

NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EM ERITRÓCITOS DE OVINOS ANÊMICOS

Andreza Amaral da Silva¹, Fernanda Martins de Abreu², Danilo Otávio Laurenti Ferreira³,
Débora Cristina Damasceno⁴, Adriano Dias⁵, Roberto Calderon Gonçalves⁶

1. Médica Veterinária, MS, Doutoranda em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP.

Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, S/N - CEP: 18.618-000 - Botucatu/SP - Brasil.

E-mail: andrezamedvet@yahoo.com.br (autor para correspondência)

2. Médica Veterinária autônoma.

3. Médico Veterinário, Mestrando em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP.

4. Bióloga, MS, Dra., Profa. Ass. do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

5. Fonoaudiólogo, MS, Dr., Prof. Ass. do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

6. Médico Veterinário, MS, Dr., Prof. Ass. do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse oxidativo, liperoxidação, radicais livres.

ABSTRACT

LEVELS OF THIOBARBITURIC ACID-REACTIVE COMPOUNDS IN ERYTHROCYTES FROM ANEMIC SHEEP

This study evaluates the effects of anemia on plasma lipoperoxidation levels in anemic sheep. A total of 30 animals were investigated, of which 10 were healthy and 20 were anemic according to clinical examination confirmed by haematological analysis. Jugular venous blood samples (10mL) were collected from each animal. These were stored in heparin and EDTA tubes (5mL each) to determine Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and haematological profile, respectively. There was no statistically significant difference in TBARS concentrations of healthy and anemic sheep. Therefore, we conclude that anemia does not lead to lipoperoxidation.

KEYWORDS: Free radicals lipoperoxidation, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como em outros países de clima tropical e sub-tropical, os problemas sanitários, têm sido considerados fatores limitantes para a criação de ovinos (ROCHA et al., 2007). Dentro deste contexto destacam-se as verminoses gastrointestinais, em sua maioria provocada por *Haemonchus* sp. (BORBA, 1996), um nematódeo hematófago que causa anemia, hipoproteinemia e diminuição do ganho de peso (ANDERSON, 1982).

A anemia é a redução na capacidade do sangue em suprir os tecidos com adequada quantidade de oxigênio necessária para as funções vitais celulares. As principais causas de anemia envolvem a perda de sangue, a destruição dos eritrócitos e a diminuição ou ausência na sua produção (FELDMAN et al., 2000). Clinicamente a anemia caracteriza-se por decréscimo do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do volume globular (ROBINSON & HUXTABLE, 1988).

Durante a anemia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) está aumentada e pode ser tóxica a células, tecidos ou órgãos quando não é neutralizada (STENVINKEL, 2003). O mecanismo pelo qual a anemia contribui para aumentar a produção de ERO não está totalmente compreendido, mas está relacionado à inadequada oxigenação tecidual, determinando alterações no metabolismo celular energético, elevação no catabolismo de catecolaminas e ativação leucocitária (SARADA et al., 2002; STENVINKEL, 2003). O aumento na produção de ERO é controlado pelo sistema antioxidante enzimático eritrocitário, que representa o maior componente da capacidade antioxidante do sangue, e a diminuição desse sistema antioxidante na anemia pode levar ao estresse oxidativo e à lipoperoxidação (STENVINKEL, 2003).

A lipoperoxidação caracteriza-se por aumento na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e malondialdeído (MDA) em consequência do ataque das ERO às membranas celulares, provocando perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Como a membrana celular e a matriz intracelular são estruturas vitais para a célula, não é surpreendente verificar que a lesão induzida por ERO influencie na extensão dos processos das doenças (BULKLEY, 1983).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da anemia sobre a lipoperoxidação em ovinos anêmicos, através da determinação da concentração de TBARS eritrocitária nesses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 ovinos, sendo 10 animais clinicamente sadios e 20 considerados anêmicos ao exame clínico, independentemente de sexo e raça, com idade acima de 3 meses, criados em regime semi-extensivo e provenientes da região de Botucatu-SP. Inicialmente, os animais foram contidos e submetidos ao exame clínico onde a determinação da coloração da mucosa ocular foi utilizada como método de triagem para distinguir animais sadios dos considerados anêmicos (grau 1 – rósea; grau 2 – pálida; grau 3 – perlácea). Foram considerados anêmicos ao exame clínico os animais que apresentaram coloração de mucosa ocular variando de grau 2 a 3.

Imediatamente após o exame clínico, foram colhidos por venopunção da jugular 10mL de sangue de cada um dos animais, sendo 5mL em tubos de ensaio heparinizados e 5mL em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA a 10%. Com as amostras dos tubos contendo EDTA foram realizadas avaliações hematológicas por meio da contagem total de hemácias, hemoglobina e determinação do volume globular (JAIN, 1993). Dos ovinos considerados anêmicos ao exame clínico só foram efetivamente incluídos na pesquisa aqueles que apresentaram hematócrito inferior a 27% (PUGH, 2005), os demais foram descartados. As amostras de sangue dos tubos contendo heparina sódica foram utilizadas para a determinação das TBARS através de um método colorimétrico previamente descrito (FERREIRA et al., 1999).

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, sendo significativo quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame clínico não foram observadas alterações nos principais parâmetros fisiológicos, exceto pela coloração das mucosas nos animais anêmicos, com 15 ovinos apresentando coloração grau 2 (15/20 – 75%) e 5 apresentando coloração grau 3 (5/20 – 25%). Com relação aos achados hematológicos, dos 20 animais anêmicos, 50% (10/20) e 70% (14/20) apresentaram valores de hemoglobina e hemácias abaixo dos valores de referência, respectivamente. Dentre os animais sadios, 30% (3/10) apresentaram hemácias abaixo dos valores de referência para a espécie, entretanto, o VG permaneceu normal. Com relação à concentração de TBARS no sangue dos animais, não foi verificada alteração estatisticamente significativa entre ovinos sadios [MED=145674,5 \pm 91324,88 ($p = 0,758$)] e anêmicos [MED=154963,3 \pm 88159,97 ($p = 0,758$)].

