

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO CELSO MACHADO JUNIOR

IMPACTO DO ESTADO REDOX DO PAR CYS/CYSS NA EFICIÊNCIA
PRODUTIVA E EM VARIÁVEIS IMUNOLÓGICAS DE SUÍNOS E BOVINOS

CURITIBA
2015

PEDRO CELSO MACHADO JUNIOR

IMPACTO DO ESTADO REDOX DO PAR CYS/CYSS NA EFICIÊNCIA
PRODUTIVA E EM VARIÁVEIS IMUNOLÓGICAS DE SUÍNOS E BOVINOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Caron

CURITIBA
2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Machado Junior, Pedro Celso

Impacto do estado redox do par Cys/CySS na eficiência produtiva e em variáveis imunológicas de suínos e bovinos. / Pedro Celso Machado Junior. – Curitiba, 2015.

76 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Luiz Felipe Caron

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Estresse oxidativo 2. Suino 3. Bovino 4. Cisteína 5. Cistina I. Título II. Caron, Luiz Felipe III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.19258
574.295



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“IMPACTO DO ESTADO REDOX DO PAR CYS/CYSS NA
EFICIÊNCIA PRODUTIVA E EM VARIÁVEIS IMUNOLÓGICAS DE
SUÍNOS E BOVINOS”**

por

PEDRO CELSO MACHADO JUNIOR

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof. Dr Luiz Felipe Caron - Presidente

Profª. Drª. Maria Eliane Merlin Rocha

Dr. Mário Sérgio Assayag Jr

Curitiba, 13 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Em especial, agradeço ao amigo e mestre Prof. Dr. Luiz Felipe Caron, pela orientação, confiança, amizade e exemplo, bem como pelo incentivo na conclusão de mais esta importante etapa.

À empresa Impextraco Latin America, por proporcionar auxílio financeiro e ceder parte de sua estrutura de pesquisa para realização deste trabalho.

À empresa Imunova Análises Biológicas, pelo auxílio técnico e financeiro; em especial ao Max, pelo auxílio fundamental na padronização da metodologia analítica e demais procedimentos de coleta, processamento e interpretação de resultados, e ao Tobias, pelo auxílio nas coletas e na discussão dos resultados.

À Fernanda e à Carla, pelo comprometimento, dedicação e seriedade exemplares no auxílio da padronização da metodologia e processamento de amostras.

À Prof.^a Lia Nakao e ao Laboratório de Patologia Redox, pela orientação no desenvolvimento da metodologia e auxílio na interpretação dos resultados, bem como ao Projeto Redoxoma Brasil, por disponibilizar recursos para a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, por proporcionar a oportunidade, e à CAPES pelo auxílio financeiro.

À toda minha família, pelo carinho, exemplos e ensinamentos sem os quais jamais teria alcançado este objetivo.

À Bruna, pelo companheirismo e cumplicidade durante todos estes anos que estamos juntos.

A Deus, por fazer com que tudo convergisse da melhor maneira até então.

RESUMO

A elevada demanda por produtos de origem animal que respeitem quesitos mínimos de qualidade higiênico-sanitária e nutricional, bem como que advenham de animais criados em sistemas que respeitem prerrogativas de bem-estar animal, tem aumentado a busca por ferramentas que identifiquem condições desfavoráveis a esta produção. Diferentes formas de stress, seja infeccioso, nutricional ou ambiental, podem comprometer tanto o bem estar dos animais de produção quanto a lucratividade da atividade. Tem-se demonstrado que tais situações estão relacionadas a eventos metabólicos no organismo animal que acabam por gerar espécies reativas de oxigênio, culminando em situações de stress oxidativo com uma mesma consequência: comprometimento da eficiência produtiva e redução da qualidade de vida dos animais. Tais situações, no entanto, nem sempre são identificadas por meio de marcadores que permitam a comparação de diferentes sistemas ou de diferentes formas de prevenção de tais eventos. A determinação do estado redox do par cisteína/cistina (Cys/CySS) aparece como parâmetro indicador de stress oxidativo, pois este par redox é impactado pelo aumento sistêmico de espécies reativas de oxigênio. Conduziu-se a quantificação dos tióis e dissulfetos Cys/CySS em plasma de suínos em fase de creche e bovinos de corte em fase de terminação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, seguido pelo cálculo do seu estado redox utilizando-se da equação de Nernst. Os valores de potencial obtido para suínos variaram entre -85mV e -110mV ao longo do período avaliado enquanto que os potenciais de bovinos variaram entre -85mV e -92mV. Em suínos, potenciais mais oxidados estiveram relacionados a maior ocorrência de diarreia, menor ganho de peso, maior conversão alimentar e menor número circulante de linfócitos B, enquanto que em bovinos, os potenciais tornaram-se mais oxidados à medida que os animais ganharam peso, o que também esteve relacionado a um maior nível de proteína sérica total, sendo que houve tendência de conversão alimentar mais elevada em animais que exibiram potenciais mais oxidados. Parece que em suínos em fase de creche, a variação apresentada no estado redox do par Cys/CySS ao longo do período avaliado esteve mais relacionada a processos adaptativos vividos por estes animais, processos estes compatíveis com situações de stress oxidativo. Em bovinos, este estado redox pareceu estar mais relacionado ao desenvolvimento fisiológico normal dos animais, provavelmente devido à fase de criação em que estes foram avaliados. A determinação do estado redox do par Cys/CySS parece ser uma ótima ferramenta para avaliar a resposta fisiológica dos animais a fatores que potencialmente induzem a ocorrência de stress oxidativo e que podem afetar a eficiência produtiva.

Palavras-chave: Stress oxidativo; potencial redox; cisteína, cistina, suínos, bovinos.

ABSTRACT

The increasing demand for animal derived products coming from systems which respect animal welfare prerogatives, as well as which are in accordance to minimal health and nutritional requirements, has led to an increase in the search for tools sensitive enough to identify unfavorable production conditions. Stress from different sources, whether infectious, nutritional or environmental, may compromise both animal's welfare and production system's profitability. It has been demonstrated that these situations are related to metabolic events in animal's organism which end up in the generation of reactive oxygen species, leading to situations of oxidative stress accounting for a single consequence: impairment in production efficiency and reduction in life quality. Such situations, however, not always may be identified through markers which allow the comparison between different systems or different counteractive strategies applied to different conditions. The establishment of the redox state of the couple cysteine/cysteine (Cys/CySS) appears as an interesting indicator of oxidative stress of different animals, once this redox couple is affected by the systemic increase in reactive oxygen species. The quantification of the redox couple Cys/CySS was carried out in plasma from piglets in the nursery period as well as from feedlot cattle in the finisher period, through the quantification by high performance liquid chromatography, followed by the calculation of its redox state using the Nernst equation. The obtained redox potentials varied between -85mV and -110mV in piglets throughout the evaluated period while for feedlot cattle the variation was established between -85mV and -92mV. In piglets, more oxidized potentials were related to higher incidence of diarrhea, higher feed conversion ratio, lower daily weight gain and fewer circulating B lymphocytes, while in feedlot cattle, potentials tend to be more oxidized as body weight increased, which was also related to an increased level of total serum protein. Also a trend for increased feed conversion ratio was observed for feedlot cattle which showed more oxidized Cys/CySS potential. Data suggested that in nursery piglets, variation in Cys/CySS redox state throughout the evaluated period was linked to the adaptive process experienced by these animals, which are often reported as situations related to oxidative stress. In feedlot cattle, such redox state seemed to be related to the normal physiological development of the animals, probably due to the period in which the evaluation was carried out. The establishment of the redox state of the couple Cys/CySS seems to be an excellent tool to evaluate animal's physiological response to factors which could potentially induce oxidative stress and impair production efficiency.

Key-words: Oxidative stress; redox potential; cysteine; cystine; piglets; beef cattle

LISTA DE SIGLAS

AIC – Critério de informação de Akaike

BIC – Critério de informação bayesiano

BPDS – Dissulfonato de batofenantrolina

CA – Conversão alimentar

Cys – Cisteína

CySS – Cistina

DTNB - ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

E_0 – potencial padrão de redução

E_h – potencial de redução

GMD – ganho médio diário

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona Oxidada

γ -EE – gama-glutamil-glutamato

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

KOH – hidróxido de potássio

\ln – logaritmo natural

Ppm – parte por milhão

mg – miligrama

mM - milimolar

mV- milivolt

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. DEMONSTRAÇÃO DO CONCEITO DE STRESS OXIDATIVO COMO UM DESEQUILÍBRIO ENTRE SUBSTÂNCIAS PRÓ-OXIDANTES E ANTIOXIDANTES E OBJETOS DE ESTUDO PARA CARACTERIZAR CADA CONDIÇÃO. É DADA ÊNFASE À VERIFICAÇÃO DO ESTADO DE EQUILÍBRIO DE PARES REDOX QUE REFLITAM O ESTADO SISTÊMICO DE OXIDAÇÃO SEM LEVAR EM CONSIDERAÇÃO O EFEITO ISOLADO DE DETERMINADAS SUBSTÂNCIAS.25
- FIGURA 2. DEMONSTRAÇÃO DO GRADIENTE DE SOLVENTES DURANTE CORRIDA DE 60 MINUTOS SUGERIDO POR JONES; LIANG (2009).....42
- FIGURA 3. DEMONSTRAÇÃO DO GRADIENTE DE SOLVENTES ESTABELECIDO PARA CORRIDA DE 45 MINUTOS OBTIDO APÓS OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO.....43
- FIGURA 4. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO OBTIDO PARA SOLUÇÃO DE PADRÃO MISTO DE 30 μM DE CYS, CYSS, GSH E GSSG, BEM COMO 8,25 μM DE Y-EE COM RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PICOS UTILIZANDO GRADIENTE DE SOLVENTES CONFORME SUGERIDO POR JONES; LIANG (2009). (INJEÇÃO DE 50 μL DE SOLUÇÃO)44
- FIGURA 5. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO OBTIDO PARA SOLUÇÃO DE PADRÃO MISTO DE 30 μM DE CYS, CYSS, GSH E GSSG, BEM COMO 8,25 μM DE Y-EE COM RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PICOS UTILIZANDO GRADIENTE DE SOLVENTES CONFORME METODOLOGIA ADAPTADA. (INJEÇÃO DE 50 μL DE SOLUÇÃO).....44
- FIGURA 6. DEMONSTRAÇÃO DE CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS SOBREPSTOS, OBTIDOS PARA SOLUÇÃO DE PADRÃO MÚLTIPLO DE 70 μM DE CYS, CYSS, GSH, GSSG E 8,25 μM DE Y-EE (LINHAS PONTILHADAS) COM RESPECTIVAS IDENTIFICAÇÃO DE

PICOS, BEM COMO DETERMINADA AMOSTRA DE PLASMA SUÍNO
TAMBÉM ADICIONADA DE 8,25 μM DE Y-EE (LINHA SÓLIDA). (INJEÇÃO
DE 50 μL).45

FIGURA 7. CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS
CISTINA (CYSS) E CISTEÍNA (CYS). FORAM UTILIZADAS DUAS
INJEÇÕES PARA CADA CONCENTRAÇÃO AVALIADA.47

FIGURA 8. CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS
GLUTATIONA (GSH) E GLUTATIONA DISSULFETO (GSSG). FORAM
UTILIZADAS DUAS INJEÇÕES PARA CADA CONCENTRAÇÃO AVALIADA.
.....47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS UTILIZADAS EM TODOS OS TRATAMENTOS AVALIADOS DE ACORDO COM FASE DE CRIAÇÃO.	28
TABELA 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS UTILIZADOS NO ARRAÇOAMENTO DOS ANIMAIS.....	29
TABELA 3. VOLUME QUANTIFICADO (MG) DE PADRÃO EXTERNO DE MANEIRA A PRODUZIR 100ML DE SOLUÇÃO 1mM.....	33
TABELA 4. EXEMPLO DE COMPOSIÇÃO DE SOLUÇÕES DE PADRÕES EXTERNOS MÚLTIPLOS UTILIZADAS PARA A COMPOSIÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO, SEGUNDO VOLUMES QUANTIFICADOS DE CADA SOLUÇÃO ESTOQUE.....	34
TABELA 5. FATOR DE CORREÇÃO APLICADO A CADA ANALITO APÓS DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE SUA CONCENTRAÇÃO.	48
TABELA 6. CONCENTRAÇÕES INFERIORES E SUPERIORES (μM) UTILIZADAS PARA COMPOR A CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CADA ANALITO DE INTERESSE.....	48
TABELA 7. CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS (μM) PARA OS PARES CYS/CYSS E RESPECTIVO POTENCIAL DE REDUÇÃO OBTIDO(MV), BEM COMO INFORMAÇÕES SOBRE PESO, OCORRÊNCIA DE DIARREIA NA SEMANA, CONVERSÃO ALIMENTAR E IDADE MÉDIA DOS ANIMAIS. DADOS APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO.....	50
TABELA 8. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E_H CYSS E VARIÁVEIS DE DESEMPENHO AVALIADAS.....	51
TABELA 9. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR EFEITOS DO PESO, IDADE, INCLUSÃO DE ANTIBIÓTICO À DIETA, OCORRÊNCIA DE DIARREIA E	

INTERAÇÃO IDADE X PESO SOBRE OS NÍVEIS CALCULADOS DO E_H CYSS.....	52
TABELA 10. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DA IDADE DOS ANIMAIS, VARIAÇÃO DO E_H CYSS (ΔE_H CYSS), OCORRÊNCIA DE DIARREIA, INTERAÇÃO IDADE X ΔE_H CYSS, E INTERAÇÃO OCORRÊNCIA DE DIARREIA X ΔE_H CYSS SOBRE O GANHO MÉDIO DIÁRIO (GMD) OBSERVADO DURANTE O PERÍODO DE AVALIAÇÃO.	54
TABELA 11. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DA IDADE DOS ANIMAIS, VARIAÇÃO DO E_H CYSS (ΔE_H CYSS), OCORRÊNCIA DE DIARREIA, E INTERAÇÃO IDADE X ΔE_H CYSS SOBRE A CONVERSÃO ALIMENTAR (C.A.) OBSERVADA DURANTE O PERÍODO DE AVALIAÇÃO.	56
TABELA 12. CÉLULAS MONONUCLEARES QUANTIFICADAS NO SANGUE PERIFÉRICO DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES PONTOS DE COLETA (% RELATIVO AO TOTAL DE LEUCÓCITOS), BEM COMO VALORES CALCULADOS PARA POTENCIAL DO PAR CYS/CYSS (E_H CYSS) (EM mV).	57
TABELA 13. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E_H CYSS, IDADE, OCORRÊNCIA DE DIARREIA E POPULAÇÕES DE CÉLULAS CIRCULANTES (LN DO % DE CADA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO).....	58
TABELA 14. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DA IDADE DOS ANIMAIS, VALOR DO E_H CYSS, E INTERAÇÃO IDADE X E_H CYSS SOBRE O LOGARITMO NATURAL (LN) DO PERCENTUAL DE LINFÓCITOS B CIRCULANTES OBSERVADOS DURANTE O PERÍODO DE AVALIAÇÃO.	59
TABELA 15. CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS (μ M) PARA OS PARES CYS/CYSS E RESPECTIVO POTENCIAL DE REDUÇÃO OBTIDO(mV), BEM COMO INFORMAÇÕES SOBRE PESO, CONVERSÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO (KG).	61

TABELA 16. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E _H CYSS E VARIÁVEIS DE DESEMPENHO AVALIADAS.....	62
TABELA 17. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DO PESO DOS ANIMAIS E INCLUSÃO DE IONÓFORO SOBRE O VALOR DO E _H CYSS.....	62
TABELA 18. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DO E _H CYSS SOBRE O VALOR DA C.A.	63
TABELA 19. RESULTADOS ENCONTRADOS PARA AS VARIÁVEIS DE BIOQUÍMICA CLÍNICA AVALIADAS NO PLASMA DOS ANIMAIS.	64
TABELA 20. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E _H CYSS E VARIÁVEIS DE BIOQUÍMICA CLÍNICA AVALIADAS.	64
TABELA 21. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DO E _H CYSS SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA TOTAL.....	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	27
3.1.1 Suínos.....	27
3.1.2 Bovinos de corte	28
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE	30
3.3 REAGENTES QUÍMICOS.....	31
3.4 SOLUÇÕES.....	31
3.4.1 Soluções utilizadas no procedimento de coleta e preservação de amostras	31
3.4.2 Soluções para procedimento de derivatização de amostras.....	32
3.4.3 Soluções para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	32
3.5 DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DAS CONCENTRAÇÕES DOS PADRÕES DE CYS E CYSS E GSH E GSSG	34
3.6 PREPARAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PLASMA.....	35
3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	36
3.8 CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS E POTENCIAL DE REDUÇÃO DE CYS/CYSS	38
3.9 DEMAIS VARIÁVEIS UTILIZADAS.....	39
3.9.1 Avaliações de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de suínos por meio de citometria de fluxo.	39
3.9.2 Avaliações de marcadores bioquímicos em sangue bovino	40

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO CROMATOGRÁFICO	42
4.2 CONCENTRAÇÃO DOS PARES CYS/CYSS EM PLASMA DE SUÍNOS, POTENCIAL DE REDUÇÃO DE CYS/CYSS E CORRELAÇÕES COM DEMAIS VARIÁVEIS AVALIADAS.	49
4.3 CONCENTRAÇÃO DOS PARES CYS/CYSS EM PLASMA DE BOVINOS, POTENCIAL DE REDUÇÃO DE CYS/CYSS E CORRELAÇÕES COM DEMAIS VARIÁVEIS AVALIADAS.	60
5 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Nos atuais sistemas de produção animal, a busca pela otimização de condições de nutrição, ambiência, saúde e bem-estar animal tem sido o principal objetivo não apenas para se atingir níveis ideais de produção como também para garantir a geração de um produto final de qualidade, quer seja carne, leite ou ovos. Assim, essas condições são o primeiro passo para a garantia de um desempenho produtivo compatível com o sucesso econômico da atividade.

