

## **NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EM ERITRÓCITOS DE OVINOS SUBMETIDOS À BIOPSIA PULMONAR**

Andreza Amaral da Silva<sup>1</sup>, Danilo Otávio Laurenti Ferreira<sup>2</sup>, Bianca Paola Santarosa<sup>3</sup>, Débora Cristina Damasceno<sup>4</sup>, Adriano Dias<sup>5</sup>, Roberto Calderon Gonçalves<sup>6</sup>

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](mailto:andrezamedvet@yahoo.com.br) (autor para correspondência)
2. Médico Veterinário, Mestrando em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP.
3. Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, 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 SHEEP SUBMITTED TO LUNG BIOPSY**

This study evaluates the effect of percutaneous transthoracic lung biopsy on the concentration of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in erythrocytes from sheep. A total of 20 clinically healthy animals were investigated. Jugular blood samples (5mL) were collected in heparin tubes before and thirty minutes after the lung biopsy, and were stored at 10°C. Laboratory investigation determined TBARS levels by colorimetric assay. The Wilcoxon paired-sample test was used for statistical analysis. There were no significant changes in TBARS concentration ( $221,97 \pm 77,37$ ;  $p = 0,135$ ) 30 minutes after the procedure. Results from this study show that percutaneous transthoracic lung biopsy did not cause significant changes in oxidative metabolism and it can be widely used in sheep without significant tissue damage until 30 minutes after it is carried out.

**KEYWORDS:** Free radicals, lipoperoxidation, oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular normal, como na reação inflamatória, por exemplo. Contudo, a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres é chamado de estresse oxidativo (KIRSCHIVINK & LEUKEUX, 2005; VALKO et al., 2007), e tem sido relacionado com a etiologia e curso de várias doenças, inclusive enfermidades do trato respiratório de animais (ART et al., 1999; KIRSCHIVINK et al., 2002; DEATON et al., 2004).

Entre os principais danos celulares causados por esses radicais está a oxidação dos lipídios das membranas celulares, levando à perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas à célula no espaço extracelular, e até mesmo sua ruptura (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; DAMASCENO et al., 2002). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um dos principais marcadores biológicos desse tipo de lesão em membranas celulares (DRAPER & HADLEY, 1990).

Atualmente a biopsia pulmonar vem sendo empregada como auxílio diagnóstico, com efetividade confirmada na obtenção de fragmentos adequados para o exame histopatológico e microbiológico (PORTO, 1991), inclusive na espécie ovina (BRAUN et al., 2000). Por ser um método diagnóstico invasivo, é possível que a biopsia pulmonar resulte em resposta inflamatória aguda acarretando aumento na produção de radicais livres pelas células fagocíticas durante a explosão respiratória, o que implicaria em danos celulares e teciduais graves se esse processo não for controlado. Diante disso, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da biopsia pulmonar transtorácica percutânea sobre as concentrações eritrocitárias de TBARS em ovinos clinicamente sadios.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ovinos clinicamente sadios destinados ao abate. Com os animais manualmente contidos, foram coletados 5 mL de sangue da veia jugular em tubos de ensaio heparinizados. Após a colheita foi realizada a biopsia pulmonar com agulha semi-automática (Euromed<sup>®</sup>, BD - 14 X 16 G), e as amostras do tecido pulmonar foram obtidas de acordo com FINN-BODNER & HATHCOCK (1993) e BRAUN et al. (1999). Uma nova colheita de sangue foi realizada 30 minutos após a biopsia, e todas as amostras colhidas foram

armazenadas a 10° C em recipiente isotérmico contendo gelo e levadas ao laboratório de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

No laboratório, as amostras de sangue foram centrifugadas a 185 x g por 10 minutos à 4° C. Para obtenção das hemácias, o sangue foi lavado com tampão-salina-fosfato (PBS) a mesma temperatura e centrifugado a 1575 x g durante 15 minutos por três vezes. A cada repetição do procedimento retirou-se o plasma, glóbulos brancos e as plaquetas, por aspiração com micropipeta. Às hemácias lavadas (50 µL) foram adicionados 950 µL de água deionizada e agitados, por inversão, para obtenção do hemolisado, que foi utilizado para 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 de Wilcoxon, para amostras relacionadas sendo significativo quando  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta minutos após a biopsia pulmonar não foi verificada alteração estatisticamente significativa nas concentrações de TBARS [ $221,978 \pm 77,37$  ( $p = 0,135$ )] em hemácias de ovinos clinicamente sadios.

As reações inflamatórias locais são caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, dilatação dos vasos e acúmulo de células do processo inflamatório. As principais células envolvidas na fase aguda da inflamação são os neutrófilos, enquanto que, na fase tardia, monócitos/macrófagos e algumas linhagens de linfócitos migram para o sítio inflamatório. Essas células produzem radicais livres durante a explosão respiratória como reação aos estímulos fagocíticos. Além disso, vários aspectos do processo inflamatório são regulados por mediadores produzidos por células do sistema imune e células endoteliais, como citocinas, histamina, leucotrienos, prostaglandinas e, também, radicais livres (HUERRE & GOUNON, 1996).

