

Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária

Erythrocyte oxidative damage and antioxidant mechanisms in Veterinary Medicine

Luciana Pereira Machado¹, Agumi Kohayagawa², Mere Erika Saito³, Veridiana Fernandes da Silveira⁴, Letícia Andreza Yonezawa⁴

Recebido em 21/08/2008; aprovado em 03/04/2009.

RESUMO

Os radicais livres são formados constantemente no metabolismo celular normal e em vários eventos patológicos. Quando em excesso, eles podem causar a oxidação de moléculas biológicas. Como mecanismo de defesa, o organismo possui um complexo sistema de proteção antioxidante. O desequilíbrio entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante denomina-se estresse oxidativo. Os eritrócitos desempenham funções vitais ao organismo que podem ser comprometidas devido ao estresse oxidativo. Por sua constituição, os eritrócitos tornam-se vulneráveis à lesão oxidativa. Os lipídios insaturados da membrana são altamente susceptíveis à oxidação e a presença do oxigênio e do ferro, propiciando a formação de radicais livres. Além disso, são células incapazes de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados. Desta forma, a manutenção dos mecanismos antioxidantes como as vitaminas E e C, enzimas superóxido dismutase e catalase, sistema glutatona e metahemoglobina redutase é importante para evitar e reparar as lesões. Este trabalho revisa informações sobre os mecanismos da lesão oxidativa e do sistema de defesa antioxidante eritrocitários, com o intuito de auxiliar os profissionais de medicina veterinária no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo eritrocitário.

PALAVRAS CHAVE: eritrócitos, radicais livres, lipoperoxidação, estresse oxidativo, antioxidantes.

SUMMARY

Free radicals are produced continuously in normal cell metabolism and in various pathological events. When in excess, they may cause oxidation of biologic molecules. As a protection mechanism, the body has a complex system of antioxidant defense. The imbalance between oxidative challenge and antioxidant defense capacity is called oxidative stress. Erythrocytes play vital functions in the body which can be compromised due to oxidative stress. Red blood cells become vulnerable to oxidative injury due to their constitution. Membrane unsaturated lipids are highly susceptible to oxidation, and the presence of oxygen and iron enhances free radicals formation. Furthermore, red blood cells are unable to synthesize new lipids and proteins to replace those that have been oxidized. Therefore, the maintenance of antioxidant mechanisms, such as vitamins E and C, and enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione system, and metahemoglobin reductase is important to prevent and repair damages. This paper reviews information about the mechanisms of erythrocyte oxidative damage and antioxidant defense system, aiming to help veterinary professionals in diagnosis and treatment of erythrocyte oxidative stress related diseases.

¹ Médica Veterinária, Doutoranda, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Distrito de Rubião Junior s/n. Cx Postal 560, CEP: 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. Bolsista CNPq. lup_machado@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

² Médica Veterinária, Professora do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

³ Médica Veterinária, Professora do Departamento de Medicina, Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Av. Luiz de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, SC.

⁴ Médica Veterinária, Doutoranda, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP. Bolsista FAPESP.

KEY WORDS: erythrocyte, free radicals, lipid peroxidation, oxidative stress, antioxidants.

INTRODUÇÃO

Os eritrócitos possuem funções vitais de transporte de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono e de tamponamento de íons hidrogênio (H^+). Não requerem energia para desempenho destas funções, porém, produzem energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) para manter a célula circulando por meses em seu estado funcional perante exposições repetidas a lesões mecânicas e/ou metabólicas (STEINBERG e BENZ JR, 2000). Destacam-se as lesões eritrocitárias induzidas por sobrecarga oxidativa, caracterizadas pela oxidação e desnaturação da hemoglobina e as alterações causadas por radicais livres nos lipídios e proteínas da membrana (HATHERILL et al., 1991). O oxigênio carreado pela hemoglobina atua como oxidante, produzindo derivados reativos como o radical livre superóxido e o peróxido de hidrogênio, o qual pela reação com o ferro forma o radical hidroxila que é altamente reativo (CALDIN et al., 2005). A manutenção dos mecanismos antioxidantes é de extrema importância nos eritrócitos, que ao contrário da maioria das células não têm capacidade de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). O efeito cumulativo da lesão oxidativa é responsável pelo processo normal de envelhecimento e destruição dos eritrócitos (HARVEY, 1997).

A utilização dos eritrócitos em modelos de estudos do metabolismo oxidativo sustenta-se na abundância destas células, relativamente simples e de fácil obtenção, sendo alvos constantes de lesões metabólicas por circularem todo o organismo (STEINBERG e BENZ JR, 2000). Em um estudo com bovinos, a avaliação do estresse oxidativo eritrocitário foi utilizada para inferir conclusões sobre o estresse oxidativo sistêmico (RANJAN et al., 2006). Apesar do papel fundamental dos eritrócitos, o estresse oxidativo eritrocitário é um assunto que ainda não recebe a devida importância na medicina veterinária, portanto, este trabalho tem por objetivo

apresentar informações sobre os mecanismos de lesão oxidativa e do sistema de defesa antioxidante eritrocitários, visando auxiliar o diagnóstico e tratamento das doenças relacionadas direta ou indiretamente com a lesão oxidativa nos eritrócitos.