No que toca à nutrição, são diversos os trabalhos que versam sobre exigências nutricionais das diferentes espécies de animais de produção Van Es (1982), National Research Council (1998) e Pesti (1995), bem como de diferentes condições de estímulo imunológico e ou outras formas de stress que alterariam essas exigências. (WILLIAMS et al. 1997; LOCHMILLER; DEERENBERG, 2000; KLASING, 2007; SELVARAJ, 2012). Da mesma forma, já se têm bastantes informações referentes às condições ditas favoráveis em termos de ambiente e de saúde animal, as quais estão também relacionadas ao conceito de bem-estar animal. (NICOL, 2001)

No entanto, além de mensurações específicas de desempenho, tais como ganho de peso e conversão alimentar, as quais por vezes não se alteram devido ao cumprimento de requerimentos nutricionais ou devido à sensibilidade destas variáveis Hicks et al. (1998), não há uma maneira de avaliar eventuais benefícios advindos da suplementação de determinados ingredientes relacionados à melhora da resposta futura do animal a determinados agentes estressores, bem como à predisposição deste animal em desenvolver determinada doença ou vivenciar episódios de baixo desempenho.

Neste contexto, a resposta a agentes estressores de diferentes categorias tem sido muito relacionada a aumentos nos níveis de espécies reativas de oxigênio. (SAUERWEIN et al., 2005; SORDILLO; AITKEN, 2009; MARCO-RAMELL et al., 2011). Por conta disso, tem-se buscado, nos últimos anos, ferramentas que permitam aferir a correta relação do nível de oxidação

do animal, os índices produtivos, e o consumo de antioxidantes. (Al-Gubory et al., 2010; Celi 2011).

O uso de antioxidantes, naturalmente oriundos da matéria prima ou suplementados, vem ganhando espaço na nutrição animal, espaço este já alcançado na nutrição humana, visto a extensa lista de publicação do potencial benefício de consumo de antioxidantes em humanos. (SARSOUR ET AL., 2009; NDHLALA ET AL., 2014). Como muito do que é recomendado e comprovado atualmente advém de extrapolações do uso humano, ou de práticas empíricas, faz-se necessário o estabelecimento de uma forma de avaliação que possa validar o uso destes produtos tanto nutricionalmente como também terapeuticamente em situações particulares relacionadas a risco de ocorrência de enfermidades. Dessa forma, o uso racional da matéria-prima para nutrição animal refletirá em melhores índices produtivos e na compreensão das interações das espécies reativas de oxigênio com vários sistemas orgânicos, entre estes, o sistema imune, em que a imunidade inata está muito relacionada ao desempenho produtivo. (COLDITZ 2002).

Jones; Liang (2009) descreveram metodologia que proporciona a quantificação *in vivo* de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e de cisteína (Cys) e cistina (CySS) utilizando amostras de plasma, por meio de HPLC. Segundo os autores, a concentração de GSH em plasma serve como um indicador de stress oxidativo sistêmico devido à interação contínua do plasma com tecidos e órgãos. Embora as concentrações de equilíbrio de GSH e GSSG em plasma não sejam simples funções das concentrações em tecidos, a relação de equilíbrio nos tecidos de GSH e GSSG refletida no plasma pode servir como um ótimo indicador de stress oxidativo, uma vez que esta relação contém componentes que refletem diretamente a disponibilidade de GSH para proteger contra reações oxidativas, bem como a geração de GSSG a partir de reações oxidativas. (JONES 2006).

Com relação à Cys/CySS, este é o par redox de maior representação, em termos quantitativos, relativo a tióis e dissulfetos de baixo peso molecular em plasma. (JONES 2006). Valores mais oxidados deste par redox já foram associados a aumentada adesão de monócitos a células endoteliais Go; Jones (2005) e maior sensibilidade a apoptose induzida por oxidação Jiang et

al. (2005), bem como a diferentes situações *in vivo*, tais como envelhecimento, tabagismo, obesidade e abuso de bebida alcoólica. (GO; JONES, 2011).

Até o momento, não se possui informação relativa ao potencial redox dos pares Cys/CySS e GSH/GSSG em plasma de animais de produção tais como suínos, bovinos e aves. A determinação de tais potenciais utilizando-se de metodologia padronizada pode servir para melhor caracterizar os níveis de oxidação e eventualmente episódios de stress oxidativo nos diferentes sistemas produtivos das referidas espécies, pois viabilizaria a quantificação destes níveis sob uma mesma ótica, auxiliando na identificação de situações que venham a afetar tanto a saúde e bem-estar animal quanto o desempenho produtivo, proporcionando a adoção de medidas preventivas.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo padronizar o método de detecção da cisteína (CyS), cistina (CySS), Glutathione (GSH) e Glutathione Dissulfeto (GSSG), em plasma de suínos e bovinos de corte por meio de metodologia utilizada para quantificação destes compostos em plasma humano Jones; Liang (2009), adaptando-a conforme necessário.

Uma vez padronizado o método, a quantificação dos pares CyS/CySS será utilizada para determinar o estado redox no plasma dos animais em diferentes situações durante a vida produtiva utilizando a equação de Nernst Schafer; Buettner (2001). Dessa forma, pretende-se:

- 1- Obter o estado redox do par mencionado em condições normais de produção, considerando uma dieta padrão e práticas comuns de manejo;
- 2- Verificar a relação do peso dos animais, conversão alimentar, idade e influência de aditivos que visam melhorar a eficiência produtiva no estado redox do par avaliado, verificando se há relação com o desempenho dos mesmos;

3- Caracterizar a relação do estado redox determinado no auxílio de identificação de situações potencialmente desfavoráveis a um desempenho produtivo ótimo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo stress oxidativo vem sendo muito utilizado na literatura científica para caracterizar situações de desequilíbrio entre a concentração de espécies oxidantes e redutoras dentro de determinados sistemas biológicos. Nestes sistemas, esta condição de stress provém de reações metabólicas que utilizam oxigênio e ocorre quando há produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e ou de nitrogênio com concomitante deficiência nos níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. (VALKO et al., 2007). Dessa forma, stress oxidativo representaria uma alteração no estado de equilíbrio das reações pró-oxidantes/antioxidantes em organismos vivos. (VALKO et al., 2007).

Stress oxidativo há muito tem sido abordado como um desequilíbrio no balanço entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que as primeiras sobressaem Sies (1985), levando a efeitos deletérios à célula ou ao indivíduo, tais como modificações de macromoléculas celulares, morte celular por apoptose ou necrose, bem como dano à estrutura tecidual. (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

Muitos trabalhos foram conduzidos em animais de produção com o objetivo de relacionar situações de stress, seja ambiental, imunológico ou nutricional, a uma maior geração de espécies reativas de oxigênio, levando a desempenho zootécnico reduzido. (LAURIDSEN et al., 1999; SAUERWEIN et al., 2005 e 2007; SHI-BIN et al., 2007; UPTON et al., 2009). A abordagem aplicada nestas avaliações focou na determinação de produtos de oxidação específicos em plasma, ou na capacidade antioxidante do plasma dos animais, o que consideraria uma relação de desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes.

Jones (2006), no entanto, propôs que stress oxidativo pode ser mais apropriadamente definido como uma alteração na sinalização e controle redox. O autor baseou esta proposição em diversos achados que apontam para efeitos significativos na função celular, sinalização para crescimento e proliferação celular, adesão de monócitos ao endotélio e resposta a apoptose

induzida por peróxido; efeitos estes influenciados pela variação do estado redox de pares tais como cisteína e cistina (Cys/CySS) e glutatona e glutatona dissulfeto (GSH/GSSG), especialmente o primeiro. Tal estado é calculado através da equação de Nernst, sendo o resultado expresso em mV, e, quanto mais negativo, indica um estado mais reduzido do par redox, assim como, quanto mais positivo, indica um estado mais oxidado. O autor ressaltou o fato de que, devido aos potenciais destes diferentes pares redox não se encontrarem em equilíbrio em condições fisiológicas, o conceito de um balanço único entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes seria uma simplificação inaceitável para consideração de existência de stress oxidativo.

Além disso, Jones (2006) apontou que alterações em potenciais de determinados pares redox, como Cys/CySS, podem indicar stress oxidativo sem haver um comprometimento do balanço global de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes.

O potencial de redução trata-se de uma medida da tendência que espécies químicas possuem em receber ou doar elétrons. (KEMP et al., (2008). Este potencial é quantitativamente expresso em milivolts (mV), sendo possível determinar este valor utilizando-se das concentrações das substâncias em suas formas oxidada e reduzida, aplicadas na equação de Nernst. Esta última relaciona o potencial padrão de redução (E_0), obtido experimentalmente para cada par redox em determinado ambiente em que a reação ocorre, ao potencial de redução (E_n) para determinadas concentrações de espécies oxidadas e reduzidas:

$e^- + y \text{ receptor de elétrons} \leftrightarrow x \text{ doador de elétrons}$

$$E_n = E_0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln \frac{[\text{receptor de elétrons}]^y}{[\text{doador de elétrons}]^x}$$

Onde:

R = constante universal dos gases perfeitos (8,314 J/m.K);

T = temperatura absoluta (K);

n = número de elétrons transferidos por molécula;

F = constante de Faraday (96,406 J/V).

x = número de mols do receptor de elétrons

y = número de mols do doador de elétrons.

A cisteína (Cys) e seu respectivo dissulfeto, cistina (CySS), constituem o principal par de tióis/dissulfetos de baixo peso molecular no plasma de mamíferos Jones et al. (2002) e o *pool* de Cys/CySS é um dos pontos centrais de controle redox envolvidos na sinalização biológica. (JONES et al., 2004). A cisteína é o único aminoácido que possui o grupo tiol (-SH) Rizvi; Maurya (2008) e, por conta disso, pode sofrer oxidações reversíveis sob condições fisiológicas. (VAN LAER et al., 2012). Este aminoácido é facilmente oxidado para formar um aminoácido dimérico, unido covalentemente, denominado cistina (CySS), em que duas moléculas de Cys estão unidas por uma ligação dissulfeto.

As oxidações reversíveis observadas para a Cys proporcionam o controle de uma extensa variedade de atividades e estruturas de proteínas Schafer; Buettner (2001), de maneira que mudanças no estado redox desse par de tiol/dissulfeto afetam interações DNA proteína, atividade de enzimas, conformações protéicas, interações entre proteínas, bem como atividades de transporte e degradação proteicos. (VALKO et al., 2007).

Segundo Jones et al. (2002), a concentração de equilíbrio do par Cys/CySS em plasma apresenta-se alterada mais em função das concentrações de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, o que sugere que este par redox pode indicar situações de stress oxidativo sistêmico. Comprovando esta relação, em humanos o potencial de redução do par Cys/CySS (E_h CySS) em plasma esteve mais elevado (mais oxidado) em situações relacionadas a maiores níveis de oxidação, tais como envelhecimento Jones et al. (2002), tabagismo Moriarty et al. (2003) e ocorrência de doença cardiovascular. (ASHFAQ et al., 2006).

Em humanos saudáveis, as concentrações de Cys livre reportadas em plasma atingem níveis de cerca de 8 a 10 μ M, enquanto que a CySS atinge concentrações de cerca de 40 a 50 μ M Jones et al. (2002), concentrações estas compatíveis com um potencial redox para o par Cys/CySS de -80mV.

(VAN LAER et al., 2012). Em roedores, este potencial é de aproximadamente -100mV Van Laer et al. (2012), e em espécies de animais de produção até o momento não se encontraram em literatura trabalhos que tenham estabelecido estes potenciais.

Lykkesfeldt; Svendsen (2007) apontaram diferentes condições já caracterizadas e diretamente relacionadas a stress oxidativo em animais de produção, tais como pneumonia, enterite e sepse em suínos; mastite e pneumonia em bovinos e obstrução das vias aéreas e exercício intenso em equinos. Contudo, a grande maioria dos trabalhos citados pelos autores caracteriza o stress oxidativo através da identificação de produtos da oxidação lipídica e substâncias antioxidantes em tecidos ou em plasma dos animais, não proporcionando comparação entre diferentes níveis de stress e ou eficácia de terapia antioxidante.

É possível verificar na literatura recente diferentes trabalhos que tratam de avaliações de stress oxidativo em várias espécies animais, stress este relacionado a distintas condições fisiológicas e ou de produção. Abuelo et al. (2013), na tentativa de determinar um índice de stress oxidativo em vacas leiteiras durante diferentes períodos de produção, mensurou a capacidade antioxidante do plasma, bem como a concentração total de substâncias pró-oxidantes. Neste trabalho, os autores definiram stress oxidativo como um desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes no organismo e sugeriram o estabelecimento de um índice de stress oxidativo obtido a partir da razão pró-oxidantes/antioxidantes em plasma, conforme proposto por Celi (2011), de maneira a determinar o risco de desenvolvimento de doenças pelos animais. Os autores encontram diferenças neste índice, relativas a períodos em que há uma maior demanda metabólica dos animais (período pré-parto e pós-parto). Porém, nos animais que estariam teoricamente sofrendo maior stress, o índice indica uma resposta antioxidante maior, que é explicada pelos autores como decorrente da suplementação vitamínica empregada neste período. Dessa forma, a utilidade deste índice é relativizada, já que a inclusão de antioxidantes à dieta pode influenciar no mesmo, e os eventuais benefícios desta maior atividade antioxidante não foram descritos no trabalho, de forma que este efeito

observado não necessariamente indicaria uma real proteção antioxidante aos animais, tendo em vista os conceitos apresentados por Jones (2006).

Resultados de estudos clínicos realizados em humanos, os quais adotaram terapia antioxidante preventiva ou atenuante de doenças relacionadas a stress oxidativo, baseando-se no conceito de desequilíbrio redox, demonstraram que na maioria das vezes, não havia melhora no quadro clínico dos grupos avaliados ao se adotar tal terapia. (GOODMAN et al., 2004; LONN et al., 2005; ROBINSON et al., 2006; ORRELL et al., 2007).

Jiang et al. (2011) perceberam aumento significativo na concentração de Malondialdeído e redução na atividade total das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase em soro e fígado de leitões expostos à micotoxina zearalenona, sugerindo a ocorrência de stress oxidativo induzido pela mesma. Neste caso, os autores relacionam a ação da toxina com o aumento na peroxidação lipídica decorrente de uma redução na defesa antioxidante enzimática dos animais. Contudo, ao controlar índices zootécnicos tais como ganho de peso e conversão alimentar, não detectam efeito significativo da toxina.

