

Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária¹

Wilson Roberto Fernandes², Jaqueline Aguiar Rodrigues², Lilian Emy dos Santos Michima² e Renata Farinelli de Siqueira^{2*}

ABSTRACT.- Fernandes W.R., Rodrigues J.A., Michima L.E.S. & Siqueira R.F. 2012. [Oxidative stress evaluation in Standardbred horses through malondialdehyde (MDA) and erythrocytic reduced glutathione (GSH) mensuration.] Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(7):677-680. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Bloco 15, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: refarinelli@yahoo.com.br

Oxidative stress by physical exercise induces a lipidic peroxidation reaction in cellular membranes and damages in proteins and nucleic acids. Malondialdehyde (MDA) is one of the final products of this reaction. Erythrocytic reduced glutathione (GSH), a multifunctional antioxidant, is present in the plasma and erythrocytes and it represents the total antioxidant suitability of the organism after an oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the oxidative stress in different physical exercise conditions through serum MDA and erythrocytic GSH measurement in 45 American Trotter and crossbred horses distributed in three groups: G1 (no physical exercise), G2 (until 6 months of regular physical exercise) and G3 (more than 12 months of regular physical exercise). In the animals with no physical exercise MDA values were lower than the others. There was no difference in GSH values corrected by hemoglobin (Hb) or hematocrit (VG) values among the groups. However, there was a tendency of greater values in G2, where their antioxidant system is adapting to the regular physical exercises and their consequent damages. We conclude that physical exercises induce cellular damage by oxidative stress, but the antioxidant system keeps the homeostasis and it is capable to adapt itself to the free radicals harm.

INDEX TERMS: Oxidative stress, malondialdehyde, erythrocytic reduced glutathione, equines, physical exercise.

RESUMO.- O estresse oxidativo, decorrente de uma atividade física, leva a peroxidação lipídica de membranas celulares, além de danos protéicos e em ácidos nucléicos, e um dos produtos finais desta reação é o malondialdeído (MDA). A glutathiona reduzida (GSH), considerada um antioxidante multifuncional, está presente no plasma e principalmente nas hemácias e tem importância pelo fato de ser um dos índices da capacidade total antioxidante do corpo

após um estresse oxidativo. Com o objetivo de avaliar o estresse oxidativo em diferentes condições de treinamento físico, determinaram-se a concentração de MDA sérico e GSH eritrocitária em 45 cavalos da raça American Trotter e mestiços divididos em três grupos: G1 (sem treinamento), G2 (até 6 meses de treinamento) e G3 (treinamento há mais de 12 meses). Observou-se que o MDA teve um valor significativamente menor no grupo de animais sem treinamento físico. Não houve diferença estatística significativa para GSH corrigida pela Hb e para GSH corrigida pelo VG entre os grupos analisados, mas houve uma aparente tendência a maiores valores no G2, no qual o sistema antioxidante está em fase de adaptação ao treinamento físico constante e suas consequentes injúrias. Conclui-se que a atividade

¹ Recebido em 18 de outubro de 2011.

Aceito para publicação em 12 de abril de 2012.

² Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Bloco 15, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brazil.* Autor para correspondência: refarinelli@yahoo.com.br

física acarreta danos celulares frente ao estresse oxidativo, mas o sistema antioxidante tem papel fundamental nesta homeostasia observando uma adaptação às injúrias causadas pelos radicais livres.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Estresse oxidativo, malondialdeído, glutatona reduzida eritrocitária, equinos, exercício físico.

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares que envolvem as respostas ao estresse em cavalos atletas é um pré-requisito fundamental para a formulação de um adequado esquema de treinamento para a obtenção de melhor desempenho, bem estar e evitar a síndrome de *overtraining* (Capelli et al. 2008).

A presença do oxigênio é um componente essencial para o metabolismo celular; todavia, qualquer situação que ocorra excesso de consumo, como exercício aeróbico, fosforilação oxidativa, NAD(P)H e xantina oxidase, pode levar à produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kerksick & Willoughby 2005). Radicais livres são moléculas ou átomos simples que possuem um elétron desemparelhado em sua órbita externa, o qual diminui sua estabilidade e aumenta sua reatividade com outras moléculas ou átomos, principalmente lipídios celulares, proteínas e bases nucleicas (Marlin et al. 2002).