Segundo MCINTYRE et al. (1997), a extensão dos eventos inflamatórios e das injúrias eventualmente provocadas por eles está diretamente relacionada à intensidade do estímulo inicial e aos mecanismos imunológicos que são ativados durante o processo. A agressão física tecidual ocorrida durante a introdução da agulha de biopsia deflagrou a resposta inflamatória e a liberação de mediadores químicos, exacerbando-a nos momentos que se seguiram.

Como a biopsia pulmonar transtorácica percutânea não induziu a peroxidação lipídica, confirmado pela não alteração dos valores de TBARS nas hemácias dos animais 30 minutos após o procedimento, os resultados deste estudo nos levam a crer que a biopsia pulmonar não

leva a produção de radicais livres em quantidade suficientes para provocar lesões em nível de membrana celular, podendo ser amplamente utilizada na rotina veterinária.

Alguns autores defendem que, para uma melhor interpretação dos resultados de estudos que envolvem estresse oxidativo, outros fatores tais como o tipo de marcador utilizado, a metodologia empregada, o tecido estudado e, principalmente, o momento no qual o marcador foi investigado, sejam criteriosamente considerados (WITT et al., 1992; VOLLARD et al., 2005). Portanto, o fato de que sinais de peroxidação lipídica não tenham sido observados, com base no marcador utilizado, até 30 minutos após a biopsia pulmonar, não exclui a possibilidade de que a peroxidação lipídica tenha ocorrido em outro momento durante a recuperação dos animais.

Com base nessa conjectura, talvez uma avaliação seriada e mais duradoura das concentrações das TBARS revelasse alterações compatíveis com peroxidação lipídica, ainda ocultas 30 minutos após o procedimento.

### CONCLUSÕES

A biopsia pulmonar transtorácica percutânea não causou alterações significativas no metabolismo oxidativo, medido por determinação das TBARS, podendo ser amplamente utilizada em ovinos sem que ocorram danos teciduais expressivos até 30 minutos após o procedimento.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao auxílio financeiro e a bolsa de estudos de mestrado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

### REFERÊNCIAS

ART, T.; KIRSCHIVINK, N.; SMITH, N. LEKEUX, P. Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. **Equine Veterinay Journal**, London, v. 31, n. 5, p. 397-401, 1999.

BRAUN, U.; ESTERMANN, U.; FEIGE, K.; SYDLER, Y.; POSPISCHIL, A. Percutaneous lung biopsy in cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 215, n. 5, p. 679-681, 1999.

BRAUN, U.; ESTERMANN, U.; FLÜCKIGER, M.; SYDLER, T.; POSPISCHIL, A. Ultrasound-guided percutaneous lung biopsy in sheep. **Veterinary Record**, London, v. 146, n. 18, p. 525-528, 2000.

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.

DEATON, C. M.; MARLIN, D. J.; SMITH, N. C.; HARRIS, P. A.; SCHROTER, R. C.; KELLY, F. J. Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, p. 2065S-2067S, 2004.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p.421-431, 1990.

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 Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 6, p. 689-694, 1999.

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.

FINN-BODNER, S. T.; HATHCOCK, J. T. Image-guided percutaneous needle biopsy: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, New York, v. 8, p. 258-278, 1993.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Research in Immunology**, Los Angeles, v. 147, p. 417-434, 1996.

KIRSCHIVIK, N.; LEKEUX, P. Oxidants and airway inflammations. In: WORLD EQUINE AIRWAYS SIMPOSIUM, 3, Nova York, 2005 **Proceedings**. Nova York: Cornell University, 2005. p.36-38. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/WEAS/2005/toc.asp>> Acesso em: jul. 2008.

KIRSCHIVINK, N.; FIÉVEZ, L.; BOUGNET, V.; ART, T.; DEGAND, G.; SMITH, N.; MARLIN, D.; ROBERTS, C.; HARRIS, P.; LEKEUS, P. Effect of nutritional supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 34, p. 705-712, 2002.

MCINTYRE, T. M.; MODUR, V.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Molecular mechanisms of early inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.78, p.302-305, 1997.

PORTO, N. Punção biopsia pulmonary transcutânea. In: SILVA, L.C.C. **Compêndio de Pneumologia**, São Paulo: Fundação FYK, 1991. cap. 5, p. 274-276.

VALKO M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Los Angeles, v. 39, p.44-84, 2007.

VOLLAARD, N. B. J.; SHEARMAN, J. P.; COOPER, C. E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **Sports Medicine**, Pennsylvania, v. 35, n. 12, p. 1045-1062, 2005.

WITT, E. H.; REZINICK, A. Z.; VIGUIE, C. A.; STARKE-REED, P.; PACKER, L. Exercise, oxidative damage, and effects of antioxidant manipulation. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, p. 766-73, 1992.