

## ESTRESSE OXIDATIVO EM BOVINOS DE CORTE CONFINADOS E DESAFIADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO

LUÍSA INÁCIO LOURENSI<sup>1</sup>; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN<sup>1</sup>,  
ANDRESSA STEIN MAFFI<sup>1</sup>, ANTÔNIO AMARAL BARBOSA<sup>1</sup>, MAYARA  
SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>1</sup>, FRANCISCO AUGUSTO BURKERT DEL  
PINO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [luisalourensi@gmail.com](mailto:luisalourensi@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fabdelpino@gmail.com](mailto:fabdelpino@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro está estimado em torno de 214,69 milhões de cabeças, sendo que 13,52 milhões se encontram no Rio Grande do Sul (RS), que é o sétimo no *ranking* brasileiro (ABIEC, 2019). No ano de 2018 foi registrado o abate de 44,23 milhões de bovinos (ABIEC, 2019). Devido o constante crescimento do setor, sistemas de confinamento são cada vez mais usuais, justamente para atender o aumento na demanda. Apesar disso, o aumento da produtividade nestes sistemas é mantido geralmente por dietas com alto teor de concentrado, o que aumenta os riscos da ocorrência de acidose ruminal (DUNLOP, 1972).

A acidose ruminal resulta em prejuízo econômico à indústria pecuária, associado geralmente à ocorrência de outras doenças e transtornos metabólicos, como abscessos hepáticos e laminite (PLAIZIER et al. 2008). Além disso, animais acidóticos induzem à liberação ruminal de lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina capaz de induzir inflamação, isso geralmente ocorre pelo acréscimo de carboidrato na alimentação, adotado muitas vezes nos sistemas de confinamento (ANDERSEN, 2003). O LPS é um componente da membrana de bactérias gram-negativas, que é liberado quando estas se multiplicam ou sofrem apoptose (ANDERSEN, 2003). A princípio o LPS é liberado do rúmen, entretanto pode passar à corrente circulatória via epitélio ruminal ou intestinal, gerando uma resposta inflamatória sistêmica, que ativa a produção de mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda, que atuam sobre o metabolismo animal (GOZHO et al., 2005).

A rotina de bovinos de corte proporciona em muitos momentos manejos que poderão resultar em estresse. Apesar de possuírem capacidade de se adaptarem às diferentes condições a que são submetidos, os animais podem aumentar o cortisol sérico, predispondo um *status* de estresse, que em muitos casos se apresenta da maneira oxidativa (RAPOSO, 2014).

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução de danos às biomoléculas pelos radicais livres ou espécies reativas a oxigênio (EROs) (DAMASCENO et al., 2002) e nitrogênio (ERNs) (BARREIROS & DAVID, 2006). As EROs podem provocar injúria tecidual (KINNULA et al., 1995), que em altas concentrações, danificam organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007). O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR & ERZURUM, 2002). Uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido para produzir EROs (DAMASCENO et al., 2002).

O estresse oxidativo também se dá pelos processos de produção e remoção de radicais livre pelos sistemas de defesa antioxidante (SIES, 1991). Devido a suas funções elencamos: a adenosina deaminase (ADA), por proliferar linfócitos e agir na resposta celular; o superóxido desmutase (SOD), por ser de suma

importância na defesa contra EROs; e os nitritos, por ser precursor do ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), que desamina bases de DNA; para serem os parâmetros analisados neste estudo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Como induziremos uma inflamação experimental com LPS, esperamos que os animais apresentem alterações nestes parâmetros já que estarão em uma situação estressante (LI et al., 2007). Sendo assim, o objetivo foi verificar o efeito do desafio com LPS sobre o *status* oxidativo sanguíneo em bovinos de corte.

## 2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado em um confinamento comercial localizado no município de São Lourenço do Sul/RS, onde os animais foram alimentados com uma dieta formulada de acordo com o NRC (2001), respeitando a relação de 60:40 de volumoso e concentrado. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Protocolo 9364).