DESENVOLVIMENTO

Produção de radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são produzidos em processos bioquímicos fisiológicos durante a redução oxidativa e o metabolismo celular e em várias condições patológicas (HATHERILL et al., 1991). Em pequena quantidade são benéficos e algumas vezes indispensáveis, contudo, em altas concentrações podem ser tóxicos, sobretudo ao oxidarem moléculas biológicas alterando suas características e provocando transtornos no metabolismo celular (CHIHUAILAF et al., 2002). Radical livre é por definição uma espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados, o que lhe confere instabilidade e reatividade bioquímica (THOMAS, 2000). Contudo, alguns agentes reativos não apresentam elétrons desemparelhados, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), todos estes metabólitos reativos derivados do O_2 sejam radicais livres ou não são coletivamente designados como espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHIHUAILAF et al., 2002).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente na mitocôndria, com conseqüente formação de água e produção de energia. Durante esse processo, são formados intermediários reativos como o H_2O_2 e os radicais livres superóxido ($O_2 \bullet$), hidroperoxila ($HO_2 \bullet$) e hidroxila ($OH \bullet$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Várias substâncias exógenas com atividade óxido-redutora participam na formação de radicais livres ou promovem a oxidação direta de componentes eritrocitários dos animais (Tabela 1). A anemia na intoxicação por cebola está relacionada com a presença de compostos oxidantes, como o n-propil dissulfeto, e pode acometer diversas espécies animais (FIGHERA et al., 2002; ASLANI et al., 2005; TANG et al., 2007). Outras fontes de ERO são os exercícios extremos nos equinos (WILLIAMS et al., 2004) e cães (HINCHCLIFF, et al., 2000) e a produção de $O_2 \bullet$ pela auto-oxidação da hemoglobina

Tabela 1 - Principais indutores de lesão oxidativa nos eritrócitos dos animais domésticos.

Indutores	Animal	Principais alterações eritrocitárias	Referência
Acetoaminofeno	cão	AH, excentrócitos, C. Heinz, , MetHb	HARVEY et al., 1986
	gato	Heinz, , MetHb	WEBB et al., 2003
Benzocaina tópica	Cão, gato, ferret	MetHb	DAVIS et al., 1993
DL-Metionina	gato	AH, C. Heinz, , MetHb	MAEDE et al., 1987
Fenazopiridina	gato	AH, C. Heinz, , MetHb	HARVEY & KORNICK, 1976
Fenilhidrazina	bezerro	C. Heinz	LYNCH et al., 1978
Hidroxiuréia	cão	MetHb	WRAY, 2008
Nitrito	bovino	MetHb	ISSI et al., 2008
Toxinas da cebola	cão	AH, C. Heinz, aumento de MDA, diminuição da deformabilidade	TANG et al., 2007
Toxinas da cebola	gato	AH, C. Heinz, MetHb, excentrócitos	FIGHERA et al., 2002
Toxinas da cebola	ovino	AH, C. Heinz	ASLANI et al., 2005
<i>Senecio sp</i>	bovino	Aumento de MDA e da fragilidade osmótica	BONDAN et al., 2005

AH: anemia hemolítica; MetHb: metahemoglobina; C. Heinz: corpúsculos de Heinz; MDA: malondialdeído

(THOMAS, 2000).

O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa do sistema antioxidante caracteriza a condição de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). A produção de ERO está elevada nas lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como o aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais (xantina oxigenase, lipoxigenase e ciclooxigenase), a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons (ROCK et al., 1996). A presença de metais de transição, principalmente ferro e cobre, catalisam a formação de radicais livres (HALLIWELL, 1994). Pela sua constituição, os eritrócitos são altamente vulneráveis ao risco do envolvimento aeróbio, a presença do oxigênio e do ferro contribuem para a formação de ERO e os lipídios insaturados da membrana são fortemente susceptíveis a oxidação (HATHERILL et al., 1991; HOKAMA et al., 1997). Quanto maior a taxa metabólica do animal, maior o

estresse oxidativo acumulado e menor a vida média dos eritrócitos (CHRISTIAN, 2000).

Lesão oxidativa nos eritrócitos

A lesão oxidativa nos eritrócitos pode causar a formação de metahemoglobina, corpúsculos de Heinz, lesão da membrana eritrocitária, excentrócitos ou até mesmo a destruição da célula (HARVEY, 1997). Os radicais sulfidrila (SH), presentes nas moléculas de hemoglobina e de proteínas estruturais, são vulneráveis à oxidação e devem ser mantidos no estado reduzido para que estas proteínas desempenhem adequadamente suas funções (HOKAMA et al., 1997). Em gatos, o principal alvo da lesão oxidativa é a hemoglobina, representada pela alta frequência de corpúsculos de Heinz, enquanto em cães predomina a lesão da membrana e do citoesqueleto com formação de excentrócitos (CALDIN et al., 2005). Contudo, um único composto oxidante também pode provocar lesão por diferentes mecanismos. Assim, a anemia hemolítica na intoxicação por cebola em cães é causada pela formação de corpúsculos de Heinz e pela

lipoperoxidação da membrana, que conseqüentemente diminuem a deformabilidade e a vida do eritrócito (TANG et al., 2007).

