

DANILO FRANÇA DE SOUZA

Avaliação do equilíbrio oxidativo na gestação e perinatologia equina.

São Paulo

2016

DANILO FRANÇA DE SOUZA

Avaliação do equilíbrio oxidativo na gestação e perinatologia equina.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes

Coorientador:

Prof. Dr. Marcílio Nichi

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3440
FMVZ

Souza, Danilo França de
Avaliação do equilíbrio oxidativo na gestação e perinatologia equina / Danilo França de Souza. -- 2016.
79 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes.
Coorientador: Prof. Dr. Marcílio Nichi.

1. Potros. 2. Éguas. 3. Enzimas antioxidantes. 4. Peroxidação lipídica 5. Parto. I. Título.



São Paulo, 30 de abril de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da idade no estabelecimento da homeostase oxidativa em éguas gestantes", protocolado sob o CEUA nº 5888210814, utilizando 70 Equídeos (70 fêmeas), sob a responsabilidade de Cláudia Barbosa Fernandes, foi aprovado na reunião de 12/11/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Influence of age on the establishment of oxidative homeostasis in pregnant mares", protocol number CEUA 5888210814, utilizing 70 Equines (70 females), under the responsibility Cláudia Barbosa Fernandes, was approved in the meeting of day 11/12/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Danilo França

Título: **Avaliação do equilíbrio oxidativo na gestação e perinatologia equina.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a toda família que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me deram força para que eu seguisse todo o trajeto até chegar à conclusão do presente trabalho, aqueles que foram responsáveis pela minha educação a partir da qual formei minha conduta de vida, senso de responsabilidade e respeito. Sobretudo a minha mãe, a pessoa mais importante da minha vida, que possibilitou de inúmeras formas que todos os meus sonhos fossem possíveis de serem realizados e meus objetivos alcançados, sem o seu apoio e sua confidencialidade não sei se chegaria perto do que sou hoje. Sempre tive a certeza que a nossa relação não é apenas de mãe e filho, somos amigos e o amor que nos une será eterno, obrigado minha querida mãe.

Aos meus amigos que deixei em Salvador, mas que nem mesmo a distância física impediu que permanecêssemos unidos e irmãos. Obrigado por me ouvirem sempre que precisei, pelos conselhos e pelos bons momentos. Agradeço ainda pela oportunidade de reencontrar aqui alguns deles, Mari e Pri, obrigado pela companhia de sempre.

À minha querida amiga Paula Hernandez e à sua família que me acolheram quando precisei vir com urgência de Salvador fazer minha matrícula na pós, e a tantos outros momentos de descontração sempre muito receptivos e atenciosos. Sempre agradeço pela sua amizade Paulinha, para mim é um privilégio enorme fazer parte da sua vida, ter você na minha e poder contar com você.

À Fê (Jordão) e a sua família que também me ajudaram quando precisei. Sou muito grato à sua amizade, obrigado por ouvir meus desabafos, por fazer parte da minha carreira como profissional, por ter me ensinado e me ajudado sempre. Obrigado por ser sempre solícita minha amiga.

À Amanda e sua família (Sr. Antônio, Tia Ana e Aline) que por dois meses me receberam e me fizeram sentir-me em casa, tia Ana, obrigado pelo cuidado. Agradeço por ter tido você, Amanda, como parceira nesses meses de experimento, sou muito grato pela sua ajuda, pela sua amizade e companhia por todo tempo de convivência, aprendizado e amadurecimento nos momentos difíceis. Nossas afinidades superaram infinitamente qualquer diferença, espero ter sua amizade pra sempre, seu jeito ímpar de ser contagia e deixa a vida mais leve.

Aos estagiários da Fazenda Santa Rita II que me ajudaram quando precisei e fizeram companhia, apesar do nosso desgaste do dia a dia, nossa convivência sempre foi muito boa. Foi um prazer imenso ter vocês como estagiários, obrigado a todos. Eduardo, Marciel, May, Joyce, Rachel, Ione, Luís, Camila, Cá (Camila Moreno), Rafael, Fê, Felipe, Carlinha, Isabela, Diego, Thiago, Onildo, Pri, Maria Fernanda, Gibson, Gabi e Débora. Em especial à May, que até hoje “encho o saco”

pedindo os infinitos favores, sou imensamente grato por tudo, mas principalmente pela sua amizade e sua atenção.

À professora Cláudia, minha querida orientadora que confiou na minha capacidade e sempre me estimulou a dar o melhor de mim. Obrigado pela preocupação, atenção e respeito ao nosso trabalho, agradeço muito por ser sempre tão aberta ao diálogo, uma característica que admiro muito e que sempre me deixou à vontade durante esse período. Apesar de termos tido só metade do tempo do mestrado em contato diário, foi o suficiente para reconhecer a pessoa legal que és, e que mesmo com a distância, sempre foi muito presente no desenvolvimento do nosso projeto e lapidação dos nossos trabalhos, obrigado Claudinha, que tenhamos esse contato e essa relação pra sempre.

Ao pessoal do VRA que me acolheu desde a minha chegada. À todos os professores que entre conversas nos corredores, de alguma forma me despertaram um senso crítico, um estímulo a buscar, conhecer, a pesquisar, a fazer ciência! Um agradecimento especial à professora Camila, por quem tenho uma enorme simpatia e sou grato por me ceder um espaço no seu laboratório, desde a mesinha de estudo ao quarto do parto sempre que precisei. Ao professor Marcílio, meu coorientador, um cara que sempre pude contar, sempre foi disposto e disponível a me ajudar nos meus trabalhos, sua participação no decorrer do meu mestrado foi essencial. Ao Brunão, Diego e Andressa pela parceria e atenção de sempre.

Ao Dani, obrigado pela sua atenção e da sua família comigo. Muito bom ter amigos com quem pude contar tanto no ambiente da Universidade quanto fora da mesma. Você é um cara exemplar e que sempre tive como referência dentro da pós.

À Marcela, pelas coletas das amostras dos potros.

Agradeço imensamente à Maíra, à Giulia e à Clau, as pessoas que tiveram participação direta no meu experimento, sem vocês, nem um terço do meu trabalho seria possível, obrigado por tantos favores e por dedicar parte do precioso tempo de vocês para me ajudar nas padronizações das técnicas e nas análises das amostras, acho que mais importante do que isso, só mesmo a amizade e o carinho que construí com vocês.

À Clara do departamento de clínica, por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas e por rodar parte das minhas amostras, muito obrigado.

À querida e amada Pirassununga, onde passei os melhores momentos da minha vida aqui em São Paulo, Pira é diferente. Agradeço pela amizade de todos que a USP me proporcionou conhecer durante esses anos, dos colegas que sempre pude contar. Os momentos vividos com cada um de vocês, ou todos vocês quase sempre juntos, foram únicos e fizeram parte do meu bem estar de espírito, o que sempre refletiu positivamente no meu desempenho. Marmotas, talvez não tenham noção do quanto nossos “rolês” e o “voleizin” me deram força no período mais crítico

da pós, lembrarei de cada um sempre, deixo meu agradecimento à vocês, “Clã” (Porco, Novinha, Palú, Jaiber, Canga, Chups, Danete, Giovani). O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas sim na intensidade que elas acontecem, valeu pela parceria!!!

À Doci, à Mi, e à Rê. Minhas queridas irmãs que o mestrado me presenteou. Agradeço imensamente pela atenção e toda ajuda de vocês. Sempre que precisei vocês foram presentes e solícitas. Pessoas muito especiais com as quais pude contar nos momentos alegres e difíceis, sou muito grato por ter conhecido vocês e por ter construído uma amizade sincera e que irá durar por toda vida, a distância física que estar por vir não diminuirá o carinho que tenho por cada uma de vocês.

À Lalá. Talvez nada do que eu tenha vivenciado tenha sido tão bom, dramático e cômico se não fosse a sua presença. Queria deixar registrado meu agradecimento à pessoa mais RESERVADA e DIVERTIDA que tive o prazer de conhecer e que muitas vezes foi o meu porto seguro nessa caminhada. Obrigado Lá, por me ouvir, me acompanhar, me incentivar e me confortar as inúmeras vezes que precisei. Morar com você, desfrutar de momentos loucos e hilários, compartilhar nossa pobreza de pós-graduandos, de sonhar junto com uma riqueza súbita, comemorar qualquer coisa, inclusive nada, foi tudo muito sensacional. Se amigos têm alma gêmea, talvez vc seja a minha, não gêmeos idênticos, temos nossas diferenças, mas com certeza as afinidades são imensas. Te adoro Lalá e mais uma vez obrigado por fazer parte, mesmo que indiretamente, deste trabalho.

Ao grande amigo Klebão e à Vanessa, por sempre que possível reservarem um espaço de vossa casa para me alojar. Obrigado pela ajuda de sempre, Klebão aprendi muito contigo, você também foi uma referência para mim dentro da pós. Obrigado pela paciência e por sua solicitude em ajudar com a estatística da dissertação, com certeza este trabalho teve sua qualidade elevada com a sua contribuição.

Em memória, tenho orgulho de dizer que conheci um grande homem, quem sempre admirei e tive um apreço muito grande. Obrigado Ricardo Alonso, de onde quer que esteja, por abrir as portas da sua fazenda e da sua casa para mim quando cheguei aqui em São Paulo pela primeira vez para fazer estágio, fazendo do seu o meu lar também.

Por último e não menos importante, meu maior agradecimento vai para Guta Alonso, minha grande amiga, e mãe, como ela mesma diz, por tudo que me proporcionou durante esses últimos cinco anos. Sou grato a ti por ter me ensinado tudo o que eu sei sobre a reprodução equina, por ter me estimulado a entrar no mestrado, a estudar e sempre procurar a excelência. Nenhuma palavra que eu possa escrever aqui descreve o sentimento de gratidão e carinho que tenho não só a você, mas por sua família que por muitas ocasiões considerei como minha também. A sua amizade, atenção e credibilidade por mim, me deixam extremamente feliz. Obrigado por estar comigo durante toda essa trajetória, mas principalmente

nessa reta final que tantas vezes te chamei desesperado e, como sempre, esteve disponível para me ajudar e me acalmar. Você é muito especial para mim, Gu.

À Fazenda Santa Rita II, que gentilmente dispôs seus animais, laboratório e moradia para desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa.

DEDICATÓRIA

Por me permitirem alcançar meus objetivos e concluir a minha pesquisa de mestrado, à Guta Alonso e à minha mãe, dedico!

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”. (Fernando Pessoa)

RESUMO

SOUZA, D F. **Avaliação do equilíbrio oxidativo na gestação e perinatologia equina**. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) conferem proteção aos seres vivos contra os contínuos ataques de microrganismos, além de serem responsáveis por diversos eventos fisiológicos. No entanto um desequilíbrio entre a produção das EROs e os agentes antioxidantes resulta diversos processos patológicos nos mais variados sistemas em seres humanos e em animais. Durante a gestação ocorrem alterações do metabolismo que podem levar a um aumento de subprodutos da oxidação. Assim como a gestação, o nascimento também impõe um período com alta demanda energética, alta tensão de oxigênio e, por consequência, determina um momento crítico na vida do neonato, por ser exigida uma rápida adaptação da condição hipóxica (intra útero) para hiperóxica (extra útero). Desta forma, o objetivo desta dissertação foi verificar o estado oxidativo das éguas no terço final da gestação, no periparto e no pós-parto levando em consideração o efeito da paridade, bem como a condição oxidativa de neonatos durante os primeiros sete dias de vida. Como indicadores de oxidação foram mensurados os níveis de TBARS e oxidação de proteína. Foi quantificado o ferro total e como parâmetros antioxidantes, foram medidas as atividades das enzimas GPx e SOD, e as concentrações de bilirrubina. Nos potros verificamos que a SOD não apresentou diferença significativa no período analisado. As concentrações de bilirrubina foram mais baixas no primeiro tempo avaliado, e tanto a bilirrubina total quanto a indireta elevaram-se às 12 horas e então caíram entre as 72h e 168h. Já a GPx demonstrou aumento da sua atividade nos tempos 12 e 72h quando comparada ao tempo 0h. Verificou-se altos níveis de TBARS no primeiro momento pós-nascimento, uma conseguinte diminuição às 12h seguida de estabilização nos demais tempos. Já a avaliação do período gestacional das éguas indicou um efeito de interação entre paridade e tempo gestacional apenas para o ferro total. SOD e oxidação proteica não apresentaram alterações significantes no período estudado. Tanto a GPx quanto as TBARS apresentaram efeito de tempo, com evidente alteração entre o parto, apresentando aumento e o

pós-parto apresentando diminuição de atividade e das concentrações dessas variáveis. Concluimos que em potros, a peroxidação lipídica ao nascimento apresentou-se alta sugerindo um balanço pró-oxidativo durante tal período, o que poderia caracterizar um aumento nos níveis de EROs com finalidade de completar importantes eventos fisiológicos. Quanto a bilirrubina indireta e a GPx podemos sugerir que frente aos altos níveis da peroxidação lipídica houve um estímulo para ativação dos sistemas antioxidantes que envolvem essas biomoléculas e que as duas tenham agido concomitantemente visando equilibrar os níveis de EROs. Com relação às éguas, apontamos que a paridade não tem influencia sobre o estabelecimento da homeostase oxidativa em éguas e que no momento do parto as mesmas passam por um desbalanço oxidativo transiente. Ou seja, o desbalanço oxidativo faz parte tanto do momento do parto quanto da primeira semana de vida dos potros, possivelmente desempenhando um papel fisiológico em ambas categorias.

Palavras-chave: Potros. Éguas. Enzimas antioxidantes. Peroxidação lipídica. Parto.

ABSTRACT

SOUZA, D. F. **Evaluation of oxidative balance in gestation and equine perinatology. [Avaliação do equilíbrio oxidativo na gestação e perinatologia equina]**. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Reactive Oxygen Species (ROS) produced protect living beings against the continuous attacks of microorganisms, as well as being responsible for several physiological events, so oxidative homeostasis is a premise. However, an imbalance between the production of ROS and the antioxidant agents causes several pathological processes in the most varied systems in humans and animals. During pregnancy it is suggested that alterations of the metabolism take place, consequently the increase of by-products of the oxidation during the gestational period. Like gestation, the birth also imposes a period with high energy demand, high oxygen tension and, consequently, it determines a critical moment in the life of the newborn because it is required a rapid adaptation of the same to the change of hypoxic condition (intra uterus) To hyperoxic (extra uterus). The aim of this dissertation was to verify the oxidative status of mares in the final third of gestation, peripartum and postpartum, taking into account the parity effect, as well as the oxidative condition of neonates during the first seven days of life. As oxidation indicators, the levels of TBARS and protein oxidation were measured. Total iron was quantified and as antioxidant parameters, activities of GPx and SOD enzymes, and bilirubin concentrations were measured. In the foals we verified that the SOD showed no significant difference in the analyzed time. Bilirubin concentrations were lower in the first time evaluated, and both total and indirect bilirubin increased at 12 hours and then fell between 72h and 168h. On the other hand, GPx showed an increase in its activity in times 12 and 72h when compared to time 0h. There were high levels of TBARS at the first post-birth moment, a consequent decrease at 12h, followed by stabilization at the other times. The results with mares indicated interaction effect between parity and gestational time only for total iron. SOD and protein oxidation did not present significant alterations in the studied period. Both GPx and TBARS

presented a time effect, with an evident alteration between childbirth and postpartum, and there was an increase and decrease, respectively, in the activity and concentrations of these variables. We conclude that in foals, lipid peroxidation at birth was high suggesting a pro-oxidative balance during such period, which could characterize an increase in the levels of ROS in order to complete important physiological events. Regarding indirect bilirubin and GPx, we can suggest that in the face of the high levels of lipid peroxidation there was a stimulus for the activation of the antioxidant systems that involve these biomolecules and that the two have acted concomitantly in order to maintain the high levels of EROs at non detrimental levels. Regarding mares, we pointed out that parity has no influence on the establishment of oxidative homeostasis in mares and that at the time of delivery they undergo transient oxidative imbalance. That is, oxidative imbalance is part of both the calving moment and the first week of life of foals, possibly playing a physiological role in categories.

