



AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO DE VACAS COM E SEM MASTITE BOVINA.

POSSENTI, Cecilia G.Rubert¹; SOSTISSO, Queli C.Bittencourt²; DIAZ, Jorge Damián Stumpfs³; KOEFENDER, Jana³; HORN, R.C³.

Palavras chave: Estresse oxidativo. Mastite. Vacas leiteiras.

Introdução

A mastite é uma doença complexa e dispendiosa para a indústria leiteira, visto que é constituída de infecções clínicas e subclínicas. É notada pela redução da produção e pelas alterações na composição do leite, além de risco potencial à saúde pública, já que promove a veiculação de patógenos causadores de zoonoses e toxinas produzidas por estes (MOREIRA *et al.*, 2008).

Segundo Radostits et al. (2002) a inflamação da glândula mamária, ou mastite, é a enfermidade de maior freqüência no gado leiteiro, e é considerada uma doença que proporciona as maiores perdas econômicas na produção de leite. Estima-se que haja um prejuízo de cerca de US\$ 185,00 vaca/ano nos EUA, em função da ocorrência de mastites. No Brasil, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, estima-se que possa ocorrer perda de produção entre 12 e 15%.

Enquanto algumas destas moléculas podem ser altamente reativas no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. No entanto, existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas. Em vista disso os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados, nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal (BARREIROS, DAVID J. M., DAVID J. P., 2006).

As defesas antioxidantes produzidas pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou, não enzimaticamente a exemplo de glutationa (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Além dos antioxidantes produzidos pelo

¹ Bióloga, Mestranda em Desenvolvimento Rural da Universidade de Cruz Alta. Email: ceciliapossenti@yahoo.com.br

² Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade de Cruz Alta.

³ Professores Doutores do Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural da Universidade de Cruz Alta..



corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina “E”), β -caroteno (provitamina “A”), ácido ascórbico (vitamina “C”), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (HALLIWELL, 1995).

Metodologia

Para este experimento, utilizaram-se vacas Holandesas puras (preto com branco), da Agropecuária Irmãos Strobel, no município de Condor, pertencente à região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. A propriedade trabalha com sistema de produção “*free stall*”, recebendo dieta completa *ad libitum*, à base de silagem de milho e concentrado. Classificaram-se os animais quanto ao seu estado de saúde, classificando-os em 3 grupos distintos: considerando vacas saudáveis como um grupo controle, animais com detecção de mastite pelo teste de CMT (californian mastits test) e pela contagem de células somáticas (CCS) sem tratamento de fármacos antimicrobianos, e animais com detecção de mastite pelo teste de CMT (californian mastits test) e pela contagem de células somáticas (CCS) com tratamento de fármacos antimicrobianos a pelo menos 3 dias.

As amostras foram coletadas no mês de janeiro de 2013. Para a realização dos testes foram coletadas amostras de sangue dos animais, por venopunção da veia coccígea após antisepsia, utilizando-se agulhas descartáveis e tubos Vacuntainer® com adição de EDTA. O sangue coletado foi conservado sob refrigeração a 4°C e centrifugado a 3.000rpm para separação do plasma logo após a coleta, posteriormente o plasma foi alíquotado a temperatura ambiente e imediatamente armazenado a -20°C para após utilização das técnicas..

Lipoperoxidação (LPO)

Foi realizada a partir da determinação do TBARS plasmático, de acordo com a técnica descrita por Jentzsch et al.(1996), em que utiliza-se 220 μ L de plasma, juntamente com 1 mL de ácido ortofosfórico, 550 μ L da água destilada e 250 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram incubadas por 45 minutos em 95 °C, e por fim a leitura foi feita em espectrofotômetro visível, em 532 nm. Os resultados foram expressos por nmol MDA/mL de plasma.

Proteína Carboniladas

Realizada a partir da técnica descrita por Levine (1990), em que previamente o plasma é preparado com uma diluição de 300 μ L de plasma em 2,7 mL de Hepes. Em 50 μ L desta amostra diluída realiza-se a determinação das Proteínas Totais com kit comercial Labtest® e em 500 μ L deste mesmo plasma diluído realiza-se a determinação das proteínas

carboniladas utilizando 250 µl de tricloroacético (TCA) 10%, ácido clorídrico 2N; 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH) e dodecil sulfato de sódio (SDS) 3%, realizando um branco para cada amostra. As leituras dos testes e dos brancos dos testes foram realizadas em espectrofotômetro visível, em 370 nm. Os resultados foram expressos por nmol carbonil/mg proteína.