Acredita-se que, fatores estressantes aos animais também podem contribuir para uma manifestação clínica mais exacerbada. Aslani et al. (2005) relataram o quadro de anemia hemolítica pela ingestão de cebola em um rebanho de ovinos, com óbito de duas fêmeas prenhes. Apesar dos ovinos serem mais resistentes a intoxicação por cebola, os autores atribuíram a manifestação clínica mais exacerbada nestes animais ao estresse da prenhez e de intempéries climáticas.

Oxidação da hemoglobina

A hemoglobina pode ser oxidada na porção heme, com oxidação do ferro e formação de metahemoglobina, ou na fração protéica, por oxidação da porção cisteína da globina levando à formação de pontes dissulfeto entre seus grupos SH, desestruturando a molécula e podendo culminar com a formação de corpúsculos de Heinz (BARRAVIERA e MACHADO, 1987; CLEMENS e WALLER, 1987). Os corpúsculos de Heinz representam o estado final da degradação oxidativa da hemoglobina (BARRAVIERA e MACHADO, 1987). Na metahemoglobina o ferro ferroso (Fe^{++}) é oxidado à forma férrica (Fe^{+++}), o que a torna incapaz de transportar oxigênio. Inevitavelmente, 3% do total de hemoglobina é convertido em metahemoglobina por oxidação espontânea, porém, em condições normais ocorre o reparo pela ação da enzima metahemoglobina redutase, mantendo os níveis de metahemoglobina inferiores a 1% da hemoglobina total (WRAY, 2008). Após a exposição a um oxidante, a formação de metahemoglobina ocorre em minutos, enquanto os corpúsculos de Heinz demoram horas para se formarem. Além disso, se o oxidante for rapidamente metabolizado em 24 horas a metahemoglobina pode apresentar-se em valores normais (HARVEY, 1997). A intoxicação por cebola em gatos pode provocar dois quadros distintos, um quadro agudo representado por metahemoglobinemia em algumas horas após a ingestão e um quadro de anemia hemolítica por corpúsculos de Heinz que ocorre mais cronicamente, a partir do terceiro dia (FIGHERA et al., 2002).

A remoção dos eritrócitos com Heinz ocorre

por fagocitose no baço ou por hemólise intravascular nos sinusóides esplênicos, estando relacionada com a menor deformabilidade destas células. A característica de deformabilidade permite que os eritrócitos normais circulem por capilares de diâmetro menores que o seu, tendo relação direta com a sua vida média (JAIN, 1993). A hemoglobina dos gatos é mais susceptível à lesão oxidativa, por possuir mais de oito grupos SH, enquanto as outras espécies possuem no máximo quatro. Adicionalmente, o baço dos felinos é ineficaz na remoção dos corpúsculos de Heinz do sangue, servindo como marcadores persistentes dos danos oxidativos (JAIN, 1993; WEBB et al., 2003).

Lesão oxidativa da membrana eritrocitária

Os lipídeos e as proteínas que constituem a membrana eritrocitária podem sofrer degradação oxidativa por lipoperoxidação, oxidação de grupos SH das proteínas de membrana, formação de ligações ou aglomerados entre proteínas oxidadas, além de inibição de enzimas e sistemas de transporte de membrana (HARVEY, 1997). A lesão oxidativa severa da membrana e do citoesqueleto dos eritrócitos pode causar a formação de excentrócitos, eritrócitos que se apresentam na microscopia óptica com a hemoglobina deslocada para uma porção da célula enquanto a outra metade apresenta-se pálida, sem hemoglobina (CALDIN et al., 2005). Todas estas alterações podem resultar em redução da deformabilidade e fluidez e estão relacionadas à maior destruição destes eritrócitos (TANG et al., 2007).

O processo de lipoperoxidação é uma reação em cadeia devido à formação dos peróxidos lipídicos que podem atuar oxidando outros lipídios e desta forma propagam a reação (HALLIWELL, 1994). Pode causar hemólise por redução da fluidez e do potencial de membrana e aumento da permeabilidade para o H^+ e outros íons (GUTTERIDGE, 1995). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da lipoperoxidação sendo utilizado como indicador de intensidade da mesma (TODOVORA et al., 2005). Como os eritrócitos circulam por todo o organismo a avaliação do estresse oxidativo eritrocitário, por meio da mensuração do MDA eritrocitário, pode ser utilizada como um índice de estresse oxidativo (MACHADO et al., 2007). Bildik et al. (2004),

verificaram que a anemia da leishmaniose visceral canina está relacionada com estresse oxidativo devido à redução de antioxidantes e elevação da concentração de MDA nos cães estudados. Cães infectados com *Babesia gibsoni* também apresentam aumento de MDA e metahemoglobinemia (MURASE, 1996). Em bovinos, a intoxicação por *Senecio* sp provoca estresse oxidativo eritrocitário, com aumento da lipoperoxidação, que torna os eritrócitos mais sensíveis à lise osmótica e pode contribuir para a hemólise (BONDAN et al., 2005).