Keywords: Foals. Mares. Antioxidant enzymes. Lipid peroxidation. Foaling.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Comportamento das bilirrubinas nos diferentes tempos, pós nascimento de neonatos equinos.....37
- Figura 2 - Interação entre tempo e grupo de paridade da variável ferro em éguas...50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Influência dos períodos 5 minutos, 12, 72 e 168 horas pós-nascimento na atividade das enzimas antioxidantes GP_x e SOD, no grau de peroxidação lipídica (TBARS) e nos níveis das bilirrubinas total (BILIT), direta (BILID) e indireta (BILII) em potros.....49
- Tabela 2 - Variação da GPx durante os quatro meses pré-parto, no parto e pós-parto em éguas nulíparas (1) e pluríparas (2).....52
- Tabela 3 - Variação da TBARS durante os quatro meses pré-parto, no parto e pós-parto em éguas.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

SOD – Superóxido Dismutase

GPx – Glutathione Peroxidase

MDA – Malondialdeído

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ATP – Adenosina Trifosfato

NADH - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina reduzido

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

O₂⁻ - Superóxido

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂O – Água

O₂ – Oxigênio

Fe³⁺ - Íon férrico

Fe²⁺ - Íon ferroso

HDL – Lipoproteína de alta densidade

NEFA – Ácido graxo não esterificado

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

BILIT – Bilirrubina Total

BILID – Bilirrubina Direta

BILII – Bilirrubina indireta

TCA – Ácido tricloroacético

OP – Oxidação de Proteína

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 OXIDANTES E ANTIOXIDANTES	21
2.2 ASPECTOS BÁSICOS DA FISIOLÓGIA DA GESTAÇÃO, PARTO E PERIPARTO.	25
2.3 ASPECTOS BÁSICOS RELACIONADOS AO NEONATO	27
3 OBJETIVOS GERAIS	30
4 ESTADO OXIDATIVO EM NEONATOS EQUINOS: ANTI E PROXIDANTES...	31
4.1 INTRODUÇÃO	33
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.4 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
5 INFLUENCIA DA PARIDADE NO ESTABELECIMENTO DA HOMEOSTASE OXIDATIVA EM ÉGUAS GESTANTES E PERIPARTURIENTES	49
5.1 INTRODUÇÃO	51
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.4 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

A homeostase oxidativa é essencial para que os processos fisiológicos ocorram naturalmente. As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) produzidas permitem que os seres vivos tenham a capacidade de sobreviver aos contínuos ataques de microrganismos (MCCORD, 1986), além de serem responsáveis por diversos eventos que envolvem a reprodução, desenvolvimento fetal e sinalização celular, o que as torna essenciais à vida (BUONOCORE; PERRONE; TARTARANNO, 2010). No entanto um desequilíbrio entre a produção das EROs e os agentes antioxidantes provoca diversos processos patológicos ou lesões nos mais variados sistemas em seres humanos (COUGHLAN et al., 2004; SHAHAB et al., 2008; SWATI; SARVESH; SOURABH, 2015) e em animais (PO et al., 2013; SGORBINI et al., 2015).

As reações de óxido redução ocorrem simultaneamente e de maneira constante no organismo e provavelmente se intensificam no decorrer da gestação, já que uma série de mudanças acontece para suprir as necessidades maternas e fetais. Sendo assim é sugerido que há alterações do metabolismo, sejam elas com intuito de adequação às transformações da gestação, ao estresse físico do parto ou com as mudanças do pós-parto (AOKI; HONDA; ISHII, 2013). Em éguas, durante a gestação ocorrem alterações hematológicas (BAZZANO et al., 2014a), hemostáticas (BAZZANO et al., 2014b), no perfil mineral (BAZZANO et al., 2016a), nas concentrações proteicas (BAZZANO et al., 2016b), de subprodutos metabólicos (BAZZANO et al., 2014c; VINCZE et al., 2015) e de reguladores metabólicos energéticos devido a maior necessidade de suprimento das éguas parturientes (ARFUZO et al., 2016).

Adicionalmente, foi observado que um considerável aumento de lipídeos oxidáveis durante a gestação (VINCZE et al., 2015), mais especificamente no último trimestre nas éguas (BAZZANO et al., 2014c), o que as predispõe a maiores danos oxidativos. Pressupõe-se que a utilização do colesterol como substrato para produção de hormônios esteroides pela placenta pode ser uma das justificativas para tal aumento (VINCZE et al., 2015). Somado a isso foi relatado que em mulheres a placenta é grande responsável pela produção de peróxidos (WALSH; WANG, 1993), com detecção de altos níveis de malondialdeído (MDA) em gestantes

comparados com não gestantes e aumento significativo nas concentrações no decorrer da gestação (SWATI; SARVESH; SOURABH, 2015).

Neste sentido é necessário que haja aumento da capacidade protetora como uma forma de balanço compensatório ao aumento dos oxidantes. Górecka et al. (2002) relataram que há mudanças significativas tanto do sistema antioxidante enzimático como não enzimático com a proximidade do parto em éguas. Já em mulheres gestantes, é relatada uma expressiva diferença tanto com relação ao dano lipídico quanto à defesa antioxidante quando comparadas com mulheres não gestantes (TIWARI et al., 2016) refletida pelo aumento das atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (SWATI; SARVESH; SOURABH, 2015).

Da mesma forma que a gestação é uma situação de desafio, o nascimento também impõe um período com alta demanda energética, alta tensão de oxigênio e, por consequência, determina um momento crítico na vida do neonato. Em um experimento realizado com porcos da Índia foi confirmado que na fase final da gestação ocorre maturação de enzimas antioxidantes pulmonares como intuito de preparar os neonatos para o aumento da tensão de oxigênio pós-nascimento. Foi sugerido também, que o aumento da atividade destas enzimas seja em resposta ao aumento do metabolismo (RICKETT; KELLY, 1990). Assim, é evidente que ao nascimento é exigida uma rápida adaptação neonatal da condição hipóxica (intra útero) para hiperóxica (extra útero) (ISHIDA et al., 1997).

Desta forma, o estudo dos diferentes aspectos que compõem o equilíbrio oxidativo em animais gestantes e neonatos saudáveis é fundamental para que um diagnóstico precoce e tratamento sejam instituídos em caso alterações da normalidade. Entretanto, apesar dessas evidências, as pesquisas em medicina veterinária estão amplamente concentradas nos machos com enfoque em sêmen com poucos estudos na perinatologia. Portanto, o objetivo desta dissertação foi verificar o estado oxidativo das éguas no terço final da gestação, no parto e no pós-parto levando em consideração o efeito da paridade dos animais, bem como a condição oxidativa de neonatos durante os primeiros sete dias de vida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OXIDANTES E ANTIOXIDANTES

Por volta dos séculos XVIII e XIX foi relatada por Lavoisier, Joseph Priestley e Carl Wilhelm Scheele a descoberta do oxigênio, da oxidação além dos efeitos tóxicos dessa molécula sobre o organismo, constituindo dessa forma o paradoxo do oxigênio como elemento extremamente vital e ao mesmo tempo deletério (AUGUSTO, 2008). No entanto, para que seja possível a compreensão deste contraste e o que é denominado estresse oxidativo, é necessário o conhecimento das fontes de produção e mecanismos de ação dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio.

O pesquisador alemão Helmes Sies (1991) propôs um conceito sobre estresse oxidativo onde haveria um desequilíbrio celular no qual os oxidantes predominariam sobre os antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo. No entanto, o conceito mais atual seria o proposto por Jones (2006)¹ no qual uma situação onde a sinalização celular esteja alterada juntamente com as reações de oxidação e redução provocaria uma condição de estresse oxidativo (2006 apud LUCA; LUCA; CALANDRA, 2015).

Os radicais livres são moléculas ou íons independentes e que contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo que, quando não emparelhados possuem *spins* opostos (orientações contrárias entre si e conseqüentemente extrema repulsão). Por outro lado as espécies reativas de oxigênio compreendem os radicais livres e as moléculas não radicalares, que são aquelas que possuem os elétrons emparelhados na última órbita, como o peróxido de hidrogênio (AUGUSTO, 2008).

Como caracteristicamente os radicais livres são instáveis, eles se tornam altamente reativos com moléculas capazes de doar ou receber elétrons, constituindo dessa forma as reações redox, que envolvem perda e ganho de elétrons entre duas moléculas, simultaneamente (AUGUSTO, 2008). Nesta busca por estabilidade, os radicais livres reagem no organismo com proteínas, lipídeos e com o DNA

¹ JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865–1879, 2006.

interferindo com o funcionamento de enzimas, do aparato celular dependente de proteínas, e da conformação da bicamada lipídica, além de causar alterações epigenéticas que podem ser irreversíveis (BUONOCORE; PERRONE; TARTARANNO, 2010; ZIECH et al., 2011).

Foi sugerido por Wong-Ekkabut et al. (2007) que uma maior quantidade de lipídeos oxidados na bicamada lipídica altera sua conformação, aumenta a densidade, diminui espessura e conseqüentemente provoca um maior espaçamento entre os fosfolipídios. Os lipídios oxidados levariam à inativação de enzimas e aumento na permeabilidade celular resultando na mudança das características estruturais da bicamada lipídica, o que provavelmente levaria a danos e morte celular (ORRENIOS et al., 1989).

Com relação às proteínas e ao DNA, os outros alvos dos oxidantes, Mikhed et al. (2015) relataram que as vias clássicas de regulação de genes por fatores de transcrição, dos mecanismos de reparação no dano ao DNA, assim como as vias de modulação dos mecanismos epigenéticos podem ser afetados pelo estado de óxido redução do organismo. Como consequência, o dano oxidativo às proteínas reparadoras de lesões do DNA é extremamente perigoso e pode ser deletério, uma vez que aumentam as possibilidades de replicação de mutações que possam ocorrer no material genético (GUERANGER et al., 2014).

O aumento da exposição às EROs gera uma maior quantidade de proteínas carboniladas e de ligações cruzadas entre os aminoácidos de proteínas ou nucleotídeos de DNA (XIE; FAN; MANG, 2007). Mirzaei e Regnier (2007) sugeriram que existe um efeito sobre a expressão de novas proteínas quando ocorrem ligações cruzadas entre proteínas ribossomais e RNA de células fúngicas. Propuseram também que em mamíferos o problema pode ser mais grave, pois as EROs mais reativas como o radical hidroxila afetam qualquer tipo de base nitrogenada que compõe o DNA. No entanto, a guanina é a mais facilmente oxidada entre as quatro bases por sofrer oxidação de outras EROs menos reativas (KAWANISHI; HIRAKU; OIKAWA, 2001).

No organismo, as EROs possuem reatividades diferentes que podem ser potencializadas pela associação com outras moléculas. O radical superóxido é capaz de reduzir íons metálicos, que reagem com o peróxido de hidrogênio oriundo

da dismutação do superóxido. Esse mecanismo, quando envolve o metal ferro, é denominado de “Fenton” numa reação que gera o radical hidroxila o mais potente e danoso às células (AUGUSTO, 2008) e responsável pela peroxidação lipídica de membradas (FUKUZAWA et al., 2005).

Fisiologicamente, as EROs são oriundas de sistemas indispensáveis. Os elétrons provenientes dos nutrientes também são recolhidos na forma de NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido), uma coenzima que participa de diversas reações de óxido redução promovendo um intenso transporte de elétrons. E esses são conduzidos por uma série de complexos multiprotéicos até o citocromo C oxidase, o grande responsável por levar os elétrons ao oxigênio. No decorrer desse processo, prótons são bombeados para o espaço intermembranas da mitocôndria, gerando energia para síntese de ATP. Por ser uma forma energética não armazenada, a produção de ATP deve ser contínua e conseqüentemente a respiração mitocondrial que é a sua principal fonte também deve ser mantida constante com intuito de manter os processos vitais. Como consequência deste processo, ocorre a geração das EROs a partir do escape de alguns elétrons durante a respiração celular (AUGUSTO, 2008).

Com propósito de debelar a ação negativa das EROs, o organismo possui eficientes sistemas de defesa que contam com enzimas tais como GPx e SOD, componentes do sistema enzimático, e biomoléculas tal como a bilirrubina por exemplo parte do sistema não enzimático.

A GPx faz parte do grupo de enzimas responsável por catalisar as reações de remoção de peróxidos de hidrogênio (NG et al. 2007), onde a glutathiona (GSH) que é um tripeptídeo formado pelo glutamato, cisteína e glicina é utilizada como substrato. O fundamento antioxidante desse sistema consiste na oxidação do grupo sulfidril do aminoácido cisteína presente no GSH, atuando neste sentido como redutor celular. Essa reação gera o dissulfeto GSSH (glutathiona oxidada) e o mesmo é reconvertido à GSH pelo uso do redutor NADPH em uma segunda reação catalisada pela glutathiona redutase, deixando as moléculas de GSH regeneradas disponíveis para outras reações com radicais livres (AUGUSTO, 2008).

Em 1969, foi sugerido por McCord e Fridovich a responsabilidade da SOD pela eliminação do radical superóxido. Essa enzima é encontrada principalmente no

compartimento intracelular, no entanto também encontra-se presente nos fluidos extracelulares como o plasma sanguíneo e outros tecidos em mamíferos (MARKLUND, 1984). São conhecidas três tipos de SOD, que são assim nomeadas pela capacidade de metabolizar duas moléculas do ânion superóxido em uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma de dióxigênio, com consumo de H^+ (MILLER, 2012). A SOD 3, que possui em sua composição o metal ferro (Fe^{2+}) ou manganês (Mn), é a encontrada no espaço extracelular em animais (CUI et al., 2014), no entanto, dentre essas duas, Fe-SOD parece ser escassa nesses indivíduos (MILLER, 2012). A dismutação do ânion superóxido ocorre espontaneamente no organismo, no entanto a SOD também promove este evento, ambas reações tem como subproduto o peróxido de hidrogênio (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).

Os esquemas a seguir demonstram as reações de pro e antioxidantes (1) e de Fenton (2):



Considerando este contexto, vale ressaltar que os processos que envolvem EROs e antioxidantes, no entanto, não se limitam a processos patológicos. A sinalização redox, definida como uma resposta celular a um oxidante de determinado compartimento celular desencadeando uma série de efeitos na função celular, sob reações passíveis de reversão, consiste uma das vias de atuação fisiológica tanto dos pró quanto dos antioxidantes. Dependendo do sinal, pode haver alteração da transcrição de genes, organização do citoesqueleto, atividade dos canais de cálcio além de outras funções celulares (WINTERBOURN, 2015). Neste sentido, a produção de moléculas antioxidantes não é estrita à proteção, a diferença entre sinalização e defesa é simplesmente uma questão de grau, tanto a

superestimação de uma ou outra via pode-se ter consequências danosas (FINK; SCANDALIOS, 2002; FORMAN; URSINI; MAIORINO, 2014).

2.2 ASPECTOS BÁSICOS DA FISIOLOGIA DA GESTAÇÃO, PARTO E PERIPARTO.

Em mulheres, inúmeras alterações adaptativas ocorrem no corpo materno no decorrer da gravidez como uma forma de ajuste a fim de garantir o crescimento do feto, sobretudo no final da gestação, momento em que os processos metabólicos da gestante tornam-se mais intensos devido às interações bidirecionais entre a mãe e o feto em desenvolvimento (HADDEN; MCLAUGHLIN, 2009).

Quando comparadas às mulheres não gestantes, percebeu-se aumento da quantidade de produtos resultantes da peroxidação lipídica em mulheres grávidas saudáveis no decorrer da gestação (LEKHARU et al., 2014; SWATI; SARVESH; SOURABH, 2015) e conseqüentemente foi evidente o aumento das atividades da SOD e GPx em mulheres grávidas (SOURABH, 2015), mesmo com declínio das atividades enzimáticas da SOD, GPx, catalase e glutathione redutase com o avançar da gravidez (LEKHARU et al., 2014). Sendo assim, acreditamos que o processo gestacional demande maior atividade antioxidante do organismo para que haja homeostase oxidativa.

Em éguas, assim como as outras fêmeas mamíferas, são perceptíveis mudanças bioquímicas durante todo o periparto para que o organismo seja capaz de manter os parâmetros sanguíneos dentro dos níveis fisiológicos (HARVEY et al., 2005) o que põe esses animais num estado de instabilidade devido as alterações metabólicas. Arfuzo et al. (2016) verificaram em éguas, diminuição em regulador metabólico energético, leptina, lipídeos e lipoproteínas do fim da gestação e início do pós-parto, e sugeriram que tais alterações ocorram em função das adaptações hormonais e do metabolismo durante as condições fisiológicas específicas que culmina com a produção de leite, bem como sugerido por Castillo et al. (2005) no que diz respeito às vacas leiteiras.

Com relação a esse período de transição entre pré-parto e pós-parto, foi perceptível em pôneis diminuição nas quantidades de colesterol, triglicérides e lipoproteína de alta densidade (*HDL*) no final da gestação e de ácidos graxos não esterificados (*NEFA*) no período de lactação, mudanças que provavelmente ocorrem

pela mobilização para o tecido mamário (WATSON et al., 1993; HARVEY et al., 2005), já que o colostro é rico em gordura, especialmente em colesterol (PIKUL; WÓJTOWSKI, 2008) além da necessidade de órgãos que utilizam tais molécula como substrato de hormônios esteroides, como é o caso da placenta para produção de progesterona (1982² apud WATSON et al., 1993).