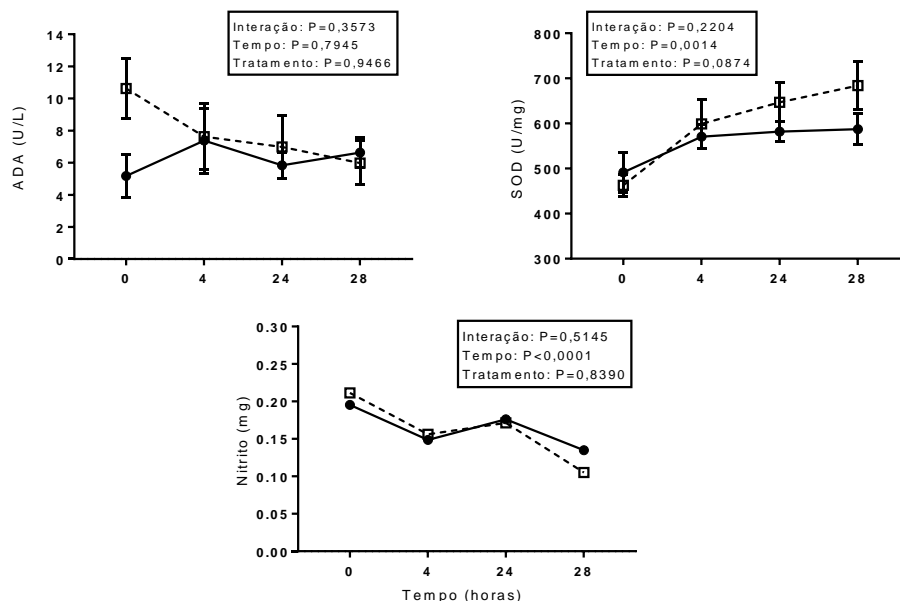
Foram utilizadas 16 novilhas de corte (*Bos taurus*), com idade média de 14 meses, mantidas em sistema de confinamento. Estas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: grupo LPS (n=8), que recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina i.v. (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich®, Missouri, EUA), com intervalo de 24 horas; e grupo controle (n=8), que recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) no mesmo intervalo.

Coletou-se o sangue desses animais para obtenção de soro, que foi centrifugado e congelados à -10°C até ser analisado. A atividade da ADA (U/L) foi medida pelo método de Giusti & Gakis (1971). Os níveis de nitrito (µM /mg de proteína) foram medidos pelo método de Stuehr & Nathan (1989). A atividade da SOD foi medida de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972) e foi relatada como UI/mgHb. Os resultados foram submetidos ao teste Two Way ANOVA no programa GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), considerando significativos valores de  $P < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desafio com duas dosagens de LPS não interferiu nas concentrações de ADA, SOD e nitritos durante o período avaliado (Figura 1 A, B e C). O grupo controle apresentou em média  $7,81 \pm 0,9$  U/L,  $598,2 \pm 48,4$  U/mg e  $0,161 \pm 0,02$  µM/mg, para ADA, SOD e nitritos, respectivamente. Já para o grupo desafiado com LPS as médias encontradas foram  $6,25 \pm 0,4$  U/L,  $557,9 \pm 22,4$  U/mg e  $0,163 \pm 0,01$  µM/mg, na mesma ordem anterior. Suspeitamos que os animais se adaptaram a condição imposta, ao contrário do que esperávamos. Segundo Bridi (2010), a adaptação é o resultado da ação conjunta de características morfológicas, anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, no sentido de promover o bem-estar e favorecer a sobrevivência de um organismo em um ambiente específico. O estresse oxidativo também se dá pelos processos de produção e remoção de radicais livre pelos sistemas de defesa antioxidante (SIES, 1991). Entretanto, este pode ser benéfico nos casos de infecção, quando ocorre produção de radicais livres por células fagocitárias para intervir em microrganismos invasores (SIES, 1991). O que é o caso dos nitritos, mais especificamente do radical óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), que pode ser produzido em maiores quantidades através dos fagócitos, intervindo na resposta imunitária (BARREIROS & DAVID, 2006). Nós pudemos observar (Figura 1 C), que os níveis de nitritos não foram estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ), porém tiveram um

pico nas primeiras 24 horas e tendo decréscimo logo após, o que nos faz crer que este aumento na sua concentração esta ligado à resposta imunológica.