Os aglomerados de proteínas de membrana oxidada induzem aumento da rigidez de membrana, o que implica em menor deformabilidade celular, e maior reconhecimento por macrófagos com consequente aumento da fagocitose destes eritrócitos (CHRISTIAN, 2000). Todos estes mecanismos de lesão de membrana estão envolvidos na patogênese da anemia de várias doenças, como na intoxicação por cobre em ruminantes (JAIN, 1993). Além da hemoglobina e dos constituintes da membrana, as enzimas glicolíticas eritrocitárias também são alvos da lesão oxidativa podendo ter suas funções alteradas (TAVAZZI, 2000). Harvey e Kaneko (1977), relatam maior utilização da glicose pela via glicolítica das pentoses em eritrócitos de equinos, gatos e cães incubados com azul de metileno. Portanto, a sobrevivência destas células depende da manutenção da integridade da membrana e dos constituintes citoplasmáticos (HOKAMA et al., 1997).

A diabetes mellitus está relacionada à maior estresse oxidativo, uma vez que a glicose e as cetonas são moléculas reativas que induzem a formação de radicais livres. Em cães a diabetes, principalmente cetoacidótica e o linfoma são relacionados a formação de excentrócitos (CALDIN et al., 2005). Christopher (1989) encontrou forte correlação entre diabete mellitus, hipertireoidismo, linfoma e corpúsculos de Heinz em gatos.

Sistemas de defesa antioxidante

Para compensar a alta susceptibilidade dos eritrócitos à oxidação, o processo evolutivo o dotou de potentes mecanismos antioxidantes (CLEMENS e WALLER, 1987), que são elementos ou o conjunto de processos que atenuam ou cessam a oxidação pelas ERO (THOMAS, 2000). Os antioxidantes

podem atuar transformando um radical livre em uma espécie menos reativa, removendo assim as formas mais nocivas antes que se propagem e causem lesão (HALLIWELL, 1994). Evitam a formação de radicais livres sequestrando metais de transição como ferro e cobre (HALLIWELL, 1994; THOMAS, 2000), função desempenhada por proteínas como a ferritina, transferrina e ceruloplasmina (CHIHUAILAF et al., 2002). Apesar dos mecanismos para remover as ERO, algumas persistem e causam lesões, sobre estas lesões inevitáveis o organismo atua com mecanismos especializados no reparo das estruturas lesionadas (HEBBEL, 1986; HALLIWELL, 1994; GUTTERIDGE, 1995).

O metabolismo antioxidante demanda gasto de energia e tem uma relação intrínseca com o sistema glicolítico. Assim, os animais com deficiência de enzimas glicolíticas são mais propensos às lesões oxidativas, como na deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) em cães (JOHNSON, 1980) e equinos (STOCKHAM et al., 1994; ALMOSNY et al., 2000) e na deficiência de piruvato quinase citada em cães das raças Basenji (GIGER e NOBLE, 1991) e Beagle (HARVEY et al., 1977). Nos eritrócitos, os mecanismos antioxidantes podem ser divididos didaticamente em sistemas que atuam na remoção dos radicais livres, como a vitamina E, superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) e mecanismos de reparação das lesões, como a vitamina C, e as enzimas glutathiona redutase (GSH-Rd), GSH-Px e a metahemoglobina redutase (HEBBEL, 1986).

Vitaminas E e C

A principal responsável pela remoção de radicais livres na membrana dos eritrócitos é a vitamina E (HEBBEL, 1986; CLEMENS e WALLER, 1987; HARVEY, 1997). Dutta-Roy et al. (1994), identificaram uma proteína na membrana que se liga ao α -tocoferol para incorporá-lo na bicamada lipídica da membrana eritrocitária. Esta vitamina possui um importante papel de interromper a propagação da reação de lipoperoxidação, o que ocorre por ser mais susceptível à oxidação que os lipídios de membrana e pela transformação dos peróxidos lipídicos em formas menos reativas (HALLIWELL, 1994). Assim, a vitamina E atua na prevenção da hemólise por

manter a estabilidade das membranas (HATHERILL et al., 1991). Quando oxidada, a vitamina E pode ser reciclada para a sua forma reduzida pela vitamina C (HALLIWELL, 1994) e pela GSH (SEN, 1997).

A vitamina C é um potente agente redutor (ROCK et al., 1996), reduzindo a vitamina E oxidada e tornando-a novamente ativa (HALLIWELL, 1994), além de manter a GSH no estado reduzido (SHANG et al., 2003). Apesar do seu conhecido efeito antioxidante na presença de metais de transição, como ferro e cobre, pode atuar como um agente oxidante (HALLIWELL, 1994; CHIHUAILAF et al., 2002). Quando oxidada, esta vitamina é captada e reduzida pelos eritrócitos e essa redução é importante na manutenção da vitamina C plasmática na forma ativa (BILDIK et al., 2004).