Mesmo com uma gama de produtos oxidáveis, segundo Sgorbini et al. (2015) é conveniente inferir o possível o papel da placenta da égua, do tipo epiteliocorial na proteção fetal à exposição direta às EROs e outros estressores (ELLIOT, 2016).

Em um trabalho realizado em ovelhas, não foi encontrada alteração no estado oxidante total durante os dias um, cinco e 10 pós-parto, no entanto, observou-se que a capacidade antioxidante foi maior com o passar dos dias pós-parto (SORIANO et al., 2015). Já em vacas, alterações no momento do parto só foram vistas na atividade da SOD e na capacidade de redução do ferro plasmático, sugerindo que esses animais sejam submetidos à mudanças rápidas e momentâneas no sistema antioxidante durante o parto (GÁAL et al., 2006) diferente do que foi visto por Castillo et al. (2005), quando observaram uma oscilação no estado antioxidante total durante a décima, sexta, segunda e primeira semana pré-parto e na primeira e segunda semanas pós-parto, sem aumentos evidentes no periparto. Esses dois grupos de pesquisa não detectaram alteração nos parâmetros oxidativos durante o final da gestação, parto e pós-parto em vacas. Em éguas, Sgorbini et al. (2015) verificaram correlação positiva entre os parâmetros antioxidantes com os oxidantes, sugerindo que haja uma resposta do sistema de defesa antioxidante durante o parto nos equinos.

Deve-se somatizar a isso uma série de eventos que ocorrem durante o pós-parto nas éguas: eliminação de fluidos, reabsorção de microcarúnculas, reorganização das glândulas uterinas, prevenção de infecções por meio de migração neutrofilica, etc. Pensando em todo esse conjunto de mudanças, associadas as alterações na expressão de RNAm para os hormônios esteroides que culminam com a ocorrência do cio do potro (JISCHA et al., 2008). Ou seja, em paralelo ao

² ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PEARSON, H. Pregnancy and its detection in the mare. In **Veterinary Reproduction and Obstetrics** (5th edn), London, p 50—55, 1982.

reestabelecimento da homeostasia do organismo materno no pós-parto, as éguas já se preparam para a retomada da ciclicidade tornando-se aptas a ficarem prenhes cerca de duas semanas pós-parto (GUNDUZ; KASIKCI; EKIZ, 2008), o que hipotetizamos representar significativas alterações metabólicas e oxidativas em um período crítico de lactação nas éguas.

2.3 ASPECTOS BÁSICOS RELACIONADOS AO NEONATO

O nascimento compreende uma série de eventos adaptativos ao novo ambiente. Alguns autores sugerem que as EROs estejam envolvidas nessas mudanças e que as mesmas ocorram ao longo da primeira semana de vida (BUONOCORE et al., 2002). Em humanos, os recém-nascidos demonstraram evidentes características bioquímicas de desbalanço oxidativo durante os 3 primeiros dias (WILINSKA et al., 2015), o que pode estar associado à grande presença de ácidos graxos de cadeia longa encontrados no plasma sanguíneo neonatal.

Da mesma forma em potros, o potencial antioxidante biológico ao nascimento foi muito inferior ao encontrado nas suas mães, mostrando pouca capacidade de proteção dos neonatos contra oxidantes (SGORBINI et al., 2015). O mesmo perfil foi encontrado em bovinos (GÁAL et al., 2006) e em suínos (YIN et al., 2013), quando os neonatos apresentaram maiores quantidades de radicais livres e menor atividade da SOD no primeiro dia de vida pós-parto quando comparados as mães.

Em experimento com bebês pretermo e a termo foi verificado que ambos apresentaram desequilíbrio oxidativo persistente na primeira semana de vida, apesar de maior nos prematuros. Sugeriu-se que esse desbalanço seja devido às grandes quantidades de produtos de peroxidação lipídica e oxidação proteica, configurando um evento fisiológico e natural dos recém nascidos (BUONOCORE et al., 2002). Somado a isso, Friel et al. (2004) notaram que em bebês o aumento das atividades enzimáticas da SOD e catalase ocorreu entre um e três meses de vida, ou seja, o processo de adaptação ao ambiente talvez seja um pouco mais prolongado e não se resume ao periparto. Corroborando com isso, Yin et al. (2013) sugeriram que em suínos, entre o sétimo e o 21º dia de vida a injúria oxidativa reduza gradativamente. Em cordeiros, foi perceptível uma diminuição do estado oxidante tota por volta do

quinto dia pós-parto, e associado a isso, altos níveis da capacidade antioxidante total no primeiro dia de nascidos (SORIANO et al., 2015).

Quando submetidos ao ambiente hiperóxico, os neonatos devem ser capazes de responder aos efeitos tóxicos do oxigênio. Foi notado, que coelhos recém-nascidos a termo, condicionados ao ambiente rico em oxigênio demonstraram adequada capacidade de resposta por meio de enzimas antioxidantes mensuradas no pulmão. No entanto, nos animais prematuros foi encontrada falha na capacidade de resposta enzimática quando expostos a tal ambiente, sendo mais susceptíveis ao efeito tóxico do oxigênio devido aumento dos indicadores da peroxidação lipídica induzida pelo oxigênio (FRANK; SOSENKO, 1991).

Diante dessas informações, é evidente a necessidade das alterações nos sistemas enzimáticos fetais no final da gestação, que preparam o pulmão e conseqüentemente proteger neonato da hiperoxia ao nascimento. Isso porque a capacidade de defesa antioxidante deste órgão parece ser uma das mudanças necessárias na maturação intrauterina, com a finalidade de garantir uma adaptação bem sucedida do pulmão ao seu novo ambiente e à nova função respiratória do recém-nascido (FRANK; GROSECLOSE, 1984). Esses autores hipotetizaram que o aumento das atividades dessas enzimas antioxidantes esteja relacionado com a diferenciação final das células responsáveis pela produção de surfactante, um indicador de maturação pulmonar. É relevante salientar, entretanto, que ambos enzima antioxidante e agente oxidante estão envolvidos nesse processo de maturação pulmonar que envolve a distensão vascular (FARROW et al., 2008).

Na medicina humana, sobretudo na neonatologia (SHAHAB et al., 2008), a função antioxidante da bilirrubina é bastante estudada e seu efeito protetor é evidente. A bilirrubina foi efetiva na capacidade antioxidante no plasma sanguíneo humano (MCLEAN et al., 2007) e foi sugerido que seu efeito tenha seletividade na proteção dos lipídeos, quando comparada à proteção conferida às proteínas, provavelmente pelo seu caráter lipossolúvel e por ter sido constatada sua incapacidade de reverter a oxidação de proteínas pelo peróxido de hidrogênio bem como feito pelo ascorbato e pelo GSH (SEDLAK et al., 2009).

O processo de maturação do sistema antioxidante parece ser um evento comum em mamíferos, pelo menos em quatro espécies analisadas (coelho, porco da

índia, hamster e rato) foi verificado que houve um rápido aumento da atividade enzimática (SOD, GPx e catalase) de 150 a 200% em média durante 10 a 15% do período final da gestação normal quando analisadas amostras dos fetos durante tal período (FRANK e SOSENKO, 1987).

Em experimento com bebês suplementados com aminoácidos essenciais para síntese de GSH, foi perceptível que a disponibilização desse antioxidante no segundo dia de vida foi aumentada, e sendo assim, foi proposto que essa elevação auxilie na diminuição do desbalanço oxidativo pós-parto (ROOK et al., 2010). Baseado nisso é possível sugerir que a ingestão colostrar pode ter influência considerável no estabelecimento da homeostase oxidativa após o nascimento (ABUELO et al., 2014), uma vez que em bovinos foram constatadas suas propriedades antioxidantes (PRZYBYLSKA; ALBERA; KANKOFER, 2007).

Junto a isso é relevante expor que após o nascimento, com o início da respiração pulmonar e exposição ao ambiente hiperóxico vias metabólicas aeróbicas são acionadas (MUTINATI et al., 2014) e a ação enzimática antioxidante é influenciada pelo aumento do metabolismo, como verificado em porcos da Índia em que a atividade da SOD aumentou consideravelmente com o passar dos dias pós-nascimento (RICKETT; KELLY, 1990).

A ativação do sistema de defesa, por exemplo, pode ser grande influenciador no que diz respeito ao aumento de oxidantes como foi sugerido por Soriano et al. (2015) em cordeiros no primeiro dia de vida, já que ela está envolvida com a defesa contra os microrganismos e que os neonatos estão submetidos a intensos desafios nos primeiros dias de vida considerando que a defesa imune do neonato é imatura.

3 OBJETIVOS GERAIS

Investigar determinadas variáveis oxidativas e antioxidantes de éguas gestantes e de neonatos saudáveis, com a finalidade de conhecer o estado oxidativo dos equinos durante o período perinatal.

4 ESTADO OXIDATIVO EM NEONATOS EQUINOS: ANTI E PROXIDANTES

RESUMO

Em recém-nascidos, a exposição ao ambiente extrauterino com alta tensão de oxigênio e súbita adaptação pulmonar levam a um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas moléculas extremamente instáveis são capazes de formar ligações cruzadas com lipídios, proteínas e bases nitrogenadas do DNA resultando na desestabilização celular, comprometimento da função e destruição do DNA podendo alterar processos vitais. No entanto, sabe-se que as EROs também desempenham diversos papéis fisiológicos essenciais no desenvolvimento fetal e neonatal. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o estado oxidativo de neonatos equinos saudáveis, a partir de sistemas enzimático e não enzimático, durante a primeira semana de vida. Foram avaliados 24 potros e as coletas foram realizadas em quatro tempos sendo eles: cinco minutos após o nascimento, às 12, 72 e 168 horas de nascidos. Como parâmetros oxidativos foram avaliados as TBARS. Foram mensuradas as atividades das enzimas SOD e GPX com intuito de verificar proteção antioxidante enzimática, e quantificadas as concentrações séricas de bilirrubinas total, direta e indireta a fim analisar um dos possíveis componentes da proteção não enzimática. A SOD não apresentou diferença significativa no tempo analisado. As concentrações de bilirrubina foram mais baixas no primeiro tempo avaliado e tanto a bilirrubina total quanto a indireta elevaram-se às 12 horas e então caíram entre as 72h e 168h. Já a GPx demonstrou aumento da sua atividade nos tempos 12 e 72h quando comparada ao tempo 0h. Foram verificados altos níveis de TBARS no primeiro momento pós-nascimento, uma conseguinte diminuição às 12h seguida de estabilização dos demais tempos. Desta forma, concluímos que a peroxidação lipídica ao nascimento apresentou-se alta sugerindo um balanço pró-oxidativo durante tal período, o que poderia caracterizar um aumento nos níveis de EROs com finalidade de completar importantes eventos fisiológicos. Quanto a bilirrubina indireta e a GPx podemos sugerir que frente aos altos níveis da peroxidação lipídica houve um estímulo para ativação dos sistemas antioxidantes que envolvem essas biomoléculas e que as duas tenham agido concomitantemente visando manter os elevados níveis de EROs em níveis não prejudiciais.

Palavras-chave: TBARS. GPx. Potros. Peroxidação lipídica. Bilirrubina.

ABSTRACT

In newborns, exposure to the extrauterine environment with high oxygen tension and sudden pulmonary adaptation leads to an increase in the formation of reactive oxygen species (ROS). These extremely unstable molecules are able to cross-link with lipids, proteins and nitrogenous bases of the DNA, resulting in cellular destabilization, impairment of function and destruction of DNA, which can alter vital processes. However, it is known that ROS also play a number of essential physiological roles in fetal and neonatal development. Thus, the objective of the present study was to evaluate the oxidative status of healthy equine neonates from enzymatic and non-enzymatic systems during the first week of life. Twenty four foals were evaluated and the samples were collected in four times: five minutes after birth, at 12, 72 and 168 hours of birth. TBARS was evaluated as oxidative parameters. The activities of SOD and GPX enzymes were measured in order to verify enzymatic antioxidant protection, and total serum concentrations of total and direct bilirubin were quantified in order to verify part of the non-enzymatic protection. SOD showed no significant difference in the time analyzed. Bilirubin concentrations were lower in the first time evaluated and both total and indirect bilirubin increased at 12h and then fell between 72h and 168h. On the other hand, GPx showed an increase in its activity in times 12h and 72h when compared to time 0h. High levels of TBARS were observed in the first post-birth moment, a consequent decrease at 12h, followed by stabilization of the other times. However, we concluded that lipid peroxidation at birth was high suggesting a pro-oxidative balance during such period, which could characterize an increase in the levels of ROS in order to complete important physiological events. Regarding indirect bilirubin and GPx, we can suggest that in the face of the high levels of lipid peroxidation there was a stimulus for the activation of the antioxidant systems that involve these biomolecules and both have acted concomitantly in order to maintain the high levels of ROS at non detrimental levels.

Key-words: TBARS. GPx. Foal. Lipid peroxidation. Bilirubin.

4.1 INTRODUÇÃO

Em recém-nascidos, a exposição ao ambiente extrauterino com alta tensão de oxigênio e súbita adaptação pulmonar levam a um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas moléculas extremamente instáveis são capazes de formar ligações cruzadas com lipídios, proteínas e bases nitrogenadas do DNA resultando na desestabilização celular, comprometimento da função e destruição do DNA, podendo alterar processos vitais (AUGUSTO, 2006; RAHMAN, 2007).

Sabe-se que as EROs desempenham diversos papéis fisiológicos essenciais no desenvolvimento fetal e neonatal como maturação e desenvolvimento neuronal (TSATMALI; WALCOTT; CROSSIN, 2005), atuam na proliferação de fibroblasto quando em baixas concentrações (MURRELL; MARTIN; BROMLEY, 1990), além de papel regulatório e sinalizador (JANKOV; NEGUS; TANSWELL, 2001). No entanto, quando um desequilíbrio na relação oxidantes/antioxidantes ocorre em favor dos agentes deletérios há propensão de algumas anormalidades como a isquemia cerebral em cordeiros (REY-SANTANO et al., 2011) e outros distúrbios biológicos em neonatos humanos como prematuridade, displasia broncopulmonar e retardo de crescimento (KAMATH et al., 2006; RAO et al., 2003).

Para debelar os efeitos deletérios das EROs, o organismo dos mamíferos conta com um poderoso sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Em humanos, sabe-se que as enzimas glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase estão envolvidas na defesa antioxidante enzimática neonatal (GURZANOVA-DURNEV; ZISOVISKA; DOSIC-MARKOVSKA, 2014; SHAHAB et al., 2008). As vitaminas C e E, adquiridas pela dieta (ABDUL-RAZZAK, et al., 2007; HUERTA et al., 1997; ROBLES; PALOMINO; ROBLES, 2001), juntamente com a bilirrubina e a glutathione (GSH) endógenas compõem parte do sistema não enzimático (SEDLAK et al., 2008; WIEDEMANN; KONTUSH; FINCKH, 2003). Sobre a bilirrubina, é proposto que seus altos valores estejam relacionados com a peroxidação lipídica em bebês, desempenhando um provável papel antioxidante (SHAHAB et al., 2008).

Nos neonatos equinos, até o presente momento não foram encontrados trabalhos que associassem enzimas e bilirrubinas como agentes antioxidantes. Sgorbini et al. (2015) conduziram um experimento envolvendo o estado oxidativo comparativo entre éguas e seus potros ao nascimento e verificaram menor potencial biológico antioxidante nos neonatos. Em bebês, foi proposto que na primeira semana de vida ocorra um aumento de subprodutos da peroxidação e que tal condição possa ser fruto de um sistema antioxidante pouco eficiente associado com o aumento da pressão de oxigênio ambiental (BUONOCORE et al., 2002).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o estado oxidativo de neonatos equinos saudáveis, a partir de sistemas enzimático e não enzimático, durante a primeira semana de vida.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

Foram avaliados vinte e quatro potros nascidos durante as estações de 2011/2012 e 2012/2013 em Piracaia, São Paulo - Brasil, latitude 23° 03' 14" S e longitude 46° 21' 29". Os critérios de inclusão foram: eutocia e neonatos com escore APGAR 7 ou 8 (KNOTTEMBELT et al., 2004) aos três e sessenta minutos após nascimento. O experimento foi aprovado e desenvolvido conforme as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 2441/2011.