Jafari et al. (2012), avaliando o impacto da suplementação de Vitamina E em aves artificialmente infectadas com *Eimeria*, quantificaram a concentração total de lipoperóxidos no plasma, bem como a capacidade antioxidante do soro de aves suplementadas ou não com a vitamina. Neste trabalho, a abordagem utilizada para caracterização de stress oxidativo também considerou a quantidade total de oxidantes e antioxidantes, comparando tais níveis.

É possível perceber que todos os trabalhos citados que avaliaram alterações no equilíbrio redox dos animais, trazem uma abordagem de stress oxidativo definida como um desequilíbrio entre a quantidade de substâncias antioxidantes e pró-oxidantes. A Figura 1 ilustra a abordagem do stress oxidativo levando-se em conta o desequilíbrio entre a relação total de substância oxidantes e antioxidantes, descrevendo os objetos de estudo para tipos de substâncias, e a vantagem de se utilizar uma ferramenta que proporcione a quantificação do stress de maneira a estabelecer situações de equilíbrio de pares redox representativos da situação do organismo.

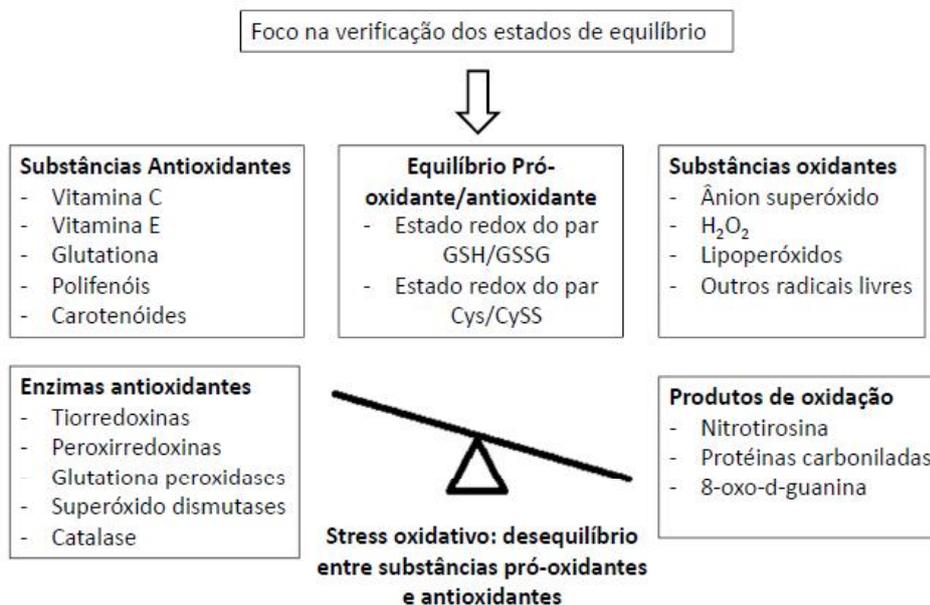


FIGURA 1. DEMONSTRAÇÃO DO CONCEITO DE STRESS OXIDATIVO COMO UM DESEQUILÍBRIO ENTRE SUBSTÂNCIAS PRÓ-OXIDANTES E ANTIOXIDANTES E OBJETOS DE ESTUDO PARA CARACTERIZAR CADA CONDIÇÃO. É DADA ÊNFASE À VERIFICAÇÃO DO ESTADO DE EQUILÍBRIO DE PARES REDOX QUE REFLITAM O ESTADO SISTÊMICO DE OXIDAÇÃO SEM LEVAR EM CONSIDERAÇÃO O EFEITO ISOLADO DE DETERMINADAS SUBSTÂNCIAS. FONTE: O AUTOR (2015), ADAPTADO DE JONES, 2006.

A definição proposta por Jones (2006), em que stress oxidativo pode ser melhor expresso como uma alteração na sinalização e controle redox, sendo que se pode observar stress oxidativo por meio da alteração de determinado circuito redox sem a necessária ocorrência de desequilíbrio redox global, indica que parâmetros que possibilitem a detecção de eventuais situações de stress oxidativo, bem como sua quantificação, seriam mais úteis, pois possibilitariam a compreensão de determinadas condições que levem ao desequilíbrio no estado redox do animal sob uma mesma ótica. Dessa forma, o monitoramento do estado redox do animal utilizando técnica que permita mensurar a quantidade de determinados pares redox pode viabilizar intervenções antes de se observarem situações de stress compatíveis com redução nos índices produtivos ou, posteriormente, doença clínica.

Com relação à melhora de índices produtivos, é prática comum na produção animal, a utilização de aditivos alimentares destinados a esta finalidade. (LIMA 1999; Nicodemo 2001; De Araujo et al., 2007;). Dentre estes aditivos, destacam-se os aditivos melhoradores de desempenho, que segundo classificação na legislação brasileira (BRASIL. Ministério da Agricultura, 2004), são substâncias definidas quimicamente que melhoram os parâmetros de produtividade dos animais, tais como aumento no ganho de peso, redução na conversão alimentar e na ocorrência de mortalidade.

Este grupo de aditivos é composto por substâncias com ação antimicrobiana, sendo que seu mecanismo de ação está baseado na inibição de determinadas populações microbianas no trato digestório dos animais, levando a uma melhora na digestão, economia de nutrientes, controle de doenças subclínicas, efeito protetor contra a produção de toxinas e efeito metabólico. (Menten 1995; Mellor 2000; Nicodemo 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

3.1.1 Suínos

Foram coletadas amostras de sangue de leitões machos em período de creche, provenientes de diferentes grupos tratados com antibiótico melhorador de desempenho (AMD), por meio de punção da veia cava cranial, utilizando-se seringa e agulha heparinizadas. Os animais eram provenientes de uma mesma unidade produtora de leitões, todos pertencentes à linhagem genética DB-Danbred. Esta avaliação foi realizada na unidade de pesquisa em suínos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, construída em parceria com a empresa Impextraco Latin America. Diferentes inclusões de AMD foram utilizados na dieta dos animais para verificar efeito sobre o desempenho zootécnico. Foram utilizados 6 tratamentos compostos cada qual por 8 repetições de 3 animais, totalizando 144 animais. Um grupo controle foi tratado somente com dieta basal e 5 grupos foram tratados com a mesma dieta adicionada de AMD (22ppm de tilosina; 20, 40 ou 60 ppm de colistina) . As dietas foram divididas de acordo com a fase de criação dos animais a partir do alojamento (pré-inicial: de 1 a 14 dias; e inicial: de 15 a 35 dias), sendo fornecidas *ad libitum* aos animais. Na Tabela 1, estão descritas as dietas utilizadas no experimento de acordo aos níveis nutricionais calculados.

TABELA 1. NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS UTILIZADAS EM TODOS OS TRATAMENTOS AVALIADOS DE ACORDO COM FASE DE CRIAÇÃO.

Níveis nutricionais	Pre-inicial (1-14d)	Inicial (15-35d)
Proteína bruta (%)	19,54	18,53
Extrato etéreo (%)	2,29	2,33
Lactose (%)	6,03	4,42
Fibra bruta (%)	0,87	0,82
Calcio (%)	0,68	0,63
Fósforo (%)	0,46	0,41
Sódio (%)	0,34	0,25
Cloro (%)	1,49	1,54
Lisina (%)	0,44	0,4
Metionina+Cisteína (%)	0,74	0,69
Treonina (%)	0,25	0,23
Colina (%)	0,89	0,83
EM ¹ (kcal/Kg)	3341,5	3335,06

FONTE: O AUTOR (2015)

¹ENERGIA METABOLIZÁVEL.

Os animais foram pesados no alojamento e ao final de cada semana do período experimental, bem como foram monitorados quanto à ocorrência de diarreia através de procedimento descrito por Vassalo et al. (1997), em que escores 0 e 1 eram referentes a fezes normais e escores 2 e 3 eram compatíveis com fezes diarreicas. As amostras de sangue foram coletadas de um mesmo animal de cada repetição de todos os tratamentos ao alojamento e aos 7, 21, 28 e 35 dias desde o início do experimento. Adotou-se, para este fim, o animal de maior peso corporal na baia ao início do período de alojamento, sendo que este mesmo animal foi avaliado nos períodos subsequentes.

3.1.2 Bovinos de corte

Foram coletadas amostras de sangue de bovinos de corte provenientes de experimento visando avaliação do efeito de adição de

ionóforo (monensina sódica a 250mg/animal/dia) à dieta de animais em confinamento.

O experimento foi conduzido no Núcleo de Produção Animal (NUPRAN) do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), em Guarapuava, PR. Foram utilizados 40 novilhos não castrados, de genética similar (1/2 sangue angus), com idade inicial de 12 meses, distribuídos em 2 tratamentos de 10 repetições cada um. Os animais foram desverminados e equilibrados por peso e condição corporal para cada baia. Dessa forma, os animais foram pesados, após jejum de sólidos de 12 horas, no início e fim do período experimental, com pesagens intermediárias a cada 28 dias, totalizando um período de avaliação de 84 dias. No momento das pesagens, foi coletado sangue de um mesmo animal por baia através da veia coccígea, com auxílio de agulha e seringa heparinizadas, seguindo-se com processamento a ser descrito na seção 3.2. Adotou-se, para este fim, o animal de maior peso corporal na baia ao início do período de alojamento, sendo que este mesmo animal foi avaliado nos períodos subsequentes.

O manejo alimentar dos animais foi conduzido por meio do fornecimento diário *ad libitum* de uma ração total misturada composta por 50% de volumoso (silagem de milho) e 50% de concentrado proteico (milho e concentrado comercial), cujos níveis nutricionais estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS UTILIZADOS NO ARRAÇOAMENTO DOS ANIMAIS.

Parâmetro	Silagem de milho	Grãos de milho	Concentrado proteico
Matéria seca, %	37,35	90,03	89,99
Matéria mineral, %MS ¹	2,42	0,76	21,03
Proteína bruta, %MS	5,91	7,60	42,71
Fibra em detergente neutro, %MS	53,61	17,13	22,85
Fibra em detergente ácido, %MS	29,04	5,93	10,77
Nutrientes digestíveis totais, %MS	67,51	83,69	69,70

FONTE: O AUTOR (2015)

¹PERCENTUAL RELATIVO À QUANTIDADE DE MATÉRIA SECA (MS) DO ALIMENTO.

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE

Os procedimentos de coleta de sangue foram os mesmos para suínos e bovinos, e foram realizados sempre pela mesma equipe. Para a determinação de tióis e dissulfetos em plasma, foi coletada amostra de 3mL de sangue, a qual foi imediatamente transferida a um tubo de microcentrífuga contendo solução de preservação – tubo 1 (descrita posteriormente). Neste tubo, foi adicionado precisamente 1350 μ L de sangue total, o qual foi misturado a 150 μ L da solução de preservação previamente adicionada ao mesmo. No momento da adição do sangue, o tubo 1 estava em temperatura ambiente. Após isso, o tubo foi gentilmente invertido duas vezes de maneira a homogeneizar a solução de preservação e o sangue.

Na sequência, o tubo foi submetido à centrifugação em microcentrífuga Eppendorf por 60 segundos a 4300 x g de maneira a separar o plasma. 200 μ L de plasma foram então retirados do tubo 1 e transferidos ao tubo 2.

O tubo 2 foi então homogeneizado e imediatamente acondicionado em gelo seco e posteriormente armazenado em freezer a -80°C até ser utilizado para os procedimentos analíticos.

O tempo decorrido desde a coleta do sangue até o acondicionamento do plasma em gelo seco foi controlado e não excedeu 3 minutos para nenhuma das amostras coletadas.

Uma amostra adicional de 3mL de sangue dos suínos foi coletada nos mesmos momentos, sendo imediatamente refrigerada e posteriormente utilizada para determinação do perfil de células mononucleares circulantes (descrito no item 3.9.1).

Da mesma forma, uma amostra adicional de 5mL de sangue de bovinos foi igualmente coletada e refrigerada, sendo posteriormente utilizada para determinação de variáveis de bioquímica clínica, posteriormente descritas no item 3.9.2.

3.3 REAGENTES QUÍMICOS

Ácido bórico, bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), L-serina (Sigma S4500), dissulfonato de batofenantrolina (BPDS), ácido iodoacético, ácido perclórico, hidróxido de potássio (KOH), tetrahidroborato ($\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloreto de Dansila, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) - DTNB, borohidreto, acetona, acetato de sódio tri-hidratado (para HPLC), ácido acético glacial (para HPLC) e metanol (para HPLC) assim como os padrões analíticos Cys (C7352), CySS (C122009), GSH (G4251) e GSSG (G4501) eram todos da marca Sigma Aldrich. O padrão interno γ -glutamilglutamato (γ -EE) foi adquirido da empresa MP Biomedicals. Água ultra pura (Milli-q) foi utilizada para a produção das soluções.

3.4 SOLUÇÕES

3.4.1 Soluções utilizadas no procedimento de coleta e preservação de amostras

- Solução de preservação (tubo 1):

Utilizou-se 12,4g de Ácido Bórico e 19g de Bórax em 500mL de água destilada e deionizada (Água Milli-q) para preparação de solução estoque de tampão borato 0,5M. Para preparo de 66 tubos 01 (tubo de microcentrífuga 2,0mL), foram adicionados 530mg de L-serina, 50mg de dissulfonato de batofenantrolina (BPDS) e 300mg de Ácido Iodoacético em 10 mL de tampão Borato 0,5M. Cada "tubo 1" recebeu 150 μ L desta solução e estes foram armazenados a -20°C.

- Solução de precipitação de proteínas e padrão interno (tubo 2):

Uma solução de Ácido Perclórico contendo 0,2M de Ácido Bórico foi preparada adicionando 6,2g de Ácido Bórico em aproximadamente 300mL de

água Milli-q. Após solubilização, foi adicionado 71mL de Ácido Perclórico (70%) e quantidade suficiente de água Milli-q para completar o volume até 500mL. Para os “tubos 2”, 190 μ L da solução de precipitação foram adicionados em microtubos de 1,5mL e armazenados a -20°C. O padrão interno γ -EE foi adicionado posteriormente no volume de 10 μ L, de modo a proporcionar uma concentração final de 8,25 μ M.

3.4.2 Soluções para procedimento de derivatização de amostras

Para o protocolo de derivatização, preparou-se com antecedência mínima de 24 horas, solução saturada de KOH/tetrahidroborato através da adição de 5,6g de KOH a uma garrafa plástica contendo 50g de tetrahidroborato e 100mL de água Milli-q.

No dia da derivatização, preparou-se solução de cloreto de dansila por meio da adição de 200mg deste composto a 10mL de acetona.

3.4.3 Soluções para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Solução estoque de tampão acetato foi preparada misturando-se 272g de acetato de sódio tri hidratado, 122mL de água Milli-q e 378mL de ácido acético glacial, mantendo-se *overnight* em agitador.

As soluções utilizadas nas fases móveis foram:

- solução A: (80% metanol e 20% água).
- solução B: (640 mL de metanol, 200 mL de solução de tampão acetato, 125 mL ácido acético glacial, e 50 mL de água)

Soluções estoque de 1mM dos padrões analíticos de CyS, CySS, GSH e GSSG foram preparadas dissolvendo-se quantidade suficiente de cada padrão em solução de água Milli-q, conforme apresentado na Tabela 3, sendo estas soluções posteriormente filtradas em membrana de nylon

0,22 μ M e divididas em alíquotas de 1mL que foram armazenadas a -80°C até posterior utilização.

TABELA 3. VOLUME QUANTIFICADO (MG) DE PADRÃO EXTERNO DE MANEIRA A PRODUZIR 100mL DE SOLUÇÃO 1mM.

Padrão	Volume (mg) para 100mL de solução 1mM
Cys	12,1
CySS	24,03
GSH	30,7
GSSG	61,26

FONTE: O AUTOR (2015)

Para estabelecimento das curvas analíticas, soluções aquosas contendo todos os padrões externos foram preparadas diretamente nos “tubos 1”, mimetizando o protocolo de coleta de amostras e guardando os mesmos volumes de transferência dos “tubos 1” para os “tubos 2”.

Para compor os pontos da curva de calibração dos padrões externos, trabalhou-se sempre com 5 pontos distintos, sendo utilizadas as concentrações de 5, 10, 30, 50 e 70 μ M (Tabela 4).

