

JOANDES HENRIQUE FONTEQUE

**ESTRESSE OXIDATIVO E LIPOPEROXIDAÇÃO DEVIDO À ANEMIA
INDUZIDA POR PERDA AGUDA DE SANGUE EM OVINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária.

**BOTUCATU – SP
- 2005-**

JOANDES HENRIQUE FONTEQUE

**ESTRESSE OXIDATIVO E LIPOPEROXIDAÇÃO DEVIDO À ANEMIA
INDUZIDA POR PERDA AGUDA DE SANGUE EM OVINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Aguemi Kohayagawa

**BOTUCATU – SP
- 2005-**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Fontequ, Joandes Henrique.

Estresse oxidativo e lipoperoxidação devido à anemia induzida por perda aguda de sangue em ovinos / Joandes Henrique Fontequ. – 2005.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Aguemi Kohayagawa

Assunto CAPES: 50501062

1.Ovino - Doenças 2.Hematologia veterinária 3.Lipoperoxidação
4. Anemia

CDD 636.30896152

Palavras-chave: Anemia aguda; lipoperoxidação; Malondialdeído; Ovinos; Oxido nítrico; Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Estresse oxidativo e lipoperoxidação devido a anemia induzida por perda aguda de sangue em ovinos"**, Protocolo nº 122/2005-CEEA do Pós-graduando, **Joandes Henrique Fontequê**, nível Doutorado desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 6 de dezembro de 2005.


PROF. ASS. DR. MICHIKO SAKATE
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 13618-000

A Deus

Por que Dele e por Ele, e para Ele são todas as coisas...

Romanos 11:36

Dedico este trabalho:

*Aos meus Pais,
Accacio Fonteque e
Maria José Fonteque*

*À minha irmã
Joyce Cristina Fonteque Gaspar,
meu sobrinho
Caio José Fonteque Gaspar e
Meu cunhado Eron José Gaspar*

*À minha noiva
Daniela dos Santos Corrêa*

Amo a todos vocês...

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifestamos nossa gratidão a todas elas de forma particular:

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida para a realização do Curso de Doutorado.

À Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, em especial aos funcionários Denise A. Fioravante Garcia, Maria Aparecida Dias de Almeida Manuel e Maria Regina Tenor Forlin.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (Cnpq) pela concessão da Bolsa de Estudo, imprescindível para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Aguemí Kohayagawa pelo carinho, incentivo e oportunidade de trabalhar ao seu lado.

À Johnson e Johnson Ortho-Clinical Diagnostics e a Márcia Sayuri Takaasy pelo fornecimento dos kits para a realização da bioquímica sérica pela química seca.

À Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, Prof. Dr. Armino, pós-graduandos e funcionários do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LABEX) da Universidade de Campinas, pelo auxílio na realização das dosagens das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

À Dra. Maria Luiza Cassetari pelas dosagens de malondialdeído pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

À Profa. Dra. Eunice Oba pela autorização da utilização do Laboratório de Endocrinologia Veterinária necessária para a realização da dosagem hormonal.

Ao Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges pela amizade, companheirismo e pelas valiosas sugestões, observações e auxílio no desenvolvimento do experimento.

Ao Prof. Dr. Rogério Martins Amorim pela amizade, companheirismo e pela prestimosa colaboração e disposição no auxílio do desenvolvimento deste trabalho.

À minha noiva Daniela dos Santos Corrêa pelo amor, compreensão e incentivo. E aos seus pais, Donizete e Cidinha.

À amiga e Pós-graduanda Mere Erika Saito pela amizade, companheirismo, auxílio na realização da parte experimental e dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

À amiga e Pós-graduanda Veridiana Fernandes da Silveira pela amizade, companheirismo e auxílio na realização das dosagens de malondialdeído (MDA).

À amiga e Pós-graduanda Luciana Pereira Machado pela amizade, companheirismo e convívio durante esses anos.

À Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira, pela amizade, apoio e disposição sempre presentes.

Ao Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes pela amizade e convívio durante esses anos em Botucatu.

À Profa. Adriane Jorge Mendonça pelo convívio e amizade que solidificamos durante o curso.

À Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves pela amizade e auxílio durante a pós-graduação.

Ao amigo Dr. Fernando de Biasi e seus pais Antônio e Lavínia pela amizade e convívio durante minha estada em Botucatu.

Aos Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa, Profa. Dra. Mara Regina Stipp Balarin, Prof. Dr. Peter Reichmann, Prof. Ney Carlos Reichert Netto e Prof. Dr. Augusto José Savioli de Almeida Sampaio pelo companheirismo e convívio amigável durante minha estada na Universidade Estadual de Londrina.

Ao amigo Prof. Andrey Teixeira Borges pela amizade e convívio durante o curso.

Ao Prof. Luciano Barbosa do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu - SP, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Aos Pós-graduandos Rita de Cássia Collicchio Zuanaze e Marcos Yun Watanabe pela amizade e convívio durante o curso de pós-graduação.

À Profa. Dra. Michiko Sakate pela amizade e ensinamentos durante o curso de pós-graduação.

À secretária do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, Marlene Dias Camargo pela amizade e apoio durante o curso.

Aos funcionários do Laboratório Clínico Veterinário Sueli de Oliveira Emílio, Ilson Aparecido Tavares e Luiz Antônio Matiazzi pela colaboração e amizade.

Às funcionárias Sônia Maria Santi do Laboratório de Enfermidades Parasitárias e Izabel Cristina Castro do Laboratório de Toxicologia pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação da UNESP – Campus de Botucatu, Rosemary Cristina da Silva pela correção das referências bibliográficas e Selma Maria de Jesus pela confecção da ficha catalográfica.

*Irmãos, reparai, pois, na vossa vocação;
visto que não foram chamados muitos sábios segundo a carne,
nem muitos poderosos, nem muitos nobres de nascimento;
pelo contrário, Deus escolheu as coisas loucas do mundo
para envergonhar os sábios e escolheu as coisas fracas do mundo para
envergonhar as fortes; e Deus escolheu as coisas humildes do mundo, e as
desprezadas, e aquelas que não são, para reduzir a nada as que são;
a fim de que ninguém se vanglorie na presença de Deus.
Mas vós sois Dele, em Cristo Jesus, o qual se tornou, da parte de Deus,
sabedoria, e justiça, e santificação, e redenção, para que, como está escrito:
Aquele que se glorie, glorie-se no Senhor.*

I Coríntios 1:26-31

À minha noiva Daniela (Branca)...

...não consigo dizer se é bom ou mal

assim como o ar me parece vital

onde quer que eu vá, o que quer que eu faça

sem você, não tem graça...

Dinho Ouro Preto

(Fogo - Capital Inicial)

Te amo...

Joândes

Sumário

Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xvii
Resumo.....	xviii
Abstract	xx
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. RESPOSTA À ANEMIA EM OVINOS.....	3
2.2. ESTRESSE OXIDATIVO, LIPOPEROXIDAÇÃO E ANEMIA.....	6
2.3. ANEMIA E BIOQUÍMICA SÉRICA.....	10
3. Objetivos.....	14
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. Material e métodos	16
4.1. LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA	16
4.2. ANIMAIS.....	16
4.3. PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA ANEMIA	17
4.4. COLHEITA DAS AMOSTRAS	17
4.5. EXAMES LABORATORIAIS	18
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5. Resultados e Discussão.....	23
5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	23
5.2. OBSERVAÇÕES CLÍNICAS.....	24
5.3. HEMOGRAMA	25
5.3.1. Eritrograma e Proteína Total Plasmática	25
5.3.2. Plaquetas, volume plaquetário (VP), volume plaquetário médio (VPM) e distribuição do diâmetro das plaquetas (DDP)	34
5.3.3. Leucograma	38
5.4. ESTRESSE OXIDATIVO E LIPOPEROXIDAÇÃO	43
5.5. BIOQUÍMICA SÉRICA.....	48
6. Conclusões.....	54
7. Referências Bibliográficas.....	56

Lista de Figuras

	Página
Figura 1- Efeitos dos radicais livres nos constituintes da membrana celular (adaptado de Sjödin et al., 1990).....	8
Figura 2- Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina (g/dL), volume globular (%) e concentração de proteínas plasmáticas totais (g/dL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	32
Figura 3- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL), distribuição do diâmetro dos eritrócitos (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	33
Figura 4- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) da avaliação da anisocitose, distribuição do diâmetro dos eritrócitos (%), número absoluto de reticulócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), policromasia e volume globular (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	33
Figura 5- Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e volume plaquetário (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	36
Figura 6- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do volume plaquetário médio (fL) e distribuição do diâmetro das plaquetas (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	36

- Figura 7- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 41
- Figura 8- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número total de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 41
- Figura 9- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) da relação neutrófilo:linfócito e da concentração sérica de cortisol (ng/mL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 42
- Figura 10- Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) da concentração sérica de óxido nítrico (nmol/L), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/mL) e malondialdeído (nmol/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 46
- Figura 11- Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) da concentração sérica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/L), volume globular (%) e concentração de cortisol sérico (ng/mL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 46
- Figura 12- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) da concentração de uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 50

- Figura 13- Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 50
- Figura 14- Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) da atividade enzimática da creatinofosfoquinase (UI/L) e lactato desidrogenase (UI/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia..... 51

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 - Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) do número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina (g/dL), do volume globular (%), volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL), distribuição do diâmetro dos eritrócitos (%), contagem de reticulócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e concentração de proteína total plasmática (g/dL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	26
Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) avaliação da anisocitose e policromasia em esfregaços sangüíneos corados graduados por escore, volume globular (VG) e contagem de reticulócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	31
Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), volume plaquetário (%), volume plaquetário médio (fL) e distribuição do diâmetro das plaquetas (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	35
Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) da concentração sérica de cortisol (ng/mL), do número total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$), linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e relação neutrófilo linfócito (N:L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	40
Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) da concentração sérica cortisol (ng/mL), volume globular (%), óxido nítrico (nmol/L), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/mL), malondialdeído (nmol/L) e lactato (nmol/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	45

Tabela 6 - Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) da concentração e uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL), atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamyltransferase (GGT), creatinofosfoquinase (UI/L) e lactato desidrogenase (UI/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.....	49
---	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

$\bar{x}$ = média
 ACTH = hormônio adrenocorticotrófico
 ADH = hormônio anti-diurético
 AST = aspartato aminotransferase
 CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média
 CK = creatinofosfoquinase
 DDE = distribuição do diâmetro dos eritrócitos
 DNA = ácido desoxirribonucléico
 EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético
 EPO = eritropoetina
 ERO = espécies reativas do oxigênio
 FMB = Faculdade de Medicina de Botucatu
 FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
 GGT = gama-glutamyltransferase
 GM-CFS = fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
 H_2O_2 = peróxido de hidrogênio
 HCM = hemoglobina corpuscular média
 HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência
 I^{125} = iodo 125
 LABEX = Laboratório de Fisiologia do Exercício
 LDH = lactato desidrogenase
 MDA = malondialdeído
 MK-CSF = fator estimulador de colônia megacariocítica
 $NO^\bullet$ = óxido nítrico
 O_2 = oxigênio
 $O_2^{\bullet-}$ = superóxido
 $OH^\bullet$ = radical hidroxil
 OPG = ovos por gramas de fezes
 p = “p-value”
 PCT = volume plaquetário
 PDW = distribuição do diâmetro das plaquetas
 RDW = distribuição do diâmetro dos eritrócitos (“red cell distribution width”)

RIA = radioimunoensaio
 s = desvio padrão
 SNC = sistema nervoso central
 TBA = ácido tiobarbitúrico
 TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
 TFG = taxa de filtração glomerular
 VCM = volume corpuscular médio
 VG = volume globular
 VPM = volume plaquetário médio

FONTEQUE, J.H. **Estresse oxidativo e lipoperoxidação devido à anemia induzida por perda aguda de sangue em ovinos**. 2005. 68p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Resumo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um evento presente em todas as células do organismo e pode estar aumentada em condições como hipóxia induzida pela anemia causando lesões em moléculas como DNA, lipídeos e proteínas. Com o objetivo de avaliar o estresse oxidativo na anemia induzida por perda aguda de sangue, foram utilizados 10 ovinos, mestiços da raça Texel, machos e fêmeas, com idade entre seis e oito meses, clinicamente saudáveis, mantidos em regime de confinamento. Os animais foram submetidos a duas flebotomias para a retirada de 30% e 20% do volume sanguíneo com intervalo de 12 horas. Amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes da flebotomia, 6h e 12h após a primeira flebotomia, 6h, 12h, 24h, 48h, 72 horas, 4d, 5d, 6d, 10d, 14d, 21d e 28 dias após a segunda flebotomia. Foram avaliados o óxido nítrico, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, malondialdeído, cortisol e lactato séricos, hemograma e bioquímica sérica. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do Teste de Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA) ao nível de 5% de significância. Os resultados demonstraram que o protocolo de indução de anemia foi capaz de induzir anemia 12 horas após a segunda flebotomia, estresse oxidativo e lipoperoxidação caracterizado pelo aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O cortisol elevou-se e alterou o leucograma aumentando o número de leucócitos, neutrófilos e a relação neutrófilo:linfócito. Todos os animais recuperaram-se dentro do período de 28 dias após a flebotomia. Conclui-se que a retirada de 30% e 20% do

volume de sangue com intervalo de 12 horas provoca estresse oxidativo e lipoperoxidação em ovinos.

Palavras-Chave: ovinos, anemia aguda, óxido nítrico, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, malondialdeído, lipoperoxidação.

FONTEQUE, J.H. **Oxidative Stress and, lipid peroxidation in phlebotomy-induced acute anemia in sheep.** 2005. 68p. Thesis Doctor in Veterinary Medicine, Clinical Veterinary – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are produced in all cells and an increase can be associated with hypoxia induced by anemia. This results in DNA, lipid and protein damage. The aim of this work was to evaluate the oxidative stress induced by experimental acute blood loss. Ten healthy cross Texel sheep underwent two phlebotomies with 12 hours interval. Blood samples were collected before the first phlebotomy (30% of blood volume) and 6 and 12 hours after. A second phlebotomy was performed 12 hours after the first one (20% of blood volume) and blood samples were collected, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 4 days, 5 days, 6 days, 10 days, 14 days, 21 days and 28 days after. Thiobarbituric acid-reactive substances, malondialdehyde, nitric oxide, lipid peroxidation, serum cortisol, serum lactate, CBC and serum biochemistry were evaluated. Statistical analysis was reformed using repeated measures ANOVA. The experimental protocol used was able to induce anemia 12 hours after the second phlebotomy resulting in oxidative stress and lipoperoxiation characterized by the thiobarbituric acid-reactive substances increase. There was also a cortisol increase causing white blood cell changes: increased number of leukocytes, neutrophils and neutrophil and lymphocyte rate. All animals were normal 28 days after the phlebotomy. In conclusion, the protocol used showed that phlebotomy causing 30 and 20% at blood loss can induce oxidative stress and, lipid peroxidation in sheep.

Key Words: ovine, acute anemia, thiobarbituric acid-reactive substances, malondialdehyde, nitric oxide, lipid peroxidation.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A anemia é caracterizada clinicamente por decréscimos do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do volume globular. As causas de anemia incluem a perda de sangue, a destruição e a produção inadequada dos eritrócitos. A principal causa de anemia envolve a perda de sangue (ROBINSON; HUXTABLE, 1988; FELDMAN et al., 2000).

Durante a anemia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) está aumentada e pode ser tóxica a células, tecidos ou órgãos quando não é neutralizada (CHAN et al., 1999; LI; KARIN, 1999; STENVINKEL, 2003). As lesões nas membranas causadas por ERO resultam em lipoperoxidação caracterizadas por aumento da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e malondialdeído (MDA) (HALLIWELL, 1995; NIELSEN et al., 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; ZWART et al., 1999; WICKENS, 2001; SARADA et al., 2002; KÜHN; BORCHERT, 2002).

Durante a hipóxia tecidual as células produzem lactato, radicais livres e fatores de inflamação que não são eliminados pela circulação sangüínea e podem causar lesão celular direta. O sistema nervoso central (SNC) é o gatilho da resposta neuroendócrina que mantém a perfusão sangüínea no coração e cérebro, diminuindo em outros tecidos (DUTTON, 2003). O rim e as glândulas adrenais são os primeiros órgãos a responderem a essas alterações com a produção de renina, angiotensina, aldosterona, cortisol, eritropoetina e catecolaminas. Devido à complexa microcirculação hepática este órgão também pode ser alvo de lesão em estados de hipóxia tecidual (DUTTON, 2003).

REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão de Literatura

Objetivando aumentar os subsídios para efetuar uma melhor discussão sobre o tema desta tese e diante da escassez ou mesmo da ausência de trabalhos na literatura referentes ao assunto na espécie ovina, serão apresentados resultados de pesquisas científicas que incluem outras espécies de animais domésticos e a espécie humana.

2.1. Resposta à anemia em ovinos

A anemia é a redução da habilidade do sangue em suprir os tecidos com adequada quantidade de oxigênio necessária para as funções metabólicas celulares. As principais causas de anemia envolvem a perda de sangue, a destruição dos eritrócitos e a diminuição ou ausência na sua produção (FELDMAN et al., 2000). Clinicamente, a anemia caracteriza-se por decréscimo do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do volume globular (ROBINSON; HUXTABLE, 1988).

A avaliação da resposta eritrocitária e leucocitária nos processos hemorrágicos foi investigada, porém, os resultados obtidos tornam o tema ainda motivo de debates e discussões (HOWARD et al., 1998).

Winter (1966; 1967) com a realização de nove flebotomias diárias em ovinos observou ao 10º dia os menores valores para hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos. A resposta eritrocitária da medula óssea iniciou no primeiro dia após a flebotomia e atingiu pico ao nono dia. Porém, os sinais de regeneração nos esfregaços sangüíneos foram observados ao quarto dia com a presença de reticulócitos, anisocitose, eritrócitos policromáticos, aumento do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e do número de plaquetas. Após 28 dias houve retorno ao tamanho normal dos

eritrócitos sem depleção das reservas de ferro. A perda de granulócitos em relação à perda sangüínea induzida não foi suficiente para modificar significativamente a proporção de maturação granulocítica.

De acordo com Jain (1993) a concentração de eritropoetina (EPO) eleva-se rapidamente após a perda de sangue, alcançando concentração máxima em 24 horas e reduz ao terceiro dia, simultaneamente ao aumento do hematócrito e ao início da resposta eritropoética na medula óssea. A perda aguda de sangue determina leucocitose e neutrofilia provocada por desvio do compartimento marginal de neutrófilos para o compartimento circulante, podendo estar associada à linfopenia e à eosinopenia. O número total de leucócitos pode estar aumentado juntamente com a resposta hematopoética pelo estímulo generalizado da medula óssea.

Segundo Howard et al. (1998) a retirada de 20% do volume de sangue total em ovinos diminuiu significativamente em 24 horas o número total de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o volume globular. Os sinais de regeneração medular, como a contagem de reticulócitos aumentou no segundo dia, seguida por ponteados basofílicos, policromasia, anisocitose e presença de eritroblastos evidenciados a partir do terceiro dia da retirada de sangue. Elevações no VCM e HCM ocorreram entre seis e 12 horas, e 12 horas após a retirada de sangue, respectivamente, devido à liberação da reserva sangüínea medular e a contração esplênica (TORRINGTON et al., 1989; HOWARD et al., 1998). Aos 12 dias após a retirada de sangue o volume globular e a concentração de hemoglobina retornaram aos valores iniciais.

Quanto à resposta leucocitária, houve elevação do número de neutrófilos com inversão da relação neutrófilo:linfócito três horas após a retirada de sangue. A estimulação adrenérgica desencadeada pelo distúrbio hemorrágico determinou o deslocamento do compartimento marginal de neutrófilos para a circulação geral, bem como a mobilização das reservas medulares. Ao terceiro dia houve

restabelecimento da relação entre neutrófilos e linfócitos, indicando o fim do período de estresse (HOWARD et al., 1998).

A farmacodinâmica da relação entre EPO, reticulócitos e número de eritrócitos foi investigada em ovinos jovens na anemia induzida por perda aguda de sangue determinada em duas flebotomias com intervalo de quatro semanas até o período de recuperação. A flebotomia resultou em elevação rápida da concentração de EPO alcançando valores máximos do terceiro ao oitavo dia, seguido por reticulocitose. A concentração de hemoglobina retornou aos valores iniciais quatro semanas após a flebotomia (CHAPEL et al., 2000; VENG-PEDERSEN et al., 2002).

Na indução de anemia fetal em ovinos por retirada de 40% de sangue no período de duas horas, observou-se que a concentração de EPO fetal elevou-se 10 a 20 vezes em relação aos valores normais dentro de 24 horas após a hemorragia. Houve pequeno aumento na produção dos eritrócitos dentro de sete dias após a indução da anemia (ZHANG et al., 2002).

Widness et al. (2000) realizaram duas flebotomias em cordeiros durante dois dias consecutivos. Observou-se que a hipóxia tecidual progressiva acompanhou 60% da diminuição da hemoglobina em relação aos valores iniciais, juntamente com o aumento da concentração de EPO e do lactato plasmático dois dias após a primeira flebotomia. Os resultados demonstraram que tanto a EPO como o lactato podem ser indicadores específicos e sensíveis da hipóxia tecidual.

Al-Huniti et al. (2004) ao induzirem anemia por perda aguda de sangue em ovinos observaram aumento da concentração plasmática de EPO ao segundo e quarto dias após a flebotomia. A percentagem relativa máxima de contagem de reticulócitos ficou entre 5,5% e 13,7% ao 2,5 e 5,0 dias, respectivamente, após o início da flebotomia. A contagem de reticulócitos retornou aos valores iniciais 10 a 15 dias após a flebotomia.

2.2. Estresse oxidativo, lipoperoxidação e anemia

O radical livre é qualquer espécie química, átomo, íon ou molécula que contém um número de elétrons não pareado na camada de valência (SINGH; JAISWAL, 1992). Duas propriedades são peculiares aos radicais livres, a alta reatividade e a instabilidade. Os radicais livres possuem vida-média muito curta, podendo reagir com qualquer molécula que esteja próxima ao seu local de formação (ARCHERS, 1993; KIECHLE; MALINSKI, 1993; THOMAS, 2000; PERCÁRIO et al., 2001).

O oxigênio é fundamental para o metabolismo celular e para a produção de energia. Porém, uma pequena quantidade de oxigênio consumida é reduzida por vias específicas fornecendo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas tais como o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), além de seus intermediários ou subprodutos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Coletivamente essas substâncias são chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHAN et al., 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LI; KARIN, 1999; WICKENS, 2001; BIESALSKY, 2002).

As ERO podem ser benéficas ou nocivas dependendo da concentração, quantidade e da eficácia dos mecanismos antioxidantes (BIESALSKY, 2002). Em indivíduos saudáveis existe um equilíbrio entre a formação e a proteção contra os radicais livres (STENVINKEL, 2003). Se a formação de ERO exceder a capacidade das defesas antioxidantes resultará em estresse oxidativo e lesão em macromoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (BIESALSKY, 2002). Portanto, altas concentrações de ERO são citotóxicas e podem estar presentes em condições como inflamação, doenças imunológicas, anemia, uremia e na diminuição da concentração de vitaminas antioxidantes (CHAN et al., 1999; LI; KARIN, 1999; STENVINKEL, 2003).

O mecanismo pelo qual a anemia contribui para o estresse oxidativo não está totalmente compreendido, mas a inadequada

oxigenação tecidual é acompanhada por aumento na produção de radicais livres determinando alterações no metabolismo celular energético, elevação no catabolismo de catecolaminas e ativação leucocitária (SOMMERBURG et al., 1998; GRUNE et al., 2000; SARADA et al., 2002; STENVINKEL, 2003).

O estado pró-oxidante está na dependência da oxigenação do organismo ou célula (HIMMELFARB; HAKIM, 2003). A anemia produz hipóxia devido à limitada capacidade de carrear o oxigênio, reduzindo a tolerância ao exercício, elevando a frequência respiratória e o metabolismo anaeróbico resultando na produção de lactato (LEWIS et al., 1992; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Sob essas condições, existe aumento na concentração de catecolaminas e na atividade de enzimas que metabolizam as catecolaminas produzindo mais radicais livres (JIANG; DOWNING, 1990; MOCHIZUKI-ODA et al., 1997). Outras causas da formação de radicais livres envolvem a degradação da purina pela xantina oxidase em condições de reperfusão durante a hipóxia temporária tecidual (KOGURE et al., 1982; LINAS et al., 1990; KOMATSU et al., 1992). A hipóxia altera o metabolismo celular e induz a liberação de mediadores inflamatórios que ativam leucócitos elevando a produção de radicais e oxidantes (MOORE et al., 1996).

Vários derivados do oxigênio quando não neutralizados causam lesão em membranas resultando em peroxidação lipídica (SARADA et al., 2002). A lipoperoxidação causada pelas ERO é o processo mais extensivamente estudado (HALLIWELL, 1995; NIELSEN et al., 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; ZWART et al., 1999; WICKENS, 2001; KÜHN; BORCHERT, 2002). A grande quantidade de fosfolípidos presente nas membranas celulares é alvo fácil e rapidamente afetado quando as ERO são formadas. Estes radicais reagem com ácidos graxos poliinsaturados para formar lipoperóxidos que compõem a cascata de reações degenerativas dos lípidos (Figura 1)

(HALLIWELL, 1995; NIELSEN et al., 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; ZWART et al., 1999; WICKENS, 2001; KÜHN; BORCHERT, 2002).

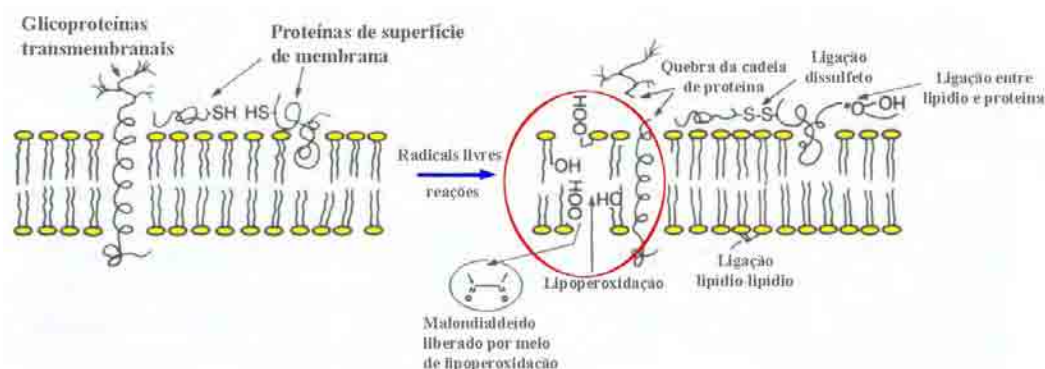


Figura 1 – Efeito dos radicais livres nos constituintes da membrana celular (adaptado por Sjödin et al. 1990).

A lipoperoxidação ocorre como uma reação em cadeia dividida em etapas. A etapa de iniciação corresponde ao seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular pelo radical hidroxila ou alcóxila formando o radical lipídico. Na etapa de propagação, o radical lipídico reage rapidamente com o oxigênio, resultando em um radical peróxila que por sua vez seqüestra um hidrogênio de um novo ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o radical lipídico. A etapa de terminação ocorre quando os radicais lipídico e peróxila produzidos anulam-se (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GATÉ et al., 1999; ABUJA; ALBERTINI, 2001; DOTAN et al., 2004). Os hidroperóxidos formados podem se decompor em numerosos produtos aldeídos de diferentes comprimentos de cadeia, reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989; SJÖDIN et al., 1990).

O peróxido lipídico formado pode acumular-se até certo grau dentro do órgão ou tecido produzindo redução irreversível da fluidez da membrana, aumentando sua permeabilidade e resultando em perda da integridade da membrana e ruptura da célula (YAGI, 1987; SJÖDIN et al.,

1990; SINGH; JAISWAL, 1992; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; WICKENS, 2001). Com a destruição celular, o peróxido lipídico é liberado para a circulação sanguínea elevando sua concentração sérica ou plasmática, indicando a ocorrência de lesão de membrana celular. O excesso de peróxidos lipídicos não pode ser excretado na urina e circula no sangue podendo causar lesões em outras células, órgãos e tecidos intactos, possibilitando o desenvolvimento de doenças secundárias (YAGI, 1987).

A produção exacerbada de radicais livres é controlada pelo sistema antioxidante eritrocitário, representado por enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, porém, esse mecanismo está diminuído durante a anemia (COSTAGIOLA et al., 1989; GRUNE et al., 2000; STENVINKEL, 2003).

A determinação dos radicais livres é extremamente difícil devido à curta vida-média e a tecnologia para detectar diretamente os radicais em sistemas biológicos (JANERO, 1990; HOLLEY; CHEESEMAN, 1996).

Devido a esses problemas analíticos relacionados ao estresse oxidativo e do mecanismo de lesão dos radicais livres, utilizam-se os biomarcadores para monitorar o envolvimento na patogênese da lesão. A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o malondialdeído (MDA) são os testes mais freqüentemente utilizados para a mensuração da lipoperoxidação de membranas (HALLIWELL, 1995; HOLLEY; CHEESEMAN, 1996; NIELSEN et al., 1997; CERVATO et al., 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; ZWART et al., 1999; WICKENS, 2001; KÜHN; BORCHERT, 2002).

A análise de reação envolvendo as TBARS é o método mais fácil e popular quando se pretende avaliar a lipoperoxidação e a atividade de radicais livres em amostras biológicas (HOLLEY; CHEESEMAN, 1996). Porém, os resultados são expressos em termos de quantidade de MDA produzido em um tempo pré-estabelecido. Mas, o

teste não avalia apenas o MDA livre, ele determina o MDA que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formado pela decomposição de peróxidos lipídicos durante a fase de aquecimento do teste (HALLIWEL; GUTERIDGE, 1989; DOTAN et al., 2004).

Diferentemente das TBARS a metodologia utilizada com o aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) determina com maior precisão e sensibilidade os componentes aldeídos, obtendo-se o MDA livre (WONG et al., 1987; DRAPER; HADLEY, 1990; DRAPER et al., 1993; HOLLEY; CHEESEMAN, 1996; JENTZSCH et al., 1996; KARATAS et al., 2002).

2.3. Anemia e bioquímica sérica

Durante a isquemia as células hipóxicas produzem lactato, radicais livres e fatores da inflamação que não são eliminados pela circulação sangüínea e podem causar lesão celular direta. O sistema nervoso central (SNC) é o gatilho da resposta neuroendócrina ao choque que mantém a perfusão sangüínea do coração e do cérebro, diminuindo-a em outros tecidos (DUTTON, 2003).

O rim e as glândulas adrenais são os primeiros órgãos a responderem às alterações neuroendócrinas com a produção de renina, angiotensina, aldosterona, cortisol, eritropoetina e catecolaminas (DUTTON, 2003).

Os testes de função renal são marcadores da função glomerular e a sua avaliação seqüencial é útil para monitorar o tratamento e a progressão das doenças (MEYER; HARVEY, 1998).

A uréia é sintetizada no fígado a partir da amônia que é proveniente do catabolismo de proteínas. Dois processos alteram a concentração de uréia sérica: a taxa de síntese da uréia nos hepatócitos e a taxa de eliminação da uréia pelos rins. A taxa de síntese da uréia depende da função hepática e é influenciada por alterações na dieta ou por catabolismo protéico. A taxa de eliminação depende da taxa de

filtração glomerular e da taxa de reabsorção da uréia nos túbulos renais (KANEKO et al., 1997).

A creatinina é formada da degradação da creatina nos músculos. Como a uréia, a concentração de creatinina depende da taxa de síntese e de excreção. A taxa de síntese, entretanto é relativamente constante, porém a excreção renal de creatinina é altamente dependente da taxa de filtração glomerular. Diferentemente da uréia a creatinina não é reabsorvida pelos túbulos renais (KANEKO et al., 1997).

As concentrações de uréia e de creatinina são mensuradas rotineiramente para detectar doenças que causam azotemia devido à redução da taxa de filtração glomerular (TFG). A diminuição da TFG pode ser resultado de mecanismos pré-renais que causam alteração do fluxo sangüíneo renal como a desidratação, hipovolemia, choque endotóxico ou redução do débito cardíaco (KANEKO et al., 1997).