4.2.2 Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de sangue total por venopunção jugular em tubos estéreis (Gel BD SST® II Advance®, BD, Brasil). Quatro momentos foram considerados: cinco minutos após o nascimento (momento 0), às 12; 72; e 168 horas de vida dos potros. Os tubos contendo as amostras foram submetidos à centrifugação a 1500 *rpm* durante 10 minutos para separação do soro. Em seguida, as amostras de soro foram aliquotadas e armazenadas em criotubos a -20° C, para posteriores análises: concentrações séricas de bilirrubina total (BILIT), bilirrubina direta (BILID) e bilirrubina indireta (BILII); grau de peroxidação lipídica pela concentração do TBARS; e atividade das enzimas SOD e GPx.

4.2.3 Análises bioquímicas

Após o descongelamento das alíquotas de soro sanguíneo, foram analisadas concentrações séricas de BILIT, BILID e BILII por meio de analisador bioquímico da marca Randox® (modelo Daytona, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom) com reagentes específicos para o equipamento.

4.2.4 Análises oxidativas

A peroxidação lipídica nos neonatos foi avaliada por meio do teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA) produzindo um complexo de coloração rósea quantificado por espectrofotometria, com comprimento de onda de 532 nm (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences).

No que diz respeito a quantificação da enzima GPx em soro sanguíneo seguiu a técnica descrita por Nichi et al. (2007), e a determinação da atividade da enzima SOD foi realizada segundo a técnica proposta por Flohé e Ötting (1984), sendo medida indiretamente, por meio da taxa de redução do citocromo C pelo O_2^- determinando-se a taxa de diminuição da redução do citocromo C.

4.2.5 Análise estatística

Foi utilizado o programa SAS System for Windows (SAS, 2000) para análise dos dados. Previamente, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, quando não respeitadas as premissas, os dados considerados *outliers* foram retirados e os valores foram transformados (raiz quadrada, logarítmico e inversão) para aplicação da estatística paramétrica. O efeito dos momentos de avaliação foi avaliado através do teste de médias *Tukey*. Além disto, os dados foram submetidos ao teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou de forma inédita o estado oxidativo de neonatos equinos saudáveis, a partir de sistemas enzimático, pela mensuração das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), e não enzimático, pela quantificação da bilirrubina, associados com a peroxidação lipídica, por meio da quantificação do malondialdeído (MDA) pelo teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) aos cinco minutos, 12, 72 e 168 horas pós nascimento.

Nossos resultados demonstram que a SOD não variou durante o período estudado (Tabela 1), corroborando com os autores que não detectaram efeito significativo dessa enzima no mesmo período analisado para neonatos humanos (FERENCZ; ORVOS; HERMESZ, 2015; SHAHAB et al., 2008). Ishida et al. (1997) verificaram, por meio do teste de Ressonância de *Spin* Eletrônico, que houve grande habilidade dos potros em remover o ânion superóxido do plasma sanguíneo logo após o nascimento e tal capacidade foi diminuída progressivamente nas 72 horas e 168 horas de vida, a partir disso, podemos sugerir que outros mecanismos possam estar envolvidos na remoção do superóxido e por isso não houve alteração da atividade dessa enzima no presente estudo.

Em contrapartida, Yin et al. (2013) realizaram experimento com leitões no qual os animais foram abatidos nos dias um, sete, 14 e 21 pós nascimento, e observaram que a atividade da SOD plasmática apresentou aumento entre leitões com um dia de vida quando comparados àqueles com sete dias de vida. Foi demonstrado também que tanto o aumento da atividade dessa enzima quanto a expressão do seu RNA mensageiro (GAÁL et al., 2006) foram significativos na primeira semana de vida. Já em bovinos, foi conferida à SOD papel protetor contra peroxidação lipídica em bezerros (GAÁL et al., 2006). Nossos resultados sugerem que a atividade da SOD não variou na primeira semana de vida dos potros, diferente dos neonatos suínos e bovinos. Foi proposto por Buetler, Krauskopf e Ruegg (2004) que o ânion superóxido está envolvido em funções biológicas como relaxamento vascular quando associado ao óxido nítrico, com a sinalização celular e com crescimento e diferenciação das células e tecidos. Foi pressuposto também por esses autores que dependendo das suas concentrações o papel deste ânion pode

variar de benéfico a destruidor. Neste sentido, uma vez que no presente trabalho foram avaliados potros hípidos, a não variação da SOD pode ser atribuída à função fisiológica do superóxido respeitando um provável limiar que é incapaz de provocar alteração no sistema antioxidante.

A SOD compõe um grupo clássico de defesa enzimática contra as EROs e tem por função catalisar o ânion superóxido tendo como produtos o oxigênio na sua forma molecular e o peróxido de hidrogênio (PERRY et al., 2010) reduzindo nesse sentido as quantidades circulantes do superóxido. Apesar disso foi proposto por Kwak et al. (1991) em um estudo conduzido *in vitro* com células do sistema nervoso, que a bilirrubina inibiu a produção do ânion superóxido, o que sugere que a mesma funcione como antioxidante. Assim, como alternativa para não variação da SOD na primeira semana de vida dos neonatos deste trabalho propomos que seja devido a um provável efeito inibitório da bilirrubina na geração do ânion superóxido. De forma semelhante Shahab et al. (2008) propuseram que em bebês os valores de SOD não teriam alterado devido ao desbalanço oxidativo ocorrido nos neonatos ter sido debelado pelo aumento da bilirrubina indireta nesses indivíduos. Corroborando com este presuposto, diferenças estatísticas significativas entre todos os momentos avaliados foram detectadas nas dosagens de BILIT, BILID e BILII. No tempo 0h, todas as concentrações foram mais baixas com relação aos demais tempos. Tanto a bilirrubina total quanto a indireta elevaram-se às 12 horas e então caíram entre as 72h e 168h. Já a BILID apresentou um pico apenas no tempo 72h (Tabela 1 e Figura 1). A bilirrubina não conjugada ou indireta é apontada como potente antioxidante em humanos (SALOMONE et al., 2013). Ao submetermos os dados ao teste de correlação de Pearson, foi observada correlação significativa entre a BILIT e BILII ($r = 0,99$ e $p < 0,0001$), essa correlação possivelmente justifica o padrão similar apresentado por elas durante os tempos analisados. Com isso verificamos que a principal forma da bilirrubina encontrada no organismo até 168 horas pós-nascimento dos neonatos equinos é BILII, e desta forma propomos que esta seja a principal bilirrubina envolvida na ação protetora aos oxidantes para estes animais. Assim, como alternativa para não variação da SOD na primeira semana de vida dos neonatos deste trabalho propomos que seja devido a um provável efeito inibitório da bilirrubina na geração do ânion superóxido.

Até o momento não há um mecanismo de ação estabelecido para a bilirrubina como agente antioxidante, o que se hipotetiza é que, em baixas concentrações, seu papel protetor esteja relacionado a um ciclo onde ao reagir com uma ERO esta seria neutralizada e a bilirrubina seria oxidada à biliverdina, e a última seria reduzida outra vez, pela biliverdina redutase, à bilirrubina (SEDLAK; SNYDER, 2004).

Em experimento medindo o consumo de bilirrubina foi verificado que a mesma teve suas concentrações reduzidas quando colocadas em diferentes sistemas contendo diferentes oxidantes como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, sugerindo dessa forma que essa biomolécula aja na eliminação das EROs (JANSEN et al., 2010). Junto a isso, foi sugerido que haja uma maior transferência de bilirrubina materno-fetal em estudo com mulheres e seus bebês o que poderia ajudar o recém-nascido a debelar, pelo menos em parte, o estresse oxidativo induzido, agindo como mecanismo compensatório que o parto ocasiona (DÍAZ-CASTRO et al., 2015). Górecka et al. (2002) verificaram que na segunda semana prévia ao parto as éguas apresentaram maiores valores de bilirrubina quando comparados aos sexto mês gestacional e na quarta semana pós-parto, bem como Harvey et al. (2005) perceberam esse aumento considerável no segundo mês prévio ao parto e no parto com rápida diminuição no primeiro mês pós-parto. Essas evidências nos levam a propor que isso provavelmente ocorreu devido a transferência de bilirrubina da mãe para o feto como citado anteriormente em humanos.

Observamos que a BILII se apresentou mais alta às 12 horas de vida dos potros, momento em que o grau de peroxidação lipídica observado pelo TBARS (Tabela 1) se manteve estável quando comparado ao momento do nascimento. Nossos resultados também demonstraram uma correlação negativa baixa ($r = -0,25$ e $p < 0,0024$), porém significativa, entre a BILII e as TBARS propondo o caráter protetor dessa biomolécula contra a peroxidação lipídica plasmática (STOKER, GLAZER e AMES, 1987). Isso corrobora com Sedlak et al. (2009) que indicaram que a bilirrubina esteja envolvida na proteção contra os ataques oxidativos aos lipídeos constituintes das membranas celulares e com Shahab et al (2008) que verificaram uma maior capacidade antioxidante total no grupo de bebês com maior nível de bilirrubina associado a um decréscimo progressivo na peroxidação lipídica. Vale ressaltar que não foram encontrados trabalhos com parâmetros de referência para os valores de bilirrubina para equinos ao nascimento, limitando as comparações,

tornando inéditos os valores aqui apresentados. Níveis muito altos de bilirrubina ao nascimento podem levar a um processo patológico que afeta o sistema nervoso denominado Kernicterus, raro em potros (LOYNACHAN; WILLIAMS; FREESTONE, 2007) e mais recorrente em bebês, onde pôde-se observar menor capacidade antioxidante total e enzimas antioxidantes (SHAHAB et al, 2008). Baseado nisso, é evidente a importância do estabelecimento dos valores de bilirrubinas em neonatos saudáveis apresentados neste trabalho, como parâmetros de referência e intervenção em caso de afecções.

O MDA, um subproduto da reação catalítica entre EROs e lipídios, é um biomarcador amplamente utilizado já que indiretamente nos revela o grau de peroxidação lipídica pela reação colorimétrica com o TBA (teste das TBARS) (KHAN; MATHAROO-BALL; SHAW, 2010; NICHI et. al, 2007; SARICI et al., 2015). Nossos resultados demonstraram haver diminuição nas concentrações do TBARS do dia do nascimento para as 72 e 168 horas pós-parto nos potros (Tabela 1), resultados que estão de acordo com a literatura consultada em suínos (YIN et al., 2013), onde foi observada diminuição do MDA do grupo de leitões abatidos no primeiro dia pós nascimento para o grupo abatido sete dias de nascidos. Sugerimos que essa redução provavelmente seja reflexo da eficiência do sistema antioxidante, mais especificamente da BILII e também que a mesma poupou os demais sistemas antioxidação nas primeiras 72h de vida, conforme também discutido por Shahab et al. (2008) em bebês.

A atividade da GP_x apresentou-se menor no tempo 0h, quando comparada aos tempos 12h e 72h, mas semelhante ao tempo 168h (Tabela 1). Este achado difere do trabalho realizado em neonatos suínos por Yin et al. (2013), onde houve aumento da atividade da GP_x do grupo analisado no primeiro dia pós-parto para o grupo analisado aos sete dias de vida, no entanto vale ressaltar que as amostras foram colhidas um dia após parto, diferindo do presente estudo no qual coletamos aos cinco minutos após o parto. Em bezerros, os resultados encontrados por Gaál et al. (2006) não demonstraram aumento da atividade desse sistema tanto no dia do parto, pré ingestão de colostro, quanto nos dias três, sete, 14 e 21 de nascidos.

A GP_x é responsável pela remoção de peróxidos de hidrogênio e peróxidos orgânicos (NG ey al., 2007), moléculas responsáveis pelo aumento da peroxidação

lipídica (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). No presente estudo, a GPx apresentou correlação negativa com as TBARS ($r = -0,179$ e $p = 0,0316$) e positiva tanto com a BILIT como com a BILII ($r = 0,242$ e $p = 0,002$; $r = 0,201$ e $p = 0,01$, respectivamente). Desta forma, propomos que a GPx agiu de forma conjunta com a BILII combatendo a peroxidação lipídica já que após aumento de ambos antioxidantes houve estabilização das TBARS às 12h e redução às 72h, momento em que a BILII se mostrou reduzida provavelmente pelo seu consumo (Tabela 1), como proposto por Benaron e Bowen (1991) onde a mesma teria sido consumida em situação de desbalanço oxidativo. Esses achados confluem para o mesmo ponto de Sedlak e Snyder (2004) que mencionaram um possível papel complementar entre a bilirrubina e o GSH (substrato utilizado pela GPx). Em bebês, foi possível verificar que a atividade da GPx foi maior quanto maiores as concentrações do MDA, provavelmente pela maior quantidade de lipídeos oxidados (LÁZÁR et al., 2014).

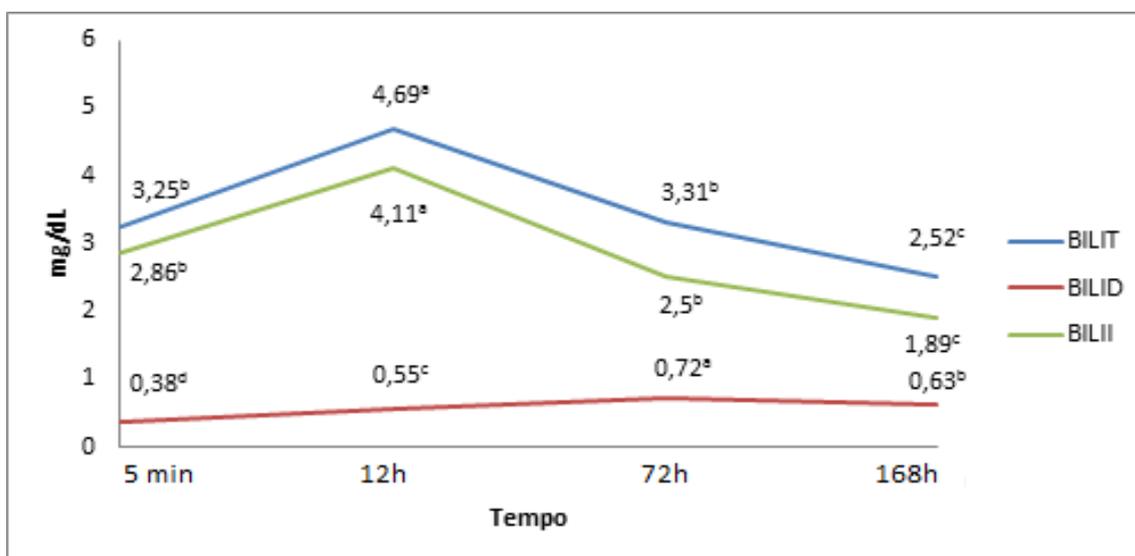
Como já mencionado, poucos estudos foram realizados relacionando pró-oxidantes e antioxidantes na neonatologia equina. Sgorbini et al. (2015), utilizando metodologia diferente da realizada no presente trabalho, porém com fins de mensurar a concentração dos metabólitos reativos ao oxigênio e o potencial biológico antioxidante no plasma sanguíneo venoso materno, da artéria umbilical e do sangue venoso dos potros, no momento do parto, verificaram que os recém-nascidos apresentaram menor potencial antioxidante biológico tanto pelo cordão umbilical quanto do plasma sanguíneo venoso, quando comparados aos adultos. Esses autores propuseram que o sistema antioxidante dos potros é ativado frente aos oxidantes horas após o nascimento, quando então, os neonatos são expostos a um ambiente hiperóxico. Além disto, Yin et al. (2013) relataram que a homeostase oxidativa dos neonatos é recuperada gradualmente com o desenvolvimento e ativação dos sistemas antioxidantes. Desta forma, nossos resultados complementam os obtidos por Yin et al. (2013) e Sgorbini et al. (2015), onde próximo ao nascimento encontramos valores mais baixos tanto das bilirrubinas quanto da GPx quando comparados às 12 horas pós parto (Tabela 1).

Tabela 1 - Influência dos períodos 5 minutos, 12, 72 e 168 horas pós-nascimento na atividade das enzimas antioxidantes GP_x e SOD, no grau de peroxidação lipídica (TBARS) e nos níveis das bilirrubinas total (BILIT), direta (BILID) e indireta (BILII) em potros.

VARIÁVEIS (M±EPM)	TEMPO APÓS NASCIMENTO				VALOR DE P
	5 min	12 h	72 h	168 h	
SOD	84,37 ^a	86,49 ^a	91,19 ^a	84,81 ^a	0,929
GP _x	44,10 ^b	59,76 ^a	67,86 ^a	54,54 ^{ab}	0,019
BILIT	3,25 ^b	4,69 ^a	3,31 ^b	2,52 ^c	< 0,0001
BILID	0,38 ^d	0,55 ^c	0,72 ^a	0,63 ^b	< 0,0001
BILII	2,86 ^b	4,11 ^a	2,50 ^b	1,89 ^c	< 0,0001
TBARS	419,53 ^a	325,75 ^{ab}	331,05 ^b	298,83 ^b	0,008

Letras diferentes nas mesmas linhas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 1 - Comportamento das bilirrubinas nos diferentes tempos, pós nascimento de neonatos equinos.