Existe uma variedade de EROs que interagem com membranas celulares e compostos citoplasmáticos, desregulando algumas funções e estão envolvidos na etiologia de muitas condições patológicas dos cavalos atletas, como fadiga muscular, intolerância ao exercício, injúrias musculares, articulares e doenças respiratórias (Janiak et al. 2009).

O organismo possui proteção antioxidante composta por sistemas enzimáticos, como a superóxido desmutase, catalase e glutatona peroxidase e não enzimáticos, como vitaminas C e E. Os EROs também desempenham importantes funções benéficas no organismo, como síntese de componentes biológicos essenciais, produção de energia e fagocitose.

Quando a produção de radicais livres aumenta até o ponto onde o sistema antioxidante celular não consegue remover ou neutralizar tudo que é produzido, ocorre o estresse oxidativo. Uma das conseqüências do estresse oxidativo mais importante é a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, ou seja, a peroxidação lipídica, que provoca danos e impede a passagem de nutrientes, como proteínas e glicose, e diminui a capacidade de reação do sistema imunológico. A peroxidação lipídica pode ser quantificada através da mensuração do acúmulo de subprodutos resultantes desse processo, como o malondialdeído (MDA), que normalmente serve como índice da intensidade da ocorrência de tal reação (Kerksick & Willoughby 2005).

Os eritrócitos possuem, além da função de troca gasosa, mecanismos efetivos na desativação dos EROs produzidos em outros tecidos, representando assim, uma importante fonte antioxidante para o sangue. Entre todos os mecanismos que as células vermelhas possuem, o mais importante é o sistema da glutatona, que consiste na glutatona re-

duzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e nas duas enzimas funcionalmente relacionadas, a glutatona peroxidase (GPX) e glutatona redutase. Na presença de EROs, a forma reduzida é oxidada por ação da glutatona peroxidase, diminuindo os níveis circulantes de GSH. Normalmente, esta forma oxidada é rapidamente reconvertida em GSH por ação da glutatona redutase (Janiak et al. 2009). A GSH, um dos antioxidantes endógenos mais importantes, existe tanto no citosol quanto na mitocôndria e o fígado é o local de ressíntese, suprindo 90% da GSH circulante e exportando GSH para o plasma e musculatura esquelética em exercícios prolongados (Sun et al. 2010).

Os EROs desempenham funções de sinalização, ou seja, animais expostos frequentemente a exercícios (treinamento crônico) demonstram menores níveis de estresse oxidativo após exercícios intensos que os não treinados (Gomez-Cabrera et al. 2006). Esse fenômeno não é um paradoxo, é o resultado da adaptação induzida pelo exercício. Esse processo de adaptação envolve a ativação do sistema antioxidante que melhora a reparação dos danos causados pela oxidação, sistemas de eliminação das EROs e influencia a transcrição, aumentando a expressão e montagem de proteínas (Radak et al. 2008).

Kinnunen et al. (2005) demonstraram que maior quantidade de antioxidantes antes do exercício está associado com menor peroxidação lipídica 4 horas após o exercício e treinamento regular induz aumento da atividade da GPx muscular e a magnitude desse aumento é proporcional à intensidade e duração dos trabalhos.

Sabe-se que exercícios intensos e de curta duração são capazes de aumentar os níveis sanguíneos de hemoglobina e hemácias. A GSH está presente em grandes quantidades nas hemácias; portanto, a dosagem de fatores como a Hb e o VG, também aumentados em exercícios físicos, seria de grande utilidade para se tentar correlacionar com a GSH mensurada, usando possivelmente tais correções como "unidades de medida".