A microcirculação hepática é complexa e sofre lesão de reperfusão no choque. As células hepáticas são metabolicamente ativas e contribuem substancialmente para a resposta inflamatória no choque descompensado (DUTTON, 2003). A circulação compreende dois suprimentos sangüíneos, a artéria hepática e a veia porta que nutre e oxigena o fígado. Esta circulação compreende aproximadamente 80% do fluxo sangüíneo hepático total que libera substâncias absorvidas do trato gastrointestinal e hormônios do pâncreas. A integridade e a função hepática podem ser alteradas secundariamente à insuficiência cardiovascular, anemia, desvio porto-sistêmico e na exposição das bactérias intestinais ou seus produtos quando a barreira intestinal for lesada. O sangue entra na tríade portal e flui através das zonas 1, 2 e 3 antes da veia terminal hepática, sendo que os hepatócitos da zona 3 são mais susceptíveis a condições hipóxicas como na insuficiência cardíaca ou no choque (MEYER; HARVEY, 1998).

Os testes mais importantes utilizados para a avaliação hepática em ruminantes são os enzimáticos que detectam lesões de

hepatócitos ou colestase (MEYER et al., 1995; LASSEN, 2004). Estes compreendem as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e as que aumentam devido à acelerada produção estimulada por redução do fluxo biliar, como a gama-glutamilttransferase (GGT) (MEYER et al., 1995; KANEKO et al., 1997; KERR, 2003; LASSEN, 2004).

Alguns fatores devem ser considerados ao avaliar as alterações da atividade sérica das enzimas hepáticas, tais como a localização celular, a atividade e a concentração da enzima nos diferentes tecidos, a quantidade de tecido lesado, o grau de severidade e a presença de processo regenerativo (MEYER et al., 1995; KRAMER; HOFFMANN, 1997; KERR, 2003; LASSEN, 2004).

A musculatura esquelética não é metabolicamente ativa durante o choque e tolera a isquemia melhor que outros órgãos. A grande massa muscular esquelética tem importância na produção de radicais livres e lactato pelas células isquêmicas (DUTTON, 2003).

O músculo esquelético contém alta atividade de creatinofosfoquinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). A lesão muscular com liberação dessas enzimas é a causa mais comum da elevação plasmática, sendo que a CK é tecido específica e útil na identificação de lesão muscular esquelética. (MEYER; HARVEY, 1998).

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da anemia por perda aguda de sangue sobre o estresse oxidativo e a lipoperoxidação em ovinos submetidos à flebotomia.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da anemia por perda aguda de sangue sobre o hemograma, o óxido nítrico, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, o malondialdeído, o lactato, o cortisol e a bioquímica sérica.

MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e métodos

4.1. Local de Execução da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório Clínico Veterinário “Aguemi Kohayagawa” junto ao Departamento de Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu-SP. Colaboraram para a pesquisa o Laboratório de Fisiologia do Exercício (LABEX) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, o Departamento de Nutrição da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Botucatu-SP, e o Laboratório de Endocrinologia junto ao Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

4.2. Animais

Os animais utilizados neste experimento foram provenientes de uma propriedade localizada no município de Araçatuba, Estado de São Paulo. Foram selecionados 10 ovinos mestiços da raça Texel, de seis a oito meses de idade, cinco machos e cinco fêmeas pesando entre 15 e 20 kg, clinicamente sadios.

Após a aquisição, os ovinos foram alojados no Hospital Veterinário da FMVZ - UNESP, localizada na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, a 48°52' longitude oeste, 22°52' latitude sul, altitude de 756 metros acima do nível do mar, apresentando clima temperado e temperatura média anual de 19°C, onde foram mantidos durante todo o experimento. Anteriormente ao início das colheitas, os animais foram desverminados¹ e passaram por um período de adaptação de 30 dias, quanto à nova alimentação e instalações.

¹ Cydectin NF, Fort Dodge.

Os ovinos foram mantidos em baias de piso concretado e alimentados com feno de “coast-cross” (*Cynodon dactylon*), ração concentrada comercial² (500g/animal/dia), sal mineral³ e água à vontade.

4.3. Protocolo de indução da anemia

Para a indução da anemia foram retirados 30% do volume sangüíneo total de acordo com o cálculo de 8% do peso corpóreo correspondendo ao volume total de sangue. Após um período de 12 horas foi realizada uma segunda flebotomia retirando-se 20% do volume sangüíneo.

A retirada de sangue em ambas as flebotomias foi realizada por venipunção jugular utilizando-se agulha hipodérmica (40 x 12) acoplada a um equipo. O animal permaneceu em decúbito lateral direito sobre uma mesa e por ação da gravidade o volume sangüíneo retirado foi quantificado utilizando-se uma proveta graduada.

4.4. Colheita das amostras

Considerando-se as flebotomias foram efetuadas colheitas de sangue de todos os ovinos, nos seguintes momentos:

- Antes F1: antes da flebotomia;
- 6hF1: 6 horas após a primeira flebotomia;
- 12hF1+F2: 12 horas após a primeira flebotomia e segunda flebotomia;
- 6h: 6 horas após a segunda flebotomia;
- 12h: 12 horas após a segunda flebotomia;
- 24h: 24 horas após a segunda flebotomia;
- 48h: 48 horas após a segunda flebotomia;
- 72h: 72 horas após a segunda flebotomia;

² Cooperativa dos Cafeicultores de São Manuel, SP.

³ Premiphos.

- 4d: quatro dias após a segunda flebotomia;
- 5d: cinco dias após a segunda flebotomia;
- 6d: seis dias após a segunda flebotomia;
- 10d: 10 dias após a segunda flebotomia;
- 14d: 14 dias após a segunda flebotomia;
- 21d: 21 dias após a segunda flebotomia;
- 28d: 28 dias após a segunda flebotomia;

Foram obtidos mediante venipunção jugular 5mL de sangue em tubo de colheita a vácuo com anticoagulante⁴ EDTA a 10% para a realização do hemograma e proteína plasmática total e 10mL de sangue em tubo de colheita a vácuo⁵ contendo gel coagulante para a obtenção do soro. O soro foi armazenado em “freezer” à temperatura de menos 20°C até o momento do processamento para a determinação do óxido nítrico, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, malondialdeído, cortisol, lactato e bioquímicos.

4.5. Exames Laboratoriais

4.5.1. Hemograma

A hematimetria foi realizada em contador eletrônico de células⁶.

4.5.2. Contagem de Plaquetas

A contagem total de plaquetas foi realizada em contador eletrônico de células⁶.

⁴ Hemogard® K3 Vacutainer Systems, Becton Dickinson, England.

⁵ Vacuum II®, Labnew, São Paulo, Brasil.

⁶ CELL-DYN 3500 R – Abbott Laboratories, USA.

4.5.3. Contagem de Reticulócitos

A contagem de reticulócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados com azul cresil brilhante de acordo com Jain (1986).

4.5.4. Avaliação morfológica dos eritrócitos

A avaliação morfológica dos eritrócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados para a determinação da anisocitose, policromasia, ponteados basofílicos, corpúsculos de Howell-Jolly e eritroblastos, conforme Jain (1986).

4.5.5. Proteína Total Plasmática

A determinação da proteína plasmática total foi realizada por meio da técnica de refratometria⁷, conforme Jain (1993).

4.5.6. Óxido Nítrico (NO•)

A concentração de nitrito sérico que reflete a produção de óxido nítrico foi determinada segundo a reação de Griess, como descrito por Hawkins et al. (1998) e mensurados em leitor de ELISA a 540nm⁸.

4.5.7. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram determinadas no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LABEX) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, de acordo com Yagi (1987) e a leitura realizada em aparelho de fluoroscopia⁹.

4.5.8. Malondialdeído sérico (MDA)

A dosagem do malondialdeído sérico foi realizada no Departamento de Nutrição da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB),

⁷ Refratômetro ATTAGO Co.

⁸ Multiscan EX, Labsystems, Finland.

⁹ Espectrofluorômetro SLM Aminco. SPF 500TM com Nozone.

Botucatu-SP, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)¹⁰ em fluoroscopia de acordo com Karatas et al. (2002).

4.5.9. Cortisol sérico

As dosagens séricas de cortisol foram determinadas no Laboratório de Endocrinologia junto ao Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu-SP, por meio da técnica de radioimunoensaio (RIA), em fase sólida, utilizando-se kit comercial¹¹. Não foi realizado qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo traçador o I¹²⁵. A leitura foi realizada em contador gama¹².

4.5.10. Bioquímica sérica

O lactato, a uréia, a creatinina, a atividade da aspartato aminotransferase, da gama-glutamilttransferase, da creatinofosfoquinase e da lactato desidrogenase¹³ foram determinadas em equipamento de bioquímica seca automatizado¹⁴.

4.6. Análise estatística

Para a verificação da normalidade do conjunto de dados, foi realizado o Teste de Kolmogorov-Smirnov (CURI, 1997).

Para os dados que passaram no Teste de Normalidade, foi utilizado o teste paramétrico de Análise de Variância de Medidas Repetidas, com o objetivo de verificar a existência de diferença entre os momentos avaliados (CURI, 1997).

¹⁰ Shymadzu Corporation, Kioto, Japão.

¹¹ Coat-a-Count-Cortisol Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, USA.

¹² Cobra™ II Auto-Gamma, Packard Instrument Company, Meriden.

¹³ LAC, UREA, CREA, AST, GGT, CK, LDH Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. Johnson-Johnson Company.

¹⁴ 750 VITROS. Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. Johnson-Johnson Company.

No caso de diferenças significativas ($p < 0,05$), foram realizadas as comparações entre os momentos por meio do Teste de Comparações Múltiplas de Student-Newman-Keuls (CURI, 1997).

A correlação entre o TBARS e o VG foi realizada segundo o teste de correlação de Pearson (CURI, 1997).

Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%.

Para a avaliação dos ponteados basofílicos, corpúsculos de Howell-Jolly e eritroblastos foi realizada a análise descritiva dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão

5.1. Considerações gerais

As escolhas da espécie, raça e idade dos animais basearam-se na ausência de literatura sobre a influência da anemia na produção de radicais livres e lipoperoxidação em ovinos, além de contribuir para o entendimento da resposta à perda aguda de sangue.

A idade influencia a resposta à perda aguda de sangue, sendo que os animais jovens apresentam melhor resposta à anemia do que adultos (JAIN, 1993; FELDMAN et al., 2000). Além desse fator, o tamanho reduzido e a facilidade do manejo auxiliaram na escolha dos animais.

Os ovinos da raça Texel e mestiços Texel estão recentemente sendo introduzidos na região e utilizados para a produção de carne em confinamentos, o que possibilita o estudo de uma raça que está em expansão no Estado de São Paulo.

A metodologia empregando-se os contadores eletrônicos de células permitiu a avaliação de novos indicadores recentemente utilizados na Patologia Clínica Veterinária. A distribuição do diâmetro dos eritrócitos (DDE), o volume plaquetário (VP), volume plaquetário médio (VPM) e a distribuição do diâmetro das plaquetas (DDP) foram avaliados e auxiliaram no estudo da resposta às anemias por perda aguda de sangue em ovinos.

A realização da bioquímica sérica utilizando a química seca com o emprego de equipamento automatizado é nova na Medicina Veterinária e determina valores com grande rapidez para várias espécies animais. Por ser uma metodologia recente, não existem valores de referência para animais jovens mestiços da raça Texel.

Uma das preocupações surgidas durante a realização do delineamento experimental foi à definição do volume de sangue a ser retirado na flebotomia. A opção da retirada de 30% e 20% do volume

sangüíneo com período de 12 horas não foi encontrada na literatura consultada.

Não se optou por nenhum tipo de reposição de líquidos, solução fisiológica ou plasma, concomitantes à retirada de sangue total. Os resultados demonstraram que o intervalo de tempo de 12 horas entre as flebotomias foi suficiente para a reposição da volemia, não sendo necessário em nenhum dos animais e em momento algum, qualquer tipo de tratamento.

5.2. Observações clínicas

Apesar do exame clínico não ter sido realizado durante o experimento, os animais foram diariamente observados nos períodos da manhã e tarde por ocasião da alimentação. Não foram observadas alterações comportamentais como depressão e decúbito lateral permanente em nenhum dos animais do experimento. Todos apresentaram apetite e comportamento normais durante o período de avaliação.

Os ovinos foram mantidos em baias com restrição do exercício, boa alimentação e água à vontade. A administração de vermífugo no início do experimento manteve em níveis mínimos aceitáveis (300 OPG), a infestação parasitária por nematódeos gastrointestinais.

5.3. Hemograma

5.3.1. Eritrograma e Proteína Total Plasmática

O transporte de líquidos para a reposição da volemia causou decréscimo do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular e concentração de proteína plasmática total seis horas após a retirada de 30% do volume sangüíneo (primeira flebotomia). Após 12 horas houve redução de 37,51% para o número de eritrócitos, 37,19% na concentração de hemoglobina e 37,11% no volume globular (Tabela 1 e Figuras 2 e 3).

A partir da segunda flebotomia com a retirada de 20% do volume sangüíneo, observou-se após 12 horas (12h) acentuada redução do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular de 53,30%, 52,80% e 53,98%, respectivamente.

A concentração de proteína total diminuiu 24,74% e 27,53%, seis horas após a primeira flebotomia (6hF1) e seis horas após a segunda flebotomia (6h), respectivamente.

A anemia foi observada seis horas após a primeira flebotomia (6hF1) e acentuou-se 12 horas após a segunda flebotomia (12h) de acordo com os valores de referência determinados por Feldman et al. (2000). Alterações na avaliação da anisocitose, policromasia e presença de reticulócitos indicando sinais de regeneração medular foram evidentes 48 horas após a segunda flebotomia (48h).

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm s$) do número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina (g/dL), do volume globular (%), volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL), distribuição do diâmetro dos eritrócitos (%), contagem de reticulócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e concentração de proteína total plasmática (g/dL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Momentos	Eritrograma						Reticulócitos		Proteína
	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	VG (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	DDE (%)	$\times 10^6/\mu\text{L}$	
Antes F1	10,45 ^a ±1,29	11,59 ^a ±1,00	33,79 ^a ±3,01	33,04 ^{de} ±1,89	11,16 ^d ±0,79	34,28 ^b ±0,61	23,86 ^{abcd} ±1,70	0,002 ^c ±0,004	5,74 ^a ±0,39
6hF1	6,67 ^e ±1,11	7,42 ^c ±0,98	21,30 ^{def} ±2,90	32,15 ^e ±2,21	11,22 ^d ±0,80	34,86 ^b ±0,49	21,55 ^{cde} ±1,86	0,003 ^c ±0,008	4,32 ^f ±0,36
12hF1+F2	6,53 ^e ±1,18	7,28 ^{cd} ±1,14	21,25 ^{def} ±3,41	32,73 ^e ±2,14	11,25 ^d ±0,78	34,30 ^b ±0,51	21,13 ^{de} ±1,70	0,007 ^c ±0,012	4,59 ^e ±0,40
6h	5,20 ^{gh} ±0,83	5,90 ^{efg} ±0,81	16,66 ^{gh} ±2,31	32,20 ^f ±2,13	11,42 ^{cd} ±0,87	35,40 ^{ab} ±0,931	21,32 ^{cde} ±2,01	0,007 ^c ±0,018	4,16 ^f ±0,22
12h	4,88 ^h ±0,81	5,47 ^g ±0,89	15,55 ^h ±2,17	32,07 ^e ±2,35	11,42 ^{cd} ±0,85	35,58 ^{ab} ±0,58	20,68 ^e ±2,05	0,008 ^c ±0,008	4,18 ^f ±0,41
24h	4,90 ^h ±0,98	5,77 ^{fg} ±0,78	15,91 ^{gh} ±2,80	32,73 ^e ±2,83	12,02 ^{abcd} ±1,62	36,67 ^a ±3,73	20,55 ^e ±1,13	0,020 ^c ±0,054	4,30 ^f ±0,25
48h	5,17 ^{gh} ±0,81	6,23 ^{defg} ±0,70	17,47 ^g ±2,27	34,97 ^{cde} ±2,66	12,19 ^{abc} ±1,48	35,82 ^{ab} ±1,57	20,51 ^e ±1,63	0,077 ^b ±0,050	4,70 ^e ±0,25
72h	5,55 ^{fg} ±0,74	6,81 ^{cdef} ±0,76	19,60 ^f ±2,30	35,50 ^{abc} ±2,51	12,33 ^{ab} ±1,00	34,74 ^b ±0,65	21,29 ^{cde} ±2,17	0,166 ^a ±0,063	4,94 ^d ±0,32
4d	5,76 ^f ±0,68	7,26 ^{cde} ±0,58	20,76 ^e ±2,00	36,25 ^{ab} ±2,61	12,69 ^a ±1,11	35,09 ^b ±2,48	22,51 ^{bcd} ±2,47	0,152 ^c ±0,107	4,97 ^d ±0,35
5d	6,24 ^e ±0,65	7,73 ^c ±0,54	22,44 ^d ±1,66	36,12 ^{ab} ±2,60	12,45 ^{ab} ±0,99	34,47 ^b ±0,59	23,14 ^c ±2,43	0,065 ^b ±0,053	5,23 ^c ±0,36
6d	6,28 ^e ±0,59	7,87 ^c ±0,57	22,63 ^d ±1,67	36,16 ^{ab} ±2,66	12,59 ^a ±1,06	34,82 ^b ±0,48	26,19 ^a ±5,46	0,049 ^{bc} ±0,052	4,90 ^d ±0,32
10d	7,75 ^d ±0,76	9,43 ^b ±0,71	27,26 ^c ±1,97	35,29 ^{ac} ±2,72	12,21 ^{abc} ±1,05	34,60 ^b ±0,53	25,16 ^{ab} ±4,17	0,005 ^c ±0,006	5,25 ^{bc} ±0,37
14d	8,70 ^c ±0,65	10,20 ^b ±0,68	30,10 ^b ±1,75	34,68 ^{bcd} ±2,42	11,76 ^{bcd} ±0,97	33,91 ^b ±0,52	24,32 ^{abc} ±3,13	0,000 ^c ±0,000	5,36 ^{bc} ±0,35
21d	9,95 ^b ±0,71	11,37 ^b ±0,75	33,04 ^a ±1,89	33,31 ^{de} ±2,11	11,44 ^{cd} ±0,79	34,35 ^b ±0,41	24,14 ^{abcd} ±2,08	0,000 ^c ±0,000	5,72 ^a ±0,27
28d	10,07 ^{ab} ±0,62	11,41 ^a ±0,71	32,53 ^a ±1,71	32,37 ^{de} ±1,82	11,34 ^d ±0,75	35,02 ^b ±0,61	23,57 ^{abcde} ±1,90	0,001 ^c ±0,003	5,52 ^b ±0,19

