. et al. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamines synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinol.*, v. 133, n. 3, p. 1411-1419, 1993.
7. MILLS, F. J.; CHIR, M. A. The endocrinology of stress. *Aviat. Space Environ. Med.*, v. 56, p. 642-650, 1985.

8. NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. et al. Serum catecholamines levels determined by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 36, n. 4, p. 119-122, 1992.
9. PEREIRA, O. C. M.; DEGA, M. R.; SOUZA, M. S. Noradrenergic response in vas deferens from rats submitted to acute and repeated stress. *Gen. Pharmacol.*, v. 30, p. 417-421, 1998.
10. SCHEURINK, A. J. W. et al. Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. *Am. J. Physiol.*, v. 256, p. 155-160, 1989.
11. SCHEURINK, A. J. W. et al. Experience affects exercise-induced changes in catecholamines, glucose, and FFA. *Am. J. Physiol.*, v. 256, p. 169-173, 1989.

SANCHEZ, Andréa; MENEZES, Manoel Lima de; PEREIRA, Oduvaldo Camara Marques. Importância do controle dos níveis de catecolaminas em experimentação científica. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 15-22, 2002.