Superóxido dismutase (SOD)

A remoção do $O_2^{\cdot-}$ é importante para o eritrócito, devido a sua produção durante a auto-oxidação da hemoglobina (THOMAS, 2000) e à participação do $O_2^{\cdot-}$ na formação de OH^{\cdot} , que possui maior potencial lesivo (CHRISTIAN, 2000). A SOD é uma metaloenzima essencial para a sobrevivência dos eritrócitos por catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para O_2 e H_2O_2 (HATHERILL et al., 1991; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Nos eritrócitos, esta enzima apresenta-se ligada a um átomo de cobre e um de zinco (CuZnSOD), que constituem a porção ativa da enzima, ocorrendo transferência de um elétron do $O_2^{\cdot-}$ para o metal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). A atividade enzimática da SOD pode estar diminuída em animais que ingerem uma dieta deficiente em cobre ou zinco (HARVEY, 1997).

Catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 , e a sua atividade enzimática é dependente do ferro presente na porção heme de sua estrutura (HARVEY, 1997). A presença desta enzima nos eritrócitos também reduz a degradação oxidativa em outros tecidos do organismo, devido à remoção do peróxido de hidrogênio que se difunde do meio extracelular para os eritrócitos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Com exceção dos cães, os eritrócitos dos

mamíferos apresentam alta atividade desta enzima (HARVEY, 1997). Todorova et al. (2005), estabeleceram valores de referência de catalase e SOD eritrocitárias para cães e gatos. Nesse trabalho observaram-se valores médios de catalase aproximadamente seis vezes maiores nos gatos em comparação aos cães.

Sistema glutaciona

A glutaciona reduzida (GSH), um tripeptídeo de ácido glutâmico, cisteína e glicina (SEN, 1997; KURATA et al., 2000), é sintetizada nos eritrócitos pelas enzimas γ -glutamilcisteína-sintetase e glutaciona sintetase com consumo de ATP (SEN, 1997). O radical SH da cisteína é a sua porção ativa e atua como acceptor de elétrons, tendo como principal função a manutenção dos grupos SH da célula na forma reduzida (HARVEY, 1997; HOKAMA, 1997). Diante da exposição a agentes oxidantes, a GSH é oxidada mais rapidamente do que a hemoglobina e outros constituintes eritrocitários, protegendo-os da degradação oxidativa (JACOB e JANDL, 1966). O eritrócito também pode intensificar a síntese de GSH em situações de estresse oxidativo, o que foi observado por Yonezawa et al. (2005) na intoxicação experimental por tetracloreto de carbono em bovinos.

O sistema glutaciona e a catalase são os principais mecanismos de defesa contra o H_2O_2 , dependendo da quantidade de peróxidos. O sistema glutaciona atua em níveis baixos de peróxido devido à maior afinidade da GSH-Px pelo peróxido de hidrogênio, enquanto que a catalase age principalmente em concentrações elevadas de peróxidos (CLEMENS e WALLER, 1987; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Quantidades pequenas de H_2O_2 são produzidas durante os eventos celulares normais, sendo altos níveis observados após a administração exógena de compostos com atividade óxido-redutora ou em locais de inflamação ativa (HARVEY, 1997). A GSH é substrato para a enzima GSH-Px durante a transformação do H_2O_2 em água. Nesta reação, a GSH sofre oxidação dando origem a glutaciona oxidada (GSSG), removendo outros peróxidos orgânicos na membrana e no interior da célula (HALLIWELL, 1994; SEN, 1997). A GSH-Px possui um resíduo de selenocisteína, sendo a presença

do selênio essencial para a sua atividade enzimática (SEN, 1997). A alta correlação entre a concentração plasmática de selênio e a atividade da GSH-Px permite utilizá-la para avaliar o equilíbrio metabólico da utilização desse mineral em diferentes espécies, principalmente bovinos e ovinos (CHIHUAILAF et al., 2002). A anemia hemolítica é rara em animais com deficiência de selênio, sendo observada apenas na presença de outros fatores estressantes (HARVEY, 1997).

A GSH sofre oxidação formando a glutathiona oxidada (GSSG) constantemente. Sendo assim, os eritrócitos possuem a enzima GSH-Rd que faz a redução do GSSG para GSH, para manter a GSH em concentração adequada. Esta reação utiliza como co-fatores o NADPH, produto da via glicolítica das pentoses, e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), derivado fosforilado da riboflavina (JACOB e JANDL, 1966; SEN, 1997; KURATA et al., 2000). A deficiência de FAD é relatada em eqüinos por defeito no metabolismo eritrocitário da riboflavina e está relacionada à metahemoglobinemia e presença de excentrócitos (HARVEY et al., 2003). Metahemoglobinemia familiar também pode ser observada em eqüinos associada à diminuição de GSH-Rd e GSH (DIXON et al., 1977). O sistema glutathiona influencia o metabolismo glicolítico eritrocitário e a taxa de glicólise pela via das pentoses é inversamente proporcional à concentração de GSH (JACOB e JANDL, 1966). Além disso, enzimas glicolíticas como a hexoquinase e a G-6-PD são importantes na reciclagem da glutathiona. Durante o processo de envelhecimento do eritrócito ocorre diminuição da reciclagem da GSH, aumento das lesões oxidativas, acúmulo de cálcio intraeritrocitário e redução da deformabilidade (KURATA et al., 2000).