^aPara letras iguais não há diferença significativa (p<0,05) entre os momentos.

Os mecanismos de reposição de líquidos induziram a hemodiluição num período de 12 horas após a segunda flebotomia caracterizada pelos menores valores do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e do volume globular. Porém, não houve aumento no VCM, HCM, CHCM, DDE e número de reticulócitos. O VCM e o DDE não aumentaram após à perda de sangue porque a pequena quantidade de reticulócitos liberados da medula óssea não foi suficiente para determinar sua elevação (MEYER; HARVEY, 1998).

Segundo Howard et al. (1998) três horas após a retirada de 20% do volume sangüíneo houve redução significativa do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular com os menores valores observados após 24 horas.

Os resultados desse experimento diferiram de Howard et al. (1998) que relacionaram a causa da elevação do HCM e VCM entre seis horas e 12 horas após a perda de sangue em ovinos, à liberação de eritrócitos imaturos e de maior diâmetro pela contração esplênica devido ao estímulo adrenérgico e liberação das reservas medulares de eritrócitos.

Após a perda aguda de sangue, ocorrem alterações nos sistemas cardiovascular e respiratório com ativação de respostas neuroendócrinas compensatórias para a reposição da volemia. A restauração do volume plasmático ocorre com o movimento de líquido do espaço intersticial para a circulação, ingestão de água, redução da perda de água e sódio no sistema renal e absorção de líquido no trato digestório (MALIKIDES et al., 2001).

A redução da pressão arterial, pressão capilar e o decréscimo do volume sangüíneo causam intensa atividade simpática dentro de segundos após a perda de sangue. Essa resposta é mediada por barorreceptores (presentes arco aórtico e seio carotídeo) e quimiorreceptores causada inicialmente pela liberação de catecolaminas

da medula adrenal resultando em alterações cardíacas e vasculares (MALIKIDES et al., 2001).

O reflexo barorreceptor e o reflexo receptor de volume atrial atuam juntos e em poucos segundos restauram a pressão sangüínea após a perda de sangue. Outros mecanismos compensatórios entram em atividade minutos a horas após a hemorragia a fim de restaurar o volume de sangue perdido (CUNNINGHAM, 2004).

A hemorragia reduz a pressão sangüínea e a pressão hidrostática e oncótica, favorecendo a reabsorção de líquidos para os capilares sangüíneos. Porém, o líquido do espaço intersticial não possui células ou proteínas, diluindo os constituintes sangüíneos causando redução do volume globular e da concentração de proteínas plasmáticas, fenômeno conhecido como hemodiluição (CUNNINGHAM, 2004).

O aumento da atividade simpática associada à redução da pressão arterial atua nos rins estimulando a liberação de renina que atua em conjunto com a angiotensina e a aldosterona para diminuir a excreção de sódio renal. Os reflexos barorreceptor e de volume atrial também estimulam a hipófise a secretar o hormônio antidiurético (ADH) que reabsorve maior quantidade de água no néfron distal. Esses mecanismos conservam o volume de sangue, mas não restabelecem o volume sangüíneo normal. A restauração do volume requer ingestão de água que é estimulada por barorreceptores e receptores de volume atrial que atuam no hipotálamo e no centro da sede. A reposição dos líquidos devido à ingestão de água ocorre dentro de dois a três dias. A compensação final inclui a reposição das células sangüíneas e proteínas plasmáticas perdidas (CUNNINGHAM, 2004).

Após 24 horas da segunda flebotomia (24h) iniciou-se a elevação do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do volume globular, sendo mais intenso após 48 horas da segunda flebotomia (48h) com a presença dos reticulócitos, anisocitose e policromasia indicando início da resposta eritropoética observada na

circulação sangüínea periférica (Tabelas 1 e 2; Figura 4). A maior concentração de reticulócitos foi observada 72 horas (72h) após a segunda flebotomia e reduziu posteriormente até 10 dias (10d).

Os ponteados basofílicos foram encontrados em maior concentração 48 horas (48h), 72 horas (72h) e quatro dias (4d), e em pequena quantidade aos cinco dias após a segunda flebotomia (5d).

Os corpúsculos de Howel-Jolly e os eritroblastos foram observados em pequena quantidade 24 horas (24h), 48 horas (48h) e 72 horas (72h) após a segunda flebotomia.

Com a redução do número dos eritrócitos e conseqüente diminuição da oxigenação tecidual e desenvolvimento de hipóxia, há estímulo para a produção de eritropoetina (EPO) sintetizada pelas células adjacentes aos túbulos proximais renais. A EPO é o principal fator de regulação das células progenitoras eritróides e exerce seu efeito sobre as células alvo da medula óssea interagindo com receptores específicos da superfície celular. Na medula óssea a EPO age sobre o compartimento de células progenitoras conhecido como células formadoras de colônia eritróide (CFU-E) multiplicando o número de eritrócitos e promovendo seu desenvolvimento para eritrócitos maduros (ADAMSON, 1996; ERSLEV, 1991).

Em ovinos, a liberação de EPO inicia-se 24 horas após a perda de sangue, alcançando valores máximos ao terceiro e oitavo dia (CHAPEL et al., 2000; VENG-PEDERSEN et al., 2002).

Eritrócitos imaturos e policromasia estão ausentes no sangue periférico de ovinos sadios e a resposta reticulocitária depende da magnitude da perda sangüínea e da idade do animal (JAIN, 1993; FELDMAN et al., 2000). A presença de reticulócitos é observada a partir do terceiro dia da perda de sangue (MEYER; HARVEY, 1998) e de acordo com Winter (1967) o número aumenta rapidamente até cinco dias, desaparecendo 21 dias após a perda de sangue acompanhada por alterações no VCM, HCM, CHCM e número de plaquetas.

A reticulocitose ou policromasia são os melhores indicadores de intensa eritropoese. A resposta regenerativa com policromasia é esperada na anemia por perda aguda de sangue, especialmente em animais jovens (FELDMAN et al., 2000).

A magnitude da resposta reticulocitária em ruminantes é menor que em cães e gatos. Portanto a presença de alguns reticulócitos é suficiente para evidenciar resposta regenerativa nesta espécie (FELDMAN et al., 2000).

A presença de anisocitose, policromasia e ponteados basofílicos em animais anêmicos indicam aumento na porcentagem de reticulócitos e intensa resposta regenerativa medular (MEYER; HARVEY, 1998; FELDMAN et al., 2000).

O VCM e o DDE devem ser avaliados em conjunto, pois refletem alterações na população eritrocitária. O VCM avalia o diâmetro dos eritrócitos e o DDE o grau de variação do diâmetro dos eritrócitos. Para que o DDE se altere é necessária uma quantidade considerável de eritrócitos grandes. O VCM alterou-se primeiramente aos quatro dias (4d) em relação ao DDE, seis dias (6d), porém, o VCM permaneceu dentro dos valores de referência citados por Feldman et al. (2000) durante todo o experimento.

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) avaliação da anisocitose e policromasia em esfregaços sangüíneos corados e graduados por escore, volume globular (VG) e contagem de reticulócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Momentos	Anisocitose	Policromasia	VG (%)	Reticulócitos $\times 10^6/\mu\text{L}$
Antes F1	0,00 ^f $\pm$ 0,00	0,00 ^c $\pm$ 0,00	33,79 ^a $\pm$ 3,01	0,002 ^c $\pm$ 0,004
6hF1	0,00 ^f $\pm$ 0,00	0,00 ^c $\pm$ 0,00	21,30 ^{def} $\pm$ 2,90	0,003 ^c $\pm$ 0,008
12hF1+F2	0,00 ^f $\pm$ 0,00	0,00 ^c $\pm$ 0,00	21,25 ^{def} $\pm$ 3,41	0,007 ^c $\pm$ 0,012
6h	0,00 ^f $\pm$ 0,00	0,00 ^c $\pm$ 0,00	16,66 ^{gh} $\pm$ 2,31	0,007 ^c $\pm$ 0,018
12h	0,00 ^f $\pm$ 0,00	0,00 ^c $\pm$ 0,00	15,55 ^h $\pm$ 2,17	0,008 ^c $\pm$ 0,008
24h	0,10 ^f $\pm$ 0,32	0,20 ^c $\pm$ 0,42	15,91 ^{gh} $\pm$ 2,80	0,020 ^c $\pm$ 0,054
48h	1,00 ^{bc} $\pm$ 0,67	1,00 ^b $\pm$ 0,67	17,47 ^g $\pm$ 2,27	0,077 ^b $\pm$ 0,050
72h	1,70 ^a $\pm$ 0,48	1,70 ^a $\pm$ 0,48	19,60 ^f $\pm$ 2,30	0,166 ^a $\pm$ 0,063
4d	1,80 ^a $\pm$ 0,42	1,80 ^a $\pm$ 0,42	20,76 ^{ef} $\pm$ 2,00	0,152 ^a $\pm$ 0,107
5d	1,80 ^a $\pm$ 0,42	1,80 ^a $\pm$ 0,42	22,44 ^{de} $\pm$ 1,66	0,065 ^b $\pm$ 0,053
6d	1,00 ^{bc} $\pm$ 0,67	0,80 ^b $\pm$ 0,79	22,63 ^d $\pm$ 1,67	0,049 ^{bc} $\pm$ 0,052
10d	0,50 ^{de} $\pm$ 0,53	0,00 ^c $\pm$ 0,00	27,26 ^c $\pm$ 1,97	0,005 ^c $\pm$ 0,006
14d	0,70 ^{cd} $\pm$ 0,48	0,00 ^c $\pm$ 0,00	30,10 ^b $\pm$ 1,75	0,000 ^c $\pm$ 0,000
21d	0,20 ^{ef} $\pm$ 0,42	0,00 ^c $\pm$ 0,00	33,04 ^a $\pm$ 1,89	0,000 ^c $\pm$ 0,000
28d	0,00 ^f $\pm$ 0,00	0,00 ^c $\pm$ 0,00	32,53 ^a $\pm$ 1,71	0,001 ^c $\pm$ 0,003

^aPara letras iguais não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos.

Graduação por escore sendo: 0 = negativa; 1 = + Leve; 2 = ++ Moderada; 3 = +++ Acentuada;

Nos últimos anos, aumentou o interesse na utilização da análise computadorizada do DDE como auxílio diagnóstico. No homem, esta técnica é de valor na quantificação da anisocitose e tem sido usada para identificar e avaliar o comportamento de várias anemias macrocíticas e microcíticas. Esta tecnologia tem sido cada vez mais utilizada na moderna prática veterinária (WEISSER, 1982; WEISSER; KOCIBA, 1983).

Aos 28 dias após a segunda flebotomia (21d) o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular, VCM, HCM

e proteína plasmática total retornaram aos valores iniciais (Antes F1). Isso difere dos relatos de Meyer; Harvey (1998) em que a concentração de proteína plasmática total retornou mais rapidamente aos valores iniciais, sendo que mais tempo foi requerido para o retorno do volume globular.

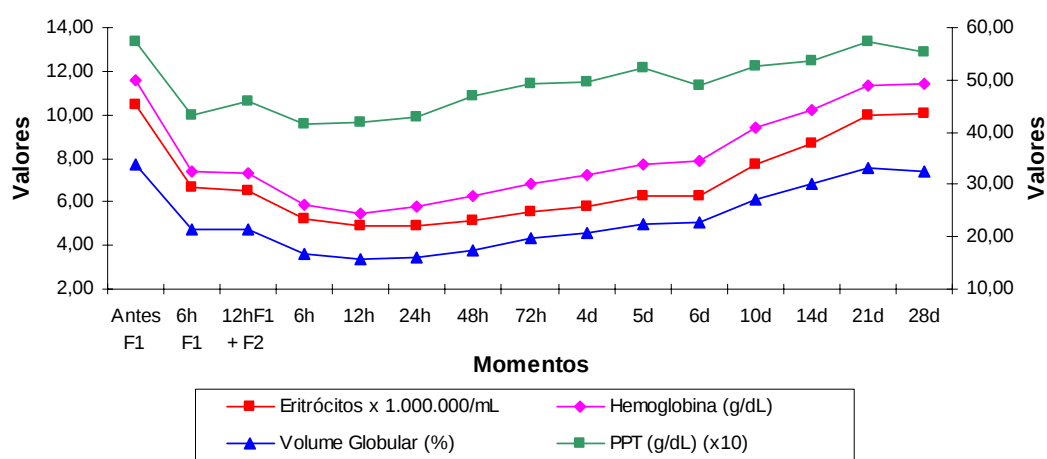


Figura 2 – Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina (g/dL), volume globular (%) e concentração de proteínas plasmáticas totais (g/dL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

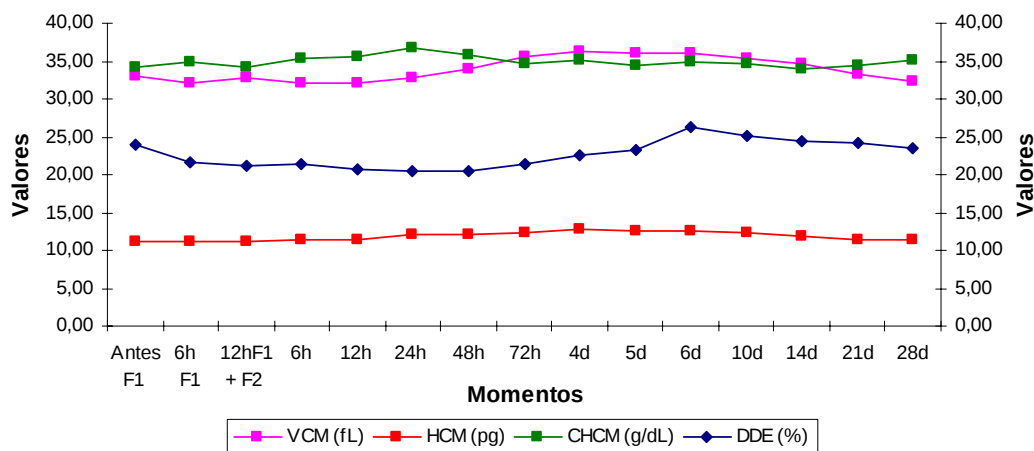


Figura 3 – Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL), distribuição do diâmetro dos eritrócitos (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