Letras diferentes nas mesmas linhas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Legenda: BILIT (bilirrubina total); BILID (bilirrubina direta); BILII (bilirrubina indireta).

4.4 CONCLUSÃO

A partir dos antioxidantes mensurados neste trabalho sugerimos que a SOD talvez não desempenhe papel efetivo durante o período neonatal avaliado ou que sua atividade não tenha sido alterada pela ausência de um desafio, já que todos os animais deste experimento eram saudáveis. A peroxidação lipídica ao nascimento apresentou-se alta sugerindo um balanço pró-oxidativo durante tal período, o que poderia caracterizar um aumento nos níveis de EROs com finalidade de completar importantes eventos fisiológicos. Em contrapartida, tanto a BILII quanto a GPx encontravam-se baixas ao nascimento e aumentaram suas concentrações nas 12h pós parto, com isso, podemos sugerir que frente aos altos níveis da peroxidação lipídica houve um estímulo para ativação dos sistemas antioxidantes que envolvem essas biomoléculas e que as duas tenham agido concomitantemente visando manter os elevados níveis de EROs em níveis não prejudiciais.

REFERÊNCIAS

ABDUL-RAZZAK, K. K.; NUSIER, M. K.; OBEDIAT, AHMAD, D.; SALIM, A. M. Antioxidant vitamins and hyperbilirubinemia in neonates. **GMS German Medical Science**, v. 5, p. 1–5, 2007.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 115 p

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.

BENARON, D. A.; BOWEN, F. W. Variation of initial serum bilirubin rise in newborn infants with type of illness. **The Lancet**, v. 338, p. 78–81, 1991.

BUETLER, T. M.; KRAUSKOPF, A.; RUEGG, U. T. Role of Superoxide as a Signaling Molecule Role of Superoxide as a Signaling Molecule. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 120–123, 2004.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; LONGINI, M.; VEZZOSI, P.; MARZOCCHI, B.; PAFFETTI, P.; BRACCI, R. Oxidative Stress in Preterm Neonates at Birth and on the Seventh Day of Life. **Pediatric research**, v. 52, n. 1, p. 46–49, 2002.

DÍAZ-CASTRO, J.; FLORIDO, J.; KAJARABILLE, N.; PRADOS, S.; DE PACO, C.; OCON, O.; PULIDO-MORAN, M.; OCHOA, J. J. A new approach to oxidative stress and inflammatory signaling during labour in healthy mothers and neonates. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

FERENCZ, Á.; ORVOS, H.; HERMESZ, E. Major differences in the levels of redox status and antioxidant defence markers in the erythrocytes of pre- and full-term neonates with intrauterine growth restriction. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 10–14, 2015.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Formation or removal of oxygen radicals. **Meth Enzimol**, v. 105, p. 92-104. 1984

GAÁL, T.; RIBICZEYNÉ-SZABÓ, P.; STADLER, K.; JAKUS, J.; REICZIGEL, J.; KÖVÉR, P.; MÉZES, M.; SÜMEGHY, L. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, n. 4, p. 391–396, 2006.

GAY, L. S.; KRONFELD, D. S.; DASCANIO, J. J.; SPLAN, R. K.; DUNNINGTON, E. A.; SKLAN, D. J. Tocopherol Concentrations in Mare and Foal Plasma and in Colostrum. **J Equine Vet Sci**, v. 24, n. 3, p. 115–120, 2004.

GÓRECKA, R.; KLECZKOWSKI, M.; KLUCIŃSKI, W.; KASZTELAN, R. Changes in Antioxidant Components in Blood of Mares During Pregnancy and After Foaling. **Bull. Vet. Inst Pulawy**, v. 46, p. 301–305, 2002.

GURZANOVA-DURNEV, I.; ZISOVSKA, E.; DOSIC-MARKOVSKA, B. Cord blood superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in premature infants. **J. Med. Biochem.**, v. 33, p. 208-215, 2014.

HALLIWELL, B. Superoxid, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. **Free Radical Research Comunication**, v. 5, n. 6, p. 315-318, 1989.

HUERTA, J. F. L.; PALOMINOB, N.; CARRASCOB, R.; QUILESA, J. Lipid Peroxidation and Antioxidants in Newborns. **Molec. Aspects Med.**, v. 18, p. 229–232, 1997.

ISHIDA, N.; SATO, F.; ASAI, Y.; MASUMIZU, T. Chronological Changes in the Superoxide-Scavenging Ability of. **J. Equine Sci.**, v. 8, n. 4, p. 109–111, 1997.

JANKOV, R. P.; NEGUS, A.; TANSWELL, A. K. Antioxidants as Therapy in the Newborn : Some Words of Caution. **Pediatric Research**, v. 50, n. 6, p. 681–687, 2001.

JANSEN, T.; HORTMANN, M.; OELZE, M.; OPITZ, B.; STEVEN, S.; SCHELL, R.; KNORR, M.; KARBACH, S.; SCHUHMACHER, S.; WENZEL, P.; MÜNZEL, T.; DAIBER, A. Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1 — evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, n. 2, p. 186–195, 2010.

KAMATH, U.; RAO, G.; KAMATH, S. U.; RAI, L. Maternal and fetal indicators of oxidative stress during intrauterine growth retardation (IUGR). **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 111–115, 2006.

KHAN, R. N.; MATHAROO-BALL, B.; SHAW, R. W. Antioxidant Enzyme Expression, Lipid Peroxidation, and Protein Oxidation in Human Myometrium With Parturition. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 1, p. 78–84, 2010.

KNOTTENBELT, D.; HOLDSTOCK, N.; MADIGAN, J. E. Intensive care, therapeutics and nursing. In: KNOTTENBELT, D.; HOLDSTOCK, N.; MADIGAN, J. E. **Equine neonatology: medicine and surgery**. Edinburgh: Saunders, 2006. cap. 8, p. 405-453.

KWAK, J. Y.; TAKESHIGE, K.; CHEUNG, B. S.; MINAKAMI, S. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1076, p. 369–373, 1991.

LÁZÁR, R.; ORVOS, H.; SZO, R.; VARGA, I. S. The quality of the antioxidant defense system in term and preterm twin neonates. **Redox Report** , v. 0, n. 0, p. 1–6, 2014.

LOYNACHAN, A. T.; WILLIAMS, N. M.; FREESTONE, J. F. Kernicterus in a neonatal foal. **J Vet Diagn Invest**, v. 19, p. 209–212, 2007.

MURRELL, G. A. C.; MARTIN, J.; BROMLEY, L. Modulation of fibroblast proliferation by free radicals. **Biochem. J.**, v. 265, p. 659–665, 1990.

NG, C. F.; SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R.; RODGERS, V. G. J. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. **Free Radical Research**. v. 41, n. 11, p. 1201-1211, 2007.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G.; CORTADA, C. N.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B.; BOLS, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Therio**. v.67, n.2, p. 334- 40, 2007.

PERRY, J. J. P.; SHIN, D. S.; GETZOFF, E. D.; TAINER, J. A. Biochimica et Biophysica Acta The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **BBA - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 245–262, 2010.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219–36, 2007.

RAO, G.; KAMATH, U.; RAGHOTHAMA, C.; PRADEEP, K. S.; RAO, P. Maternal and fetal indicators of oxidative stress in various obstetric complications chemicals : Preparation of oxidatively damaged. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 80–86, 2003.

REY-SANTANO, C.; MIELGO, V. E.; GASTIASORO, E.; MURGIA, X.; LAFUENTE, H.; RUIZ-DEL-YERRO, E.; SOLER, A. V.; HILARIO, E.; ALVAREZ, F. J. Early cerebral hemodynamic, metabolic and histological changes in hypoxic-ischemic fetal lambs during postnatal life. **Frontiers in Neuroscience**, v. 5, p. 1-12, 2011.

ROBLES, R.; PALOMINO, N.; ROBLES, A. Oxidative stress in the neonate. **Early Human Development**, v. 2, p. 75–81, 2001.

SALOMONE, F.; VOLT, G. L.; ROSSO, C.; GROSSO, G.; BUGIANESI, E. Unconjugated bilirubin, a potent endogenous antioxidant, is decreased in patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 28, p. 1202–1208, 2013.

SARICI, D.; GUNES, T.; YAZICI, C.; AKIN, M. A.; KORKMAZ, L.; MEMUR, S.; KURTOGLU, S.; OZTURK, M. A.; SARICI, S. U. Investigation on Malondialdehyde, S100B, and Advanced Oxidation Protein Product Levels in Significant Hyperbilirubinemia and the Effect of Intensive Phototherapy on these Parameters. **Pediatrics and Neonatology**, v. 56, p. 95-100, 2015.

SEDLAK, T. W.; SALEH, M.; HIGGINSON, D. S.; PAUL, B. D.; JULURI, K. R.; SNYDER, S. H. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. **PNAS**, v. 106, n. 13, p. 5171-5176, 2008.

SEDLAK, T. W.; SNYDER, S. H. Bilirubin Benefits : Cellular Protection by a Biliverdin Reductase. **Pediatrics**, v. 113, n. 6, p. 1776-1782, 2004.

SGORBINI, M.; BONELLI, F.; ROTA, A.; MARMORINI, P.; BIAGI, G.; CORAZZA, M.; PASQUINI, A. Maternal and neonatal evaluation of derivated reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential in the horse. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 48–51, 2015.

SHAHAB, M. S.; KUMAR, P.; SHARMA, N.; NARANGA, A.; PRASAD, R. Evaluation of oxidant and antioxidant status in term neonates : a plausible protective role of bilirubin. **Mol Cell Biochem.**, v. 317, p. 51–59, 2008.

STOCKER, R.; GLAZER, A. N.; AMES, B. N. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 5918-5922, 1987.

TSATMALI, M.; WALCOTT, E. C.; CROSSIN, K. L. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. **Brain Research**, v. 1040, p. 137–150, 2005.

WIEDEMANN, M.; KONTUSH, A.; FINCKH, B. Neonatal Blood Plasma Is Less Susceptible to Oxidation Than Adult Plasma Owing to Its Higher Content of Bilirubin and Lower Content of Oxidizable Fatty Acids. **Pediatric Research** , v. 53, n. 5, p. 9–11, 2003.

YIN, J.; REN, W.; LIU, G.; DUAN, J.; YANG, G.; WU, L.; LI, T.; YIN, Y. Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets. **Free Radical Research**, v. 47, n. 12, p. 1027–1035, 2013.

5 INFLUENCIA DA PARIDADE NO ESTABELECIMENTO DA HOMEOSTASE OXIDATIVA EM ÉGUAS GESTANTES E PERIPARTURIENTES

RESUMO

São evidentes as inúmeras alterações metabólicas que ocorrem com o avançar da gestação nas éguas e com isso, presume-se que produtos passíveis de oxidação estejam mais abundantes no período gestacional bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), já que no decorrer da gestação há uma alta demanda metabólica, energética e conseqüentemente maior demanda de oxigênio. Sendo assim, é pressuposto que haja a maior necessidade das fêmeas prenhes de ativarem os sistemas de defesa na tentativa de estabelecer a homeostase oxidativa, uma vez que os antioxidantes extracelulares são responsáveis por prevenir tanto a oxidação lipídica quanto proteica. Desta forma, esta pesquisa objetivou investigar as mudanças do estado oxidativo pela mensuração da atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase - GPx e superóxido dismutase - SOD), mensuração do metal ferro, e graus de peroxidação lipídica e oxidação de proteína durante o terço final da gestação, parto e pós-parto de éguas conforme a paridade com a hipótese de que as fêmeas nulíparas possuem maior dificuldade de estabelecer a homeostase oxidativa ao longo do período estudado. Para tanto, utilizou-se 20 éguas divididas em dois grupos experimentais, nulíparas e pluríparas. Foram quantificados as TBARS, oxidação proteica e o ferro total como parâmetros dos processos oxidativos, já as enzimas SOD e GPx foram as referências para a defesa antioxidante. Nossos resultados indicaram efeito de interação entre paridade e tempo gestacional apenas para o ferro total. Assim como a SOD, a oxidação proteica não apresentou alteração significativa no período estudado. Tanto a GPx quanto as TBARS apresentaram apenas efeito de tempo, com evidente alteração entre o parto e o pós-parto, sendo que houve aumento e diminuição, respectivamente, da atividade e das concentrações dessas variáveis. Concluímos, portanto que a paridade não tem influencia sobre o estabelecimento da homeostase oxidativa em éguas e que no momento do parto as mesmas passam por um desbalanço oxidativo transiente.

Palavras-chave: TBARS. GPx. Gestação. Peroxidação lipídica. Equinos.

ABSTRACT

The innumerable metabolic alterations that occur with the advancement of gestation in mares are evident and it is presumed that products susceptible to oxidation are more abundant in the gestational period as well as the production of reactive oxygen species (ROS), since during the course of gestation there is a high energy demand and consequently a greater oxygen demand. Thus, it is assumed that there is a greater need for pregnant females to activate the defense systems in an attempt to establish oxidative homeostasis, since extracellular antioxidants are responsible for preventing both lipid and protein oxidation. The objective of this research was to investigate the changes in the oxidative status by measuring the activity of antioxidant enzymes (glutathione peroxidase, GPx and superoxide dismutase, SOD), iron metal measurements, besides lipid and protein oxidation during the final third of gestation and postpartum of mares according to parity with the hypothesis that primiparous have greater difficulty in establishing oxidative homeostasis throughout the studied period. Twenty mares were divided into two experimental groups, primiparous and multiparous. TBARS, protein oxidation and total iron were quantified as parameters of the oxidative processes, whereas the SOD and GPx enzymes were the references for the antioxidant defense. Our results indicated interaction effect between parity and gestational time only for total iron. As with SOD, protein oxidation showed no significant change in the period studied. Both GPx and TBARS presented only a time effect, with an evident alteration between foaling and postpartum, and there was an increase and decrease, respectively, in the activity and concentrations of these variables. We conclude, therefore, that parity has no influence on the establishment of oxidative homeostasis in mares and that at the time of delivery they undergo transient oxidative imbalance.

Kee-words: TBARS. GPx. Gestation. Lipid peroxidation. Equine.

5.1 INTRODUÇÃO

São evidentes as inúmeras alterações metabólicas que ocorrem com o avançar da gestação nas éguas (BAZZANO et al., 2014a, 2014b, 2014c, 2016a, 2016b) e com isso, presume-se que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) seja aumentada, já que no decorrer da gestação há uma alta demanda energética e conseqüentemente maior demanda de oxigênio. Sendo assim, é pressuposto que haja maior necessidade das fêmeas prenhes de ativarem os sistemas de defesa na tentativa de manter a homeostase oxidativa, uma vez que os antioxidantes extracelulares são responsáveis por prevenir tanto a oxidação lipídica quanto proteica (OTTAVIANO; HANDY; LOSCALZO, 2008).

Sabe-se que dentre as EROs o radical hidroxila é altamente danoso às células e o mesmo pode ser produzido a partir de uma reação específica denominada de Fenton (KEHRER, 2000; THOMAS et al., 2009). Na presença do ânion superóxido e do ferro gera-se o radical hidroxila que ao reagir com ácidos graxos insaturados desencadeia uma cascata de peroxidação lipídica das membranas biológicas e lipoproteínas (apud CASANUEVA; VITERI, 2003; ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001).

O estado oxidativo no decorrer da gestação das mulheres é amplamente estudado (DÍAZ-CASTRO et al., 2015; LEKHARU et al., 2014; PATIL; KODLIWADMATH; KODLIWADMATH, 2007; UPADHYAYA et al., 2005). Relatos indicam um aumento de biomarcadores oriundos dos danos promovidos pelas EROs sobre lipídios e proteínas tanto sob processo patológico (COUGHLAN et al., 2004) como em mulheres grávidas saudáveis quando comparadas com não grávidas (LEKHARU et al., 2014). Ainda assim, foi sugerido por Manzano et al. (2015) que um bom estado antioxidante de mulheres no terceiro trimestre gestacional está relacionado positivamente com o peso ao nascer dos bebês. Por outro lado um aumento no grau de peroxidação lipídica pode afetar negativamente o peso dos recém-nascidos, um parâmetro que é fortemente associado com a ocorrência de doenças nos bebês (WILCOX, 2001). Quanto aos potros, foi sugerido que aqueles menores e menos desenvolvidos estão mais propensos a desenvolver falha da transferência passiva de anticorpos colostrais (CLABOUGH et al., 1991).