Proteínas Totais

Foi realizada de acordo com o Kit labtest, utilizando como reagente de com o biureto. Os dados foram expressos: mg/mL de plasma.

Estatística

Todos os grupos estudados foram comparados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, utilizando o programa estatístico Graph pad Prism 5, considerando significativos os valores com P<0,05.

Resultados e discussão

De acordo com as figuras 1 e 2 verifica-se que as vacas com mastite em tratamento prévio com antiobióticos estava com os níveis de TBARS e de proteínas carboniladas maiores do que o grupo controle e o grupo das vacas com mastite e sem tratamento prévio.

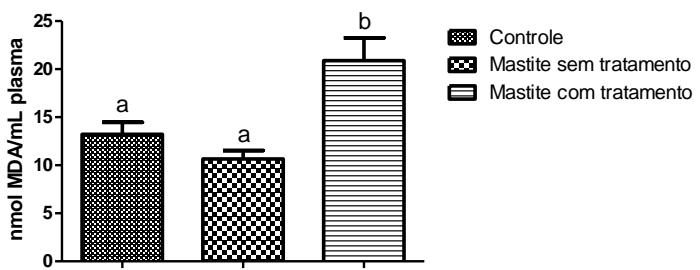


Figura 1: Níveis de TBARS (nmol MDA/mL plasma) nas vacas controles, vacas com mastite sem tratamento e vacas com mastite com tratamento antibiótico. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes considerando um p<0,05.

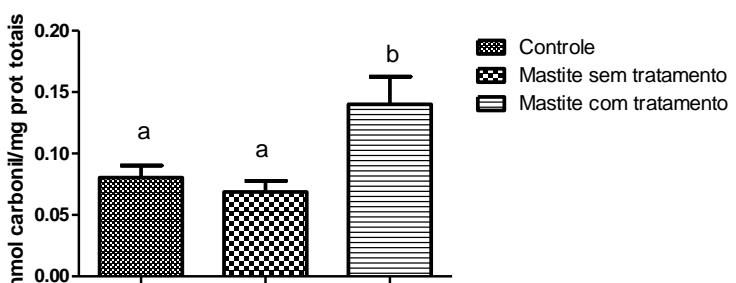


Figura 2: Níveis de proteínas carboniladas (nmol carbonyl/mg prot totais) nas vacas controles, vacas com mastite sem tratamento e vacas com mastite com tratamento antibiótico. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes considerando um $p<0,05$.

Isso demonstra que após a administração do fármaco antibiótico, os níveis de TBARS e das proteínas carboniladas aumentaram significativamente quando comparadas ao grupo controle e mastite sem tratamento, o que demonstra que o medicamento pode estar causando o estresse oxidativo que pode causar edema e pior o quadro clínico conforme Miller *et al.* (1993) existem evidências que o “estresse oxidativo” pode contribuir com a manifestação de edema de mama e alteração do desempenho reprodutiva em bovinos da raça holandesa preta e branca.

Conclusão

Os resultados demonstram que os bovinos sofrem estresse oxidativo ao ser administrado o antibiótico e que alternativas precisam ser encontradas a fim de minimizar os efeitos fisiológicos que estes danos podem causar aos animais.

Referencias

- MOREIRA, M.A.S. *et al.*, Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.60 no.6 Belo Horizonte Dezembro, 2008.
- RADOSTITS, O. M. *et al.* **Clínica Veterinária**: Um tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Caprinos e Eqüinos. 9º Ed, Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, p.676-683, 2002.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I.; **Food Chem. Toxicol.** 1995, 33, 601.
- BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M; DAVID, J.P. **Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo**. Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- JENTZSCH AM, BACHMANN H, FÜRST P. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Rad. Bio. and Med.** 1996;20(2):251-56.
- LEVINE RL. Determination of carbonyl in oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** 1990;186:468-78.