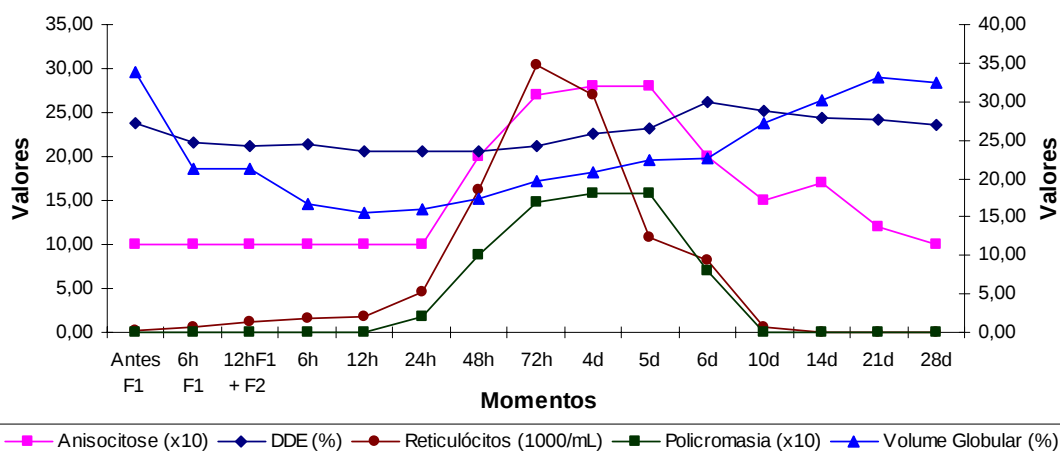


Figura 4 – Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) da avaliação da anisocitose, distribuição do diâmetro dos eritrócitos (%), número absoluto de reticulócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), policromasia e volume globular (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

5.3.2. Plaquetas, volume plaquetário (VP), volume plaquetário médio (VPM) e distribuição do diâmetro das plaquetas (DDP)

A retirada de 30% seguida por 20% do volume sangüíneo total com intervalo de 12 horas foi suficiente para determinar trombocitopenia (Tabela 3 e Figuras 5 e 6) devido à hemodiluição, de acordo com os valores de referência de Feldman et al. (2000). Após 24 horas da segunda flebotomia (24h) o número de plaquetas aumentou, porém, aos 28 dias após a segunda flebotomia (28d) não havia retornado aos valores observados inicialmente (Antes F1).

As variações mais importantes observadas durante o experimento incluíram a contagem total do número de plaquetas e o volume plaquetário. O VPM e o DDP se alteraram significativamente ao longo do experimento, porém sem importância clínica.

Depois dos eritrócitos as plaquetas são as mais numerosas células circulantes no sangue, sendo essenciais para a coagulação, manutenção da integridade e controle da hemostasia. Essas pequenas células anucleadas originam-se da fragmentação do citoplasma de megacariócitos maduros presentes na medula óssea. Os maiores fatores responsáveis pela regulação da megacariocitopoese e trombocitopoese incluem o fator estimulador de colônia megacariocítica (MK-CSF), fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), interleucina-3, interleucina-6, interleucina-1, eritropoetina e trombopoetina. Trombocitopenia leve a moderada pode ocorrer após a perda aguda de sangue, sendo reversível sem necessidade de tratamento (MEYER; HARVEY, 1998; FELDMAN et al., 2000).

A utilização de contadores automáticos de células proporcionou a obtenção de valores plaquetários específicos que incluem o volume plaquetário (VP), volume plaquetário médio (VPM) e a distribuição do diâmetro das plaquetas (DDP).

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), volume plaquetário (%), volume plaquetário médio (fL) e distribuição do diâmetro das plaquetas (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Momentos	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	VP (%)	VPM (fL)	DDP (%)
Antes F1	1255,60 ^a $\pm$ 298,52	0,57 ^a $\pm$ 0,14	4,76 ^a $\pm$ 0,40	19,3 ^a $\pm$ 1,15
6hF1	701,70 ^{ef} $\pm$ 177,27	0,29 ^{cd} $\pm$ 0,07	4,15 ^b $\pm$ 0,35	17,2 ^c $\pm$ 0,73
12hF1+F2	689,60 ^{ef} $\pm$ 182,04	0,28 ^{cd} $\pm$ 0,08	4,05 ^b $\pm$ 0,34	16,8 ^c $\pm$ 0,66
6h	561,30 ^g $\pm$ 155,67	0,23 ^d $\pm$ 0,06	4,03 ^b $\pm$ 0,41	17,1 ^c $\pm$ 0,78
12h	555,30 ^g $\pm$ 153,88	0,24 ^d $\pm$ 0,06	4,26 ^b $\pm$ 0,44	16,8 ^c $\pm$ 0,47
24h	599,20 ^{fg} $\pm$ 123,45	0,25 ^{cd} $\pm$ 0,05	4,19 ^b $\pm$ 0,48	17,0 ^c $\pm$ 0,49
48h	766,20 ^e $\pm$ 186,47	0,31 ^c $\pm$ 0,06	4,12 ^b $\pm$ 0,37	17,1 ^c $\pm$ 0,61
72h	925,10 ^{cd} $\pm$ 217,12	0,39 ^b $\pm$ 0,08	4,25 ^b $\pm$ 0,42	17,2 ^c $\pm$ 0,54
4d	1022,20 ^{bcd} $\pm$ 202,99	0,43 ^b $\pm$ 0,09	4,22 ^b $\pm$ 0,45	17,5 ^c $\pm$ 0,72
5d	1073,20 ^b $\pm$ 207,50	0,44 ^b $\pm$ 0,10	4,11 ^b $\pm$ 0,44	17,3 ^c $\pm$ 0,59
6d	1058,50 ^{bc} $\pm$ 212,53	0,43 ^b $\pm$ 0,09	4,07 ^b $\pm$ 0,34	17,3 ^c $\pm$ 0,61
10d	1045,90 ^{bc} $\pm$ 271,49	0,42 ^b $\pm$ 0,12	4,05 ^b $\pm$ 0,32	17,6 ^c $\pm$ 0,81
14d	941,50 ^{bcd} $\pm$ 170,56	0,39 ^b $\pm$ 0,08	4,09 ^b $\pm$ 0,38	18,3 ^b $\pm$ 1,14
21d	1008,00 ^{bcd} $\pm$ 243,39	0,43 ^b $\pm$ 0,12	4,07 ^b $\pm$ 0,39	19,1 ^{ab} $\pm$ 1,47
28d	888,80 ^d $\pm$ 182,52	0,40 ^b $\pm$ 0,09	4,21 ^b $\pm$ 0,29	19,0 ^{ab} $\pm$ 1,18

^aPara letras iguais não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos.

O volume plaquetário é mensurado pelos analisadores hematológicos eletrônicos e representa a porcentagem do volume de sangue ocupado pelas plaquetas (STOCKHAM; SCOTT, 2002).

O volume plaquetário médio (VPM) é a estimativa do tamanho das plaquetas (fL) realizada pelo contador eletrônico de células e pode ser uma informação útil em animais trombocitopênicos. O aumento do VPM sugere aumento da trombopoese (STOCKHAM; SCOTT, 2002).

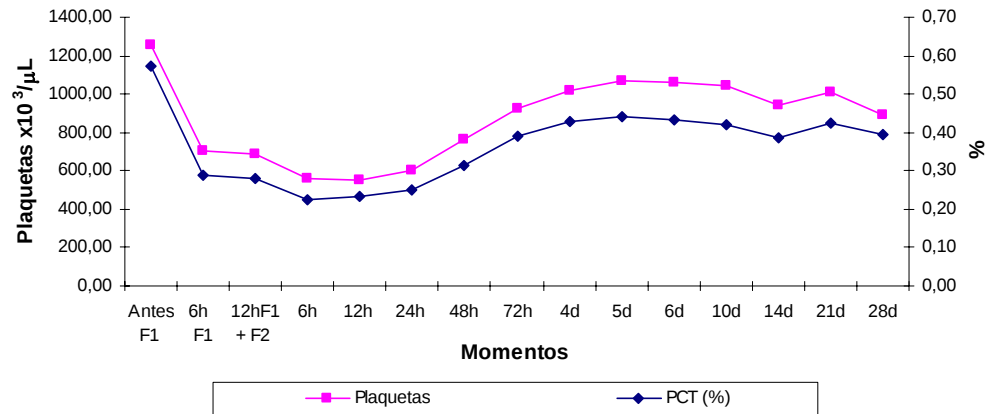


Figura 5 – Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e volume plaquetário (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

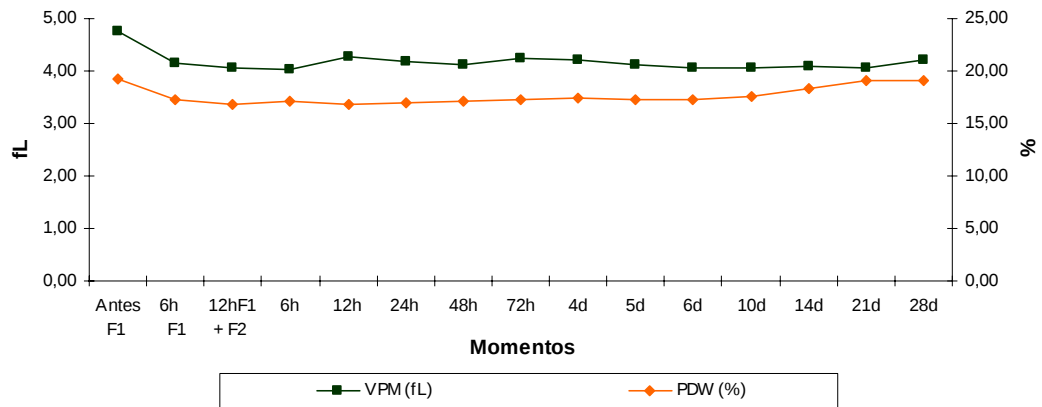


Figura 6 – Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do volume plaquetário médio (fL) e distribuição do diâmetro das plaquetas (%) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

O PDW representa o índice de variação do tamanho das plaquetas (MEYER; HARVEY, 1998; FELDMAN et al., 2000; STOCKHAM; SCOTT, 2002; LATIMER et al., 2003).

De acordo com Winter (1967) o número de plaquetas no sangue periférico elevou-se após quatro a cinco dias seguidos ao início da perda sangüínea e retornou aos valores iniciais após 31 dias.

As alterações no número de plaquetas e no volume plaquetário estão relacionadas, da mesma maneira descrita para os eritrócitos, com a hemodiluição causada pela reposição da volemia após a retirada de sangue. A resposta medular com aumento na produção de plaquetas foi evidente após 48 horas da segunda flebotomia (48h) diferindo dos observados por Winter (1967).

5.3.3. Leucograma

A perda aguda de sangue determinada pela flebotomia promoveu alterações na concentração de cortisol e no número total de leucócitos, neutrófilos segmentados, monócitos e eosinófilos (Tabela 4 e Figuras 7, 8 e 9). Seis horas (6h) e 12 horas após a primeira flebotomia (12h) e seis horas após a segunda flebotomia (6h) observou-se o aumento nas concentrações de cortisol.

As maiores concentrações de cortisol coincidiram com as elevações do número total de leucócitos, neutrófilos e monócitos, com a inversão da relação neutrófilo:linfócito e com a redução dos eosinófilos. Porém, durante todo o experimento os valores do leucograma permaneceram dentro do intervalo de referência citados por Feldman et al. (2000).

A anemia causa estímulo ao sistema nervoso central (SNC) iniciando a resposta neuroendócrina, mantendo a perfusão sangüínea no coração e no cérebro e diminuindo em outros tecidos. O rim e as glândulas adrenais são os primeiros órgãos a responderem às alterações neuroendócrinas com a produção de renina, angiotensina, aldosterona, vasopressina, hormônio do crescimento, glucagon, cortisol, eritropoetina e catecolaminas (DUTTON, 2003).

A excitação produz liberação de epinefrina induzindo leucocitose fisiológica caracterizada por neutrofilia, aumento de linfócitos e monócitos e redução de eosinófilos (FELDMAN et al., 2000).

Sob condições de estresse, há liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula pituitária anterior o qual estimula o córtex adrenal a aumentar a síntese e a secreção de cortisol, elevando a concentração sérica (ROTH; KAEBERLE, 1982).

A dosagem de cortisol em amostras colhidas antes, durante e após um período de estresse em grandes animais, de maneira geral, pode fornecer importantes informações sobre a magnitude dessa condição (STOTT, 1981).

Alterações relacionadas ao estresse em ruminantes incluem leucocitose, neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose (FELDMAN et al., 2000).

De acordo com Howard et al. (1998) três horas após a perda aguda de sangue houve elevação do número de leucócitos e inversão da relação neutrófilo:linfócito. Após três dias a relação neutrófilo:linfócito retornou aos valores iniciais.

Diferentemente de Howard et al. (1998), após 24 horas da segunda flebotomia o leucograma, a relação neutrófilo:linfócito e a concentração de cortisol retornaram aos valores observados no início do experimento indicando o término do período de estresse causado pela perda aguda de sangue.

As observações deste experimento estão de acordo com a ação da alta concentração de cortisol sobre a medula óssea e sobre os neutrófilos presentes na circulação sangüínea. Na medula óssea, o cortisol tem o efeito de promover a liberação dos neutrófilos segmentados do compartimento de estocagem, determinando elevação dos leucócitos circulantes. Nos leucócitos presentes na circulação periférica, o cortisol diminui a expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos, reduzindo sua ligação com as células endoteliais. Com isso, ocorre diminuição do número de neutrófilos do compartimento marginal e aumento no compartimento circulante (MADDUX; KEETON, 1987).

Segundo Roth; Kaeberle (1982) os glicocorticóides têm efeito incerto na cinética dos monócitos bovinos induzindo monocitose ou não produzindo alterações.