**Figura 1** – Níveis de adenosina deaminase (ADA), superóxido desmutase (SOD) e nitritos, em novilhas mantidas em confinamento e desafiadas com lipopolissacarídeo (LPS).

Confrontando nossos dados com os encontrados por Silva (1998), que determinaram que bovinos que apresentaram caso clínico de leucose enzoótica bovina mantiveram os níveis séricos de ADA em torno de 22,8 +/- 30,1 (U/L) e animais sadios apresentaram 3,9 +/- 1,9 (U/L). Apesar de não demonstrar diferença estatística, a atividade de ADA apresentou médias muito acima das encontradas no estudo anteriormente referido. Então, continuamos acreditando que isto se deve pela resposta do sistema imunológico. Uma vez que, a ADA está diretamente ligada ao metabolismo das purinas e está relacionada à proliferação dos linfócitos durante a resposta celular (GIUSTI & GAKIS, 1971). O aumento desta enzima também estimula a lipólise e a inosina, produto da adenosina endógena, que tem ação anti-inflamatória, neuroprotetora e cardiotônica (CARVALHO, 2003). A média de SOD de ambos os grupos foram maiores das encontradas por Cunha et al. (2014) para bovinos da raça Nelore em confinamento, que demonstraram níveis basais por volta de 270 (UI SOD/mgHb). Defendemos novamente, que a apresentação da SOD se deu assim, devido ao sistema imunológico, já que ela tem papel fundamental na defesa do organismo contra as EROs, pois atua na dismutação (oxidação e redução) do oxigênio (O<sub>2</sub>) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

#### 4. CONCLUSÕES

O desafio com duas aplicações de LPS com intervalo de 24h não afetou os níveis de ADA, SOD e nitritos. Sendo assim, mais estudos para elucidar como o LPS atua sob o estresse oxidativo ainda são persistentes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. BeefREPORT Perfil da Pecuária no Brasil. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>. Acesso em: 02/09/2019.

- ANDERSEN, C. Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. In: **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2003. p. 122-165.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.
- BRIDI, Ana Maria. Adaptação e aclimação animal. **UEL, Londrina**, 2010.
- CARVALHO, R.; MAIA, G. A.; FERREIRA, J. M. Adenosine regulates the survival of avian retinal neurons and photoreceptors in culture. **Neurochemical research**, v. 28, n. 10, p. 1583-1590, 2003.
- COMHAIR, Suzy AA; ERZURUM, Serpil C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.
- CUNHA, Roberta Dias da Silva et al. Estresse oxidativo em bovinos confinados alimentados com feno de Brachiaria e suplementados com antioxidantes. 2014.
- DAMASCENO, D. C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes. **Diabetes Clínica**, v. 5, n. 5, p. 355-361, 2002.
- DUNLOP, R. H. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. **Advances in veterinary science and comparative medicine**, 1972.
- GIUSTI, G.; GAKIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**, v. 12, p. 417-425, 1971.
- GOZHO, G. N. et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 4, p. 1399-1403, 2005.
- HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, JMC Defesas antioxidantes: endógenas e derivadas da dieta. **Radicais livres em biologia e medicina**, v. 4, p. 79-186, 2007.
- KINNULA, Vuokko L.; CRAPO, James D.; RAIPIO, Kari O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 73, n. 1, p. 3-19, 1995.
- LI, G. et al. Resposta ao estresse sustentada após estresse oxidativo em células trabeculares de malha. **Visão molecular**, v. 13, p. 2282, 2007.
- MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- PLAIZIER, J. C. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 21-31, 2008.
- RAPOSO, S. **Beef Point**. Comportamento do bovino e sua relação com o manejo. 2014. Acessado em 20 ago. 2019. Disponível em: <http://sites.beefpoint.com.br/sergioraposo/2014/06/05/como-o-boi-funciona-comportamento-do-bovino-e-sua-relacao-com-o-manejo/>
- SIES, Helmut. Estresse oxidativo: da pesquisa básica à aplicação clínica. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S31-S38, 1991.
- SILVA, Marcio Roberto. Determinação da atividade sérica de adenosina deaminase como método diagnóstico auxiliar da tuberculose bovina. 1998.
- STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 5, p. 1543-1555, 1989.
- VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.