

AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO PLASMA DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TECIDUAL E TRATADOS COM HIDROGEL DE POLIAMIDO DE MANDIOCA

Andréia Assunção Soares¹
 Johany Diego Vicente²
 Monique Catarine Fischer Possamai³
 Gabriela Rocha Santos⁴
 Luciana Kazue Otutumi⁵
 Ranulfo Piau Júnior⁶
 André Felipe Berto Almada⁷
 Ricardo de Melo Germano^{8*}

SOARES, A. A.; VICENTE, J. D.; POSSAMAI, M. C. F.; SANTOS, G. R.; OTUTUMI, L. K.; PIAU JÚNIOR, R.; ALMADA, A. F. B.; GERMANO, R. de M. Avaliação da peroxidação lipídica no plasma de ratos submetidos à lesão tecidual e tratados com hidrogel de poliamido de mandioca. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 19, n. 3, p. 175-178, jul./set. 2016.

RESUMO: As espécies reativas ao oxigênio (EROS) são produzidas como mecanismo de defesa celular, participando dos processos de cicatrização celular. Entretanto, altos níveis de EROS podem causar danos como a peroxidação lipídica (PL). O presente estudo teve como objetivo, verificar os níveis de PL por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de ratos com lesão tecidual induzida. Foram utilizados 32 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, os quais foram pesados e da média $\pm 10\%$ do peso foram distribuídos em quatro grupos: A – controle negativo; B - Vetaglós®; C – hidrogel de poliamido de mandioca+ Vetaglós®; D – Hidrogel de poliamido de mandioca. Após 21 dias, todos os animais foram anestesiados com isoflurano e foi feita a coleta de sangue por punção cardíaca, e os plasmas foram obtidos após centrifugação, na sequência por superdosagem do anestésico foi realizada a eutanásia. Os níveis de PL nos plasmas dos ratos foram determinados pelo método do TBARS. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à PL, indicando um equilíbrio entre as defesas antioxidantes celulares e os níveis de EROS produzidos durante o processo de cicatrização celular. Essa ausência nos diferentes grupos experimentais, em relação à PL, deixa claro a importância de se contemplar estudos de parâmetros de bioindicadores de estresse oxidativo em protocolos experimentais. **PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes. Cicatrização. EROS. Malondialdeído.

LIPID PEROXIDATION IN PLASMA OF RATS SUBMITTED TO TISSUE INJURY AND TREATED WITH CASSAVA POLYAMIDE HYDROGEL

ABSTRACT: Reactive oxygen species (ROS) are produced as a cellular defense mechanism, participating in the processes of cellular healing. However, high levels of ROS can cause damages such as lipid peroxidation (LPO). This study aimed to verify the levels of LPO through the determination of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) in rat plasma with induced tissue injury. A total of 32 *Rattus norvegicus albinus Wistar* were used, with a mean weight $\pm 10\%$. They were divided into four groups: A – negative control; B - Vetaglós®; C - Polyamide cassava; D - Polyamide cassava + Vetaglós®. After 21 days, all animals were anesthetized with isoflurane and blood was collected by cardiac puncture. Plasma was obtained after centrifugation. Euthanasia was performed with administration of an overdose of inhalational anesthetic previously used. The LPO levels in rat plasma were determined using the TBARS method. There was no significant difference between the groups in relation to LPO, indicating a balance between antioxidant defenses and cellular levels of ROS produced during the cellular healing process. This absence in the different experimental groups in relation to LPO emphasizes the importance of further studies related to the bio-indicator parameters for oxidative stress in experimental protocols.

KEYWORDS: Antioxidants. Healing. Malondialdehyde. ROS.

EVALUACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN PLASMA DE RATAS SOMETIDAS A LESIÓN TISULAR Y TRATADAS CON HIDROGEL DE POLIAMIDA DE YUCA

RESUMEN: Las especies reactivas al oxígeno (EROS) se producen como mecanismo de defensa celular, que participan

DOI: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v19i3.2016.6092>

¹Bióloga. Pós-doutoranda em Ciência Animal – UNIPAR. Bolsista PNPd/Capes. andasoares7@gmail.com

²Médico Veterinário. Discente do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNIPAR. johanymh@gmail.com

³Médica Veterinária. Discente do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNIPAR. Bolsista PROSUP/Capes. mo.fischer@hotmail.com

⁴Acadêmica de Medicina Veterinária. Bolsista PIBIC/UNIPAR. gabrielarochasts@gmail.com

⁵Médica Veterinária. Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNIPAR. otutumi@prof.unipar.br

⁶Médico Veterinário. Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNIPAR. piau@prof.unipar.br

⁷Zootecnista. Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UNIPAR. Bolsista PROSUP/CAPES. andrefelipe@zootecnista.com.br

⁸Biólogo. Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNIPAR - Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, Centro, Umuarama, PR 87502-100, Brasil. E-mail: germano@prof.unipar.br*

en los procesos de curación celulares. Sin embargo, los altos niveles de EROS pueden causar daños como la peroxidación lipídica (PL). Este estudio tuvo como objetivo verificar los niveles de peroxidación lipídica por sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el plasma de ratas con lesión tisular inducida. Se han utilizado 32 ratas machos, *Rattus norvegicus albinus* de linaje Wistar, que se pesaron y la media \pm 10% en peso, y se dividieron en cuatro grupos: A – control negativo; B - Vetaglós[®]; C – hidrogel de poliamida de yuca + Vetaglós[®]; D – Hidrogel de poliamida de yuca. Después de 21 días, todos los animales fueron anestesiados con isoflurano y se hizo la extracción de sangre por punción cardíaca, y se obtuvieron los plasmas después de la centrifugación, enseguida con sobredosis de anestésico se realizó la eutanasia. Los niveles de PL en los plasmas de las ratas se determinaron por el método de TBARS. No hubo diferencia significativa entre los grupos en relación a la peroxidación lipídica, lo que indica un equilibrio entre las defensas antioxidantes celulares y los niveles de EROS producidos durante el proceso de curación celular. Esa ausencia en los diferentes grupos experimentales, en relación a la PL, pone de manifiesto la importancia de contemplarse estudios de parámetros de bioindicadores de estrés oxidativo en los protocolos experimentales.

PALABRAS CLAVE: Antioxidantes. Curación. EROS. Malondialdeído.

Introdução

A pele reúne uma complexidade própria no que diz respeito à sua constituição, representando o maior órgão do corpo tendo como função atuar como barreira anatômica e fisiológica entre o organismo e o meio ambiente (MILLER et al., 2013).

A pele serve como uma barreira seletiva contra o ambiente externo e quando ocorrem feridas, que são lesões fisiológicas, resultam em danos que comprometem a função da pele. O objetivo após as lesões é restaurar a estrutura e função do tecido lesionado, envolvendo os mecanismos de inflamação, proliferação celular e remodelamento do tecido e consequentemente a integridade celular (AGARWAL et al., 2009).

O processo de cicatrização de feridas envolve eventos biológicos como a proliferação celular e a inflamação. Os radicais livres ou as espécies reativas ao oxigênio (EROS) são produzidos como mecanismo de defesa celular, participando dos processos de sinalização e cicatrização celular. As defesas celulares mantêm o equilíbrio entre os níveis de EROS e os antioxidantes, porém a produção de altos níveis de EROS podem causar danos celulares. Esse desequilíbrio celular é denominado de estresse oxidativo (BONDY; LEBEL, 1993; ILANGO; CHITRA, 2010).

Os danos celulares incluem oxidações de macromoléculas, tais como proteínas, carboidratos e lipídeos. Os lipídeos das membranas celulares, principalmente os fosfolipídeos e ácidos graxos poli-insaturados são os mais suscetíveis à oxidação dos radicais livres ocorrendo a peroxidação lipídica (PL) (CATALÁ, 2009; SCOLARO et al., 2012).

Ainda para os mesmos autores, PL pode alterar a fluidez e a permeabilidade da membrana e consequentemente a inibição de processos metabólicos essenciais à sobrevivência do organismo.