TABELA 4. EXEMPLO DE COMPOSIÇÃO DE SOLUÇÕES DE PADRÕES EXTERNOS MÚLTIPLOS UTILIZADAS PARA A COMPOSIÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO, SEGUNDO VOLUMES QUANTIFICADOS DE CADA SOLUÇÃO ESTOQUE.

	Padrão múltiplo (concentrações nominais finais)				
	5 μ M	10 μ M	30 μ M	50 μ M	70 μ M
Soluções estoque	Volume quantificado (μ L)				
CyS (1mM)	7,5	15	45	75	105
CySS (1mM)	7,5	15	45	75	105
GSH (1mM)	7,5	15	45	75	105
GSSG (1mM)	7,5	15	45	75	105
Água Milli-q	1320	1290	1170	1050	930
solução de preservação (tubo 1)	150	150	150	150	150
volume final total (μ L)	1500	1500	1500	1500	1500

FONTE: O AUTOR (2015)

Após preparação das soluções contendo múltiplos padrões, transferiu-se 200 μ L de cada solução para um tubo 2 correspondente contendo 200 μ L de solução de precipitação de proteínas, ao qual foi adicionado 10 μ L de solução de γ -EE de maneira a atingir uma concentração final de 8,65 μ M deste. Seguiu-se então com protocolo de derivatização descrito na seção 3.7

As concentrações teóricas estabelecidas para os padrões externos foram posteriormente corrigidas de acordo à determinação espectrofotométrica, descrita na seção 3.5, aplicando-se fator de correção específico estabelecido individualmente para cada padrão.

3.5 DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DAS CONCENTRAÇÕES DOS PADRÕES DE CYS E CYSS E GSH E GSSG

As concentrações das soluções estoque dos padrões externos foram confirmadas através de espectrofotometria, utilizando o DTNB.

O DTNB reage apenas com o grupo tiol. Dessa forma, para determinar a concentração de cistina e glutathiona dissulfeto foi necessário reduzir ambos

os compostos utilizando-se de borohidreto. (JOCELYN 1987; JACOBSEN et al., 1994).

A redução foi realizada adicionando-se, em um tubo de 1,5 mL, 100 µL da solução estoque (1 mM) de cistina e 35 µL de uma solução 1,43 M NaBH₄ dissolvida em 0,1 M NaOH. O mesmo foi realizado para solução de GSSG. Em outro tubo de 1,5 mL foram adicionados 100 µL de água Milli-q e 35 µL da solução de borohidreto. Os tubos foram então incubados a 36°C por 30 minutos. Após essa etapa foi acrescentado 70 µL de 1M HCl aos tubos e estes foram agitados até pararem de borbulhar.

Para a reação com DTNB foram colocados separadamente, em tubos de 1,5 mL, 50 µL da solução de cistina reduzida e 50 µL da solução de Glutathiona dissulfeto reduzida ou 50 µL de água Milli-q tratada com NaBH₄. Aos tubos foram adicionados 950 µL de uma solução 0,5 mM DTNB, 0,5 mM DTPA em 50 mM KH₂PO₄. Foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro, em 412 nm, e a concentração foi calculada através da equação:

$$A = \epsilon b c$$

Onde:

A = Absorbância

ϵ = Coeficiente de absorção molar (14100 M⁻¹ x cm⁻¹)

b = Caminho óptico da cubeta (1 cm)

c = Concentração (M)

Para a determinação da concentração da cisteína e glutathiona, foi utilizada a mesma reação com DTNB, porém sem realizar redução prévia.

3.6 PREPARAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PLASMA

As amostras de plasma a serem derivatizadas foram descongeladas e o pH foi corrigido para 9 ($\pm 0,2$) através da adição de 250 μL da solução saturada de KOH/Tetrahidroborato. Após a verificação do pH, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por vinte minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 300 μL da solução de Cloreto de dansila diluído em Acetona, sendo as amostras envoltas em papel alumínio e transferidas à estufa com temperatura constante de 25°C durante 20 horas. Após esse período, foram adicionados 500 μL de clorofórmio para extrair o cloreto de dansila que não reagiu com a amostra, sendo as amostras armazenadas na presença do precipitado de perclorato e na camada de clorofórmio a uma temperatura de 0-4°C até serem submetidas a análise por meio de HPLC.

As amostras foram analisadas dentro de menos de 7 dias desde a derivatização.

Após procedimento de derivatização, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 12.000 x g em microcentrífuga Eppendorf. Alíquotas de 50 μL da fase aquosa (camada superior) foram então retiradas para injeção no cromatógrafo.

3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência consiste na partição de componentes de uma mistura entre uma fase móvel, que é representada por soluções contendo diferentes solventes, e uma fase estacionária, representada por partículas sólidas empacotadas em uma coluna. As forças químicas e físicas resultantes entre a interação dos solutos e os componentes das duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre as colunas cromatográficas. Assim, as substâncias presentes em determinada solução líquida migram, carregadas pela fase móvel, mais rapidamente ou mais lentamente através da fase estacionária, dependendo de suas propriedades, proporcionando sua separação. (NELSON; COX 2002).

O protocolo de análise seguido no presente trabalho foi o proposto por Jones; Liang (2009), com pequenas alterações. Segundo os autores, este protocolo baseia-se na coleta de amostras de sangue sem promover hemólise e incluindo uma solução de preservação para bloquear os tióis presentes na amostra imediatamente após a coleta. As amins presentes são posteriormente modificadas através de reação com cloreto de dansila (procedimento chamado de derivatização), de forma a proporcionar quantificação por meio de fluorescência. Os derivados formados são então separados por HPLC utilizando uma coluna de troca iônica fraca com eluição por gradiente de solventes, sendo posteriormente quantificados.

No presente trabalho, utilizou-se um sistema cromatográfico Shimadzu Prominence (Série LCA20) com detecção por fluorescência (detector de fluorescência Shimadzu RF-20A - excitação a 335nm e emissão detectada a 518 nm), uma bomba modelo LC-20AD, degaseificador modelo DGU-20 e forno para coluna equipados com um injetor manual Rheodyne. A separação dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna LC-NH2 Supelco (25cm x 4,6mm, 5 μ m) da marca Sigma Aldrich (Cat. No. 58338), acondicionada a uma temperatura de 40°C. O controle do equipamento e a análise dos dados foram feitos através do programa LC Solution (Shimadzu).

O fluxo de passagem no HPLC foi mantido constante a uma taxa de 1mL/minuto.

Jones; Liang (2009) propuseram um gradiente de solvente compatível com uma corrida cromatográfica que totaliza 60 minutos. No presente trabalho, este gradiente foi alterado de maneira a reduzir o tempo da corrida cromatográfica para 45 minutos da seguinte maneira: Condições iniciais de solvente de 80%A (80% metanol e 20% água), 20%B (640 mL de metanol, 200 mL de solução de acetato, 125 mL ácido acético glacial, e 50 mL de água) durante 3,7 minutos. Aos 3,71 minutos, este gradiente era alterado para 66,8%A e 33,2%B aplicando um gradiente linear seguindo a proporção 37,14%A, 62,86%B durante um período de 3,71 a 21 minutos. Aos 21,1 minutos, este gradiente era novamente alterado para 20%A, 80%B, aplicando-se novamente um gradiente linear seguindo a proporção 10%A, 90%B durante um período de 21,1 a 35 minutos. Aos 35,1 minutos, este

gradiente era novamente alterado para 80%A, 20%B, sendo mantido nestas condições até atingir o tempo de 45 minutos, encerrando-se a corrida cromatográfica (a representação gráfica deste gradiente, bem como do gradiente proposto por Jones; Liang (2009); está apresentada na Figura 2 e na Figura 3).

Para identificar os tempos de retenção e respectivo picos de cada analito (Cys, CySS, GSH e GSSG), bem como de padrão interno (y-EE) dentro do protocolo proposto por Jones; Liang (2009), utilizaram-se soluções de padrões externos individuais e associados (múltiplos), visando à determinação do tempo de corrida ótimo, que proporcionasse adequado tempo de estabilização da coluna entre uma corrida e outra. Da mesma forma, amostras de plasma de suínos foram também utilizadas para a identificação dos picos dos analitos e padrão interno, de forma a se certificar que o método estava efetivamente identificando os analitos de interesse.

3.8 CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS E POTENCIAL DE REDUÇÃO DE CYS/CYSS

Para obtenção das concentrações dos analitos, os valores da integral estabelecidos pelo software do HPLC para picos correspondentes a GSH, GSSG, CyS e CySS foram utilizados e as concentrações relativas às integrais dos padrões internos nas mesmas amostras foram calculadas utilizando curva de calibração estabelecida para cada analito.

Para o estabelecimento das curvas de calibração, utilizou-se o método de regressão linear, o qual preconiza uma relação linear simples descrita pela equação $y = ax + b$ em que a área do pico do analito relativa à área do pico do padrão interno representa a variável x , e a concentração do analito sabida de cada solução de padrão externo representa a variável y ; sendo a o valor da inclinação da reta e b o intercepto da reta no eixo y .

As concentrações individuais de cada analito dentro de cada amostra avaliada, expressas em valores molares, foram utilizadas na equação de Nernst para calcular o potencial redox.

Para plasma a pH 7,4 um valor de E_0 de -250mV foi utilizado para o par Cys/CySS, seguindo-se a fórmula:

$$E_{h\text{CySS}} = E_0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln \frac{[\text{CySS}]}{[\text{Cys}]^2}$$

Onde:

$$E_0 = -250 \text{ mV};$$

$$R = 8,314 \text{ J/ml.K};$$

$$T = 309\text{K};$$

$$n = 2;$$

$$F = 96,406 \text{ J/V};$$

3.9 DEMAIS VARIÁVEIS UTILIZADAS

3.9.1 Avaliações de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de suínos por meio de citometria de fluxo.

Para determinação do perfil de PBMC, as amostras de sangue foram enviadas à empresa Imunova Análises Biológicas, sendo tratadas segundo técnica descrita por Filho et al. (2013).

Brevemente, o sangue total foi diluído 1:1 com solução tampão fosfato e adicionado a 1ml de Histopaque 1077 (Sigma), sendo posteriormente submetido a centrifugação a 450 x g por 30 minutos a 22°C, seguido de duas etapas de lavagem com 4ml de solução tampão fosfato e centrifugação a 450 x g por 7 minutos. Um volume de cerca de 180µL do concentrado celular

(correspondente a aproximadamente 10^6 células) foi utilizado para marcação com os anticorpos específicos, seguido de fixação com paraformaldeído por 30 minutos a 4°C, posteriormente acondicionados em tubos de citometria em volume final de 400µL de PBS e submetidos a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD).

Anticorpos monoclonais primários específicos para suínos (Southern Biotechnology Associates, Inc) foram utilizados para detectar antígenos de superfície dos leucócitos purificados: mouse anti-porcine CD4 FITC; mouse anti-porcine CD8α R-PE; mouse anti-porcine B cell R-PE; e mouse anti-porcine Kul-1 FITC.

3.9.2 Avaliações de marcadores bioquímicos em sangue bovino

As amostras de sangue bovino foram enviadas ao laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFPR, onde foram submetidas à centrifugação a 3000 x g para separação do plasma. Alíquotas de plasma de cada amostra foram transferidas ao analisador automático Mindray® BS200, China, que quantificou as concentrações de fibrinogênio plasmático, proteína total, albumina, AST, GGT, creatinina e uréia.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para o potencial calculado para o par Cys/CySS (E_h CySS) em suínos foram submetidos à análise de correlação linear, de maneira a compreender eventuais tendências observadas entre esta variável e as variáveis idade, peso corporal, ocorrência de diarreia e conversão alimentar. Da mesma forma, eventuais efeitos do peso, idade, adição de antibióticos e ocorrência de diarreia sobre os níveis determinados dos respectivos potenciais foram verificados por meio de modelos mistos,

utilizando-se o software JMP, considerando cada animal avaliado no tempo como variável aleatória e as demais variáveis incluídas como efeitos fixos.

Para ambas as análises foi utilizado um nível de significância de 5% para verificação dos efeitos testados. A variação do E_hCySS entre os períodos avaliados, a ocorrência de diarreia, a idade dos animais e as interações destes fatores, foram utilizadas para verificar impactos no ganho de peso médio diário dos animais e na conversão alimentar. Para isso, foram igualmente utilizados modelos mistos, utilizando-se o software JMP, considerando cada animal avaliado no tempo como variável aleatória e as variáveis citadas e interações como efeitos fixos.

Para verificação do efeito do E_hCySS sobre os resultados observados para o perfil circulante de célula mononucleares, seguiu-se primeiramente com análise de correlação linear, verificando-se a interação daquela variável com cada população celular determinada. Os valores percentuais obtidos de cada subtipo celular foram transformados aplicando-se o logaritmo natural anteriormente às análises. Efeitos do E_hCySS , da idade dos animais e interação destes fatores sobre as populações celulares que demonstraram tendências após análise de regressão linear, foram igualmente avaliados por meio de modelo misto considerando cada animal avaliado no tempo como variável aleatória e as variáveis citadas como efeitos fixos, com igual nível de significância.

Os valores obtidos do E_hCySS , peso corporal, ganho de peso e conversão alimentar de bovinos foram igualmente submetidos à análise de correlação linear de maneira a observar eventuais tendências entre essas variáveis. Da mesma forma, eventuais efeitos do peso e adição de ionóforo sobre os níveis determinados dos respectivos potenciais foram verificados por meio de modelos mistos, utilizando-se do mesmo software de análise estatística, considerando cada animal avaliado no tempo como variável aleatória e as demais variáveis incluídas como efeitos fixos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO CROMATOGRÁFICO

A adaptação da metodologia proposta por Jones; Liang (2009) foi realizada através da alteração do gradiente de solventes de maneira a reduzir o tempo total de corrida e adicionando-se o padrão interno diretamente ao tubo 2 (descrito previamente na seção 3.4.1) devido à disponibilidade deste insumo.

Primeiramente, diversas injeções de soluções de padrões externos foram realizadas visando à obtenção de um tempo de corrida que proporcionasse a correta identificação dos analitos, reduzindo-se o tempo total da corrida cromatográfica.

Com relação ao gradiente de solventes, o gradiente sugerido por Jones; Liang (2009) está descrito na Figura 2.

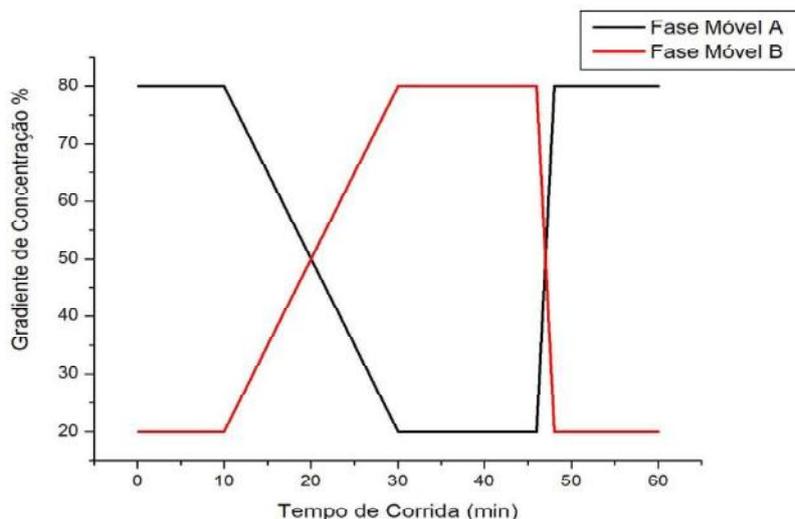


FIGURA 2. DEMONSTRAÇÃO DO GRADIENTE DE SOLVENTES DURANTE CORRIDA DE 60 MINUTOS SUGERIDO POR JONES; LIANG (2009). FONTE: O AUTOR (2015)

O gradiente de solventes obtido para a metodologia adaptada estabelecida na presente avaliação está representado na Figura 3.