Tabela 4 – Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm s$) da concentração sérica de cortisol (ng/mL), do número total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$), linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e relação neutrófilo linfócito (N:L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Momentos	Cortisol					Leucograma $\times 10^3/\mu\text{L}$					Relação	
	(ng/mL)	Leucócitos	N. Segtos.	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	N:L				
Antes F1	21,76 ^{bc} $\pm 10,95$	5,68 ^{ef} $\pm 1,70$	1,88 ^{def} $\pm 0,82$	3,69 ^a $\pm 1,31$	0,03 ^c $\pm 0,01$	0,07 ^{bc} $\pm 0,05$	0,01 ^c $\pm 0,01$	0,54 ^{cde} $\pm 0,22$				
6hF1	23,26 ^b $\pm 11,83$	7,47 ^{bcd} $\pm 2,44$	3,77 ^b $\pm 1,37$	3,63 ^a $\pm 1,81$	0,05 ^{bc} $\pm 0,02$	0,02 ^f $\pm 0,02$	0,01 ^c $\pm 0,01$	1,21 ^b $\pm 0,54$				
12hF1+F2	38,65 ^a $\pm 19,82$	7,86 ^{abc} $\pm 2,20$	3,09 ^c $\pm 1,55$	4,59 ^a $\pm 1,89$	0,11 ^{abc} $\pm 0,10$	0,04 ^{def} $\pm 0,02$	0,03 ^{abc} $\pm 0,01$	0,78 ^c $\pm 0,53$				
6h	37,93 ^a $\pm 26,66$	8,70 ^a $\pm 2,73$	4,99 ^a $\pm 1,37$	3,49 ^a $\pm 1,49$	0,16 ^a $\pm 0,11$	0,02 ^f $\pm 0,01$	0,04 ^{ab} $\pm 0,02$	1,59 ^a $\pm 0,50$				
12h	21,98 ^{bc} $\pm 11,13$	8,13 ^{ab} $\pm 2,18$	4,18 ^b $\pm 1,66$	3,73 ^a $\pm 1,33$	0,16 ^a $\pm 0,12$	0,03 ^{def} $\pm 0,02$	0,03 ^{bc} $\pm 0,02$	1,22 ^b $\pm 0,51$				
24h	22,45 ^{bc} $\pm 12,26$	6,71 ^{cdef} $\pm 2,37$	2,51 ^{cd} $\pm 1,68$	3,93 ^a $\pm 1,10$	0,19 ^a $\pm 0,08$	0,05 ^{cde} $\pm 0,03$	0,03 ^{abc} $\pm 0,02$	0,64 ^{cd} $\pm 0,32$				
48h	16,71 ^{bc} $\pm 8,84$	7,03 ^{bode} $\pm 1,73$	2,14 ^{def} $\pm 0,67$	4,59 ^a $\pm 1,27$	0,17 ^a $\pm 0,14$	0,07 ^{bcd} $\pm 0,04$	0,06 ^a $\pm 0,06$	0,49 ^{cde} $\pm 0,16$				
72h	14,51 ^{bc} $\pm 10,63$	5,72 ^{ef} $\pm 1,69$	1,48 ^{ef} $\pm 0,55$	4,08 ^a $\pm 1,28$	0,09 ^{abc} $\pm 0,08$	0,05 ^{cde} $\pm 0,03$	0,03 ^{bc} $\pm 0,02$	0,37 ^{de} $\pm 0,12$				
4d	11,58 ^{bc} $\pm 7,49$	5,96 ^{ef} $\pm 1,37$	1,24 ^f $\pm 0,35$	4,55 ^a $\pm 1,10$	0,09 ^{abc} $\pm 0,11$	0,05 ^{cde} $\pm 0,02$	0,03 ^{bc} $\pm 0,03$	0,28 ^e $\pm 0,07$				
5d	10,78 ^{bc} $\pm 11,38$	5,90 ^{ef} $\pm 1,60$	1,33 ^{ef} $\pm 0,57$	4,35 ^a $\pm 1,25$	0,13 ^{abc} $\pm 0,08$	0,06 ^{cd} $\pm 0,04$	0,03 ^{abc} $\pm 0,02$	0,32 ^{de} $\pm 0,16$				
6d	10,54 ^{bc} $\pm 9,30$	6,04 ^{ef} $\pm 1,79$	1,22 ^f $\pm 0,48$	4,57 ^a $\pm 1,56$	0,15 ^{ab} $\pm 0,13$	0,06 ^{cd} $\pm 0,03$	0,05 ^{ab} $\pm 0,03$	0,28 ^e $\pm 0,10$				
10d	7,48 ^c $\pm 9,80$	5,47 ^{ef} $\pm 1,13$	1,38 ^{ef} $\pm 0,79$	3,90 ^a $\pm 0,96$	0,10 ^{abc} $\pm 0,06$	0,07 ^{cd} $\pm 0,03$	0,03 ^{abc} $\pm 0,02$	0,38 ^{de} $\pm 0,25$				
14d	12,02 ^{bc} $\pm 9,83$	5,71 ^{ef} $\pm 1,28$	1,56 ^{ef} $\pm 0,72$	3,96 ^a $\pm 1,08$	0,09 ^{abc} $\pm 0,06$	0,06 ^{cd} $\pm 0,04$	0,03 ^{bc} $\pm 0,02$	0,42 ^{de} $\pm 0,25$				
21d	13,36 ^{bc} $\pm 11,08$	6,41 ^{def} $\pm 1,49$	1,74 ^{def} $\pm 0,69$	4,47 ^a $\pm 1,24$	0,08 ^{abc} $\pm 0,13$	0,10 ^a $\pm 0,05$	0,02 ^{bc} $\pm 0,01$	0,41 ^{de} $\pm 0,20$				
28d	14,13 ^{bc} $\pm 13,70$	6,79 ^{cdef} $\pm 1,49$	2,17 ^{de} $\pm 1,13$	4,08 ^a $\pm 1,21$	0,11 ^{abc} $\pm 0,08$	0,09 ^{ab} $\pm 0,04$	0,04 ^{ab} $\pm 0,04$	0,56 ^{cde} $\pm 0,30$				

^aPara letras iguais não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos.

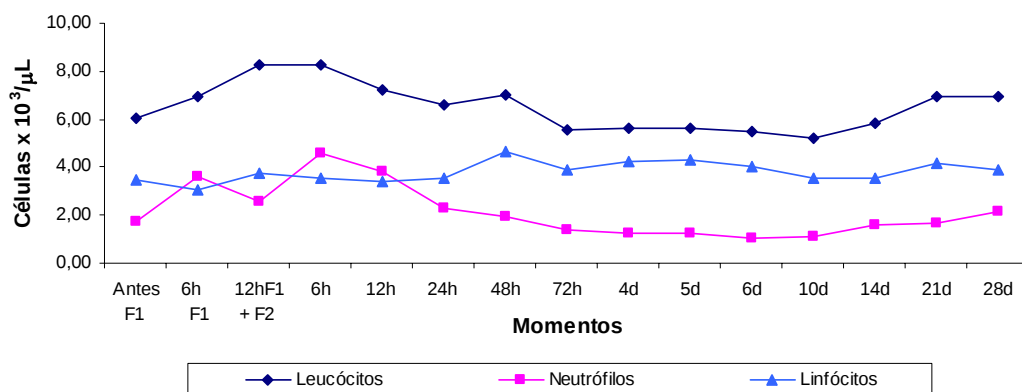


Figura 7 – Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

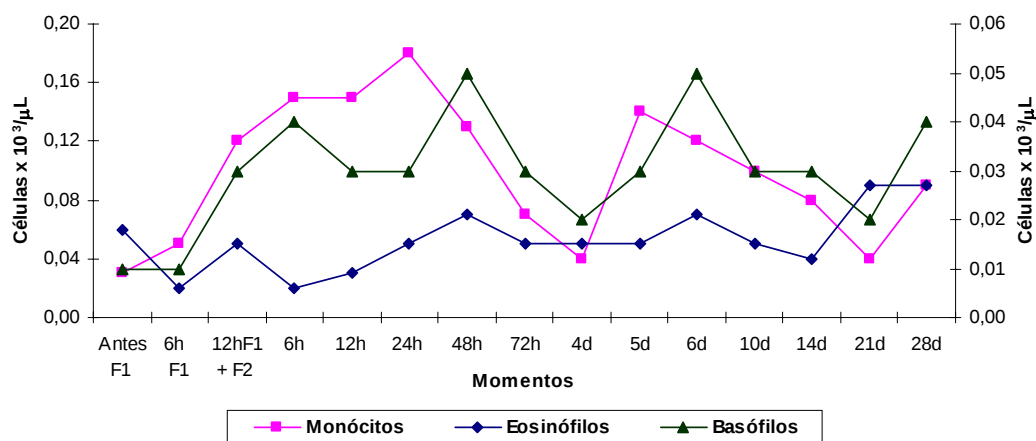


Figura 8 – Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) do número total de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

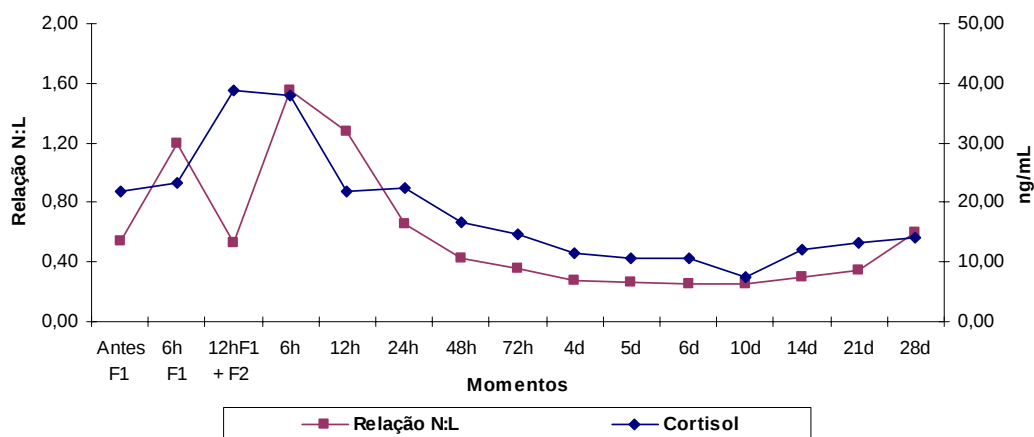


Figura 9 – Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) da relação neutrófilo:linfócito e da concentração sérica de cortisol (ng/mL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Segundo Feldman et al. (2000) o cortisol induz redução no número de eosinófilos sangüíneos pela inibição da eosinopoeise na medula óssea e/ou migração destas células para outros tecidos (baço e linfonodos).

Essas informações são importantes porque durante 24 horas após a perda aguda de sangue o leucograma pode estar alterado devido à influencia do cortisol.

5.4. Estresse oxidativo e lipoperoxidação

A realização de duas flebotomias com retirada de 30% e 20% do volume sangüíneo com intervalo de 12 horas não foram capazes de determinar alterações significativas ($p < 0,05$) na produção de MDA (Tabela 5). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o NO em alguns momentos durante o experimento, sendo os menores valores observados entre 48h (48h) e cinco dias (5d) após a segunda flebotomia.

Os resultados diferiram dos relatados por Sarada et al. (2002) e Stenvinkel (2003) onde a anemia foi associada ao aumento das concentrações plasmáticas de biomarcadores de lipoperoxidação como o malondialdeído (MDA) plasmático devido à ação dos radicais livres.

Durante o período de indução da anemia houve aumento da concentração de TBARS concomitante à diminuição do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular (Tabela 5 e Figuras 10 e 11). Observou-se correlação negativa ($r = -0,59$) entre as TBARS e o volume globular indicando que houve estresse oxidativo e lipoperoxidação.

O aumento na produção de radicais livres é controlado pelo sistema antioxidante eritrocitário, representado pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Os eritrócitos representam o maior componente da capacidade antioxidante do sangue e a diminuição desse sistema antioxidante enzimático na anemia pode levar ao estresse oxidativo e lipoperoxidação (COSTAGIOLA et al., 1989; GRUNE et al., 2000; LUDAT et al., 2000; STENVINKEL, 2003).

Porém, neste experimento a concentração de MDA não se alterou, indicando que outro fator que não o MDA pode ter aumentado as concentrações séricas das TBARS.

A resposta a essa possível alteração é que o teste de reação ao ácido tiobarbitúrico é amplamente utilizado para determinar o índice de lipoperoxidação através da mensuração do MDA. Porém, as TBARS não avaliam o MDA livre (MEAGHER; FITZGERALD, 1999). O

ácido tiobarbitúrico reage com uma variedade de compostos incluindo ácido siálico, prostaglandinas, desoxirribose e certos aldeídos produzindo interferência nos resultados (HONG et al., 2000b).

Apesar das interferências analíticas, o teste das TBARS tem mostrado grande utilidade e não difere da dosagem do MDA pelo método do HPLC na determinação da lipoperoxidação em fluidos corporais (STRADAIOLI; MAGISTRINI, 2002).

Neste experimento o NO pode ter demonstrado seu efeito antioxidante nos momentos em que sua concentração sérica atingiu os menores valores concomitantes à elevação da concentração das TBARS.

A molécula de óxido nítrico tem papel regulador de várias funções biológicas. Induz vasodilatação, liberação de renina, regula a adesão plaquetária, está envolvida no remodelamento vascular, atua como neurotransmissor, mediador do crescimento celular e apoptose, e possui atividade antitumoral e antimicrobiana (MONCADA et al., 1991; POSTOVIT et al., 2005).

Além dessas funções, pode ser considerado um radical livre capaz de interagir com produtos intermediários do oxigênio e causar lesões em moléculas ou possuir atividade antioxidante, protegendo contra os ataques das ERO. A sua propriedade pró-oxidante ou antioxidante dependerá de onde e quando ele for formado (WINK et al., 1995; ERDOGAN et al., 2002; ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

Embora existam resultados conflitantes, evidências indicam que o NO pode conferir efeito pró-oxidante e antioxidante sobre a lipoperoxidação. O papel do NO na lipoperoxidação depende de um delicado equilíbrio de efeitos que podem alterar subitamente as concentrações e a taxa de produção de NO.

Tabela 5 – Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm s$) da concentração sérica de cortisol (ng/mL), volume globular (%), óxido nítrico (nmol/L), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/mL), malondialdeído (nmol/L) e lactato (nmol/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Momentos	Cortisol (ng/mL)	VG (%)	NO (nmol/L)	Lipoperoxidação		Lactato (nmol/L)
				TBARS (nmol/mL)	MDA (nmol/L)	
Antes F1	21,76 ^{bc} ±10,95	33,79 ^a ±3,01	1,95 ^b ±1,45	33,40 ^{cde} ±10,65	0,18 ^a ±0,04	4,71 ^a ±1,13
6hF1	23,26 ^b ±11,83	21,30 ^{def} ±2,90	1,13 ^{bc} ±1,99	34,64 ^{cd} ±2,57	0,13 ^a ±0,04	4,16 ^{ab} ±0,71
12hF1+F2	38,65 ^a ±19,82	21,25 ^{def} ±3,41	0,49 ^{bc} ±0,68	33,97 ^{cde} ±3,40	0,12 ^a ±0,02	3,74 ^{bc} ±1,50
6h	37,93 ^a ±26,66	16,66 ^{gh} ±2,31	1,66 ^{bc} ±1,26	36,35 ^{bc} ±4,66	0,10 ^a ±0,03	2,81 ^{cde} ±0,65
12h	21,98 ^{bc} ±11,13	15,55 ^h ±2,17	0,99 ^{bc} ±1,30	43,30 ^a ±3,93	0,11 ^a ±0,02	2,70 ^{de} ±0,58
24h	22,45 ^{bc} ±12,26	15,91 ^{gh} ±2,80	0,43 ^{bc} ±0,83	39,48 ^b ±4,41	0,11 ^a ±0,02	2,32 ^e ±0,69
48h	16,71 ^{bc} ±8,84	17,47 ^g ±2,27	0,16 ^c ±0,52	36,45 ^{bc} ±5,20	0,12 ^a ±0,03	2,25 ^e ±0,45
72h	14,51 ^{bc} ±10,63	19,60 ^f ±2,30	0,18 ^c ±0,42	29,79 ^{def} ±3,77	0,13 ^a ±0,02	2,85 ^{cde} ±1,18
4d	11,58 ^{bc} ±7,49	20,76 ^{ef} ±2,00	0,10 ^c ±0,31	29,00 ^{ef} ±3,03	0,13 ^a ±0,03	2,44 ^{de} ±0,34
5d	10,78 ^{bc} ±11,38	22,44 ^{de} ±1,66	0,13 ^c ±0,35	32,87 ^{cde} ±5,74	0,16 ^a ±0,02	3,40 ^{bcd} ±1,37
6d	10,54 ^{bc} ±9,30	22,63 ^d ±1,67	0,85 ^{bc} ±1,21	32,78 ^{cde} ±3,40	0,17 ^a ±0,02	2,15 ^e ±0,66
10d	7,48 ^c ±9,80	27,26 ^c ±1,97	0,55 ^{bc} ±0,63	30,94 ^{cdef} ±3,31	0,16 ^a ±0,05	2,35 ^e ±0,95
14d	12,02 ^{bc} ±9,83	30,10 ^b ±1,75	1,76 ^{bc} ±1,76	26,45 ^{fg} ±2,26	0,15 ^a ±0,02	2,11 ^e ±0,52
21d	13,36 ^{bc} ±11,08	33,04 ^a ±1,89	1,23 ^{bc} ±1,05	26,02 ^{fg} ±1,78	0,15 ^a ±0,04	3,13 ^{cde} ±1,23
28d	14,13 ^{bc} ±13,70	32,53 ^a ±1,71	3,52 ^a ±2,53	23,57 ^g ±1,51	0,22 ^a ±0,27	2,86 ^{cde} ±1,03

^aPara letras iguais não há diferença significativa (p<0,05) entre os momentos.