Metahemoglobina redutase

Como mecanismo de reparo e prevenção da metahemoglobinemia, os eritrócitos possuem a enzima metahemoglobina redutase, que está presente em duas formas, a enzima que utiliza o NADH produzido pela via glicolítica anaeróbica como cofator (NADH-metahemoglobina redutase), mais ativa e importante em condições normais, e a enzima que utiliza como cofator o NADPH produzido pela via glicolítica das

pentoses (NADPH-metahemoglobina redutase) (JAIN, 1993). Na intoxicação por cebola em gatos ocorre quadro agudo de metahemoglobinemia, possivelmente pela ação do n-propil dissulfito, presente na cebola, inibindo a atividade das duas formas da enzima (FIGUERA et al., 2002.). Em condições normais, apesar da sua constante formação, a metahemoglobina não excede 1% do total de hemoglobina, devido principalmente à atuação da NADH-metahemoglobina redutase. Porém, na presença de substâncias doadoras de elétrons como o azul de metileno, que possuem forte atividade óxido-redutora, a NADPH-metahemoglobina redutase intensifica a sua atividade (WRAY, 2008). Metahemoglobinemia devido à deficiência de metahemoglobina redutase é relatada em cães (HARVEY et al., 1991) e gatos (HARVEY et al., 1994).

Suplementação e terapia antioxidante

Em medicina humana a suplementação com antioxidantes é recomendada de forma preventiva ou terapêutica, principalmente de vitaminas C e E (SHANG, 2003). Pesillo et al. (2004) observaram maior concentração de MDA e menores concentrações de vitamina E em cães com anemia hemolítica imunomediada, apontando a necessidade de mais estudos a respeito dos benefícios potenciais do tratamento antioxidante em cães com esta doença. Com o intuito de diminuir o estresse oxidativo causado pelo exercício, várias pesquisas vem sendo desenvolvidas em eqüinos atletas envolvendo a suplementação com vitamina E e selênio (AVELLINI, et al., 1995; MOFFARTS et al., 2005) e vitaminas E e C (WILLIAMS et al., 2004). Kamiloglu et al. (2006), verificaram que a suplementação com vitamina A e β -caroteno em ovinos atenuou o estresse oxidativo induzido pelo parto, demonstrado pela maior concentração de GSH eritrocitária e menores concentrações de MDA plasmático.

Além dos antioxidantes vitamínicos, destacam-se também os antioxidantes sintéticos como a N-acetilcisteína que possui atividade antioxidante por conter um grupamento SH em sua composição, sendo um de seus efeitos aumentar a concentração de GSH (HILL et al., 2001). Gatos intoxicados experimentalmente por acetaminofeno e tratados com

N-acetilcisteína apresentaram menor concentração de metahemoglobina e corpúsculos de Heinz que os animais não tratados (GAUNT et al., 1981). No estudo de Webb et al., (2003), a S-adenosilmetionina (SAME) foi utilizada no tratamento da intoxicação experimental por acetoaminofeno e protegeu os eritrócitos da lesão oxidativa, limitando a formação de corpúsculos de Heinz e a destruição dos eritrócitos. Outros antioxidantes como os bioflavonóides (ALLISON et al., 2000) e uma associação de cisteína e vitamina E também apresentaram efeito protetor na intoxicação por acetaminofeno em gatos (HILL et al., 2005). A suplementação com cisteína também aumenta a síntese e a concentração de GSH (FETTMAN et al., 1999).

Apesar do conhecido efeito oxidante, o azul de metileno, em doses específicas, é utilizado com eficiência no tratamento da metahemoglobinemia. A enzima NADPH-metahemoglobina redutase tem forte afinidade pelo azul de metileno e o reduz a leucometileno, o qual em contrapartida atua reduzindo a metahemoglobina (JAIN, 1993). Wray (2008) relata o caso de um cão da raça Greyhound intoxicado com hidroxuréia que apresentou cianose e 72,9 % de metahemoglobina, sem formação de corpúsculos de Heinz. A conduta terapêutica incluiu azul de metileno e acetilcisteína endovenoso, transfusão de papa de hemácias e oxigênio terapia. O animal apresentou melhora completa e 16 horas após a instituição do tratamento pode-se observar menos de 1% de metahemoglobina. Em bovinos, o azul de metileno também é usado com sucesso no tratamento da metahemoglobinemia devido à intoxicação por nitrito (ISSI et al., 2008). Outra possibilidade que necessita ser mais estudada na medicina veterinária é a utilização de quelantes de ferro. Devido à participação do ferro na formação de radicais livres, a administração de quelantes de ferro, como a desferroxamina, tem efeito antioxidante em processos que envolvem aumento de ferro livre (BALOGH et al., 2002).