O objetivo deste experimento foi avaliar o estresse oxidativo que ocorre em cavalos de trote através da mensuração de MDA sérico e GSH eritrocitária e comparar a influência do treinamento sobre o sistema antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 45 cavalos da raça American Trotter e mestiços, machos e fêmeas, com idades acima de 12 meses, e peso acima de 200 kg, hípidos, sob mesmas condições nutricionais e sanitárias, agrupados em três grupos de 15 animais, sendo G1: cavalos sem treinamento; G2: cavalos em até 6 meses de treinamento constante e G3: cavalos em treinamento constante há mais de 12 meses.

O treinamento foi feito, em média, cinco vezes por semana, percorrendo de 5 a 6 km por dia, em pista de areia batida de 800 m de extensão. Os animais eram treinados atrelados ao sulk ou conduzidos em guia, alternadamente.

As amostras de sangue foram obtidas dos animais em repouso pela manhã, antes do trabalho, por venopunção jugular, colhidas em tubos com vácuo, com anticoagulante EDTA para a dosagem de GSH volume globular e hemoglobina e tubos sem anticoagulante para a dosagem de MDA. Logo após a colheita, as amostras eram protegidas da luminosidade e mantidas sob refrigeração (+5°C) até o momento do processamento.

A técnica utilizada para a determinação de glutathiona (GSH) eritrocitária foi uma adaptação do método de Beutler et al. (1963), fazendo-se a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro em 412nm de comprimento de onda. Os valores de GSH foram calculados com base em equação de reta obtida pela curva construída a partir das densidades ópticas observadas das soluções padrão a 5, 10, 20 e 50mg/dL de GSH. Tais valores foram, então, recalculados com base nos valores de hemoglobina (Hb) ou volume globular (VG) do animal.

A determinação de hemoglobina foi feita pela técnica de cianeto de hemiglobina (HiCN), com leitura da densidade óptica em 540nm de comprimento de onda.

Para a determinação do volume globular (VG), utilizou-se a técnica de micro-hematócrito, sendo o resultado obtido em porcentagem.

A determinação de malondialdeído sérico (MDA) foi feita segundo Esterbauer et al. (1990), com leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 532nm de comprimento de onda. O cálculo da concentração de MDA das amostras foi realizado baseado em equação de reta dada pela curva obtida das densidades ópticas das soluções padrão de 0, 1, 2, 4 e 6µM de MDA, multiplicada pela densidade óptica observada na amostra, sendo os resultados expressos em µmol/L.

Realizou-se a análise estatística descritiva das variáveis VG, MDA, GSH corrigida pelo VG e GSH corrigida pela Hb. A comparação dos resultados obtidos entre os grupos (1, 2 e 3) foi feita pela análise de variância para as variáveis paramétricas (VG e Hb) e pelo teste de Kruskal-Wallis para as não-paramétricas (MDA e GSH corrigida pelo Ht e pelo VG). Realizou-se teste de correlação dos postos de Spearman, para verificar a existência de relação linear entre as variáveis. Para todos os testes, adotou-se o nível de significância de 5%. Para tanto, utilizou-se o programa MINITAB® Statistical Software v.13.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão representados em forma de quadros (1 e 2), especificando as variáveis analisadas de acordo com a divisão dos grupos. Os valores de MDA apresentados (Quadro 1) foram relativamente maiores aos valores 0,90µmol/L obtidos por Michima et al. (2004) em cavalos de várias raças. Isto pode ser devido à diferença amostral dos experimentos e a características específicas dos cavalos de trote.

Segundo alguns autores (Deaton & Marlin 2003, Radak et al. 2008, Sun et al. 2010), o MDA é um dos produtos finais da peroxidação lipídica que ocorre como consequência do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico. Entre os grupos analisados, observou-se que o MDA teve um valor

Quadro 1. Valores médios (variação) de glutathiona reduzida corrigida pela Hb, expressos em mg/gHb, valores medianos (variação) de glutathiona reduzida corrigida pelo volume globular, expressos em mg/dLHe, e de malondialdeído, expressos em µmol/L, de equinos da raça American Trotter e mestiços

Grupos	GSH (mg/gHb)	GSH (mg/dLHe)	MDA (µmol/L)
1	3,94 ^A (2,32-5,63)	128,33 ^A (73,08-169,42)	0,89 ^A (0,56-1,06)
2	4,09 ^A (2,96-5,64)	132,92 ^A (97,13-177,26)	1,17 ^B (0,76-2,66)
3	3,91 ^A (3,07-4,98)	119,88 ^A (100,00-161,70)	1,03 ^B (0,73-1,97)

Caracteres diferentes representam diferenças significantes a p<0,05 (Kruskal-Wallis). GSH = glutathiona reduzida; MDA = malondialdeído.