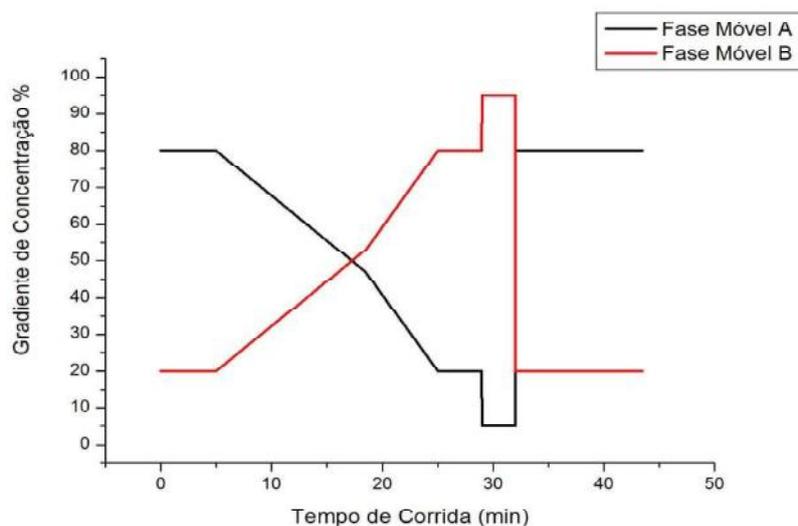


FIGURA 3. DEMONSTRAÇÃO DO GRADIENTE DE SOLVENTES ESTABELECIDO PARA CORRIDA DE 45 MINUTOS OBTIDO APÓS OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO. FONTE: O AUTOR (2015)

Os cromatogramas apresentados na Figura 4 e Figura 5, obtidos a partir da injeção de 50 μ L de soluções de padrão múltiplo contendo 30 μ M de cada analito pesquisado, bem como 8,25 μ M de padrão interno, quando processadas utilizando o gradiente sugerido por Jones; Liang (2009) e conforme determinado na presente metodologia, demonstram que a alteração do gradiente não impactou na correta identificação dos picos dos analitos de interesse.

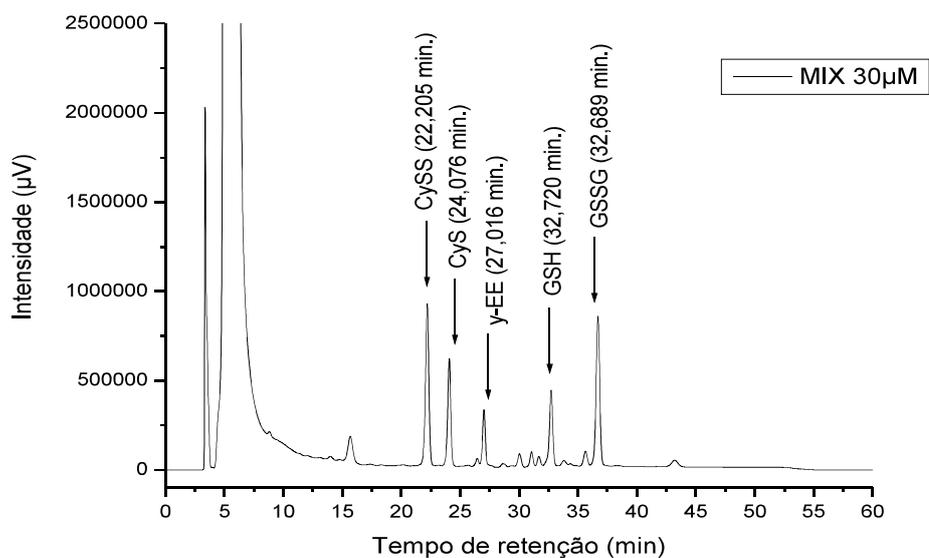


FIGURA 4. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO OBTIDO PARA SOLUÇÃO DE PADRÃO MISTO DE 30 µM DE CYS, CYSS, GSH E GSSG, BEM COMO 8,25 µM DE Y-EE COM RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PICOS UTILIZANDO GRADIENTE DE SOLVENTES CONFORME SUGERIDO POR JONES; LIANG (2009). (INJEÇÃO DE 50µL DE SOLUÇÃO)
 FONTE: O AUTOR (2015)

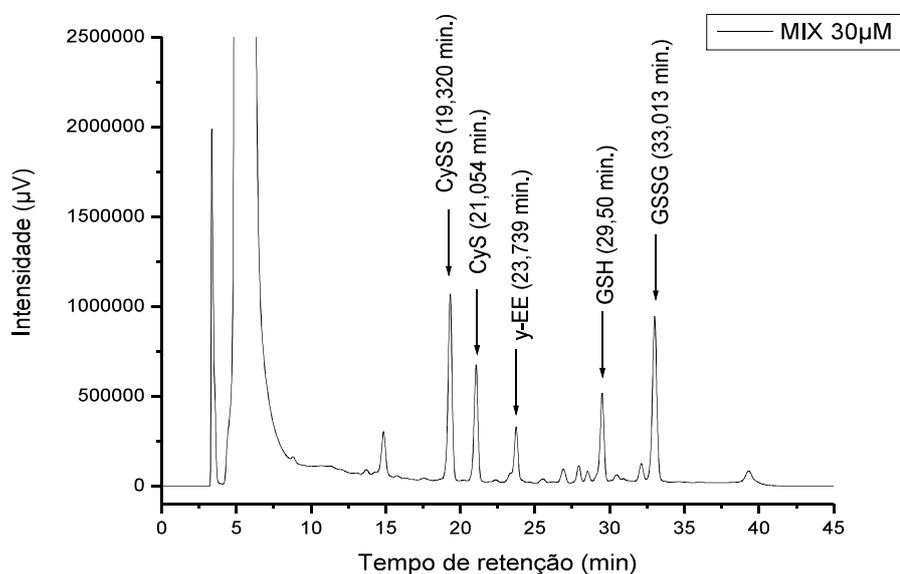


FIGURA 5. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO OBTIDO PARA SOLUÇÃO DE PADRÃO MISTO DE 30µM DE CYS, CYSS, GSH E GSSG, BEM COMO 8,25 µM DE Y-EE COM RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PICOS UTILIZANDO GRADIENTE DE SOLVENTES CONFORME METODOLOGIA ADAPTADA. (INJEÇÃO DE 50µL DE SOLUÇÃO).
 FONTE: O AUTOR (2015)

Percebe-se que a metodologia adaptada proporcionou a redução do tempo de corrida em 15 minutos em relação à metodologia original, preservando a correta identificação dos picos dos analitos, otimizando o tempo necessário para injeções das amostras.

Uma vez adaptada a metodologia, seguiu-se com injeção de amostra de plasma suíno para identificação dos analitos a serem quantificados. A Figura 6 demonstra que os analitos de interesse são efetivamente identificados através da metodologia proposta, bem como o padrão interno (γ -EE) é efetivamente identificado na amostra e na solução de padrões externos em concentrações muito semelhantes, conforme esperado.

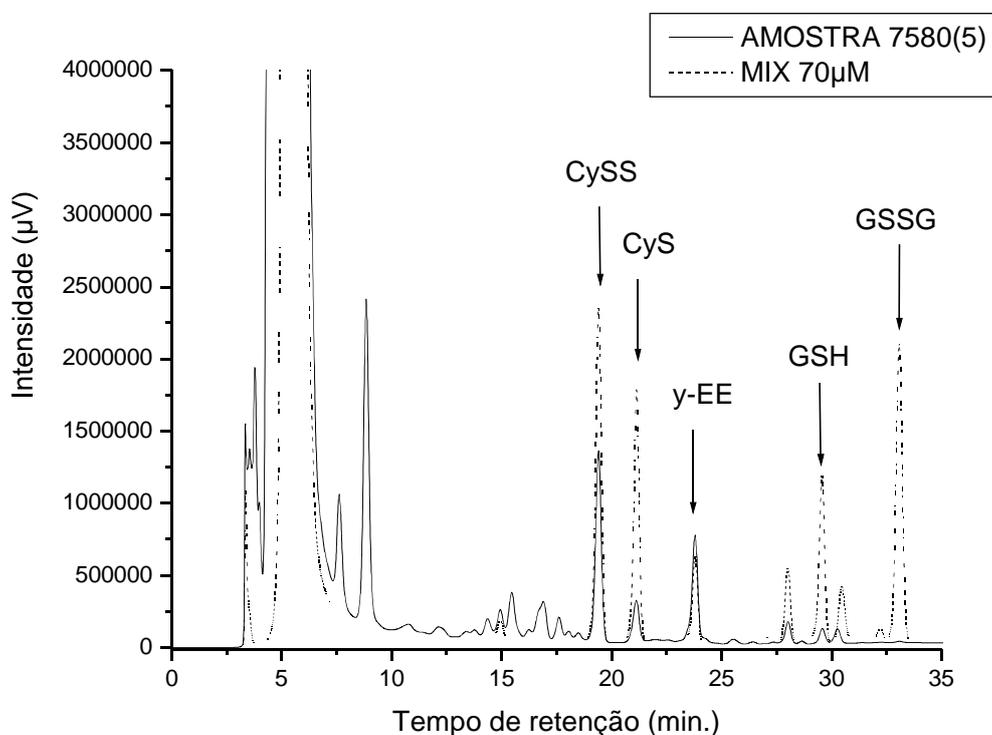


FIGURA 6. DEMONSTRAÇÃO DE CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS SOBREPOSTOS, OBTIDOS PARA SOLUÇÃO DE PADRÃO MÚLTIPLO DE $70\mu\text{M}$ DE CYS, CYSS, GSH, GSSG E $8,25\mu\text{M}$ DE γ -EE (LINHAS PONTILHADAS) COM RESPECTIVAS IDENTIFICAÇÃO DE PICOS, BEM COMO DETERMINADA AMOSTRA DE PLASMA SUÍNO TAMBÉM ADICIONADA DE $8,25\mu\text{M}$ DE γ -EE (LINHA SÓLIDA). (INJEÇÃO DE $50\mu\text{L}$). FONTE: O AUTOR (2015)

Percebe-se também, por meio da Figura 6, que os picos relativos à GSH e GSSG são pouco expressivos, dada a baixa concentração esperada destes compostos em plasma.

Após o estabelecimento do gradiente de solventes e novo tempo de corrida cromatográfica, seguiu-se com a determinação das curvas de calibração dos padrões externos, bem como verificação da estabilidade dos analitos de interesse desde o momento da finalização das derivatizações até a efetiva injeção das amostras derivatizadas.

Percebeu-se que os resultados referentes às áreas normalizadas dos padrões externos não apresentaram variação significativa (C.V. inferior a 3%) para determinações realizadas dentro de um mesmo dia (*intra day*) e durante um período de até 7 dias (*inter day*), período este correspondente ao tempo necessário para efetiva corrida cromatográfica de todas as amostras desde a finalização do procedimento de derivatização.

Para proporcionar uma determinação acurada das concentrações plasmáticas dos analitos de interesse em diferentes momentos, a cada procedimento de derivatização de amostras também foi realizado preparo e derivatização de novas soluções múltiplas de padrões externos. Este procedimento visou à determinação de novas curvas de calibração a cada procedimento de derivatização, uma vez que a reação entre o cloreto de dansyl e os analitos de interesse é dependente de diversos fatores, tais como pH da solução, temperatura e tempo de reação, que embora padronizados, poderiam variar entre procedimentos.

Na Figura 7 e Figura 8, estão demonstradas as curvas de calibração utilizadas para quantificação de CySS, Cys e GSH e GSSG, respectivamente, obtidas a partir da injeção de soluções contendo os analitos em diferentes concentrações.

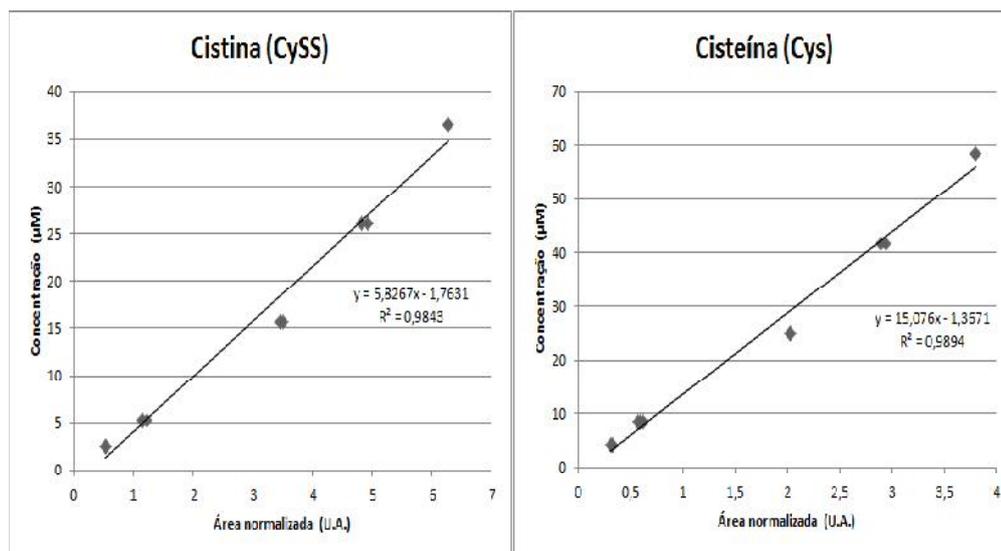


FIGURA 7. CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS CISTINA (CYSS) E CISTEÍNA (CYS). FORAM UTILIZADAS DUAS INJEÇÕES PARA CADA CONCENTRAÇÃO AVALIADA.

FONTE: O AUTOR (2015)

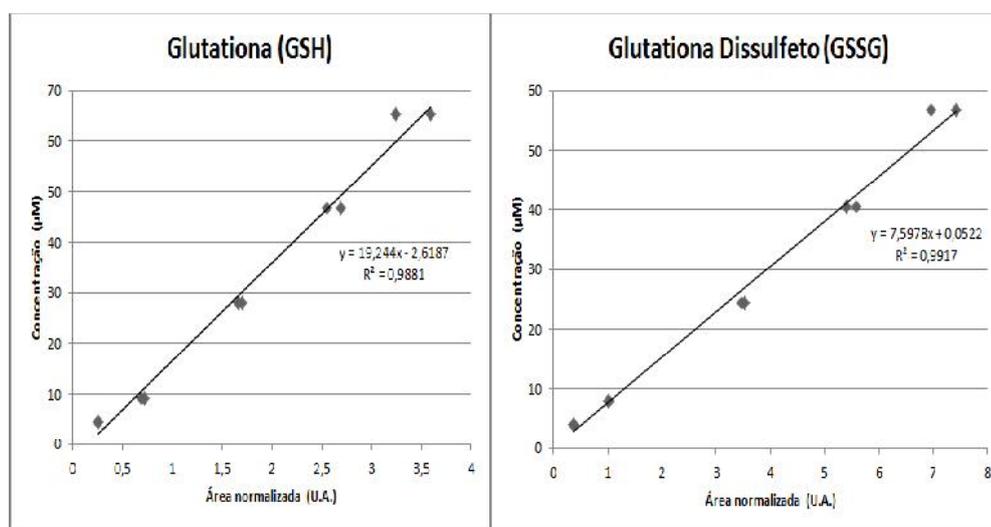


FIGURA 8. CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS GLUTATIONA (GSH) E GLUTATIONA DISSULFETO (GSSG). FORAM UTILIZADAS DUAS INJEÇÕES PARA CADA CONCENTRAÇÃO AVALIADA.

FONTE: O AUTOR (2015)

As curvas de calibração utilizadas eram sempre obtidas utilizando-se de dados de ao menos duas diferentes injeções de solução de cada concentração testada dos padrões externos. Tais injeções de solução dos padrões múltiplos eram realizadas em diferentes dias, de maneira que os dados da curva de calibração também refletem a estabilidade dos analitos.

Todas as curvas de calibração utilizadas apresentaram um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,98.

As concentrações nominais dos analitos avaliados foram corrigidas para o valor obtido por meio da determinação espectrofotométrica (item 3.5), aplicando-se o fator de correção descrito na Tabela 5.

TABELA 5. FATOR DE CORREÇÃO APLICADO A CADA ANALITO APÓS DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE SUA CONCENTRAÇÃO.