CONCLUSÕES

Os antioxidantes eritrocitários formam um complexo e eficiente sistema de manutenção da integridade e, conseqüentemente, funcionalidade dos eritrócitos durante o seu curto período de vida na

circulação perante a produção normal de radicais livres do organismo. Porém, a suplementação ou terapia antioxidante pode ser necessária em situações de estresse oxidativo, seja por uma ineficiência dos sistemas antioxidantes ou por aumento dos eventos oxidantes endógenos ou exógenos.

O estudo e a utilização de terapias antioxidantes ainda é escasso em medicina veterinária, apesar da medicina humana utilizar animais como modelos experimentais para avaliação do efeito antioxidante de diversas substâncias. As lesões oxidativas eritrocitárias estão presentes em inúmeras enfermidades dos animais. Deste modo, deve-se sempre realizar uma investigação cautelosa de alterações morfológicas e funcionais dos eritrócitos. O efeito antioxidante de várias substâncias foi comprovado em estudos experimentais, sendo necessário um direcionamento mais aplicado das pesquisas futuras, a fim de estabelecer a conduta terapêutica mais adequada para cada espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, R.W. et al. Effect of a bioflavanoid dietary supplement on acetaminophen-induced oxidative injury to feline erythrocytes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.217, p.1157-1161, 2000.
- ALMOSNY, N.R.P. et al. Avaliação da deficiência eritrocitária da glicose-6-fosfato desidrogenase e valores hematológicos de equinos de salto. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niteroi, v.7, p.14-16, 2000.
- ASLANI, M.R.Ç.; MOHRI, M.; MOVASSAGHI, A.R. Heinz body anaemia associated with onion (*Allium cepa*) toxicosis in a flock of sheep. **Comparative Clinical Pathology**, London, v.14, p.118-120, 2005.
- AVELLINI, L.; SILVESTRELLI, M.; GAITI, A. Training-induced modifications in some biochemical defenses against free radicals in equine erythrocytes. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.19, p.179-184, 1995.
- BALOGH, N. et al. Effect of deferoxamine and L-arginine treatment on lipid peroxidation in an intestinal ischaemia-reperfusion model in rats. **Acta Veterinária Hungarica**, Budapest, v.50, p.343-356,

- 2002.
- BARRAVIERA, B.; MACHADO, P.E.A. Glutathione reductase e grupos SH reativos intra-eritrocitários-revisão. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, Rio de Janeiro, v.61, p.399-403, 1987.
- BILDIK, A. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidant status in dogs with visceral Leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, London, v.77, p.63-66, 2004.
- BONDAN, C. et al. Oxidative stress in the erythrocytes of cattle intoxicated with *Senecio sp.* **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.34, p.353-357, 2005.
- CALDIN, M. et al. A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.34, p.224-231, 2005.
- CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITWER, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinária México**, México, v.33, p.265-283, 2002.
- CHRISTIAN, J.A. Red blood cell survival and destruction. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.20, p.117-124.
- CLEMENS, M.R.; WALLER, H.D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.45, p.251-268, 1987.
- CHRISTOPHER, M.M. Relation of endogenous Heinz bodies to disease and anemia in cats: 120 cases (1978-1987). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.189, p.1089-1095, 1989.
- DAVIS, J.A.; GREENFIELD, R.E.; BREWER, T.G. Benzocaine-induced methemoglobinemia attributed to topical application of the anesthetic in several laboratory animal species. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.54, p.1322-1326, 1993.
- DIXON, P.M.; McPHERSON, E.A.; MUIR, A. Familial methemoglobinaemia and haemolytic anaemia in the horse associated with decreased erythrocytic glutathione reductase and glutathione. **Equine Veterinary Journal**, London, v.9, p.198-201, 1977.
- DUTTA-ROY, A.K.; GORDON, M.J.; CAMPBELL, F.M.; et al. Vitamina E requirements, transport, and metabolism: role of α -tocopherol-binding proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.5, p.562-570, 1994.
- FETTMAN, M.J. et al. Effects of dietary cysteine on blood sulfur amino acid, glutathione, and malondialdehyde concentrations in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.60, p.328-333, 1999.
- FIGHERA, R.A. et al. Intoxicação experimental por cebola *Allium cepa* (Liliacea), em gatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.22, p.79-84, 2002.
- GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; GREEN, R.A. Clinicopathologic evaluation of n-acetylcysteine therapy in acetaminophen toxicosis in the cat. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.42, p.1982-1984, 1981.
- GIGER, U.; NOBLE, N.A. Determination of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in basenjis with chronic hemolytic anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.198, p.1755-1761, 1991.
- GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.41, p.1819-1828, 1995.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v.52, p.253-265, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2001. 936 p.
- HARVEY, J.W.; KORNICK, H.P. Phenazopyridine toxicosis in the cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.169, p.327-331, 1976.
- HARVEY, J.W.; KANEKO, J.J. Mammalian erythrocyte metabolism and oxidant drugs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.42, p.253-261, 1977.
- HARVEY, J.W.; KANEKO, J.J.; HUDSON, E.B. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in a beagle dog. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.6, p.13-17, 1977.
- HARVEY, J.W.; FRENCH, T.W.; SENIOR, D.F. Hematologic abnormalities associated with chronic acetaminophen administration in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**,