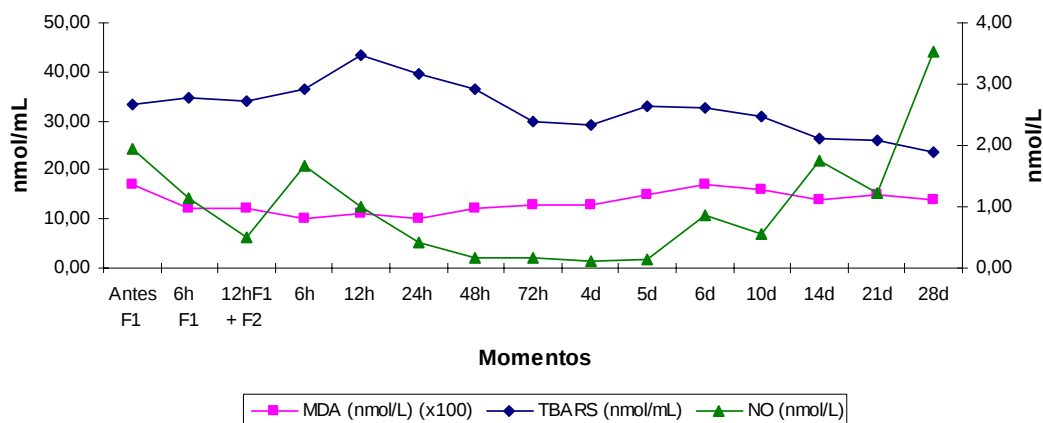


Figura 10 – Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) da concentração sérica de óxido nítrico (nmol/L), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/mL) e malondialdeído (nmol/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

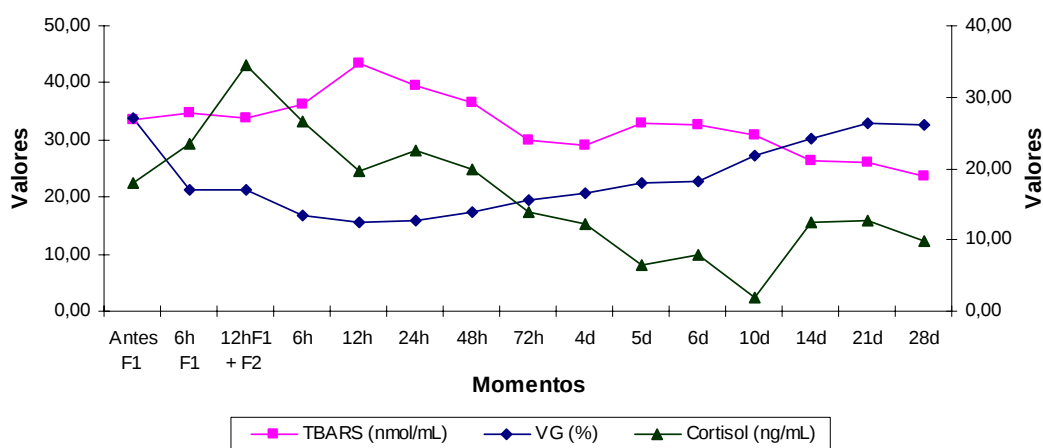


Figura 11 – Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) da concentração sérica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/L), volume globular (%) e concentração de cortisol sérico (ng/mL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Um dos métodos mais comumente usados para o estudo do efeito do NO na lipoperoxidação é das TBARS. O NO pode inibir a formação de TBARS pela decomposição de produtos da peroxidação primária de lipídeos limitando a extensão da lipoperoxidação (WINK et al., 1995; D' ISCHIA et al., 2000).

A hipóxia e a reperfusão determinam aumento na produção de NO. Porém, o aumento das ERO também ocorre em condições de reduzida oxigenação que caracterizam a hipóxia celular. O NO pode estar diminuído devido à sua reação com o ânion superóxido e formação do peróxido nítrico (SUREDA et al., 2004).

Porém, resultados conflitantes têm demonstrado que a hipóxia pode reduzir, elevar ou não alterar as concentrações de NO (HONG et al., 2000).

O lactato sérico é um indicador laboratorial da diminuição da oxigenação e considerado um índice de isquemia apresentando correlação significativa com a liberação de oxigênio tecidual (MOLLER et al., 1996; SCHUBER, 2003). O choque determina acidose intracelular devido ao acúmulo de íons hidrogênio que ocorre durante o metabolismo anaeróbico na conversão de glicose em lactato (MANIKIS et al., 1995; DESJARDINS, 2003; WILSON et al., 2003). A produção de lactato, radicais livres e fatores inflamatórios por células isquêmicas podem causar lesões celulares quando a perfusão é restabelecida (DUTTON, 2003).

Os resultados deste experimento demonstraram que não houve elevação na produção de lactato sérico apesar da diminuição significativa ($p < 0,05$) do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular. Estes diferiram dos de Malikides et al. (2001) que observaram necessidade da perda de 30% do volume sanguíneo em eqüinos para que ocorresse inadequada perfusão tecidual e hipóxia elevando o metabolismo anaeróbico com produção de ácido láctico, redução do pH e alterações no potencial de membrana celular.

5.5. Bioquímica sérica

Os valores da bioquímica sérica tiveram pequena variação entre os obtidos no início do experimento e podem estar relacionados com a hemodiluição decorrente da reposição de líquidos após a retirada de sangue (Tabela 6 e Figuras 12, 13 e 14). Porém, não há relatos sobre a raça ou idade dos animais utilizados para a determinação dos valores de referência utilizando a metodologia da química seca em equipamento automatizado.

A magnitude das variações de uréia e creatinina não indicaram a possibilidade de alteração na função renal em decorrência da anemia durante o experimento. Apesar da concentração de uréia estar acima dos valores citados na literatura para o equipamento utilizado na pesquisa (8,0 – 20,0 mg/dL), a creatinina sérica permaneceu abaixo dos valores de referência de 1,2 - 1,9 mg/dL durante todo o experimento (Ortho-Clinical Diagnostics, 1989).

Segundo Scalea (2003) a função tubular renal é afetada quando há perda de 20% do volume sangüíneo. Porém, humanos jovens compensam a perda de 40-50% do volume sangüíneo, enquanto os mais velhos são mais susceptíveis a desenvolver insuficiência cardiovascular e hipotensão.

Os resultados da atividade enzimática sérica da AST e da GGT não evidenciaram qualquer alteração decorrente da anemia em nenhum dos animais do experimento. Apesar da atividade estar acima dos valores citados na literatura para o equipamento utilizado na pesquisa (AST 40-96 UI/L e GGT 33-55 UI/L) eles apresentaram pequena variação entre os obtidos no início do experimento (Ortho-Clinical Diagnostics, 1989).

Tabela 6 – Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm s$) da concentração e uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL), atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), creatinofosfoquinase (U/L) e lactato desidrogenase (U/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6hF1) e 12h após a primeira flebotomia (12hF1+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

Momentos	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (U/L)	GGT (U/L)	CK (U/L)	LDH (U/L)
Antes F1	46,98 ^{ab} ±5,10	0,81 ^{abcd} ±0,10	129,10 ^{ab} ±24,34	120,10 ^{ab} ±17,65	92,60 ^{bc} ±18,49	901,60 ^{abc} ±242,13
6hF1	44,66 ^{ab} ±4,19	0,78 ^{abcd} ±0,10	120,60 ^{bc} ±19,34	97,90 ^{efg} ±12,72	261,30 ^a ±229,49	744,40 ^{cde} ±272,82
12hF1+F2	38,08 ^{bcd} ±5,08	0,74 ^d ±0,12	139,40 ^a ±22,22	104,40 ^{de} ±12,79	166,80 ^{bc} ±137,35	920,40 ^{ab} ±305,13
6h	35,85 ^{cde} ±10,78	0,78 ^{bcd} ±0,10	133,00 ^{ab} ±18,09	93,30 ^{fg} ±10,54	178,30 ^b ±124,38	537,30 ^e ±216,90
12h	31,19 ^{de} ±11,64	0,77 ^{bcd} ±0,12	130,70 ^{ab} ±17,20	91,00 ^g ±10,88	109,00 ^{bc} ±56,82	729,90 ^{cde} ±161,54
24h	49,59 ^a ±9,86	0,85 ^a ±0,12	110,60 ^{cd} ±13,71	100,30 ^{def} ±11,01	61,70 ^c ±12,88	691,90 ^{de} ±184,57
48h	44,44 ^{ab} ±10,16	0,81 ^{abcd} ±0,13	99,10 ^d ±12,37	102,00 ^{de} ±10,47	62,20 ^c ±19,38	725,60 ^{cde} ±200,74
72h	44,93 ^{ab} ±6,57	0,85 ^a ±0,11	96,00 ^d ±11,02	108,40 ^{cd} ±12,38	73,30 ^b ±17,28	697,30 ^{de} ±212,68
4d	29,65 ^e ±5,85	0,83 ^{abc} ±0,11	102,80 ^d ±14,64	114,80 ^{bc} ±13,54	81,40 ^b ±15,26	597,30 ^{de} ±130,05
5d	40,14 ^{bc} ±7,26	0,80 ^{abcd} ±0,11	108,20 ^d ±18,88	119,80 ^{ab} ±16,24	83,80 ^{bc} ±20,90	628,30 ^{de} ±159,69
6d	35,56 ^{cde} ±6,04	0,79 ^{abcd} ±0,11	104,80 ^d ±18,33	118,50 ^{ab} ±17,99	76,70 ^{bc} ±9,23	592,60 ^{de} ±172,206
10d	46,20 ^{ab} ±6,75	0,79 ^{abcd} ±0,05	107,30 ^d ±14,42	127,00 ^a ±15,80	103,60 ^{bc} ±39,02	673,10 ^{de} ±181,48
14d	50,16 ^a ±6,63	0,83 ^{ab} ±0,07	121,50 ^{bc} ±21,83	124,10 ^{ab} ±21,96	78,80 ^{bc} ±17,80	775,40 ^{ab} ±227,89
21d	46,06 ^{ab} ±7,39	0,80 ^{abcd} ±0,11	133,00 ^{ab} ±24,09	121,90 ^{ab} ±17,76	75,90 ^{bc} ±13,98	1069,50 ^a ±199,49
28d	49,47 ^a ±7,40	0,76 ^{cd} ±0,09	126,40 ^{ab} ±17,93	116,00 ^{bc} ±19,28	101,90 ^{bc} ±96,46	972,60 ^a ±154,87

^aPara letras iguais não há diferença significativa (p<0,05) entre os momentos.

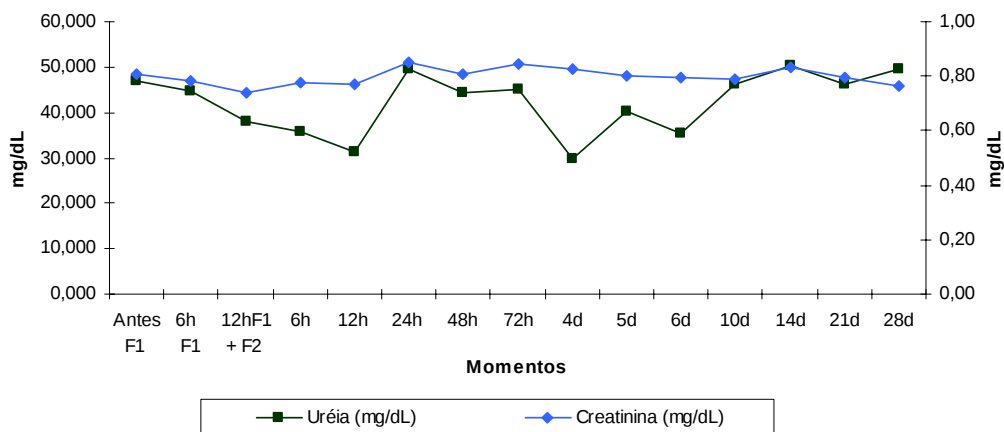


Figura 12 – Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) da concentração de uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

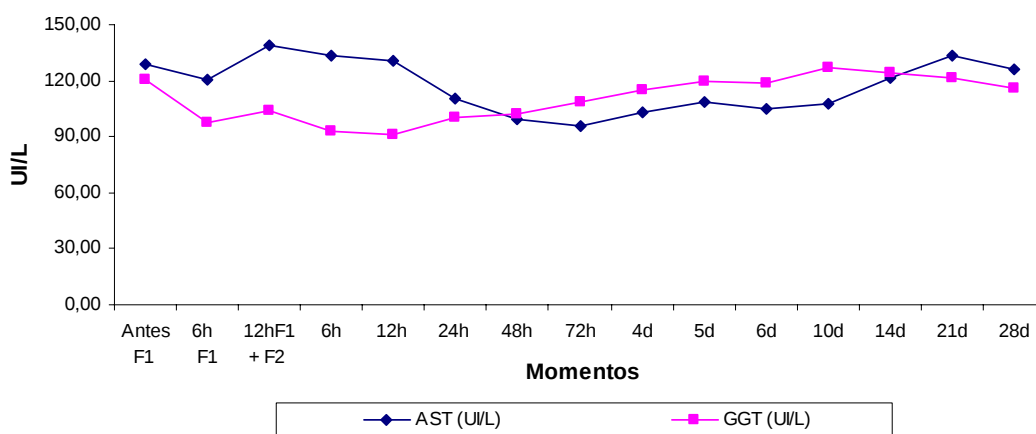


Figura 13 – Gráfico representativo dos valores médios ($\bar{x}$) da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

O fígado é um órgão que possui uma microcirculação complexa e sofre lesão de reperfusão no choque. As células hepáticas são metabolicamente ativas e contribuem substancialmente para a resposta inflamatória no choque descompensado. Células isquêmicas produzem lactato, radicais livres e fatores de inflamação que não são retirados pela circulação sanguínea, podendo causar lesão celular direta (DUTTON, 2003).

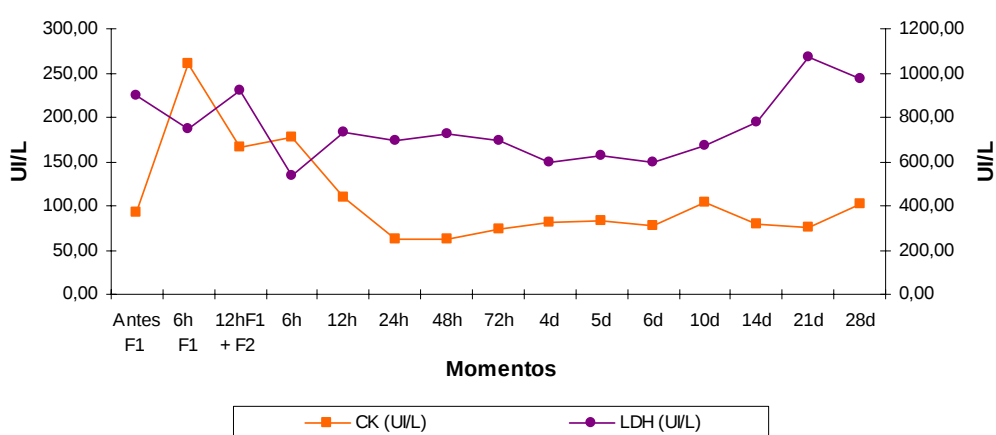


Figura 14 – Gráfico demonstrativo dos valores médios ($\bar{x}$) da atividade enzimática da creatinofosfoquinase (U/L) e lactato desidrogenase (U/L) de ovinos mestiços Texel, imediatamente antes da flebotomia (Antes F1), 6h (6h) e 12h após a primeira flebotomia (12h+F2), 6h (6h), 12h (12h), 24h (24h), 48h (48h), 72h (72h), 4 dias (4d), 5 dias (5d), 6 dias (6d), 10 dias (10d), 14 dias (14d), 21 dias (21d) e 28 dias (28d) após a segunda flebotomia.

A alteração bioquímica mais importante está relacionada ao aumento da atividade da CK seis horas após a primeira flebotomia (6hF1) e pode ser decorrente do maior período de decúbito esternal apresentado pelos animais após a retirada de sangue. Porém, não foi observado decúbito permanente nos ovinos durante todo o experimento. A vida-média da CK é cerca de quatro horas e sua redução indica que o estímulo não se manteve. Isso pode ser evidenciado pelo retorno dos valores aos observados no início do experimento 12 horas após a

segunda flebotomia (12h). A creatinofosfoquinase esteve em alguns momentos durante o experimento acima dos valores de referência de 8 - 100UI/L.

Os valores de LDH estiveram acima dos valores de referência (504-1049 UI/L) somente 21 dias após a segunda flebotomia (21d) (Ortho-Clinical Diagnostics, 1989).