Quadro 2. Valores médios (erro padrão da média) de volume globular, expressos em %, e de hemoglobina, expressos em g/dL, de equinos da raça American Trotter e mestiços

Grupos	VG (%)	Hb (g/dL)
1	31,60 ^A (1,20)	9,94 ^A (0,43)
2	36,47 ^B (1,19)	11,96 ^B (0,55)
3	39,13 ^B (1,51)	12,36 ^B (0,56)

Caracteres diferentes representam diferenças significantes a p<0,05 (ANOVA). VG: = volume globular; Hb = hemoglobina.

significativamente menor (p=0,014) no grupo 1, o qual os animais estavam sem nenhum treinamento.

Já os grupos 2 e 3 possuem valores de MDA similares; talvez pela pequena diferença de tempo de treinamento existente entre tais grupos e principalmente pelo fato de que o sistema antioxidante, após ativações crônicas e constantes ou períodos de treinamento físico controlado, haja uma adaptação à injúria causada pela peroxidação lipídica, melhorando sua ação frente aos radicais livres, de acordo com Radak et al. (2008).

Com base em escassa literatura em equinos e pela não padronização de resultados, optou-se pela correção dos valores de GSH tanto pelo volume globular quanto pela hemoglobina, para que possa haver uma melhor comparação de resultados com outros trabalhos.

Os valores de GSH (tabela 1) foram relativamente maiores do que valores de 106,6 mg/dLHe propostos por Yonezawa et al. (2004), talvez pela diferença racial dos cavalos analisados.

Não houve diferença estatística significativa para GSH corrigida pela Hb (p=0,757) e para GSH corrigida pelo VG (p=0,374) entre os grupos analisados, talvez pelo exercício físico intenso não alterar a atividade de enzimas como a glutathiona peroxidase no início, apenas após 24 horas de treinamento, como sugerido por Avellini et al. (1995). Como o objetivo desse trabalho foi avaliar se o treinamento físico causa estresse oxidativo ao longo do tempo e não o efeito do exercício realizado no dia anterior, optou-se pela colheita de sangue matinal, com os animais em repouso.

Aparentemente, houve uma tendência a maiores valores no grupo 2, no qual há animais em treinamento a menos de 6 meses, o que seria explicado por maior atividade do sistema antioxidante, em fase de adaptação ao treinamento físico constante e suas consequentes injúrias. Assim, como forma de prevenção e reserva, haveria um aumento das concentrações de GSH contra o estresse oxidativo. Já no grupo 3, devido ao maior tempo de treinamento, os animais provavelmente se adaptaram à condição de estresse e por isso não houve aumento nas concentrações de GSH eritrocitária.

Os valores de VG e de Hb foram significativamente menores no grupo 1 (p=0,001 e p=0,004, respectivamente) (Quadro 2), provavelmente devido à pouca demanda por oxigênio nos tecidos dos animais ainda sem treinamento. Houve média correlação linear positiva significativa (p<0,001) entre VG e GSH (r=0,625) e entre Hb e GSH (r=0,682). Tais correlações talvez possam ser explicadas pelo fato de o exercício físico induzir aumento no número

ro de eritrócitos e conseqüentemente o esperado seria que aumentassem os valores de VG, Hb e GSH, como observado no experimento.

A GSH é abundante e alterações em seus níveis, normalmente, refletem modificações musculares recentes. Porém, como é parte importante do sistema antioxidante celular, responde prontamente ao treinamento, aumentando seus níveis celulares e conseqüentemente manifestando poucas alterações após o exercício (Williams et al. 2004).