Escassos são os trabalhos acerca dos processos oxidativos e antioxidantes envolvidos na gestação das éguas no parto e pós-parto o que torna o presente

estudo significativamente relevante e inovador. Górecka et al. (2002) avaliaram as mudanças dos antioxidantes em éguas prenhes no sexto mês de gestação, dois meses pré-parto e no pós-parto. Mais recentemente Sgorbini et al. (2015) conduziram experimento com éguas no qual observaram parâmetros oxidativos e antioxidantes no momento do parto.

Esta pesquisa objetivou investigar as mudanças do estado oxidativo pela mensuração da atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, GPx e superóxido dismutase, SOD), mensuração do metal ferro, e graus de peroxidação lipídica e oxidação de proteína de éguas conforme a paridade, com a hipótese de que as múltíparas possuem maior dificuldade de estabelecer a homeostase oxidativa ao longo do período estudado, baseado na literatura encontrada em mulheres.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Animais

Participaram do experimento vinte éguas da raça Mangalarga Paulista durante a estação reprodutiva de 2015/2016 em Piracaia, São Paulo - Brasil, latitude 23° 03' 14" S e longitude 46° 21' 29". Todos os animais foram vacinados e vermifugados, e a partir de um mês antecedente à data prevista do parto foi fornecido às éguas um kg de concentrado comercial (15% de proteína, Equitage 15 Guabi®) diariamente até o desmame dos potros. Somente éguas que levaram a gestação a termo, sem intercorrências foram incluídas no estudo. As éguas foram divididas em dois grupos experimentais quanto à paridade: Grupo 1 (nulíparas) e Grupo 2 (pluríparas). O experimento foi aprovado e desenvolvido conforme as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo CEUA número 5888210814.

5.2.2 Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de sangue total por venopunção jugular em tubos estéreis para soro (Gel BD SST® II Advance®, BD, Brasil) e plasma (Tubo Vacuplast a Vácuo 13x75MM EDTA K3, Vacuplast®, Brasil) As coletas foram feitas semanalmente a partir dos quatro meses antecedentes a data prevista do parto, considerando 343 dias de gestação para a raça Mangalarga, conforme estabelecido em pesquisas prévias do nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2016). Também foi realizada uma coleta em torno das 12 horas pós-parto e as coletas seguiram semanalmente até a detecção da segunda ovulação pós-parto. Os tubos contendo as amostras foram submetidos à centrifugação a 1500 *rpm* durante 10 minutos para separação do soro e plasma sanguíneo. Em seguida, para posterior análise, as amostras de soro foram alíquotadas em criotubos de 1,5 mL para mensuração do ferro total; já as amostras de plasma foram alíquotadas em criotubos de 1,5 mL num volume de 100 µL cada para análise da atividade da GPx e SOD, e oxidação proteica, e em um volume de 300 µL para o teste da TBARS. As análises foram feitas mensalmente considerando regressivamente o dia exato do parto, para tanto, foi feito um *pool* das amostras coletadas resultando em 4 alíquotas pré-parto analisadas de cada égua.

5.2.3 Análise do ferro total

Após o descongelamento das alíquotas do soro sanguíneo, foram analisadas as concentrações totais do metal ferro por meio de analisador bioquímico automático marca Randox® (modelo Daytona, país de origem Irlanda do Norte - Reino Unido) com reagentes específicos para o equipamento.

5.2.4 Análises oxidativas

Quanto à oxidação de proteína, a metodologia foi baseada em Levine et al. (1990) e Odetti et al. (1996) modificada e padronizada para a espécie equína. Foram retiradas alíquotas de 50 µL das amostras que foram diluídas em água mili q na proporção de 1:1. Vale ressaltar que as análises foram feitas em duplicata (denominadas A e B) para que cada alíquota tivesse o seu branco. Foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético (TCA – T 6399-100g Sigma®) a 20% às para promover a precipitação das proteínas. Após isso, as amostras foram centrifugadas em criotubos de dois mL da marca Eppendorf® a 1100 g por 10 minutos à temperatura de 5 °C e posteriormente o sobrenadante foi descartado. Nas alíquotas A 500 µL de 2,4 dinitrofenilhidrazina (D 199303 – 100g Sigma®) foram adicionados e nas alíquotas B de cada amostra adicionou-se 500 µL de ácido clorídrico (HCL – 38283-1EA - Sigma) em concentração de dois molar. Logo depois, as amostras foram colocadas em banho seco a 37°C por uma hora e dentro deste período, agitou-se os criotubos a cada 15 minutos com auxílio de vórtex. Passado esse tempo, 500 µL de TCA 20% foram adicionados e logo após as amostras foram submetidas à centrifugação a 1100 g por cinco minutos sob 5°C. depois de descartado o sobrenadante, as amostras foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente (21° C) numa solução de etanol (C₂H₅OH – 1336 Dinâmica) e acetato de etila (CH₃COOC₂H₅ – Dinâmica) (1:1) e depois submetidas a centrifugação por 15 minutos a 1100g em temperatura ambiente e posteriormente desprezou-se o sobrenadante. Feito isso, os *pellets* foram dissolvidos com 2 mL de hidróxido de sódio (Dinâmica®) na concentração de 1 molar, e colocados em banho seco a 37° C por 15 minutos. Passado o tempo, as amostras foram submetidas à centrifugação durante cinco minutos a 1100 g sob temperatura de 5° C. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para cubetas 1,5 mL apropriadas para leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences). Procedeu-se

a leitura das amostras à absorvância de 380 nm. Vale ressaltar que no início da leitura uma cubeta contendo apenas hidróxido de sódio foi colocada no aparelho, configurando uma amostra branco. Dados os resultados a diferença entre as alíquotas de cada amostra (A – B) foi obtida.

Para chegar ao resultado final da oxidação de proteínas, os valores acima obtidos foram corrigidos conforme a concentração proteica de cada amostra conforme seguinte descrição: inicialmente 5 µL da amostra foi diluída em 495 µL de hidróxido de sódio (Dinâmica®) a 0,1 molar, após isso, a cada amostra foi adicionado 2,5 mL do reagente quatro e homogeneizado por meio do vórtex e deixado em descanso por 10 minutos em temperatura ambiente. Passado o tempo, adicionou-se 250 µL do reagente cinco e imediatamente homogeneizou-se as amostras e posteriormente deixadas em descanso por 30 minutos. Após esse período, as amostras foram transferidas para cubetas apropriadas para leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences). Vale ressaltar que no início da leitura utilizou-se 500 µL de hidróxido de sódio a 0,1 molar como branco.

A peroxidação lipídica nos neonatos foi avaliada por meio do teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA) produzindo um complexo de coloração rósea quantificado por espectrofotometria, com comprimento de onda de 532 nm (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences).

No que diz respeito a quantificação da enzima GPx em soro sanguíneo seguiu a técnica descrita por Nichi et al. (2007), e a determinação da atividade da enzima SOD foi realizada segundo a técnica proposta por Flohé e Ötting (1984), sendo medida indiretamente, por meio da taxa de redução do citocromo C pelo O₂⁻ determinando-se a taxa de diminuição da redução do citocromo C.

5.2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias. Quando a normalidade e/ou homogeneidade do teste foi significativa (P<0,05), os dados foram transformados e reavaliados. Comparações entre os grupos foram analisadas para efeitos principais de grupo e tempo, assim como para efeito de interação grupo x tempo. As análises foram realizadas pelo procedimento misto (PROC MIXED) do SAS (Versão 9.3; SAS

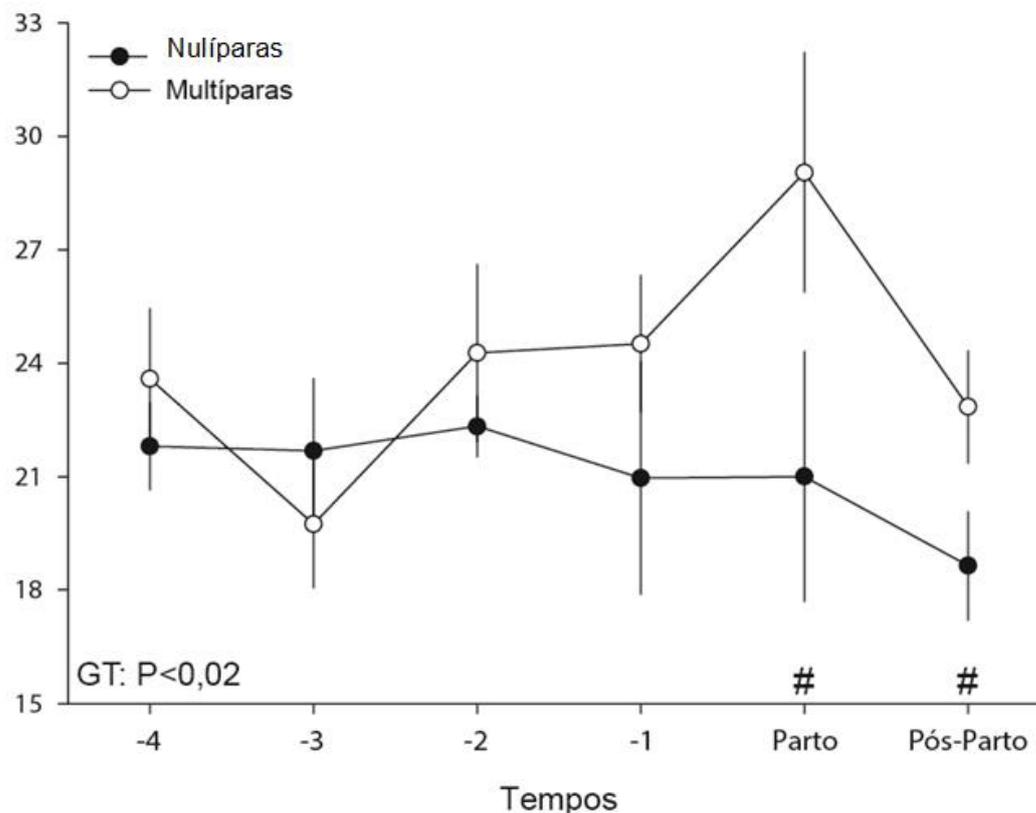
Institute, Inc., Cary, NC, USA) utilizando a função *repeated* para a autocorrelação entre mensurações sequenciais. Quando foi observado algum efeito significativo, as médias foram então separadas pelo procedimento PDIFF do SAS. A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como diferença. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou de forma inédita, o estabelecimento da homeostase oxidativa em fêmeas equinas saudáveis prenhes, a partir do quarto mês antecedente à data prevista do parto, no intervalo de até 12 horas após o delivramento, e até a segunda ovulação pós-parto, por meio da mensuração das atividades das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) e pela quantificação do metal ferro, associados com a peroxidação lipídica, por meio da quantificação do malondialdeído (MDA) pelo teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e oxidação de proteína (OP) considerando a paridade dos animais, nulíparas e pluríparas.

O ferro foi a única das variáveis estudadas que apresentou efeito de interação entre a paridade e o tempo. Pudemos verificar que durante o parto as éguas nulíparas mantiveram os níveis de ferro estáveis, enquanto que as pluríparas elevaram os níveis consideravelmente, já no pós-parto, mesmo havendo diferença entre os dois grupos, ambos declinaram seus valores (Figura 2). O ferro está envolvido diretamente na formação do radical hidroxila, o mais deletério e grande responsável pela peroxidação lipídica (THOMAS et al., 2009), provavelmente a redução desse metal no pós-parto esteja relacionado com a diminuição dos subprodutos da lipoperoxidação. É possível estabelecer um paralelo entre nossos resultados e a lactoferrina, uma proteína responsável por carrear os íons de ferro e que está presente na circulação sanguínea e em maiores quantidades no colostro (BARTON et al., 2006).

Figura 2. Interação entre tempo e grupo de paridade da variável ferro em éguas.



Notas: A cerquilha (#) indica uma tendência de diferença ($P < 0,1$) entre os grupos de paridade dentro dos períodos especificados. Probabilidades para efeito de grupo (G), tempo (T) ou interação grupo x tempo (GT) que foram estatisticamente significativos ou aproximaram-se de ser significativos estão apresentados.

Não verificamos diferenças significativas na oxidação proteica no período analisado, isso provavelmente devido a não alteração nas concentrações de albumina, globulinas e proteínas totais de éguas prenhes quando comparadas a éguas paridas (HARVEY et al., 2005).

Trabalhos que envolvam a influência da paridade tanto de mulheres quanto de animais nos parâmetros oxidantes e antioxidantes são escassos. No entanto, a partir das análises aqui apresentadas foi possível verificarmos que com exceção do ferro total, a paridade não teve influência sobre as variáveis, diferente do que foi proposto por Golalizadeh et al. (2016) onde verificaram que em mulheres nulíparas a capacidade antioxidante total foi maior em relação às plúripas, sendo assim, estes autores sugeriram que indicadores de estresse oxidativo são mais elevados em mulheres com mais de um parto. Foi observado também, que os níveis de TBARS

foram mais elevados em mulheres grávidas com três ou mais partos quando comparadas àquelas com um ou dois partos (IDONIJE et al., 2011).

A atividade da SOD também não apresentou diferença tanto entre os tempos estudados quanto entre os tratamentos. Isso parece acontecer também em mulheres (DÍAZ-CASTRO et al., 2015; PATIL; KODLIWADMATH; KODLIWADMATH, 2007) e ovelhas (CELI; TRANA; CLAPS, 2010), mas diferente do que ocorre em vacas de leite, onde foi verificada oscilação na atividade dessa enzima com o aproximar do parto e no pós-parto (BERNABUCCI et al., 2005; GAÁL et al., 2006). As últimas, no entanto, provavelmente possuem comportamento diferente por serem animais de alta produção e terem um desafio energético superior das demais espécies devido as alterações metabólicas que ocorrem sob regulações endócrinas no início da lactação (CASTILLO et al., 2006). Entretanto, existe relato na literatura que em éguas a atividade da SOD é aumentada duas semanas antes do parto quando comparada nos seis meses gestacionais e na quarta semana pós-parto (GÓRECKA et al., 2002). Todavia, propomos que o momento da coleta seja a justificativa para a divergência desses resultados com os nossos, onde nós avaliamos as éguas mensalmente por meio de um *pool* entre as amostras coletadas semanalmente, uma forma mais fidedigna de amostragem que representa todo o período de avaliações, ao passo que os demais autores realizaram a colheita em um dia específico. Foi proposto que o ânion superóxido é responsável pela diminuição da contratilidade do miométrio uterino em mulheres (WARREN et al., 2005), baseado nisso, acreditamos que a atividade da SOD não se eleve durante o parto desses animais devido os mesmos não terem demonstrado alterações durante o período analisado, sobretudo no parto, uma evidência de que provavelmente os mesmos estivessem em homeostase oxidativa, não sendo necessária a ação da SOD.

Já com relação às demais variáveis, a GPx (Tabela 2) e TBARS (Tabela 3) apresentaram efeito de tempo entre os períodos analisados.

Tabela 2 - Variação da GPx durante os quatro meses pré-parto, no parto e pós-parto em éguas nulíparas (1) e pluríparas (2).

GPX						
Tempo	PARIDADE		Média	Valor de P		
	1	2		Trat	Tempo	Trat*Tempo
-4	180.84 ± 11.24	143.89 ± 23.56	158.10 ± 15.57 ^b	-	-	-
-3	130.35 ± 33.78	131.59 ± 17.00	131.23 ± 14.97 ^{bc}	-	-	-
-2	84.76 ± 28.43	114.52 ± 8.61	105.77 ± 10.34 ^c	-	-	-
-1	129.2 ± 34.04	119.86 ± 18.80	122.60 ± 16.06 ^{bc}	-	-	-
Parto	118.09 ± 35.92	119.72 ± 19.62	119.22 ± 16.64 ^{bc}	-	-	-
Pós-Parto	234.92 ± 15.32	175.40 ± 27.84	195.24 ± 20.27 ^a	-	-	-
Geral	147.33 ± 13.81	132.93 ± 8.00	137.47 ± 6.99	0,669	<0.0001	0,557

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os tempos para $p < 0,05$.

Tabela 3 - Variação da TBARS durante os quatro meses pré-parto, no parto e pós-parto em éguas.