Analito	Fator de correção aplicado
CySS	0,522
CyS	0,835
GSH	0,933
GSSG	0,81

FONTE: O AUTOR (2015)

Como procedimento analítico padrão, sempre ao início e ao final das corridas cromatográficas dentro de um mesmo dia, eram injetadas soluções de padrão múltiplo, de maneira a confirmar os tempos de retenção e área de pico dos analitos em relação às injeções realizadas nos dias anteriores, bem como garantir a estabilidade do equipamento e gerar mais pontos para compor a curva de calibração.

Após a correção das concentrações nominais dos padrões dos analitos avaliados, chegou-se aos pontos inferiores e superiores da curva de calibração para cada analito, conforme descrito na Tabela 6.

TABELA 6. CONCENTRAÇÕES INFERIORES E SUPERIORES (μM) UTILIZADAS PARA COMPOR A CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CADA ANALITO DE INTERESSE.

Analito	Concentração inferior testada (μM)	Concentração superior testada (μM)
CySS	2,61	36,54
CyS	4,18	58,48
GSH	4,66	65,3
GSSG	4,05	56,72

FONTE: O AUTOR (2015)

4.2 CONCENTRAÇÃO DOS PARES CYS/CYSS EM PLASMA DE SUÍNOS, POTENCIAL DE REDUÇÃO DE CYS/CYSS E CORRELAÇÕES COM DEMAIS VARIÁVEIS AVALIADAS.

A determinação da concentração plasmática dos pares GSH e GSSG não foi possível na presente metodologia devido à baixa concentração destes tióis em plasma, a qual esteve sempre abaixo da menor concentração utilizada dos mesmos para composição das curvas de calibração (Tabela 6). Fukagawa et al. (1996) e Schafer; Buettner (2001) relataram níveis de GSH e GSSG em torno de $2\mu\text{M}$ e $0,09\mu\text{M}$, respectivamente, para amostras advindas de humanos. Os dados obtidos no presente trabalho concordam com estas observações e sugerem que os níveis de concentração destes tióis em suínos podem ser semelhantes aos encontrados em humanos.

Os resultados observados para as concentrações determinadas de Cys e CySS, potenciais calculados para o par Cys/CySS ($E_h\text{CySS}$) e variáveis de desempenho e ocorrência de diarreia estão demonstrados na Tabela 7.

TABELA 7. CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS (μM) PARA OS PARES CYS/CYSS E RESPECTIVO POTENCIAL DE REDUÇÃO OBTIDO (MV), BEM COMO INFORMAÇÕES SOBRE PESO, OCORRÊNCIA DE DIARREIA NA SEMANA, CONVERSÃO ALIMENTAR E IDADE MÉDIA DOS ANIMAIS. DADOS APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO.

	alojamento (n=30)	7dias (n=48)	21dias (n=48)	28dias (n=48)	35dias (n=48)
Peso (kg)	6,01 \pm 1,27	8,01 \pm 2,08	14,26 \pm 3,55	18,13 \pm 3,94	23,43 \pm 4,5
Idade (dias)	26,8 \pm 4,7	34,32 \pm 4,74	48,21 \pm 4,7	55,21 \pm 4,7	62,21 \pm 4,7
C.A. no período ¹	-	1,38 \pm 0,31	1,69 \pm 0,18	1,92 \pm 0,2	1,72 \pm 0,15
Ocorrência de diarreia ²	-	0,3 \pm 0,14	0,19 \pm 0,14	0,07 \pm 0,1	0,08 \pm 0,1
[Cys] μM	9,43 \pm 3,09	9,81 \pm 3,72	14,21 \pm 3,51	16 \pm 3,69	10,31 \pm 2,44
[CySS] μM	27,52 \pm 9,09	15,02 \pm 7,87	11,25 \pm 3,77	14,36 \pm 4,32	15,92 \pm 3,62
Eh CySS (mV)	-87,33 \pm 7,44	-96,6 \pm 8,93	-109,7 \pm 4,25	-109,48 \pm 4,95	-96,65 \pm 5,75

FONTE: O AUTOR (2015)

¹CONVERSÃO ALIMENTAR NA SEMANA EXATAMENTE ANTERIOR À COLETA.
²OCORRÊNCIA DE DIARREIA REFERE-SE AO PERCENTUAL DE ESCORES 2 E 3 APRESENTADO NAS BAIAS DE CADA ANIMAL AVALIADO NA SEMANA EXATAMENTE ANTERIOR À COLETA (1 EQUIVALE A 100%).

Com relação às concentrações de Cys e CySS, estas, bem como o potencial calculado para este par redox, apresentaram variação significativa ao longo dos pontos de coleta.

Percebe-se que no momento do alojamento (período exatamente após o desmame), os animais apresentaram um E_hCySS mais oxidado (mais positivo) em relação aos demais períodos. Este potencial apresenta uma tendência de redução subsequente, atingindo níveis de cerca de -109mV nos dias 21 e 28, retornando a um potencial médio de cerca de -96mV aos 35 dias, conforme observado aos 7 dias de idade.

A análise de correlação linear apresentada na Tabela 8 demonstra que as variáveis peso, idade e conversão alimentar possuem relação inversa ao E_hCySS, ou seja, o aumento na idade, peso corporal e conversão alimentar estão relacionados a uma redução no valor de E_hCySS. Em contrapartida, uma maior ocorrência de diarreia está relacionada a um maior E_hCySS.

TABELA 8. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E_h CYSS E VARIÁVEIS DE DESEMPENHO AVALIADAS.

	Eh CySS	peso	idade	Ocorrência de diarreia
peso	-0,2663*			
idade	-0,3947*	0,9411*		
Ocorrência de diarreia	0,283*	-0,5738*	-0,6165*	
C.A.	-0,2738*	-0,2997*	0,5267*	-0,2997*

FONTE: O AUTOR (2015)

*P<0,05 AO SE TESTAR A HIPÓTESE DE QUE NÃO EXISTE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS.

Avaliando as variáveis idade, peso, interação idade x peso, inclusão de antibiótico e ocorrência de diarreia como variáveis explicativas do E_hCySS, percebe-se que as variáveis idade e peso induziram um efeito negativo no E_hCySS, de maneira que, ao longo do período avaliado, animais mais pesados apresentaram valores mais reduzidos de E_hCySS, da mesma forma que animais mais velhos apresentaram a mesma situação (Tabela 9).

TABELA 9. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR EFEITOS DO PESO, IDADE, INCLUSÃO DE ANTIBIÓTICO À DIETA, OCORRÊNCIA DE DIARREIA E INTERAÇÃO IDADE X PESO SOBRE OS NÍVEIS CALCULADOS DO E_hCYSS.

Efeito aleatório (parâmetro de covariância)	Coefficiente estimado	Erro padrão
Animal (indivíduo)	-1,8726	3,487
Resíduo	60,2608	7,244
AIC = 1336,23		
BIC = 1361,52		

Termos – efeitos fixos	coeficiente	erro padrão	Prob> t
Intercepto	-71,12197	6,5602926	<0,0001*
idade	-0,709789	0,150156	<0,0001*
peso	-2,654765	0,581826	<0,0001*
antibiótico	-0,192765	1,4256653	0,8931
ocorrência de diarreia	12,531893	5,0517647	0,0142*
idade x peso	0,0510006	0,0080395	<0,0001*

FONTE: O AUTOR (2015)

*INDICA EFEITOS FIXOS QUE FORAM CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS (P<0,05).

AIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO DE AKAIKE

BIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO BAYESIANO

No entanto, ao se analisar a interação idade x peso, percebe-se que o coeficiente estimado foi positivo, indicando que animais mais pesados de idades semelhantes apresentaram E_hCySS mais oxidado, da mesma forma que a ocorrência de diarreia também esteve relacionada a potenciais mais oxidados. A inclusão de antibióticos não influenciou os valores do E_hCySS ao longo dos períodos avaliados.

Ao se avaliar a correlação diarreia vs peso e diarreia vs idade, percebe-se que animais mais pesados e mais velhos tendem a ter menor ocorrência de diarreia. Os valores mais elevados de E_hCySS em animais mais pesados de idade semelhantes provavelmente podem ter uma relação maior com fatores inerentes ao metabolismo destes animais. Corino et al. (2007), demonstraram que os níveis totais de substâncias oxidantes em soro de suínos aumentaram à medida que os animais ganharam peso (início em relação ao final da fase de creche), sugerindo que o aumento de peso dos animais pode levar à geração de espécies reativas de oxigênio, o que concorda em parte com a relação observada na presente avaliação. Tal observação pode estar relacionada ao aumento da massa muscular dos

animais avaliados, uma vez que o músculo esquelético gera espécies reativas de oxigênio que podem ser detectadas tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular. (REID; DURHAM, 2006).

Com relação à ocorrência de diarreia, esta esteve significativamente relacionada a um E_hCySS mais elevado, indicando uma situação de maior oxidação nos animais acometidos por aquela condição.

O momento da transferência dos animais após o desmame e início da fase de creche é um ponto bastante crítico na produção de suínos, pois, além do stress ao qual os animais são submetidos devido às mudanças no ambiente, há uma alteração repentina na alimentação, alternando de uma dieta a base de leite para uma dieta seca e basicamente vegetal. Além disso, nessa fase o trato gastrointestinal do leitão ainda não se encontra adaptado para tal tipo de alimento, produzindo quantidades insuficientes de enzimas necessárias à digestão Jensen et al. (1997). Por isso, é comum observar diarreia e animais refugos nesse período. Dessa forma, a diarreia observada nesse período pode ser tanto de origem infecciosa quanto de origem alimentar, sendo que, nos dois casos, é comum se observar uma reação inflamatória no intestino dos animais. (HOPWOOD; HAMPSON, 2003).

É sabido que reações inflamatórias produzem espécies reativas de oxigênio. (VALKO et al., 2007). Um trabalho em suínos demonstrou que animais apresentando níveis elevados de haptoglobina em soro, uma proteína de fase aguda, apresentaram maiores níveis de espécies reativas de oxigênio. (SAUERWEIN et al., 2005). Dessa forma, um E_hCySS mais oxidado em animais que apresentaram uma maior incidência de diarreia no período próximo à coleta de sangue seria condizente com uma maior geração de espécies reativas de oxigênio, refletindo numa maior oxidação deste importante par redox.

Identificadas as relações e potenciais efeitos das variáveis de desempenho no E_hCySS , procurou-se verificar como a variação encontrada para tal potencial poderia explicar os resultados observados para ganho de peso e conversão alimentar em cada período avaliado. Para isso, seguiu-se com modelo de regressão misto, adotando-se como variáveis explicativas de efeitos fixos a variação do E_hCySS (ΔE_hCySS) nos períodos avaliados, a

idade dos animais, a ocorrência de diarreia, e as interações $\Delta E_h\text{CySS}$ vs idade e $\Delta E_h\text{CySS}$ vs ocorrência de diarreia, e como variável aleatória cada animal avaliado no tempo.

TABELA 10. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DA IDADE DOS ANIMAIS, VARIAÇÃO DO $E_h\text{CySS}$ ($\Delta E_h\text{CySS}$), OCORRÊNCIA DE DIARREIA, INTERAÇÃO IDADE X $\Delta E_h\text{CySS}$, E INTERAÇÃO OCORRÊNCIA DE DIARREIA X $\Delta E_h\text{CySS}$ SOBRE O GANHO MÉDIO DIÁRIO (GMD) OBSERVADO DURANTE O PERÍODO DE AVALIAÇÃO.

Efeito aleatório (parâmetro de covariância)	Coefficiente estimado	Erro padrão	
Animal (indivíduo)	0,002292	0,00123	
Resíduo	0,011309	0,001467	
AIC = -246,957			
BIC = -225,608			
Termos – efeitos fixos	coeficiente	erro padrão	Prob> t
idade	0,0105095	0,0002453	<,0001*
$\Delta E_h\text{CySS}$	-0,012051	0,0042053	0,0048*
ocorrência de diarreia	-0,08179	0,0718903	0,2569
idade x $\Delta E_h\text{CySS}$	0,0003057	7,66E-05	0,0001*
ocorrência de diarreia x $\Delta E_h\text{CySS}$	-0,010487	0,0058194	0,0725

FONTE: O AUTOR (2015)

*INDICA EFEITOS FIXOS QUE FORAM CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS ($P < 0,05$).

AIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO DE AKAIKE

BIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO BAYESIANO

Verificou-se que as variáveis que mais explicaram GMD foram a idade, a variação no $E_h\text{CySS}$ ($\Delta E_h\text{CySS}$), e a interação idade x $E_h\text{CySS}$.

Percebe-se que a idade possui coeficiente estimado positivo, indicando efeito positivo desta sobre o GMD, conforme esperado. Com relação à $\Delta E_h\text{CySS}$, observa-se que o efeito desta variável foi negativo em relação ao GMD, o que indica que quando há um aumento do $E_h\text{CySS}$ (variação positiva, compatível com maior oxidação), o GMD reduz significativamente. Em contrapartida, quando esta variação é negativa, ou seja $E_h\text{CySS}$ ao final do período < $E_h\text{CySS}$ no início do período, o ganho é positivo. Percebe-se que este efeito da $\Delta E_h\text{CySS}$ é também dependente da idade, uma vez que o efeito da interação dos dois fatores foi considerado significativo no modelo. Como o coeficiente é positivo, variações positivas no potencial, compatíveis com maior oxidação estariam relacionadas a maior

GMD. No entanto, de acordo com estimativas do modelo, isso ocorreria somente após os 47 dias de idade dos animais (final da 3ª semana de avaliação), período em que a ocorrência de diarreia começa a reduzir. Antes deste período, variações negativas no E_hCySS (potencial mais reduzido em relação ao período anterior) estiveram relacionadas a GMD mais alto.

A ocorrência de diarreia e a interação ocorrência de diarreia x ΔE_hCySS não afetaram significativamente o GMD. No entanto, percebe-se que o coeficiente estimado para ambos é negativo, sugerindo redução no GMD de animais acometidos por esta condição. A interação ocorrência de diarreia x ΔE_hCySS , embora não significativa considerando $p < 0,05$; sugere ($p = 0,0725$) que animais acometidos por diarreia, porém que apresentaram uma variação negativa no E_hCySS , compatível com estado mais reduzido, obtiveram GMD mais alto no período.

Com relação à conversão alimentar (C.A.), esta foi significativamente afetada pela idade, conforme esperado, cujo coeficiente positivo indica que o animal perde eficiência com o passar da idade (Tabela 11). A ΔE_hCySS também afetou significativamente a C.A., sendo que animais que demonstraram valores negativos para esta variação (potencial mais reduzido), apresentaram C.A. menores, sugerindo maior eficiência alimentar. A ocorrência de diarreia não interferiu significativamente na C.A., embora o coeficiente estimado tenha sido positivo, sugerindo menor eficiência alimentar em animais que apresentam esta condição. A interação ocorrência de diarreia x ΔE_hCySS não foi significativa ($p = 0,5360$) e não foi considerada no modelo apresentado na Tabela 11 pois ocasionava um pior ajuste do mesmo.

TABELA 11. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DA IDADE DOS ANIMAIS, VARIAÇÃO DO EHCYSS (ΔE_h CySS), OCORRÊNCIA DE DIARREIA, E INTERAÇÃO IDADE X ΔE_h CySS SOBRE A CONVERSÃO ALIMENTAR (C.A.) OBSERVADA DURANTE O PERÍODO DE AVALIAÇÃO.

Efeito aleatório (parâmetro de covariância)	Coefficiente estimado	Erro padrão
Animal (indivíduo)	-0,00396	0,003039
Resíduo	0,053007	0,006877
AIC = -22,4201		
BIC = -1,07056		

Termos – efeitos fixos	coeficiente	erro padrão	Prob> t
intercepto	0,959012	0,1359784	<0,0001*
idade	0,0144592	0,0023658	<0,0001*
ΔE_h CySS	0,0204229	0,0073067	0,0059*
ocorrência de diarreia	0,2681639	0,1645037	0,1055
idade x ΔE_h CySS	-0,000438	0,0001394	0,002*

FONTE: O AUTOR (2015)

*INDICA EFEITOS FIXOS QUE FORAM CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS (P<0,05).

AIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO DE AKAIKE

BIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO BAYESIANO

Por fim, a interação idade x ΔE_h CySS também afetou significativamente a C.A. observada, sendo que o coeficiente positivo indica que a partir de determinada idade (estimada no modelo em cerca de 45 dias), uma variação positiva no E_h CySS seria compatível com menores índices de C.A.