A concentração de MDA seria um indicativo de maior estresse oxidativo, o qual levaria a uma maior ação do sistema antioxidante (GSH); dessa forma era esperado que houvesse uma relação entre essas duas variáveis, fato este não observado neste estudo, visto que a correlação linear foi baixa ($r=0,242$) e sem diferença significativa ($p=0,109$).

CONCLUSÕES

O exercício físico leva a um aumento na peroxidação lipídica das membranas celulares, o que reflete em aumento nas concentrações sanguíneas de MDA como produto final de tal reação, como observado nos grupos 2 e 3, nos quais houve maiores danos oxidativos causados pelo exercício.

O MDA, apesar das controvérsias quanto à técnica, estabilidade da amostra, tipo e intensidade de exercício, nesse trabalho mostrou-se um eficiente marcador de estresse oxidativo em cavalos de trote.

O sistema antioxidante tem papel fundamental na homeostasia em animais sob treinamento físico, fato representado pela concentração eritrocitária de GSH, a qual se mostrou levemente alterada no grupo em que a exigência de tal sistema foi mais acentuada (grupo 2), sendo que no grupo 3 os animais estariam melhor adaptados às injúrias causadas pelas espécies reativas de oxigênio.

Agradecimentos.- À Clara Satsuki Mori, técnica responsável pelo Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ/USP, pelo auxílio nas dosagens amostrais e ao Alfredo, funcionário da Sociedade Paulista de Trote, pelo auxílio na obtenção das amostras, além de todos os proprietários de equinos que nos permitiram a colheita de material para a realização deste trabalho. Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

REFERÊNCIAS

- Avellini L., Silvestrelli M. & Gaiti A. 1995. Training-induced modification in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. *Vet. Res. Commun.* 19:179-184.
- Beutler E., Duron O. & Kelly B.M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61(5):882-888.
- Capelli K., Felicetti M., Capomaccio S., Spinsanti G., Silvestrelli M. & Supplizi A.V. 2008. Exercise induced stress in horses: selection of most stable references genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC Molecular Biology* 9(49):1-8.
- Deaton C.M. & Marlin D.J. 2003. Exercise-associated oxidative stress. *Clin. Tech. Equine Pract.* 2(3):278-291.
- Esterbauer H. & Cheeseman K.H. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186:407-421.
- Gomez-Cabrera M., Martínez A., Santangelo G., Pallardó F.V., Sastre J. & Viña J. 2006. Oxidative stress in Marathon runners: Interest of antioxidant supplementation. *Brit. J. Nutr.* 96(Suppl.1):31-33.
- Janiak M., Suska M., Dudzinska W. & Skotnicka E. 2009. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94:137-145.
- Kerksick C. & Willoughby D. 2005. The antioxidant role of glutathione and n-acetyl-cysteine supplements and exercise induced oxidative stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2(2):38-44.
- Kinnunen S., Atalay M., Hyypä S., Lehmuskero A., Hänninen O. & Oksala N. 2005. Effect of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horses. *J. Sports Sci. Med.* 4:415-421.
- Marlin D.J., Fenn K., Smith N., Deaton C.D., Roberts C.A., Harris P.A., Dunster C. & Kelly F.J. 2002. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J. Nutr.* 132(6):1622S-1627S.
- Michima L.E.S., Yonezawa L.A., Mirandola R.M.S. & Fernandes W.R. 2004. Viability of different conservation methods of samples for malondialdehyde determination in racing standardbred horses. *Proc. XI Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry, Chile*, p.11.
- Radak Z., Chung H. & Goto S. 2008. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 44:153-159.
- Sun L., Shen W., Zhongbo L., Guan S., Liu J. & Ding S. 2010. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sciences* 86:39-44.
- Williams C.A., Kronfeld D.S., Hess T.M., Saker K.E., Waldron J.N., Crandel K.M., Hoffman R.M., Harris P.A. 2004. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J. Anim. Sci.* 82:588-594.
- Yonezawa L.A., Michima L.E.S., Mirandola R.M.S. & Fernandes W.R. 2004. Viability of different blood sample conservation methods for reduced glutathione determination in horses. *Proc. XI Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry, Chile*, p.12.