TBARS						
Tempo	PARIDADE		Média	Valor de P		
	1	2		Trat	Tempo	Trat*Tempo
-4	131.73 ± 53.03	48.32 ± 11.19	80.4 ± 23.3 ^a	-	-	-
-3	31.11 ± 10.96	38.38 ± 10.7	36.57 ± 8.35 ^c	-	-	-
-2	92.34 ± 46.96	51.55 ± 8.11	63.55 ± 14.68 ^{ab}	-	-	-
-1	47.93 ± 14.69	63.32 ± 14.75	58.79 ± 11.16 ^{abc}	-	-	-
Parto	118.31 ± 70.17	82.99 ± 36.01	94.76 ± 31.98 ^a	-	-	-
Pós-Parto	51.94 ± 26.45	48.03 ± 20.51	49.33 ± 15.72 ^{bc}	-	-	-
Geral	79.19 ± 16.97	54.35 ± 6.92	62.08 ± 7.16	0,399	0,007	0,635

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os tempos para $p < 0,05$.

Ao longo do tempo, a GPx apresentou uma redução da sua atividade do quarto para o segundo mês gestacional precedente ao parto, a partir do qual manteve-se constante até o parto. No entanto, no pós-parto pudemos verificar que sua atividade foi aumentada, sugerindo com isso, que mesmo com toda demanda energética e metabólica durante o período gestacional, os processos de oxidação podem ser eventos fisiológicos importantes sem que haja necessidade de alterações na atividade da GPx. No entanto, provavelmente o aumento da atividade enzimática após o parto seja fundamental aos processos que envolvam reorganização uterina incluindo a invasão neutrofílica no pós-parto, a lactação, além da retomada da ciclicidade e alterações hormonais que culminam com o cio do potro (GÜNDÜZ;

KAŞIKCI; EKIZ, 2008; JISCHA et al., 2008). Em estudo realizado com amostras de miométrio uterino de mulheres submetidas a cesariana por não entrarem em trabalho de parto, foi percebido que o peróxido de hidrogênio foi responsável pelo relaxamento miometrial, tendo esse efeito inibitório reduzido apenas quando posto em incubação com a catalase, um antioxidante responsável por anular o efeito do peróxido de hidrogênio (WARREN et al., 2005). Baseado nessas informações, sugerimos que a GPx tenha aumentado sua atividade no período pós-parto a fim de evitar o relaxamento miometrial necessário para que os eventos do puerpério decorram de forma adequada.

Em vacas leiteiras a atividade da GPx aumenta durante a última semana pré-parto culminando com valores mais elevados no pós-parto (BERNABUCCI et al., 2005), semelhante aos resultados do presente estudo. Já em mulheres saudáveis, Swati, Sarvesh e Sourabh (2015) verificaram que houve alta atividade dessa enzima já no terceiro trimestre gestacional. No entanto, nossos resultados se contrapõem aos encontrados por Góreck et al. (2002) que verificaram decréscimo significativo na atividade da GPx em éguas prenhes durante os períodos coletados, aos seis meses de gestação, na segunda semana antecedente ao parto e na quarta semana após o parto. No entanto, estes achados são pouco comparáveis uma vez que a análise realizada no período de pós parto do presente estudo, contemplar o *pool* de amostras feitas semanalmente até a segunda ovulação.

Avaliando a TBARS ficou claro um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica no momento do parto deixando evidente que é provável que haja grande produção de EROs durante o mesmo, o que pode ser atribuído a uma possível função no desencadeamento do parto por parte dessas moléculas como sugerido por Yaacobi, Ohel e Hochman (1999).

Em mulheres gestantes foi possível verificar que as quantidades de produtos da peroxidação lipídica estavam aumentadas, presumindo dessa forma que o estado gestacional aumenta fisiologicamente tais produtos (IDONIJE et al., 2011; SWATI; SARVESH; SOURABH, 2015). Quanto ao nosso trabalho, tal observação foi impossibilitada de ser realizada uma vez que tivemos como fator limitante a ausência de um grupo controle com éguas vazias já que os animais desse experimento pertenciam à uma central de reprodução, impedindo a formação do grupo em questão. Em estudo conduzido por Bouwstra et al. (2008) com novilhas, verificou-se que os níveis de MDA de ambos grupos experimentais, suplementado e

não suplementado com vitamina E aumentaram no parto. Baseado nos níveis de MDA foi proposto por esses autores que as novilhas passam por desbalanço oxidativo no parto, mesmo aquelas suplementadas com o antioxidante.

Analisando os níveis de TBARS e antioxidantes em mulheres grávidas e não grávidas, Upadhyaya et al. (2005) verificaram que o sistema antioxidante das grávidas evidenciou menores quantidades de antioxidantes não enzimáticos quando comparadas às não grávidas e associado a isso, os níveis de peroxidação lipídica foi maior nas gestantes, assim como foi relatado por Patil, Kodllwadmath e Kodllwadmath (2007), quando verificaram menores atividades das enzimas SOD e GPx.

O parto é um evento naturalmente inflamatório devido a elevada quantidade de citocinas pró-inflamatórias (DÍAZ-CASTRO et al., 2015) além de no útero e cérvix serem encontradas grandes quantidades de células inflamatórias como neutrófilos e monócitos (KELLY, 2002). Sabe-se que tais mediadores e células estão relacionados com o aumento da geração de EROs e que essas são responsáveis pela modulação de prostaglandinas, atuantes na contração miométrial (MUTINATI et al., 2013) e relaxamento da cérvix, bem como o estrogênio que também favorece a atividade miométrial (JENKIN; YOUNG, 2004). De forma semelhante Shimitz, Levine e Nathanielsz (2006) propuseram que tanto o estrogênio quanto a prostaglandina E₂ estejam envolvidas nas alterações musculares e principalmente nos vasos sanguíneos, o que facilitaria invasão leucocitária e relaxamento muscular durante a dilatação da cérvix, inclusive com provável indução no aumento da síntese de espécies reativas.

Em éguas (ABOEL-MAATY et al., 2012) e cadelas foram verificadas altas concentrações de produtos da peroxidação lipídica no período em torno da ovulação, momento em que os níveis estrogênicos circulantes também estão elevados, sugerindo então, que as EROs estejam relacionadas ao processo inflamatório agudo decorrente da ovulação, ao aumento das atividades imunológica e metabólica, às alterações celulares e à e atividade contrátil do miométrio promovidas pelos altos níveis estrogênicos na cadela (RIZZO et al., 2009). Portanto, sugerimos que o aumento estrogênico no parto possa, de forma semelhante, influenciar o aumento das TBARS durante o mesmo, e paralelo a isso associamos que a disponibilidade de ferro diminuída no período pós-parto possivelmente influenciou na redução da peroxidação lipídica.

Em estudo feito em ovelhas, observou-se que houve um aumento de EROs no intervalo entre 36 horas pré-parto e 36 horas pós-parto, e para tanto os autores sugeriram duas alternativas: o aumento poderia ser causado pelo processo inflamatório agudo que o parto representa, assim como tal geração de EROs seja um estímulo para sinalizar o momento do parto. Desta forma as EROs poderiam ser consideradas tanto consequência como causa da inflamação subjacente ao parto natural. Foi hipotetizado, também pelos autores que o aumento das concentrações das EROs sejam dependentes das altas atividades enzimáticas e metabólicas envolvidas na síntese estrogênica e nas alterações uterinas em torno do parto (RIZZO et al., 2008).

Junto a isso, os resultados apresentados por Díaz-Castro et al. (2015) mostraram um aumento dos indicadores de danos oxidativos em mulheres juntamente com elevadas quantidades de citocinas proinflamatórias associadas à diminuição do estado antioxidante total durante o parto, diante disso sugere-se que o delivramento seja responsável por forte agressão oxidativa à mãe. Portanto é plausível afirmar que o aumento da geração de EROs durante o trabalho de parto seja um evento previsível, uma vez que os níveis de EROs são conhecidos por serem aumentados acentuadamente, em especial nas condições de alta demanda metabólica tanto em animais como em humanos (RIZZO et al., 2012).

Alguns autores afirmam que um bom estado antioxidante reflete positivamente no peso ao nascer em bebês (MANZANO et al., 2015) e consequentemente há efeito sobre o estado antioxidante dos neonatos (UPADHYAYA et al., 2005). Deste modo sugerimos que o equilíbrio nos animais do presente estudo estava mantido, uma vez que as gestações resultaram em potros saudáveis.

Pelo fato de nossas análises compreenderem apenas o terço final da gestação, propomos que as alterações de TBARS e GPx só estejam evidentes no pós-parto, talvez devido as éguas já estarem em homeostase oxidativa desde um momento gestacional anterior. É provável que frente as alterações ocorridas entre parto e pós-parto, estes animais tenham que promover alterações, como as apresentadas aqui, em busca da manutenção do equilíbrio oxidativo.

5.4 CONCLUSÃO

Concluimos, portanto que a paridade não tem influência sobre o estabelecimento da homeostase oxidativa em égua. Podemos sugerir que no terço final da gestação em equinos, comparado com o momento do parto não haja mudanças tão significantes no que diz respeito aos indicadores de defesa antioxidante e oxidação. Sugerimos, portanto que devido as éguas já estarem em homeostase oxidativa as alterações na SOD e GPx só ocorreram após a parição. Provavelmente, diante das novas mudanças fisiológicas ocorridas estes animais foram levados a uma readaptação durante esse momento de desbalanço transiente, e necessário, em busca do equilíbrio oxidativo

REFERÊNCIAS

- ABOEL-MAATY, A. M.; SHATA, F. Y. H.; MAHMOUD, M. B. E.; GABR, F. I. Oxidant/antioxidant status during foal heat in Arab mares and their relation to ovarian hormones. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 1, n. 3, p. 198–202, 2012.
- APPIAH, I.; MILOVANOVIC, S.; RADOJICIC, R.; NIKOLIC-KOKIC, A.; ORESCANIN-DUSIC, Z.; SLAVIC, M.; TRBOJEVIC, S.; SKRBIC, R.; SPASIC, M.; BLAGOJEVIC, D. Hydrogen peroxide affects contractile activity and anti-oxidant enzymes in rat uterus. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 8, p. 1932–1941, 2009.
- BARTON, M. H.; HURLEY, D.; NORTON, N.; HEUSNER, G.; COSTA, L.; JONES, S.; BYARS, D.; WATANABE, K. Serum Lactoferrin and Immunoglobulin G Concentrations in Healthy or Ill Neonatal Foals and Healthy Adult Horses. **J Vet Intern Med**, v. 20, p. 1457–1462, 2006.
- BAZZANO, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; ARFUSO, F.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G. Metabolic profile of broodmares during late pregnancy and early post-partum. **Reprod Domest Anim**, v. 49, n. 6, p. 947–953, 2014a.
- BAZZANO, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; MARAFIOTI, S.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G. Hemostatic profile during late pregnancy and early postpartum period in mares. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 639–643, 2014b.
- BAZZANO, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; RIZZO, M.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G. Physiological adjustments of haematological profile during the last trimester of pregnancy and the early post partum period in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3–4, p. 199–203, 2014c.
- BAZZANO, M.; GIUDICE, E.; FAZIO, F.; ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; PICCIONE, G. Serum protein electrophoresis profile during late pregnancy and early post partum period in mares. **Animal Science Papers and Reports**, v. 34, n. 1, p. 53–60, 2016a.
- BAZZANO, M.; GIUDICE, E.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; SCOLLO, C.; PICCIONE, G. The peripartum period influenced the serum macromineral profile in mares. **Archiv Tierzucht**, v. 59, n. 1, p. 65–70, 2016b.
- BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 88, n. 6, p. 2017–2026, 2005.

BOUWSTRA, R. J.; GOSELINK, R. M. A.; DOBBELAAR, P.; NIELEN, M.; NEWBOLD, J. R.; VAN WERVEN, T. The Relationship Between Oxidative Damage and Vitamin E Concentration in Blood, Milk, and Liver Tissue from Vitamin E Supplemented and Nonsupplemented Periparturient Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 977–987, 2008.

CASANUEVA, E.; VITERI, F. E. Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1700-1708, 2003.

CASTILLO, C.; HERNÁNDEZ, J.; VALVERDE, I.; PEREIRA, V.; SOTILLO, J.; LÓPEZ ALONSO, M.; BENEDITO, J. L. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 2, p. 133–139, 2006.

CELI, P.; TRANA, A. Di; CLAPS, S. Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 1, p. 95–99, 2010.

CLABOUGH, D. L.; LEVINE, J. F.; GRANT, G. L.; CONBOY, H. S. Factors associated with failure of passive transfer of colostral antibodies in Standardbred foals. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 6, p. 335–40, 1991.

COUGHLAN, M. T.; VERVAART, P. P.; PERMEZEL, M.; GEORGIU, H. M.; RICE, G. E. Altered Placental Oxidative Stress Status in Gestational Diabetes Mellitus. **Placenta**, v. 25, n. 1, p. 78–84, 2004.

DÍAZ-CASTRO, J.; FLORIDO, J.; KAJARABILLE, N.; PRADOS, S.; DE PACO, C.; OCON, O.; PULIDO-MORAN, M.; OCHOA, J. J. A new approach to oxidative stress and inflammatory signaling during labour in healthy mothers and neonates. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

ERCAL, N., GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n.6, p. 529-539, 2001.

FERREIRA, J. R. M.; MEIRELLES, M. G.; GUIMARÃES, C. F.; ALONSO, M. A.; NICHI, M.; FERNANDES, C. B. Factors affecting gestational length in the Mangalarga Paulista breed. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 117–121, 2016.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Formation or removal of oxygen radicals. **Meth Enzimol**, v. 105, p. 92-104. 1984

GÁÁL, T.; RIBICZEYNÉ-SZABÓ, P.; STADLER, K.; JAKUS, J.; REICZIGEL, J.; KÖVÉR, P.; MÉZES, M.; SÜMEGHY, L. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, n. 4, p. 391–396, 2006.

GOLALIZADEH, F.; SHOBEIRI, F.; RANJBAR, A.; NAZARI, M. Maternal Parity and Blood Oxidative Stress in Mother and Neonate. **Biotechnology and Health Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2016.

GÓRECKA, R.; KLECZKOWSKI, M.; KLUCIŃSKI, W.; KASZTELAN, R. Changes in Antioxidant Components in Blood of Mares During Pregnancy and After Foaling. **Bull. Vet. Inst Pulawy**, v. 46, p. 301–305, 2002.

GÜNDÜZ, M. C.; KAŞIKCI, G.; EKIZ, B. Follicular and steroid hormone changes in Arabian mares in the postpartum period. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1–4, p. 200–205, 2008.

HARVEY, J. W.; PATE, M. G.; KIVIPELTO, J.; ASQUITH, R. L. Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. **Veterinary clinical pathology**, v. 34, n. 3, p. 248–254, 2005.

IDONIJE, O. B.; FESTUS, O.; OKHIAI, O.; AKPAMU, U. A comparative study of the status of oxidative stress in pregnant Nigerian women. **Research Journal of Obstetrics and Gynecology**, p. 1-9, 2011.

JENKIN, G.; YOUNG, I. R. Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 567–581, 2004.

JISCHA, S.; WALTER, I.; NAT, R.; NOWOTNY, N.; NAT, R.; PALM, F.; VET, M.; BUDIK, S.; NAT, R.; KOLODZIEJEK, J.; AURICH, C.; VET, M. Uterine involution and endometrial function in Postpartum Pony Mares. **AJVR**, v. 69, n. 11, p. 1525–1534, 2008.

KELLY, R. W. Inflammatory mediators and cervical ripening. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1–2, p. 217–224, 2002.

KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

LEKHARU, R.; PRADHAN, R.; SHARMA, R.; SHARMA, D. A Study of Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Normal Pregnancy. **GCSMC J Med Sci** , v. 3, n. 1, p. 55–56, 2014.

LEVINE, B. R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.; AHN, B. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Assay and Repair of Biological Damage**, v. 186, n. 1983, p. 464–478, 1990.

MASUMOTO, N.; TASAKA, K.; MIYAKE, A.; TANIZAWA, O. Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 36, p. 22533–22536, 1990.

MANZANO, E. C.; POSTIGO, O. E.; OSÓRIO, J. C.; MORENO, M. L.; OJE A, M. M.; IZAGUIRRE, L. Z. V. Maternal Oxidant and Antioxidant Status in the Third Trimester of Gestation and Its Relation to the Birthweight. **Obstetrics & Gynecology: An International Journal**, v. 2015, p. 1–16, 2015.

MUTINATI, M.; PICCINNO, M.; RONCETTI, M.; CAMPANILE, D.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L. Review Article Oxidative Stress During Pregnancy in the Sheep. **Reprod Dom Anim** , v. 48, p. 353–357, 2013.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G.; CORTADA, C. N.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B.; BOLS, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Therio**. v.67, n.2, p. 334- 40, 2007

ODETTI, P.; GARIBALDI, S.; GURRERI, G.; ARAGNO, I.; DAPINO, D.; PRONZATO, M. A.; MARINARI, U. M. Protein oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. **Metabolism**, v.45, n. 11, p. 1319-1322, 1996.