A grande massa muscular esquelética tem importância na geração de radicais livres e de lactato pelas células isquêmicas, porém não é metabolicamente ativa durante o choque e tolera a isquemia melhor que outros órgãos (DUTTON, 2003).

CONCLUSÕES

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos mediante a metodologia aplicada a este experimento, chegou-se às seguintes conclusões:

1. A retirada de 30% e 20% do volume sangüíneo total com intervalo de 12 horas foi capaz de produzir anemia, trombocitopenia e diminuir a concentração de proteína total plasmática em ovinos devido à hemodiluição 6 e 12 horas após a primeira e a segunda flebotomia;
2. O protocolo de indução de anemia com redução de 50% do volume globular foi capaz de provocar estresse oxidativo em ovinos determinado pelo aumento das TBARS e diminuição do NO;
3. O eritrograma de ovinos sadios submetidos à retirada de 30% e 20% do volume sangüíneo total com intervalo de 12 horas foi restabelecido em 28 dias;
4. A resposta medular a perda de sangue foi evidente na circulação sangüínea 48 horas após a flebotomia com a presença de reticulócitos, anisocitose e policromasia;
5. A retirada de sangue por meio da flebotomia foi capaz de causar estresse caracterizado pelo aumento da concentração de cortisol determinando aumento do número de leucócitos, neutrófilos, relação neutrófilo:linfócito, monócitos e diminuição dos eosinófilos;
6. O leucograma e a concentração de cortisol retornaram aos valores iniciais após 24 horas evidenciando o término do período de estresse;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas*

ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and antioxidant resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.306, p.1-17, 2001.

ADAMSON, J.W. Regulation of red blood cell production. **American Journal Medicine**, v.101, suppl. 2A, p.4S-6S, 1996.

AL-HUNITI, N.H.; WIDNESS, J.A.; SCHMIDT, R.L.; VENG-PEDERSEN, P. Erythropoietin production rate in phlebotomy-induced acute anemia. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v.25, p.389-397, 2004.

ANDRADE JÚNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, n.1, p.60-68, 2005.

ARCHERS, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v.7, p.349-60, 1993.

BIESALSKY, H.K. Free radicals theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**, v.5, p.5-10, 2002.

CERVATO, G.; VIANI, P.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. A fluorescence method for the determination of plasma susceptibility to lipid peroxidation. **Clinical Biochemistry**, v.32, p.171-177, 1999.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NRB 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
Biosis. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

CHAN, A.C.; CHOW, C..K.; CHIU, D. Interaction of Antioxidants and Their Implication in Genetic Anemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, n.3, p.274-282, 1999.

CHAPEL, S.H.; VENG-PEDERSEN, P.; SCHMIDT, R.L.; WIDNESS, J.A. A pharmacodynamic analysis of erythropoietin-stimulated reticulocyte response in phlebotomized sheep. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.295, p.346-351, 2000.

COSTAGIOLA, C.; ROMANO, L.; SORICE, P.; Di BENEDETTO, A. Anemia in chronic renal failure: the possible role of the oxidative state of glutathione. **Nephron**, v.52, p.11-14, 1989.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579p.

CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu: Tipomic, 1997. 263p.

D'ISCHIA, M.; PALUMBO, A.; BUZZO, F. Interaction of nitric oxide with lipid peroxidation products under aerobic conditions: inhibitory effects on the formation of malondialdehyde and related thiobarbituric acid-reactive substances. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.4, n.1, p.4-14, 2000.

DESJARDINS, G. **Management of massive hemorrhage and transfusion on trauma**. Baltimore: The International Trauma Anesthesia and Critical Care Society (ITACCS). 2003. p.34-37.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of stress oxidative. **Progress in Lipid Research**, v.43, p.200-227, 2004.

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

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation on thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology Medicine**, v.15, p.353-363, 1993.

DUTTON, R.P. **Patophysiology of the traumatic shock**. Massive transfusion and control of hemorrhage in the trauma patient. Baltimores: The International Trauma Anesthesia and Critical Care Society (ITACCS). 2003. p.5-7.

ERDOGAN, C.; ÜNLÜÇERÇİ, Y.; TÜRKMEN, A.; KURU, A.; ÇETIN, O.; BEKPMAN, S. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. **Clinica Chimica Acta**, v.322, p.157-161, 2002.

ERSLEV, A.J. Erythropoietin. **New England Journal of Medicine**, v.324, n.19, p.1339-1344, 1991.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2000. 1344p.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BA, G.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.52, p.169-180, 1999.

GRUNE, T.; SOMMERBURG, O.; SIEMENS, W.G. Oxidative stress anemia. **Clinical Nephrology**, v.53, suppl., p.S18-S22, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals in rheumatoid disease. In: HENDERSON, B.; EDWARDS, J.C.W.; PETTIPHER, E.R. **Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis**. London: Academic Press, 1995. p.301-314.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3th. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: HALLIWELL, B. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2th. New York: Oxford University Press, 1989. p.189-276.

HAWKINS, D. L.; MACKAY, R. J.; MACKAY, S. L. D.; MOLDAWER, L. L. Human interleukin 10 suppresses procuction of inflammatory mediator by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, p. 1-10, 1998.

HIMMELFARB, J.; HAKIM R.M. Oxidative stress in uremia. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.12, p.593-598, 2003.

HOLLEY, A.E.; CHEESEMAN, K.H. Mensuração das reações dos radicais livres in vivo. In: OLSZEWER, R. **Radicais livres em Medicina**. Rio de Janeiro: Interlivro Edições, 1996. p.15-26.

HONG, Y.; SUZUKI, S.; YATOH, S.; MIZUTANI, M.; NAKAJIMA, T.; BANNAI, S.; SATO, H.; SOMA, M.; OKUDA, Y.; YAMADA, N. Effect of hipóxia on nitric oxide production and its synthesis gene expression in rat smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.268, p.329-332, 2000.

HONG, Y.L.; YEH, S.L.; CHABG, C.Y.; HU, M.L. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid test and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clinical Biochemistry**, v.33, n.8, p.619-25, 2000b.

HOWARD, D.L.; PEREIRA, L.; SANCHEZ, A.; REINHOLZ NETTO, J.; MADSUURA, T.A.; RAUPP, H. Avaliação do hemograma de ovinos em processo hemorrágico experimental agudo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.5, n.2, p.89-92, 1998.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4.ed. Philadelphia. Lea & Febiger, 1986. 1221p.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid – reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology Medicine**, v.9, p.515-540, 1990.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN, H.; FURST, P. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology Medicine**, v.20, p.251-256, 1996.

JIANG, J.P.; DOWNING, S.E. Catecholamine cardiomyopathy: review and analysis of pathogenic mechanisms. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.63, p.581-591, 1990.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.311, p.76-79, 2002.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.

KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **Clinical Chemistry**, v.100, n.5, 567-575, 1993.

KOGURE, K.; WATSON, B.D.; BUSTO, R.; ABE, K. Potentiation of lipid peroxides by ischemia in rat brain. **Neurochemistry Research**, v.7, p.473-454, 1982.

KOMATSU, H.; KOO, A.; GHADISHAH, E. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals. **American Journal Physiology**, p.G669-G676, 1992.

KÜHN, H., BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p.154–172, 2002.

LASSEN, E.D. Laboratory evaluation of the liver. In: THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WIESER, G. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p.355-375.

LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. **DUNCAN & PRASSE'S Veterinary Laboratory Medicine**. 4th. Iowa: Iowa State Press, Blackwell Publishing Company, 2003. 450p.

LEWIS, N.P.; McDOUGALL, I.C.; WILLIS, N.; HENDERSON, A.H. The ventilatory cost of exercise compared in chronic heart failure and chronic renal anemia. **The Quarterly Journal of Medicine**, v.83, p.523-531, 1992.

LI, N.; KARIN, M. Is NF-kB the sensor of oxidative stress? **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v.13, p.1137-1143, 1999.

LINAS, S.L.; WHITTENBURG, D.; REPINE, J.E. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. **American Journal Physiology**, v.258, p.F711-F716, 1990.

LUDAT, K.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T.; SIEMS, W.G.; RIEDEL, E.; HAMPL, H. Oxidation parameters in complete correction of renal anemia. **Clinical Nephrology**, v. 53, Suppl.1, p.S30-35, 2000.

MADDUX, J.M.; KEETON, K.S. Effects of dexamethasone, levamisole, and dexamethasone-levamisole combination on neutrophil function in female goats. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, p.1114-1125, 1987.

MALIKIDES, N.; HODGSON, J.L.; ROSE, R.J.; HODGSON, D.R. Cardiovascular, haematological and biochemical responses after large volume blood collection in horses. **The Veterinary Journal**, v.162, p.44-55, 2001.

MANIKIS, P.; JANKOWSKI, S.; KAHN, R.J.; VINCENT, J.L. Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. **American Journal of Emergency Medicine**, v.13, n.6, 1995.

MEAGHER, E.A.; FITZGERALD, G.A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, n.12, p.1475-1450, 2000.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinária. Interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

MEYER, D.J.; HARWEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine. Interpretation and diagnosis**. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1998. 373p.

MOCHIZUKI-ODA, N.; TAKEUCHI, Y.; MATSUMURA, K.; OOSAWA, Y.; WATANABE, Y. Hipoxia-induced catecholamine release and intracellular Ca_2^+ increase via supression of K^+ channels in cultured rat adrenal chromaffins cells. **Journal Neurochemistry**, v.69, p.377-387, 1997.

MOLLER, J.C.; SCHWARZ, U.; SCHAIBLE, T.F.; ARTLICH, A.; TEGTMEYER, F.K.; GORTNER, L. Do cardiac output and serum lactate levels indicate blood transfusion requirements in anemia of prematurity? **Intensive Care Medicine**, v.22, n.5, p.472-476, 1996.

MONCADA, S.; PLAMER, R.M.J.; FERRIGE, G. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, n.2, 109-142, 1991.

MOORE, T.M.; KHIMENKO, P.L.; TAYLOR, A.E. Endothelial damage caused by ischemia and reperfusion and different ventilatory strategies in the lung. **The Chinese Journal of Physiology**, v.39, p. 65-81, 1996.

NIELSEN, F.; MIKKELSEN, B.B.; NIELSEN, J.B.; ANDERSEN, H.R.; GRANDJEAN, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative

stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry**, v.43, n.7, p.1209-1214, 1997.

ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS. **Guia de referência veterinário**. Ortho-Clinical Diagnostics a Johnson-Johnson Company. 1989. p. 34.

PERCÁRIO, S.; ROMALDINI, H.; ODORIZZI, F.V. Papel dos radicais livres e da defesa antioxidante no broncoespasmo induzido em cobaias. **Laes/Haes**, n.133, p.126-156, 2001.

POSTOVIT, L.M.; SULLIVAN, R.; ADAMS, M.A.; GRAHAM, C.H. Nitric oxide signalling and celular adaptations to changes in oxygenation. **Toxicology**, v.208, p.235-248, 2005.

ROBINSON, F.W.; HUXTABLE, C.R.R. **Clinicopathologic Principles for Veterinary Medicine**. New York: Cambridge University Press, 1988. 440p.

ROTH, J.A.; KAEBERLE, M.L. Effect of glucocorticoids on the bovine immune system. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.180, n.15, p.894-901, 1982.

SARADA, S.K.S.; DIPTI, P.; ANJU, B.; PAULINE, T.; KAIN, A.K.; SAIRAM, M.; SHARMA, S.K.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVENDRA KUMAR, W.; Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.149-153, 2002.

SCALEA, T.M. **Trauma, a disease of bleeding**. Baltimore: The International Trauma Anesthesia and Critical Care Society (ITACCS). 2003. p.3-5.

SCHUBER, A. **Hemoglobin therapeutics, blood substitutes, and high volume blood loss.** The International Trauma Anesthesia and Critical Care Society (ITACCS). 2003. p.44-48.

SINGH, M.; JAISWAL, N. Oxygen-derived free radicals and circulatory shock. **Indian Journal of Pharmacology**, v.24, p.8-11, 1992.

SJÖDIN, B.; WESTING, Y.H.; APLLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v.10, n.4, p.236-254, 1990.

SOMMERBURG, O.; GRUNE, T.; HAMPL, H.; RIEDEL, E.; van KUIJK, F.J.; EHRICH, J.H.H.; SIEMS, W.G. Does long-term treatment of renal anemia with recombinant erythropoietin influence oxidative stress in hemodialyzed patients? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.13, p.2583-2587, 1998.

STENVINKEL, S. Anemia and inflammation: what are the implications for the nephrologists? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, suppl. 8, p. 17-22, 2003.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology.** Iowa: Iowa State Press, Blackwell Publishing Company, 2002. 610p.

STOTT, G.H. What is animal stress and how is it mensured? **Journal of Animal Science**, v.52, n.1, p.150-153, 1981.

STRADAIOLI, G.; MAGISTRINI, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid method for determination of malondialdehyde in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.347-350, 2002.

SUREDA, A.; BATLE, J.M.; TAULER, P.; AGUILÓ, A.; CASES, N.; TUR, J.A.; PONNS, A. Hipóxia/reoxygenation and vitamin C intake influence NO synthesis and antioxidant defenses of neutrophils. **Free Radical Biology and Medicine**, v.37, n.11, p.1744-1755, 2004.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**. v.16, n.7/8, p.716-717, 2000.

TORRINGTON, K.G.; Mc NEIL, J.S.; PHILLIPS, Y.Y.; RIPPLE, G.R. Blood volume determination in sheep before and after splenectomy. **Laboratory Animal Science**, v.39, n.6, p.598-602, 1989.

VENG-PEDERSEN. P.; CHAPEL, S.; SCHMIDT, P.R.L.; AL-HINITI, N.H.; COOK, R.T.; WIDNESS, J.A. An integrated pharmacodynamic analysis of erythropoietin, reticulocyte, and hemoglobin responses in acute anemia. **Pharmaceutical Research**, v.19, n.11, p.1630, 2002.

WEISSER, M.G. Erythrocyte volume distribution analysis in health dogs, horses and dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.163-166, 1982.

WEISER, M.G.G.; KOCIBA, G.J. Sequential changes in erythrocyte volume distribution and microcytosis associated with iron deficiency in kittens. **Veterinary Pathology**, v.20, p.1-12, 1983.

WICKENS, A.P. Agein and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v.128, p.379-391, 2001.

WIDNESS, J.A.; LOWE, L.S.; BELL, E.F.; BURMEISTER, L.F.; MOCK, D.M.; KISTARD, J.A.; BARD, H. Adaptative responses during anemia and

its correction in lambs. **Journal Applied Physiology**, v.88, p.1397- 1406, 2000.

WILSON, M.; DAVIS, D.P.; COIMBRA, R. Diagnostic and monitoring of haemorrhagic shock during the initial resuscitation of multiple trauma patients: a review. **The Journal of Emergency Medicine**, v.24, n.4, p.413-422, 2003.

WINK, D.A.; COK, J.A.; PACELLI, R.; LIEBMANN, J.; KRISHNA, M.C.; MITCHELL, J.B. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, v.82/83, p.221-226, 1995.

WINTER, H. Changes of the red blood cell hemogram in posthemorrhagic anemia in sheep. **American Journal Veterinary Research**, v. 27, n.119, p.891-897, 1966.

WINTER, H. Myelogram of sheep in post-hemorrhagic anemia. **American Journal Veterinary Research**, v. 28, n.126, p.1389-1395, 1967.

WONG, S.H.Y.; KNIGHT, J.A.; HOPFER, S.M.; ZAHARIA, O.; LEACH JR, C.N.; SUNDERMAN JR, F.W. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatography separation of malondialdehyde-thyobarbituric acid adduct. **Clinical Chemistry**, v.33, n.2, p.214-220, 1987.

YAGI, K. Lipid peroxides and human diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.45, p.337-351, 1987.

ZANGH, L.; ALEXANDER, R.L.; WIDNESS, J.A.; CHEUNG, C.Y.; GRACE, R.A. Red cell mass responses to daily erythropoietin and iron injections in the ovine fetus. **American Journal Obstetric Gynecology**, v.186, n.2, p.315-320, 2002.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.N.; COMMANDEUR, J.N.M.;
VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage application in
experimental animal and humans. **Free Radical Biology and Medicine**,
v. 26, n. 1/2, p.202-226, 1999.