Tomados em conjunto, os dados apontam para uma melhor condição fisiológica dos animais quando da ocorrência de potenciais mais reduzidos para o par Cys/CySS, haja vista que tanto ocorrência de diarreia quanto reduções de ganho de peso e aumentos na conversão alimentar foram relacionados a potenciais mais oxidados do par redox em questão, especialmente no período inicial da fase de creche, período sabidamente crítico para o desenvolvimento dos animais.

Em estudo avaliando o efeito de stress oxidativo através de modelo de indução experimental, Deng et al. (2010) demonstraram que animais sob condições de stress oxidativo exibiram desempenho inferior, caracterizado por uma redução no ganho de peso e aumento da C.A. Na presente avaliação, animais que exibiram pior desempenho apresentaram também um

potencial significativamente mais oxidado do par Cys/CySS, sugerindo uma situação de maior stress oxidativo, concordando com as observações daqueles autores.

Os achados referentes ao perfil circulante de células mononucleares estão demonstrados na Tabela 12.

TABELA 12. CÉLULAS MONONUCLEARES QUANTIFICADAS NO SANGUE PERIFÉRICO DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES PONTOS DE COLETA (% RELATIVO AO TOTAL DE LEUCÓCITOS), BEM COMO VALORES CALCULADOS PARA POTENCIAL DO PAR CYS/CYSS (E_h CYSS) (EM MV).

	Alojamento (n=30)	7 dias (n=48)	21 dias (n=48)	28 dias (n=48)	35 dias (n=48)
CD4-CD8+	19,83 ± 11,25	22,28 ± 6,62	16,49 ± 9,09	22,26 ± 8,1	26,34 ± 9,25
CD4+CD8+	2,35 ± 1,74	6,15 ± 1,98	3,51 ± 2,27	9,5 ± 3,27	6,7 ± 3,18
CD4+CD8-	7,95 ± 5,78	24,04 ± 6,14	7,88 ± 5,3	26,58 ± 7,55	11,12 ± 4,07
Linfócito B	0,55 ± 0,32	1,14 ± 0,52	2,14 ± 1,65	1,29 ± 0,85	1,73 ± 1,06
Monócito	1,44 ± 0,82	3,65 ± 1,75	2,07 ± 1,99	6,33 ± 3,2	2 ± 1,33
CD4+/CD8+ ¹	0,46 ± 0,29	1,17 ± 0,45	0,6 ± 0,48	1,35 ± 0,78	0,48 ± 0,24
E_h CySS (mV)	-87,33 ± 7,44	-96,6 ± 8,93	-109,7 ± 4,25	-109,48 ± 4,95	-96,65 ± 5,75

FONTE: O AUTOR (2015)

¹QUOCIENTE OBTIDO DO TOTAL DE CÉLULAS CD4+CD8- E CD4-CD8+.

Verifica-se que há uma variação nos valores médios para as populações celulares circulantes entre os pontos de coleta para todas as células quantificadas.

Uma vez que o intuito do presente trabalho é compreender o eventual impacto do E_h CySS sobre variações na quantidade circulante das células quantificadas, somente serão alvo de discussão aquelas populações celulares que apresentarem alguma tendência de variação relativa à variação do E_h CySS, identificadas por meio de análise de correlação (Tabela 13).

A análise de correlação realizada demonstrou correlação positiva entre o E_h CySS apenas para as células CD4-CD8+ indicando que à medida que se aumenta o valor do E_h CySS (maior oxidação), há uma tendência de aumento do percentual destas células. Para a quantidade circulante de células

CD4+CD8+, linfócito B e monócito, bem como para a relação CD4+/CD8+, houve uma tendência de redução à medida que os valores de E_hCySS aumentam.

TABELA 13. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E_H CYSS, IDADE, OCORRÊNCIA DE DIARRÉIA E POPULAÇÕES DE CÉLULAS CIRCULANTES (LN DO % DE CADA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE CÁLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO).

	E _h CySS	idade	LnCD4- CD8+	LnCD4 + CD8-	LnCD4 + CD8+	Ln Linf. B	Ln Monócito	LnCD4 +/CD8+
Idade	-0,3947*							
Ln CD4- CD8+	0,1362*	0,1465*						
Ln CD4+CD8-	-0,0768	0,072	0,4187					
Ln CD4+CD8+	-0,1725*	0,4595*	0,6087*	0,7386*				
Ln Linf. B	-0,2974*	0,3570*	0,2443*	0,2373*	0,3982*			
Ln Monócito	-0,1794*	0,0665	0,2443*	0,6868*	0,5484*	0,2350*		
Ln CD4+/CD8+ ¹	-0,1634*	-0,033	-0,282*	0,7531*	0,3318*	0,0731	0,5420*	
ocor. de diarreia	0,283*	-0,617*	0,0605	0,2880*	0,0220	-0,155*	0,1193	0,2411*

FONTE: O AUTOR (2015)

*P<0,05 AO SE TESTAR A HIPÓTESE DE QUE NÃO EXISTE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS.

¹RELAÇÃO ENTRE CÉLULAS CD4+CD8- E CD4-CD8+

Ao se verificar o efeito do E_hCySS, idade dos animais, e relação E_hCySS x idade sobre os níveis circulantes das células avaliadas por meio de modelo misto de regressão, apenas se identificou efeito significativo destas variáveis na quantidade circulante de linfócitos B (Tabela 14).

Verificou-se que a quantidade circulante de linfócitos B aumenta significativamente com a idade dos animais (coeficiente positivo), enquanto que valores mais negativos de E_hCySS (potencial mais reduzido) estão igualmente relacionados com um aumento na quantidade circulante de linfócitos B. Já a interação idade x E_hCySS apresentou coeficiente positivo, indicando que há uma relação direta destas variáveis sobre os níveis circulantes de linfócitos a partir de determinada idade (estimada no modelo em cerca de 54 dias). Isso indica que animais apresentaram maiores

quantidades circulantes de linfócitos B quanto mais reduzido apresentava-se o E_hCySS. A partir dos 54 dias, níveis mais oxidados deste potencial estiveram relacionados com aumentos nos níveis circulantes destas células.

TABELA 14. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DA IDADE DOS ANIMAIS, VALOR DO E_hCYSS, E INTERAÇÃO IDADE X E_hCYSS SOBRE O LOGARITMO NATURAL (LN) DO PERCENTUAL DE LINFÓCITOS B CIRCULANTES OBSERVADOS DURANTE O PERÍODO DE AVALIAÇÃO.

Efeito aleatório (parâmetro de covariância)	Coefficiente estimado	Erro padrão
Animal (indivíduo)	0,0677286	0,0355068
Resíduo	0,3694366	0,0419448
AIC = 429,378		
BIC = 449,132		

Termos – efeitos fixos	coeficiente	erro padrão	Prob> t
intercepto	-7,052384	1,5191007	<0,0001*
idade	0,1374806	0,0348398	<0,0001*
E _h CySS	-0,068203	0,0162618	0,0001*
idade x E _h CySS	0,0012796	0,0003636	0,005*

FONTE: O AUTOR (2015)

*INDICA EFEITOS FIXOS QUE FORAM CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS (P<0,05).

AIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO DE AKAIKE

BIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO BAYESIANO

O efeito positivo da idade sobre o número de linfócitos B indica que à medida que os animais se desenvolvem, há um aumento na quantidade circulante destas células, provavelmente em consequência ao desenvolvimento de respostas específicas a determinados agentes, infecciosos ou não, a que os animais têm contato com o passar do tempo. Entendendo-se essa quantidade circulante de linfócitos B como uma resposta imune mais desenvolvida, é possível que animais exibindo valores de E_hCySS mais oxidados apresentem uma resposta imune menos desenvolvida, ou até mesmo menos efetiva, dado que a condição de potencial mais oxidado também foi positivamente relacionada à ocorrência de diarreia na presente avaliação.

As relações estabelecidas para os valores de $E_h\text{CySS}$ em suínos indicam que, de uma maneira geral, em condições em que o $E_h\text{CySS}$ apresentou-se mais oxidado, houve um pior desempenho dos animais. Da mesma forma, potenciais mais oxidados estariam também relacionados com menores níveis circulantes de linfócitos B, os quais poderiam indicar uma pior adaptação às condições ambientais, dadas as relações apresentadas para desempenho e maior ocorrência de diarreia para situações de maior oxidação.

4.3 CONCENTRAÇÃO DOS PARES CYS/CYSS EM PLASMA DE BOVINOS, POTENCIAL DE REDUÇÃO DE CYS/CYSS E CORRELAÇÕES COM DEMAIS VARIÁVEIS AVALIADAS.

Conforme descrito na seção 4.2, a determinação da concentração plasmática dos pares GSH e GSSG não foi possível na presente metodologia devido à baixa concentração destes tióis em plasma.

Os resultados referentes à quantificação de Cys, CySS, potencial calculado para o par Cys/CySS ($E_h\text{CySS}$), bem como variáveis de desempenho controladas estão demonstrados na Tabela 15.

TABELA 15. CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS (μM) PARA OS PARES CYS/CYSS E RESPECTIVO POTENCIAL DE REDUÇÃO OBTIDO (MV), BEM COMO INFORMAÇÕES SOBRE PESO, CONVERSÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO (KG).

	Início	28 dias	56 dias	84 dias
Peso (kg)	393,55 \pm 12,1	426,2 \pm 18,13	460,75 \pm 29,26	493,65 \pm 37,12
C.A. no período ¹	-	8,3 \pm 1,89	9,53 \pm 3,68	10,01 \pm 2,63
Ganho no período ¹	-	32,65 \pm 10,13	34,55 \pm 15,67	32,9 \pm 15,69
[Cys] μM	4,86 \pm 1,92	5 \pm 1,39	4,31 \pm 1,32	5,3 \pm 5,28
[CySS] μM	5 \pm 1,47	5,72 \pm 1,34	7,09 \pm 3,04	8,78 \pm 8,94
E _h CySS (mV)	-91,7 \pm 9,36	-90,82 \pm 8,63	-84,93 \pm 5,18	-85,56 \pm 7,07

FONTE: O AUTOR (2015)

DADOS APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO.

¹CONVERSÃO ALIMENTAR (N=20) E GANHO DE PESO TOTAL (N=40) NO PERÍODO EXATAMENTE ANTERIOR À COLETA.

PARA AS DEMAIS VARIÁVEIS, N=40 POR PONTO DE OBSERVAÇÃO.

Verifica-se que as concentrações encontradas para Cys e CySS, ao se comparar com aquelas encontradas em suínos, são bastante inferiores e não sofreram tanta variação como reportado naqueles animais. Da mesma forma, o valor calculado para o E_hCySS variou menos, embora a variação encontrada tenha sido significativa ao se comparar as médias obtidas entre os períodos de avaliação.

Percebe-se que há uma tendência ao aumento do E_hCySS com o passar da idade dos animais, ao contrário do que foi observado em suínos, em que houve tendência de redução deste potencial. Apesar desta tendência em bovinos ter sido significativa, a variação foi muito inferior à encontrada em suínos, talvez devido a fatores como idade, adaptação ao ambiente e maturidade. De fato, no final do período de creche dos suínos, animais mais pesados apresentaram valores de E_hCySS mais oxidados, provavelmente relacionados ao peso corporal mais elevado.

A análise de correlação linear entre variáveis de desempenho e E_hCySS demonstrou efeito significativo apenas para peso (Tabela 16).

TABELA 16. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E_h CYSS E VARIÁVEIS DE DESEMPENHO AVALIADAS.

	E_h CySS	peso	Ganho de peso
peso	0,2597*		
Ganho de peso	-0,1413	0,5367*	
C.A.	0,2116	-0,1329	-0,5503*

FONTE: O AUTOR (2015)

* $P < 0,05$ AO SE TESTAR A HIPÓTESE DE QUE NÃO EXISTE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS.

Este efeito positivo indica que à medida que os animais aumentam de peso, há uma tendência de aumento do E_h CySS, ou seja, haveria um estado mais oxidado com o aumento de peso dos animais. Esta relação foi confirmada pelo modelo de regressão linear utilizado, verificando-se que animais de peso mais elevado apresentaram potenciais mais oxidados, não se. Esta condição também foi verificada em suínos na fase final de creche. Não se identificou efeito da adição do ionóforo sobre os valores de E_h CySS (Tabela 17).

TABELA 17. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DO PESO DOS ANIMAIS E INCLUSÃO DE IONÓFORO SOBRE O VALOR DO E_h CYSS.

Efeito aleatório (parâmetro de covariância)	Coefficiente estimado	Erro padrão
Animal (indivíduo)	14,253796	9,370705
Resíduo	50,646493	9,335974

AIC = 563,913

BIC = 575,014

Termos – efeitos fixos	coeficiente	erro padrão	Prob> t
intercepto	-112,1087	8,6367	<,0001*
peso	0,053827	0,0192	0,0062*
ionóforo	0,05589	1,1973	0,9633

FONTE: O AUTOR (2015)

*INDICA EFEITOS FIXOS QUE FORAM CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS ($P < 0,05$).

AIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO DE AKAIKE

BIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO BAYESIANO

Ao se verificar o efeito da variação do E_h CySS no ganho de peso ou na conversão alimentar (C.A.) do período, não se encontraram efeitos

significativos. No entanto, ao se incluir o E_h CySS como variável explicativa para C.A., embora o coeficiente estimado não tenha sido considerado significativo ($p=0,0532$) percebe-se que há uma forte tendência de o E_h CySS influenciar de maneira positiva a C.A.

TABELA 18. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DO E_h CYSS SOBRE O VALOR DA C.A.

Efeito aleatório (parâmetro de covariância)	Coeficiente estimado	Erro padrão	
Animal (indivíduo)	1,8172	1,40019	
Resíduo	6,2875	1,42964	
AIC = 299,801			
BIC = 307,451			
Termos – efeitos fixos	coeficiente	erro padrão	Prob> t
intercepto	18,2749	4,5429	0,0002*
E_h CySS (mV)	0,10335	0,0192	0,0512

FONTE: O AUTOR (2015)

*INDICA EFEITOS FIXOS QUE FORAM CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS ($P<0,05$).

AIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO DE AKAIKE

BIC: CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO BAYESIANO

Neste caso, o coeficiente positivo determinado revela que animais que apresentaram potencial mais oxidado no momento da coleta de sangue e consequente aquisição de dados para cálculo da C.A. (pesagem do animal), foram os que também apresentaram valores de C.A. mais elevados. Dessa forma, o efeito que foi considerado significativo em suínos, de que animais com potencial mais reduzido apresentaram melhor eficiência alimentar no período avaliado, parece ser verdadeiro também para bovinos, apesar da menor variação deste potencial na última espécie.

Os valores estabelecidos para as variáveis de bioquímica clínica estão apresentados na Tabela 19.

TABELA 19. RESULTADOS ENCONTRADOS PARA AS VARIÁVEIS DE BIOQUÍMICA CLÍNICA AVALIADAS NO PLASMA DOS ANIMAIS.

	Início (n=40)	28 dias (n=40)	56 dias (n=40)	84 dias (n=40)
Fibrinogênio (g/dL)	0,63 ± 0,15	0,45 ± 0,18	0,33 ± 0,2	0,77 ± 0,34
Proteína Total (g/dL)	8,1 ± 0,57	6,92 ± 0,46	8,01 ± 0,92	8,77 ± 0,58
Albumina (g/dL)	4,54 ± 0,35	4,39 ± 0,25	4,23 ± 0,52	4,19 ± 0,21
Globulina (g/dL)	3,57 ± 0,53	2,53 ± 0,4	3,78 ± 0,64	4,59 ± 0,55
AST (U/L)	67,34 ± 19,87	75,5 ± 17,01	84,47 ± 28,49	74,42 ± 15,46
GGT (U/L)	8,19 ± 3,24	18,31 ± 3,75	13,73 ± 5,48	12,5 ± 6,26
Uréia (mg/dL)	19,53 ± 4,75	23,96 ± 4,38	33,68 ± 8,31	33,86 ± 5,75
Creatinina (mg/dL)	1,13 ± 0,28	1,63 ± 0,39	1,5 ± 0,35	1,63 ± 0,2
Eh CySS (mV)	-91,7 ± 9,36	-90,82 ± 8,63	-84,93 ± 5,18	-85,56 ± 7,07

FONTE: O AUTOR (2015)

A análise de correlação linear demonstrou tendência significativa somente entre os valores de E_hCySS e os níveis de proteína total. O coeficiente positivo indica que, à medida que os níveis de proteína plasmática aumentaram, também aumentou o E_hCySS, tornando-se mais oxidado.