- Schaumburg, v.189, p.1334-1335, 1986.
- HARVEY, J.W. et al. Methaemoglobin reductase deficiency in dogs. **Comparative Clinical Pathology**, London, v.1, p.55-59, 1991.
- HARVEY, J.W.; DAHL, M.; HIGH, M.E. Methaemoglobin reductase deficiency in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.205, p.1290-1291, 1994.
- HARVEY, J.W. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. In: KANEKO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1997. Cap.7, p. 157-203.
- HARVEY, J.W. et al. Methemoglobinemia and eccentrocytosis in equine erythrocyte flavin adenine dinucleotide deficiency. **Veterinary Pathology**, Washington, v.40, p.632-642, 2003.
- HATHERILL, J.R.; TILL, G.O.; WARD, P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents and Actions**, Switzerland, v.32, p.351-358, 1991.
- HEBBEL, R. P. Erythrocytes antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v.107, p.401-404, 1986.
- HILL, A.S. et al. Antioxidant prevention of Heinz body formation and oxidative injury in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.62, p.370-374, 2001.
- HILL, A.S. et al. Effects of dietary antioxidant supplementation before and after oral acetaminophen challenge in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.66, p.196-204, 2005.
- HINCHCLIFF, K.W. et al. Oxidative stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.61, p.512-517, 2000.
- HOKAMA, N.K.; MATSUBARA, L.S.; MACHADO, P.E.A. Fisiologia eritrocitária e hemólise. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v.72, p.19-32, 1997.
- ISSI, M. et al. Acute nitrate poisoning in two cattle. **Toxicological and Environmental Chemistry**, New York, v.90, p.135-140, 2008.
- JACOB, H.S.; JANDL, J.H. Effect of sulfhydryl inhibition on red blood cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.241, p.4243-4250, 1966.
- JAIN, N.C. Hemolytic anemias of noninfectious origin. In: **Essential of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap.11, p.193-209.
- JOHNSON, G.J. et al. Decreased survival in vivo of diamine-incubated dog erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.66, p.955-961, 1980.
- KAMILOGLU, N.N.; BEYTUT, E.; AKSAKAL, M. Alteration in antioxidant status and lipid peroxidation of sheep previously treated with vitamin A and β -Carotene during breeding and periparturient period. **Bulletin Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v.50, p.171-177, 2006.
- KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N.S. Glutathione regeneration in mammalian erythrocytes. **Comparative Haematology International**, London, v.10, p.59-67, 2000.
- MACHADO, L.P. et al. Malondialdeído eritrocitário como índice de estresse oxidativo em equinos da raça Árabe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.29, p. 237, 2007.
- MAEDE, Y. et al. Methionine toxicosis in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.48, p.289-292, 1987.
- LYNCH, G.P. et al. Heinz body formation in calf erythrocytes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.61, p.1161-1166, 1978.
- MOFFARTS, B. et al. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidants status in trained thoroughbred horses. **The Veterinary Journal**, London, v.169, p.7-9, 2005.
- MURASE, T. et al. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.58, p.259-261, 1996.
- PESILLO, S.A.; FREEMAN, L.M.; RUSH, J.E. Assessment of lipid peroxidation and serum vitamin E concentration in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.65, p.1621-1624, 2004.
- RANJAN, R. et al. Erythrocyte lipid peroxides and blood zinc and copper concentrations in acute undifferentiated diarrhea in calves. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.30,

p.249-254, 2006.

ROCK, C.L.; JACOB, R.A.; BOWEN, P.E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.96, p.693-702, 1996.

SEN, C.K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.8, p.660-672, 1997.

SHANG, F. et al. Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H₂O₂. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v.34, p.521-530, 2003.

STEINBERG, M.H.; BENZ JR, E.J. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In: HOFMAN, R. et al. **Hematology**. 3.ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 356 – 367.

STOCKHAM, S.L.; HARVEY, J.W.; KINDEM, D.A. Equine glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Veterinary Pathology**, Washington, v.31, p.518-27, 1994.

TANG, X.; XIA, Z.; YU, J. An experimental study of hemolysis induced by onion (*Allium cepa*) poisoning in dogs. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, Oxford, v.31, p.143149, 2007.

TAVAZZI, B. et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.267, p.684-689, 2000.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, London, v.16, p.716-718, 2000.

TODOVORA, I. et al. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. **Comparative Clinical Pathology**, London, v.13, p.190-194, 2005.

WEBB, C.B.; TWEDT, D.C.; FETTMAN, M.J. S-adenosylmethionine (SAME) in a feline acetaminophen model of oxidative injury. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.5, p.69-75, 2003.

WILLIAMS, C.A. et al. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.82, p.588-594, 2004.

WRAY, J.D. Methaemoglobinemia caused by hydroxycarbamide (hydroxyurea) ingestion in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.49,

p.211-215, 2008.

YONEZAWA, L.A. et al. Preventive treatment with vitamin E alleviates the poisoning effects of carbon tetrachloride in cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.52, p.292-297, 2005.