A oxidação do eritrócito tem sido estudada como modelo para avaliar o dano oxidativo sobre biomembranas. Quando há ataque dos radicais livres sobre as membranas dos eritrócitos ocorre oxidação dos lipídios e proteínas causando hemólise. (SIES, 1993). De acordo com IMAI et al. (1991), geralmente ocorre aumento nos valores de TBARS em situações de estresse oxidativo, como o observado durante a anemia.

O fato do marcador escolhido para determinar o *status* oxidativo nos animais deste estudo não ter aumentado nos ovinos anêmicos pode ser explicado pelas características do quadro de anemia que geralmente acomete ovinos criados em regime semi-extensivo. Como nesses animais o processo anemiante se dá por perda crônica de sangue devido à hemorragia externa e não por hemólise, não há liberação de grande quantidade de hemoglobina e ferro, o que favoreceria a ocorrência de reações oxirredutoras dependentes de ferro livre.

O ferro tem a capacidade de doar elétrons, prontamente, interconvertendo-se entre a forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}). Esta propriedade o torna um componente muito útil em citocromos, em moléculas que ligam e transportam oxigênio (hemoglobina e mioglobina), e em muitas enzimas que realizam processo “redox”, funcionando como transportadoras de elétrons. Entretanto, também pode causar danos aos tecidos, atuando como catalisador durante a formação de ERO. Um exemplo é a produção do radical hidroxil, a espécie reativa mais citotóxica, facilitada pelo ferro, que catalisa a interação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio através das reações de Fenton e Haber-Weiss (SCHIMMEL & BAUER, 2002).

No caso deste estudo, em função do comprometimento da via de formação de ERO dependente de ferro livre devido à perda crônica de sangue por hemorragia externa, é possível que o estresse oxidativo induzido pela anemia não tenha atingido magnitude suficiente para induzir a lipoperoxidação.

Além disso, cabe ressaltar o papel do sistema antioxidante enzimático eritrocitário na manutenção do *status* oxidativo celular. De maneira geral, em resposta à constante exposição ao estresse oxidativo, o sistema antioxidante reage inicialmente com um decréscimo das enzimas viáveis, seguido por elevação devido à mobilização dos estoques em outros órgãos e aumento na produção (SILVA, 2009). Embora as concentrações desses antioxidantes não tenham sido determinadas neste estudo e, com base nessa conjectura, é provável que esse efeito compensatório tenha contribuído para manter sob controle o aumento de ERO induzido pela anemia crônica, impedindo assim a ação deletéria das ERO sobre a membrana e, conseqüentemente, a lipoperoxidação.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que a anemia por perda crônica de sangue devido à hemorragia externa em ovinos não provoca danos teciduais expressivos, uma vez que não induz a lipoperoxidação. Entretanto, a determinação dos principais antioxidantes enzimáticos faz-se necessária para avaliar melhor o papel da anemia sobre o status oxidativo nos eritrócitos desses animais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a bolsa de Iniciação Científica concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

REFERÊNCIAS

BORBA, M. F. S. Efeitos do parasitismo gastrintestinal sobre o metabolismo do hospedeiro. In: SILVA SOBRINHO, A. G. **Nutrição de ovinos**. Jaboticabal: FUNEP, p.213-233, 1996.

BULKLEY, G.B.; The role of oxygen free radicals in human disease processes. **Surgery**, Mosby, v.94, p.407-411, 1983.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, São Paulo, v. 5, n. 5, p. 355-361, 2002.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2000. 1344p.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MACHADO, P. E. A.; MATSUBARA, L. S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 6, p. 689-694, 1999.

IMAI, K.; AIMOTO, T.; SATO, M.; KIMURA, R. Antioxidative effect of protoporphyrin on lipid peroxidation in tissues homogenates of intravenously administrated rats. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, Tokyo, v. 14, p. 20-24. 1991.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

LUDAT, K.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T.; SIEMS, W. G.; RIEDEL, E.; HAMPL, H. Oxidation parameters in complete correction of renal anemia. **Clinical Nephrology**, Oxford, v. 53, suppl.1, p. S30-S35, 2000.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 513p.

ROBINSON, F. W.; HUXTABLE, C. R. R. **Clinicopathologic principles for veterinary medicine**. 2.ed. New York: Cambridge University Press, 1988. 440p.

ROCHA, R. X.; BONDAN, C.; MARINHO, R.; LOPES, S. T. A.; CECIM, M. Ferro dextrano em cordeiros anêmicos: efeitos na reticulocitose e produção de radicais livres. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p.1 344-1348, 2007.

SARADA, S. K. S.; DIPTI, P.; ANJU, B.; PAULINE, T.; KAIN, A. K.; SAIRAM, M.; SHARMA, S. K.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVENDRA KUMAR, W.; Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Dublin, v. 79, p. 149-153, 2002.

SCHIMMEL, M.; BAUER, G. Proapoptotic and redox-state related signaling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. **Oncogene**, New York, v. 21, p. 5886-5896, 2002.

SIES H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radical Biology & Medicine**, London, v. 4, p. 313-323, 1993.

SILVA, A. A. **Avaliação da técnica de biopsia pulmonar transtorácica em ovinos clinicamente sadios e os efeitos do procedimento sobre o metabolismo oxidativo**. 2009. 86p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

STENVINKEL, S. Anemia and inflammation: what are the implications for the nephrologists? **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 18, suppl. 8, p. 17-22, 2003.