TABELA 20. CORRELAÇÃO OBSERVADA ENTRE O E_H CYSS E VARIÁVEIS DE BIOQUÍMICA CLÍNICA AVALIADAS.

	Eh CySS	Fibrinogênio	Proteína total	Albumina	Globulina	AST	GGT	Uréia
Fibrinogênio	0,016							
Proteína total	0,248*	0,338*						
Albumina	0,164	0,185	0,2372*					
Globulina	0,158	0,272*	0,921*	-0,160*				
AST	-0,159	0,023	0,157	0,189	0,084			
GGT	0,114	-0,082	-0,144	0,148	-0,208	0,152		
Uréia	0,188	-0,057	0,357*	-0,151	0,424*	0,291*	0,174	
Creatinina	0,158	-0,034	-0,037	-0,052	-0,017	0,365*	0,353*	0,48*

FONTE: O AUTOR (2015)

*P<0,05 AO SE TESTAR A HIPÓTESE DE QUE NÃO EXISTE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS.

Um dos fatores que pode afetar os níveis de proteína sérica é a disponibilidade de proteína alimentar. (ROUBICEK; RAY, 1972). Na presente avaliação, todos os animais receberam a mesma dieta, com igual disponibilidade de nutrientes. Percebeu-se que o aumento nos níveis séricos

de proteína total acompanhou o aumento no peso corporal dos animais, de forma que a relação estabelecida entre E_h CySS e proteína total foi semelhante à estabelecida entre aquela variável e peso corporal.

Seguindo-se com modelo de regressão misto incluindo o E_h CySS como variável explicativa do nível sérico de proteína, verifica-se que a relação discutida de fato se confirma (Tabela 21).

TABELA 21. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO MODELO MISTO UTILIZADO PARA VERIFICAR IMPACTO DO E_h CYSS SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA TOTAL.

Efeito aleatório (parâmetro de covariância)	Coeficiente estimado	Erro padrão	
Animal (indivíduo)	0,1027	0,0099	
Resíduo	0,7147	0,1335	
AIC = 210,593			
BIC = 219,472			
Termos – efeitos fixos	Coeficiente	erro padrão	Prob> t
intercepto	10,5458	1,1512	<0,0001*
E_h CySS (mV)	0,0294	0,0129	0,0260*

FONTE: O AUTOR (2015)

*INDICA EFEITOS FIXOS QUE FORAM CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS ($P < 0,05$).

É provável que um maior consumo de alimento e conseqüente ganho de peso corporal possa ter influenciado os níveis séricos deste marcador. Jordan; Swanson (1979), avaliando níveis séricos de proteína em vacas de leite em período pós-parto, caracterizaram um aumento desta variável de maneira linear até se atingir um platô. Os autores também relacionaram este aumento a um aumento no consumo de proteína, por meio do aumento do consumo de alimento, observando também um aumento nos níveis plasmáticos de ureia à medida que os níveis de proteína sérica aumentaram. Na presente avaliação, o coeficiente de correlação positivo e significativo entre proteína sérica e ureia também indica um aumento correlacionado nos níveis destes marcadores, estando em linha com o observado por Jordan; Swanson (1979).

Todas as variáveis de bioquímica clínica controladas na presente avaliação estiveram dentro dos valores de referência considerado normais

para bovinos. (LOPES et al., 2007; KANEKO 2008). Assim, como não se reportou nenhuma situação compatível com doença clínica ou alteração indesejada no comportamento dos animais, pode-se entender a variação observada para os valores do $E_n\text{CySS}$ observados como fisiológica, ao passo que a variação observada em suínos poderia ter maiores causas inerentes a fatores ambientais e adaptativos dos animais, como desenvolvimento fisiológico do trato gastrointestinal, adaptação à nova hierarquia social e crescimento.

5 CONCLUSÃO

A metodologia de quantificação de Cys e CySS por meio de cromatografia líquida de alta eficiência empregada na presente avaliação mostrou-se adequada para a correta mensuração destes tióis/dissulfetos presentes em plasma tanto de bovinos quanto de suínos. Não foi possível quantificar as concentrações de GSH e GSSG devido a restrições da metodologia aplicada.

O cálculo do potencial redox do par Cys/CySS por meio da equação de Nernst demonstrou que suínos em fase de creche apresentaram valores de potencial mais variável durante esta fase de produção, assumindo valores de -85mV a -110mV durante diferentes pontos amostrados, enquanto que bovinos em fase de terminação apresentaram potenciais mais estáveis, porém também variando entre -85 e -92 mV de acordo com os períodos de avaliação.

Em suínos, o potencial do par Cys/CySS esteve relacionado com a idade, peso dos animais, e ocorrência de diarreia, mostrando-se mais oxidado em situações compatíveis com piores condições de produção, tais como maior ocorrência de diarreia, menor ganho de peso e pior conversão alimentar. Também nestes animais, este potencial mais oxidado esteve relacionado a uma menor concentração circulante de linfócitos B, o que também esteve relacionado a uma pior condição de produção.

Já em bovinos, somente o peso dos animais pareceu influenciar positivamente no valor do potencial do par Cys/CySS, estando provavelmente relacionado ao desenvolvimento dos animais. Também se verificou que animais exibindo valores mais oxidados deste potencial tenderam a apresentar valores mais elevados de conversão alimentar, sugerindo pior eficiência produtiva. Nestes animais, Estabeleceu-se relação positiva entre o potencial avaliado e os níveis séricos de proteína total, sendo que esta relação foi semelhante à encontrada para peso corporal, estando provavelmente ligado ao desenvolvimento dos animais.

Percebeu-se que a determinação do potencial redox do par Cys/CySS pode ser uma ferramenta efetiva para auxiliar na caracterização de situações relacionadas com piores condições de produção.

Dado o potencial demonstrado desta ferramenta no presente trabalho para as espécies animais avaliadas, abordagem semelhante, respeitando-se particularidades fisiológicas, pode ser empregada na compreensão de episódios de stress oxidativo em aves comerciais, o que ainda aparece como um desafio a ser vencido.

REFERÊNCIAS

ABUELO, A; HERNÁNDEZ, J.; BENEDITO, J. L.; CASTILLO, C. Oxidative stress index (OSi) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 7, p. 1374–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510791>>. .

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, p. 1634–1650, 2010.

DE ARAUJO, J. A.; DA SILVA, J. H. V.; DE LIMA AMÂNCIO, A. L.; DE LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2007.

ASHFAQ, S.; ABRAMSON, J. L.; JONES, D. P.; et al. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 5, p. 1005–1011, 2006.

CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 33, n. June 2010, p. 233–240, 2011.

COLDITZ, I. G. Effects of the immune system on metabolism: implication for production and disease resistance in livestock. **Livestock Production Science**, v. 75, p. 257–268, 2002.

CORINO, C.; ROSSI, R.; MUSELLA, M.; CANNATA, S.; PASTORELLI, G. Growth performance and oxidative status in piglets supplemented with verbascoside and teupolioside. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 292–294, 2007.

DENG, Q.; XU, J.; YU, B.; et al. Effect of dietary tea polyphenols on growth performance and cell-mediated immune response of post-weaning piglets under oxidative stress. **Archives of animal nutrition**, v. 64, n. 1, p. 12–21, 2010.

VAN ES, A. J. H. The nutrient requirements of ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, 1982.

FILHO, T. F.; FÁVARO, C.; INGBERMAN, M.; et al. Effect of Spray Escherichia coli Vaccine on the Immunity of Poultry. **Avian Diseases**, v. 57, n. 3, p. 671–676, 2013. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1637/10456-112612-ResNote.1>>. .

FUKAGAWA, N. K.; AJAMI, A. M.; YOUNG, V. R. Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans. **The American journal of physiology**, v. 270, n. 2 Pt 1, p. E209–E214, 1996.

GO, Y.-M.; JONES, D. P. Intracellular proatherogenic events and cell adhesion modulated by extracellular thiol/disulfide redox state. **Circulation**, v. 111, n. 22, p. 2973–80, 2005. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/111/22/2973.short>>. Acesso em: 16/1/2015.

GO, Y.-M.; JONES, D. P. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. **Free radical biology & medicine**, v. 50, n. 4, p. 495–509, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584910014012>>. Acesso em: 16/1/2015.

GOODMAN, G. E.; THORNQUIST, M. D.; BALMES, J.; et al. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: Incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping β -carotene and retinol supplements. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 23, p. 1743–1750, 2004.

HICKS, T. A.; MCGLONE, J. J.; WHISNANT, C. S.; KATTESH, H. G.; NORMAN, R. L. Behavioral , Endocrine , Immune , and Performance Measures for Pigs Exposed to Acute Stress. **Journal of Animal Science** , n. 76, p. 474–483, 1998.

HOPWOOD, D. E.; HAMPSON, D. J. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. **Weaning the Pig: Concepts and Consequences**. p.199–213, 2003. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. Disponível em:

<<http://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=aBLrT61-38cC&pgis=1>>. Acesso em: 18/1/2015.

JACOBSEN, D. W.; GATAUTIS, V. J.; GREEN, R.; et al. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: Sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 873–881, 1994.

JAFARI, R. A.; KIANI, R.; SHAHRIYARI, A.; ASADI, F.; HAMIDINEJAT, H. Effect of dietary vitamin E on plasma oxidative stress in broiler chicks infected with *Eimeria tenella*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, p. 895–899, 2012.

JENSEN, M. S.; JENSEN, S. K.; JAKOBSEN, K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. **Journal of animal science**, v. 75, n. 2, p. 437–45, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9051467>>. Acesso em: 17/1/2015.

JIANG, S.; MORIARTY-CRAIGE, S. E.; ORR, M.; et al. Oxidant-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: dependence on extracellular redox state. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 46, n. 3, p. 1054–1061, 2005.

JIANG, S. Z.; YANG, Z. B.; YANG, W. R.; et al. Effects of purified zearalenone on growth performance, organ size, serum metabolites, and oxidative stress in postweaning gilts. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 3008–3015, 2011.

JOCELYN, P. C. Chemical reduction of disulfides. **Methods in Enzymology**, v. 143, n. C, p. 246–256, 1987.

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

JONES, D. P.; GO, Y.-M.; ANDERSON, C. L.; et al. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 11, p. 1246–1248, 2004.

JONES, D. P.; LIANG, Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1329–1338, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.021>>. .

JONES, D. P.; MODY, V. C.; CARLSON, J. L.; LYNN, M. J.; STERNBERG, P. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1290–1300, 2002.

JONES, D. P.; MODY, V. C.; CARLSON, J. L.; LYNN, M. J.; STERNBERG, P. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1290–1300, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584902010407>>. Acesso em: 25/1/2015.

JORDAN, E. R.; SWANSON, L. V. Effect of Crude Protein on Reproductive Efficiency, Serum Total Protein, and Albumin in the High-Producing Dairy Cow. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 1, p. 58–63, 1979. Elsevier. Disponível em: <<http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030279832026/fulltext>>. Acesso em: 25/1/2015.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic Press, 2008.

KEMP, M.; GO, Y.-M.; JONES, D. P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. **Free radical biology & medicine**, v. 44, p. 921–937, 2008.

KLASING, K. C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, v. 48, n. October 2007, p. 525–537, 2007.

VAN LAER, K.; HAMILTON, C. J.; MESSENS, J. Low molecular weight thiols in thiol disulfide exchange. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 13, p. 121017065246008, 2012.

LAURIDSEN, C.; HØJSGAARD, S.; SØRENSEN, M. T. antioxidative and oxidative status of pigs . The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Influence of

Dietary Rapeseed Oil , Vitamin E , and Copper on the Performance and the Ant. , p. 906–916, 1999.

LIMA, G. Uso de aditivos na produção de suínos. Simpósio sobre as Implicações Sócio-Econômicas do Uso de Aditivos na Produção Animal. **Anais...** . p.51–68, 1999.

LOCHMILLER, R. L.; DEERENBERG, C. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? **Oikos**, v. 88, n. 1, p. 87–98, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x>>. Acesso em: 19/1/2015.

LONN, E.; BOSCH, J.; YUSUF, S.; et al. **Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial.** 2005.

LOPES, S. T. .; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária.** 3º ed. Santa Maria, 2007.

LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. **Veterinary Journal**, v. 173, p. 502–511, 2007.

MAPA. **IN 13-2004.** 2004.

MARCO-RAMELL, A.; PATO, R.; PEÑA, R.; et al. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. e66–e71, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.01.003>>. .

MELLOR, S. Alternatives do antibiotic. **Pig Progress**, p. 18–21, 2000.

MENTEN, J. F. M. **Eficácia, efeito sinérgico e modo de ação de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento de suínos.**, 1995. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MORIARTY, S. E.; SHAH, J. H.; LYNN, M.; et al. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 12, p. 1582–1588, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of swine**. The National Academies Press, 1998.

NDHLALA, A. R.; NCUBE, B.; STADEN, J. VAN. Antioxidants Versus Reactive Oxygen Species – A Tug of War for Human Benefits? In: I. Laher (Org.); **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**. p.3771–3783, 2014. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30018-9>>. .

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 2002.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande, BR: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, 2001.

NICOL, C. The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, 2001.

ORRELL, R. W.; LANE, R. J. M.; ROSS, M. Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, , n. 1, p. CD002829, 2007.

PESTI, G. M. Nutrient requirements of poultry. **Animal Feed Science and Technology**, 1995.

REID, M. B.; DURHAM, W. J. Generation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Contracting Skeletal Muscle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 959, n. 1, p. 108–116, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02087.x>>. Acesso em: 18/1/2015.

RIZVI, S. I.; MAURYA, P. K. L-cysteine influx in erythrocytes as a function of human age. **Rejuvenation research**, v. 11, n. 3, p. 661–665, 2008.

ROBINSON, I.; DE SERNA, D. G.; GUTIERREZ, A.; SCHADE, D. S. Vitamin E in humans: an explanation of clinical trial failure. **Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, v. 12, n. 5, p. 576–82, 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/17002935>>. Acesso em: 20/1/2015.

ROUBICEK, C. B.; RAY, D. E. Serum protein and protein fractions in unsupplemented range cattle. **Journal of Animal Science**, v. 34, n. 6, 1972.
SARSOUR, E. H.; KUMAR, M. G.; CHAUDHURI, L.; KALEN, A. L.; GOSWAMI, P. C. Redox control of the cell cycle in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 12, p. 2985–3011, 2009.

SAUERWEIN, H.; SCHMITZ, S.; HISS, S. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. **Redox report : communications in free radical research**, v. 10, p. 295–302, 2005.

SAUERWEIN, H.; SCHMITZ, S.; HISS, S. Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, p. 369–380, 2007.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 2001.
SELVARAJ, R. K. Maximum immunity effectors: Mechanisms and animal performance limitations. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 21, p. 185–192, 2012.

SHI-BIN, Y.; DAI-WEN, C.; KE-YING, Z.; BING, Y. Effects of Oxidative Stress on Growth Performance , Nutrient Digestibilities and Activities of Antioxidative Enzymes of Weanling Pigs * . , v. 20, n. 10, p. 1600–1605, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: Introductory Remarks. In: H. Sies (Org.); **Oxidative Stress**. p.1–8, 1985. London: Academic Press.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 104–109, 2009.

UPTON, J. R.; EDENS, F. W.; FERKET, P. R. The effects of dietary oxidized fat and selenium source on performance, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, p. 193–202, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VASSALO, M.; FIALHO, E. T.; DE OLIVEIRA, A. I. G.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G. Vassalo_diarreia_1997.pdf. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 1, p. 131–138, 1997.

WILLIAMS, N. H.; STAHLY, T. S.; ZIMMERMAN, D. R. Effect of Chronic Immune System Activation on the Rate, Efficiency, and Composition of Growth and Lysine Needs of Pigs Fed from 6 to 27 kg. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2463–2471, 1997.