Segundo Devasagayam et al. (2003), quando as EROS degradam os lipídeos poli-insaturados das membranas celulares, ocorre um aumento do composto malondialdeído (MDA), um produto secundário da PL. A produção deste aldeído, geralmente quantificada como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é frequentemente usado como um biomarcador para medir a PL e o nível de estresse oxidativo num organismo.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo, verificar os níveis de peroxidação lipídica por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma de ratos com lesão tecidual induzida.

Material e Métodos

Foram utilizados 32 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, com 80 dias de idade os quais foram pesados e da média \pm 10% do peso, foram distribuídos em quatro tratamentos, com oito animais cada, sendo que todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução de ferida cutânea de um cm² entre as escápulas, e sendo as feridas tratadas de acordo com o grupo a que pertenciam, a saber: tratamento A – grupo controle negativo com administração de veículo isento de qualquer fármaco; tratamento B – grupo controle positivo tratado com Vetaglós[®]; tratamento C – grupo teste tratado com o hidrogel do biopolímero de poliamido de mandioca+Vetaglós[®]–; tratamento D grupo teste, tratado com o hidrogel do biopolímero de poliamido de mandioca.

Após 21 dias de tratamento, todos os animais foram anestesiados com isoflurano e após o aprofundamento anestésico, foi feita a coleta de três mililitros de sangue por punção cardíaca, em seguida, o sangue foi transferido para tubos heparinizados que foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Após a coleta, a eutanásia foi realizada com administração de uma superdosagem do anestésico inalatório já utilizado, levando-os a uma parada respiratória seguida por parada cardíaca.

Os níveis de PL nos plasmas dos ratos foram determinados pelo método do TBARS conforme descrito por (BHATTACHARYA et al, 2003), com algumas modificações. Esta técnica quantifica moléculas de baixa massa molecular, predominantemente o MDA, que reagem com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido. O Kit Comercial TBARS ASSAY Kit[®]2 foi utilizado para análises e os valores foram expressos em μ mol de MDA por mL de plasma. O composto MDA foi utilizado como curva padrão.

Os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paranaense sob protocolo n. 1003/2016.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram primeiramente analisados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância. Após confirmação da normalidade dos dados e homogeneidade de variância, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo considerado o nível de significância de 5% e os dados foram expressos como média \pm erro padrão. O programa estatístico utilizado foi o BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

¹Vetaglós - Vetnil – Louveira SP

²TBARS ASSAY Kit - Cayman Chemical Company – Ann Arbor - USA

Resultados e Discussão

No presente trabalho, a lesão tecidual e a ação do tratamento com um hidrogel de biopolímero de poliamido extraído da mandioca nos ratos foi examinado em termos de indicadores clássicos, tais como os níveis de PL.

A Tabela 1 lista os resultados do marcador de estresse oxidativo no plasma dos ratos nos seguintes grupos: grupo A (controle negativo com administração de veículo isento de qualquer fármaco); grupo B (controle positivo que foi tratado com Vetaglós®); grupo C (recebeu o hidrogel do biopolímero de poliamido de mandioca+Vetaglós®); grupo D (com hidrogel do biopolímero de poliamido de mandioca) não teve influência sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Tabela 1: Média ± erro padrão das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (µmol/mL) do plasma de ratos que tiveram suas feridas tratadas com Vetaglós® e/ou hidrogel de biopolímero de mandioca.

Grupos – Ratos	TBARS (µmol/mL plasma)
Grupo A	0,016±0,001
Grupo B	0,016±0,001
Grupo C	0,017±0,004
Grupo D	0,017±0,002

Grupo A. controle negativo; Grupo B. Vetaglós®; Grupo C. Hidrogel de poliamido de mandioca +Vetaglós; Grupo D. Hidrogel de poliamido de mandioca.

Verificou-se que não houve diferença nos níveis de estresse oxidativo – peroxidação lipídica no plasma de ratos que tiveram suas feridas tratadas com Vetaglós® ou hidrogel de biopolímero de mandioca (Tabela 1).