OTTAVIANO, F. G.; HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Redox regulation in the extracellular environment. **Circulation journal**, v. 72, p. 1–16, 2008.

PATIL, S. B.; KODLIWADMATH, M. V.; KODLIWADMATH, S. M. Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 135–137, 2007.

RIZZO, A.; MUTINATI, M.; SPEDICATO, M.; MINOIA, G.; TRISOLINI, C.; JIRILLO, F.; SCIORSCI, R. L. First demonstration of an increased serum level of reactive oxygen species during the peripartal period in the ewes. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 741–6, 2008.

RIZZO, A.; ROSCINO, M. T.; BINETTI, F.; SCIORSCI, R. L. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344–352, 2012.

RIZZO, A.; ROSCINO, M. T.; MINOIA, G.; TRISOLINI, C.; SPEDICATO, M.; MUTINATI, M.; PANTALEO, M.; JIRILLO, F.; SCIORSCI, R. L. Serum levels of reactive oxygen species (ROS) in the bitch. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 31, n. 2, p. 310–3, 2009.

SGORBINI, M.; BONELLI, F.; ROTA, A.; MARMORINI, P.; BIAGI, G.; CORAZZA, M.; PASQUINI, A. Maternal and neonatal evaluation of derivated reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential in the horse. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 48–51, 2015.

SHIMITZ, T.; LEVINE, B. A.; NATHANIELSZ, P. W. Localization and steroid regulation of prostaglandin E2 receptor protein expression in ovine cervix. **Reproduction Research**, v. 131, p. 743-750, 2006.

SWATI, S.; SARVESH, K.; SOURABH, S. Free Radicals and Antioxidants Enzymes Status in Normal Pregnant Women. **Scholars Journal of Applied Medical**, v. 3, n. 4B, p. 1703–1706, 2015.

THOMAS, C.; MACKEY, M. M.; DIAZ, A. A.; COX, D. P. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. **Redox Report**, v. 14, n. 3, p. 102-108, 2009.

UPADHYAYA, C.; MISHRA, S.; SINGH, P. P.; SHARMA, P.; SHARMA, P. P. Antioxidant status and peroxidative stress in mother and newborn - a pilot study. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 30–34, 2005.

VINCZE, B.; KUTASI, O.; BASKA, F.; SZENCI, O. Pregnancy-Associated changes of serum biochemical values in Lipizzaner broodmares. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, n. 3, p. 303-316, 2015.

WARREN, A. Y.; MATHAROO-BALL, B.; SHAW, R. W.; KHAN, R. N. Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility. **Reproduction Research**, v. 130, p. 539-544, 2005.

WILCOX, A. J. On the importance--and the unimportance--of birthweight. **Int J Epidemiol**, v. 30, n. 6, p. 1233–1241, 2001.

YAACOBI, N.; OHEL, G.; HOCHMAN, A. Reactive oxygen species in the process of labor. **Arch Gynecol Obstet**, v. 263, p. 23–24, 1999.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos pudemos verificar que éguas aparentaram equilíbrio oxidativo no terço final da gestação, parto e pós-parto e que potros neonatos apresentam equilíbrio oxidativo na primeira semana de vida. Sugerimos, portanto, que as alterações observadas fazem parte dos mecanismos fisiológicos de ambas categorias como uma forma de adaptação às mudanças metabólicas ocorridas nos períodos estudados.

REFERÊNCIAS

ABUELO, Á.; PÉREZ-SANTOS, M.; HERNÁNDEZ, J.; CASTILLO, C. Effect of colostrum redox balance on the oxidative status of calves during the first 3 months of life and the relationship with passive immune acquisition. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 295–299, 2014.

AOK, T.; HONDA, H.; ISHII, M. Immunologic Profiles of Peripheral Blood Leukocytes and Serum Immunoglobulin G Concentrations in Perinatal Mares and Neonatal Foals (Heavy Draft Horse). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 989-995, 2013.

ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; RIZZO, M.; FAZIO, F.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G. Serum levels of mitochondrial uncoupling protein 1, leptin, and lipids during late pregnancy and the early postpartum period in mares. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1156–1164, 2016.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human healthy and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 115 p

BAZZANO, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; ARFUSO, F.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G. Metabolic profile of broodmares during late pregnancy and early post-partum. **Reprod Domest Anim**, v. 49, n. 6, p. 947–953, 2014a.

BAZZANO, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; MARAFIOTI, S.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G. Hemostatic profile during late pregnancy and early postpartum period in mares. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 639–643, 2014b.

BAZZANO, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; RIZZO, M.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G. Physiological adjustments of haematological profile during the last trimester of pregnancy and the early post partum period in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3–4, p. 199–203, 2014c.

BAZZANO, M.; GIUDICE, E.; FAZIO, F.; ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; PICCIONE, G. Serum protein electrophoresis profile during late pregnancy and early post partum period in mares. **Animal Science Papers and Reports**, v. 34, n. 1, p. 53–60, 2016a.

BAZZANO, M.; GIUDICE, E.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; SCOLLO, C.; PICCIONE, G. The peripartum period influenced the serum macromineral profile in mares. **Archiv Tierzucht**, v. 59, n. 1, p. 65–70, 2016b.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 186–190, 2010.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; LOPEZ-ALONSO, M.; PEREIRA, V.; BENEDITO, J. L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **Veterinary Journal**, v. 169, n. 2, p. 286–292, 2005.

COUGHLAN, M. T.; VERVAART, P. P.; PERMEZEL, M.; GEORGIU, H. M.; RICE, G. E. Altered Placental Oxidative Stress Status in Gestational Diabetes Mellitus. **Placenta**, v. 25, n. 1, p. 78–84, 2004.

CUI, R.; GAO, M.; QU, S.; LIU, D. Overexpression of superoxide dismutase 3 gene blocks high fat diet-induced obesity, fatty liver and insulin resistance. **Gene Ther**, v. 21, n. 9, p. 840–848, 2014.

ELLIOT, M. G. Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 114, p. 75–80, 2016.

FARROW, K. N.; LAKSHMINRUSIMHA, S.; REDA, W. J.; WEDGWOOD, S.; CZECH, L.; GUGINO, S. F.; DAVIS, J. M.; RUSSELL, J. A.; STEINHORN, R. H. Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 295, p. L979–L987, 2008.

FINK, R. C.; SCANDALIOS, J. G. Molecular evolution and structure--function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 399, n. 1, p. 19–36, 2002.

FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. An overview of mechanisms of redox signaling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 73, p. 2–9, 2014.

FRANK, L.; SOSENKO, I. R. Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. **The Journal of Pediatrics**, v. 110, n. 1, p. 106–110, 1987.

FRANK, L.; SOSENKO, I. R. Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. **Pediatric research**, v. 29, n. 3, p. 292–6, 1991.

FRANK; GROSECLOSE. Preparation For Birth Into An O₂ Rich Environment: The Antioxidant Enzymes In The Developing Rabbit Lung. **Pediatr Res**, v. 18, n. 3, p. 240, 1984.

FRIEL, J. K.; FRIESEN, R. W.; HARDING, S. V.; ROBERTS, L. J. Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. **Pediatric Research**, v. 56, n. 6, p. 878–882, 2004.

FUKUZAWA, K.; SAITOH, Y.; AKAI, K.; KOGURE, K.; UENO, S.; TOKUMURA, A.; OTAGIRI, M.; SHIBATA, A. Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1668, n. 1, p. 145–155, 2005.

GAÁL, T.; RIBICZEYNÉ-SZABÓ, P.; STADLER, K.; JAKUS, J.; REICZIGEL, J.; KÖVÉR, P.; MÉZES, M.; SÜMEGHY, L. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, n. 4, p. 391–396, 2006.

GÓRECKA, R.; KLECZKOWSKI, M.; KLUCIŃSKI, W.; KASZTELAN, R. Changes in Antioxidant Components in Blood of Mares During Pregnancy and After Foaling. **Bull. Vet. Inst Pulawy**, v. 46, p. 301–305, 2002.

GUERANGER, Q.; LI, F.; PEACOCK, M.; LARNICOL-FERY, A.; BREM, R.; MACPHERSON, P.; EGLY, J.-M.; KARRAN, P. Protein oxidation and DNA repair inhibition by 6-thioguanine and UVA radiation. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 5, p. 1408–17, 2014.

GÜNDÜZ, M. C.; KAŞIKCI, G.; EKIZ, B. Follicular and steroid hormone changes in Arabian mares in the postpartum period. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1–4, p. 200–205, 2008.

HADDEN, D. R.; MCLAUGHLIN, C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 14, n. 2, p. 66–71, 2009.

HALLIWELL, B. Superoxid, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. **Free Radical Research Communication**, v. 5, n. 6, p. 315-318, 1989.

HARVEY, J. W.; PATE, M. G.; KIVIPELTO, J.; ASQUITH, R. L. Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. **Veterinary clinical pathology**, v. 34, n. 3, p. 248–254, 2005.

ISHIDA, N.; SATO, F.; ASAI, Y.; MASUMIZU, T. Chronological Changes in the Superoxide-Scavenging Ability of. **J. Equine Sci.**, v. 8, n. 4, p. 109–111, 1997.

JISCHA, S.; WALTER, I.; NAT, R.; NOWOTNY, N.; NAT, R.; PALM, F.; VET, M.; BUDIK, S.; NAT, R.; KOLODZIEJEK, J.; AURICH, C.; VET, M. Uterine involution and endometrial function in Postpartum Pony Mares. **AJVR**, v. 69, n. 11, p. 1525–1534, 2008.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

KAWANISHI, S.; HIRAKU, Y.; OIKAWA, S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. **Mutation Research**, v. 488, n. 1, p. 65–76, 2001.

LEKHARU, R.; PRADHAN, R.; SHARMA, R.; SHARMA, D. A Study of Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Normal Pregnancy. **GCSMC J Med Sci**, v. 3, n. 1, p. 55–56, 2014.

LOURENÇO DOS SANTOS, S.; BARAIBAR, M. A.; LUNDBERG, S.; EEG-OLOFSSON, O.; LARSSON, L.; FRIGUET, B. Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing. **Redox Biology**, v. 5, p. 267–274, 2015.

LUCA, M.; LUCA, C.; CALANDRA, C. The Role of Oxidative Damage in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

MACLEAN, P. D.; DRAKE, E. C.; ROSS, L.; BARCLAY, C. Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: Its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 4, p. 600–609, 2007.

MARKLUND, S. L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. **Biochem. J.**, v. 222, p. 649-655, 1984.

MCCORD, J. M. Superoxide radical: A likely link between reperfusion injury and inflammation. **Advances in Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 325–345, 1986.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MIKHED, Y.; GÖRLACH, A.; KNAUS, U. G.; DAIBER, A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. **Redox Biology**, v. 5, p. 275–289, 2015.

MILLER, A. Superoxide dismutases : Ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, v. 586, n. 5, p. 585–595, 2012.

MIRZAEI, H.; REGNIER, F. Protein-RNA cross-linking in the ribosomes of yeast under oxidative stress. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 12, p. 3249–3259, 2006.

MUTINATI, M.; PANTALEO, M.; RONCETTI, M.; PICCINNO, M.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L. Oxidative Stress in Neonatology: A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 7-16, 2014.

NG, C. F.; SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R.; RODGERS, V. G. J. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. **Free Radical Research**. v. 41, n. 11, p. 1201-1211, 2007.

OLIVER, C. N.; AHN, B. W.; MOERMAN, E. J.; GOLDSTEIN, S.; STADTMAN, E. R. Age-related changes in oxidized proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5488–5491, 1987.

ORRENIUS, S.; MCCONKEY, D. J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. **Trends in Pharmacological Science**, v. 10, n. 7, p. 281-285, 1989.

PIKUL, J.; WÓJTOWSKI, J. Fat and cholesterol content and fatty acid composition of mares' colostrums and milk during five lactation months. **Livestock Science**, v. 113, n. 2–3, p. 285–290, 2008.

PO, E.; WILLIAMS, C.; MUSCATELLO, G.; CELI, P. Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of thoroughbred foals. **Veterinary Journal**, v. 196, n. 2, p. 269–271, 2013.

PRZYBYLSKA, J.; ALBERA, E.; KANKOFER, M. Antioxidants in bovine colostrum. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 4, p. 402–409, 2007.

RAJAGOPAL, S.; DEB, I.; PODDAR, R.; PAUL, S. Aging is associated with dimerization and inactivation of the brain-enriched tyrosine phosphatase STEP. **Neurobiology of Aging**, v. 41, p. 25–38, 2016.

RICKETT, G. M.; KELLY, F. J. Developmental expression of antioxidant enzymes in guinea pig lung and liver. **Development**, Great Britain, v. 108, n. 2, p. 331–6, 1990.

ROOK, D.; TE BRAAKE, F. W.; SCHIERBEEK, H.; LONGINI, M.; BUONOCORE, G.; VAN GOUDOEVER, J. B. Glutathione synthesis rates in early postnatal life. **Pediatr Res**, v. 67, n. 4, p. 407–411, 2010.

SEDLAK, T. W.; SALEH, M.; HIGGINSON, D. S.; PAUL, B. D.; JULURI, K. R.; SNYDER, S. H. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. **PNAS**, v. 106, n. 13, p. 5171-5176, 2009.

SGORBINI, M.; BONELLI, F.; ROTA, A.; MARMORINI, P.; BIAGI, G.; CORAZZA, M.; PASQUINI, A. Maternal and neonatal evaluation of derivated reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential in the horse. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 48–51, 2015.

SHAHAB, M. S.; KUMAR, P.; SHARMA, N.; NARANGA, A.; PRASAD, R. Evaluation of oxidant and antioxidant status in term neonates : a plausible protective role of bilirubin. **Mol Cell Biochem**, v. 317, p. 51–59, 2008.

SHMITZ, T.; LEVINE, B. A.; NATHANIELSZ, P. W. Localization and steroid regulation of prostaglandin E2 receptor protein expression in ovine cervix. **Reproduction**, v. 131, p. 743-750, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SORIANO, V. S.; E SÁ, J.; JUNIOR, H. P. R.; TORBITZ, V. D.; MORESCO, R. N.; STEFANI, L. M.; DA SILVA, A. S. Postpartum nitric oxide, oxidants and antioxidants levels in ewes and their lambs. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 13–16, 2015.

SWATI, S.; SARVESH, K.; SOURABH, S. Free Radicals and Antioxidants Enzymes Status in Normal Pregnant Women. **Scholars Journal of Applied Medical Science**, v. 3, n. 4B, p. 1703–1706, 2015.

TIWARI, D.; AKHTAR, S.; GARG, R.; MANGER, P. T.; KAHN, M. M. A comparative study of oxidative status in pregnant and non-pregnant women. **Indian Journal of Basic and Applied Medical Research**, v. 5, n. 3, p. 225–230, 2016.

VINCZE, B.; KUTASI, O.; BASKA, F.; SZENCI, O. Pregnancy-Associated changes of serum biochemical values in Lipizzaner broodmares. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, n. 3, p. 303–316, 2015.

WALSH, S. W.; WANG, Y. Secretion of lipid peroxides by the human placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 6, p. 1462–1466, 1993.

WATSON, T. D. G.; BURNS, L.; PACKARD, C. J.; SHEPHERD, J. Effects of pregnancy and lactation on plasma lipid and lipoprotein concentrations, lipoprotein composition and post-heparin lipase activities in Shetland pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, n. 2, p. 563–568, 1993.

WILINSKA, M.; BORSZEWSKA-KORNACKA, M. K.; NIEMIEC, T.; JAKIEL, G. Oxidative stress and total antioxidant status in term newborns and their mothers. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 4, p. 736–740, 2015.

WINTERBOURN, C. C. Free Radical Biology and Medicine Are free radicals involved in thiol-based redox signaling ? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 164–170, 2015.

WONG-EKKABUT, J.; XU, Z.; TRIAMPO, W.; TANG, I.-M.; TIELEMAN, D. P.; MONTICELLI, L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. **Biophysical journal**, v. 93, n. 12, p. 4225–36, 2007.

XIE, J.; FAN, R.; MENG, Z. Protein oxidation and DNA-protein crosslink induced by sulfur dioxide in lungs, livers, and hearts from mice. **Inhalation toxicology**, v. 19, n. 9, p. 759–765, 2007.

YIN, J.; REN, W.; LIU, G.; DUAN, J.; YANG, G.; WU, L.; LI, T.; YIN, Y. Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets. **Free Radical Research**, v. 47, n. 12, p. 1027–1035, 2013.

ZIECH, D.; FRANCO, R.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutation research**, v. 711, n. 1–2, p. 167–73, 2011.