Os danos oxidativos na membrana celular - PL é demonstrado pelos altos níveis de TBARS encontrados em tecidos lesionados (SOARES et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). Esses níveis elevados de TBARS podem ser normalizados com produtos bioativos com potencial antioxidante, antioxidantes fenólicos, que agem como sequestradores de radicais, e, por vezes, agem como quelantes metálicos, atuando tanto na etapa de iniciação e propagação da oxidação, prevenindo a peroxidação lipídica (SOARES et al., 2013).

O processo de cicatrização de feridas envolve mecanismos biológicos (fases) como inflamação, proliferação e remodelação celular. Essas fasesse sobrepõem de forma contínua e temporal visando à restauração do tecido lesionado (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009; ISAAC et al., 2010).

Na fase inflamatória são recrutadas para o local da lesão na pele, várias células específicas, tais como os macrófagos e neutrófilos. Componentes do tecido lesionado, partículas estranhas e bactérias são eliminadas principalmente pela ação dos macrófagos e neutrófilos, os quais permitem a formação de EROS pelo mecanismo de defesa celular (ISAAC et al., 2010). Entretanto, a produção de altos níveis de EROS podem causar danos celulares como a peroxidação lipídica, quando não ocorre o equilíbrio entre os níveis de EROS e o sistema de defesa antioxidante (BONDY; LEBEL, 1993; ILANGO; CHITRA, 2010).

No presente trabalho, a lesão tecidual nos ratos não

foi suficiente para um aumento nos níveis de peroxidação lipídica no plasma. Isso pode ser devido ao mecanismo de defesa antioxidante endógeno, onde as defesas celulares mantêm o equilíbrio entre os níveis de EROS e os antioxidantes (LLANGO; CHITRA, 2010). É difícil inferir os mecanismos bioquímicos envolvidos nesse processo, porém os resultados obtidos são importantes para a interpretação de estresse oxidativo e PL e suas consequências celulares.

Conclusão

A ausência de diferenças significativas nos diferentes grupos experimentais, em relação à peroxidação lipídica, deixa claro a importância de se contemplar estudos de parâmetros de bioindicadores de estresse oxidativo em protocolos experimentais, tornando claro que a presença dos radicais livres nos processos, devem ser mantidos dentro de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, no tocante a integridade das membranas celulares, permitindo que não ocorra interferência nos resultados dos experimentos realizados.

Referências

- AGARWAL, P. K. et al. Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisica*) in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, p. 32-40, 2009.
- BHATTACHARYA, A. et al. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone MZB/W female mice. **Journal the American College of Nutrition**, v. 22, n. 5, p. 388-399, 2003.
- BONDY, S. C.; LEBEL, C. P. The relationship between excite toxicity and oxidative stress in the central nervous. **System Free Radical & Medicine**, v. 14, n. 6, p. 633-642, 1993.
- CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 157, n. 1, p.1-11, 2009.
- DEVASAGAYAM, T. P. A.; BOLOOR, K. K.; RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, n. 5, p. 300-308, 2003.
- GONÇALVES, G. A. et al. Green tea extract improves the oxidative state of the liver and brain in rats with adjuvant-induced arthritis. **Food & Function**, v. 6, n. 8, p. 2701-2711, 2015.
- ILANGO, K.; CHITRA, V. Wound Healing and Anti-oxidant Activities of the Fruit Pulp of *Limonia Acidissima* Linn (Rutaceae) in Rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 223-230, 2010.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista Médica**, v. 89, n. 3/4, p. 125-31, 2010.

MENDONÇA, J. R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MILLER, W. et al. K. **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**. 7th. ed. Missouri: Mosby, Elsevier. 2013 p. 1-70.

SCOLARO, B. et al. Mate Tea prevents oxidative Stress in the Blood and Hippocampus of Rats with Acute or Chronic Ethanol Administration. **Oxidative Medicine and Cellular Lonvety**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

SOARES, A. A. et al. Effects of an *Agaricus blazei* Aqueous Extract Pretreatment on Paracetamol-Induced Brain and Liver Injury in Rats. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

Recebido em: 15.09.2016

Aceito em: 20.12.2016