

DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE REFERÊNCIA DE GLUTATION PEROXIDASE NO SORO DE BOVINOS SADIOS

DETERMINATION OF THE REFERENCE RANGE OF GLUTATHIONE PEROXIDASE IN THE SERUM OF HEALTHY BOVINES

Nilson PENHA-SILVA¹; Guilherme Nascimento CUNHA³; Fernando Antônio FERREIRA²; Daniel Pinto COELHO³

RESUMO: Os metabólitos reativos do oxigênio (ROM) são capazes de reagir com vários tipos de biomoléculas, particularmente ácidos graxos polinsaturados das membranas biológicas, gerando peróxirradicais, que deflagram reações oxidativas citotóxicas em cadeia. Os organismos vivos são protegidos contra a ação dos ROM por anti-oxidantes endógenos, como a enzima glutathione peroxidase (GSHPx). O objetivo deste trabalho foi determinar a faixa de referência da GSHPx no soro sanguíneo de bovinos sadios, usando 30 vacas leiteiras da raça holandesa e trinta da raça Guzerá. A atividade da GSHPx foi monitorada pela formação de glutathione oxidado (GSSG). O valor normal determinado para a atividade sérica da GSHPx nos bovinos sadios foi de 7.070 ± 2.240 U.L.L⁻¹.

UNITERMOS: Glutathione peroxidase, Faixa de referência, Soro bovino.

INTRODUÇÃO

Cerca de 2 a 3% do oxigênio absorvido por organismos animais resulta na formação de um grupo de compostos designados como metabólitos reativos do oxigênio (ROM), que compreendem o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, dentre outras espécies (SOHAL; WEINDRUCH, 1996).

A formação dos ROM é catalisada por metais de transição como cádmio, mercúrio, cobre, vanádio, chumbo, níquel e ferro, e desacelerada por selênio e vitamina E (BAGCHI et al., 1998).

Uma exacerbação do estresse oxidativo por deficiência de selênio na dieta, especialmente quando associada a baixos níveis de vitamina E, tem importância na patogênese de doenças miodegenerativas bem como de distúrbios neurais, reprodutivos e imunológicos (ANDRÉS et al., 1997; COUNOTTE; HARTMANS, 1989; ERSKINE et al., 1987; GUPTA; GUPTA; SHUKLA, 1998; HAMLIRI et al., 1990; VAN HEUGTEN et al., 1997; KOLLER; EXON, 1986; KOTT et al., 1998; ROPSTAD, FROSLIE, LANDSVERK, 1988; WHEATLEY; BECK, 1988; WILSON, 1997).

De fato, o tratamento de várias formas de miopatia, como miosite, polimiosite e azotúria, responde bem à suplementação nutricional com selênio e vitamina E (KOLLER; EXON, 1986).

Os danos oxidativos induzidos por metabólitos reativos do oxigênio (ROM) também podem ser prevenidos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) e catalase.

A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. O peróxido de hidrogênio, uma vez formado, deve ser removido para prevenir a geração do radical hidroxila. A remoção do peróxido de hidrogênio é promovida pela GSHPx e pela catalase (MARKS, MARKS; SMITH, 1996).

A GSHPx catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos por glutathione reduzido (GSH). Os grupos sulfidrílica de duas moléculas de GSH agem como doadores de hidrogênio, numa reação que forma o dissulfeto GSSG, que é a forma oxidada do glutathione (FLOHÉ, GUNZLER; LANDESTSTEIN, 1976; KOSOWER, 1976).

A GSHPx é uma enzima oligomérica, com quatro subunidades, que têm uma massa molecular entre 75000

¹ Professor titular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

² Professor titular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

³ Pesquisadores do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Received: 22/06/04 Accept: 25/01/05

e 100000 Daltons, dependendo da fonte e do método de determinação (KOSOWER, 1976). Ela tem 4 átomos-grama de selênio por mol de enzima (FLOHÉ; GUNZLER; LANDESTEIN, 1976; KOSOWER, 1976).

A GSHPx é altamente específica para o seu substrato doador de hidrogênio (GSH), mas o substrato acceptor pode ser lipídeos insaturados, esteróides, ácidos nucleicos e prostaglandinas (FLOHÉ; GUNZLER; LANDESTEIN, 1976; KOSOWER, 1976).

Como o selênio é o grupo prostético de cada uma das subunidades da GSHPx, os processos patológicos decorrentes de deficiência de selênio podem ser determinados por deficiência na atividade da GSHPx. De fato, a atividade da GSHPx é indicada como um marcador válido do nível sanguíneo de selênio, constituindo um método preferível de avaliação do *status* de selênio de um organismo vivo (COUNOTTE; HARTMANS, 1989; THOMPSON *et al.*, 1981; WEISS *et al.*, 1990; WHEATLEY; BECK, 1988).

Em bovinos, os níveis de GSHPx aparecem descritos para a massa (MORE *et al.*, 1989; RICE; BLANCHFLOWER, 1986) ou volume de eritrócitos (THOMPSON *et al.*, 1981), leucócitos (MORE *et al.*, 1989), leite (LINDMARK-MANSSON *et al.*, 2001), sêmen (SLAWETA, LASKOWSKA, SZYMANSKA, 1988), mas não para o soro sanguíneo. Este trabalho teve por objetivo determinar a faixa de referência da enzima GSHPx no soro de bovinos sadios.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 animais sadios para se

$$\frac{\Delta A_{\text{teste}}/\text{min.} - \Delta A_{\text{controle}}/\text{min.}}{6,22 \times 10^3 (\text{mol.L}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}} \times \frac{1000000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

onde $\Delta A_{\text{teste}}/\text{min.}$ e $\Delta A_{\text{controle}}/\text{min.}$ são as variações da absorvância do teste e do controle por minuto; $6,22 \times 10^3 (\text{mol.L}^{-1})^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ é o valor do coeficiente de extinção molar do NADPH + H⁺; 1 cm é o caminho óptico da cubeta utilizada; 1/0,1 é o fator de correção do volume utilizado da amostra; e 1000000/1 é um fator para converter mol em μmol . A divisão de $\Delta A/\text{min}$ pelo coeficiente de extinção molar do NADPH + H⁺ fornece o decréscimo na concentração de NADPH. A taxa de reação dependente da GSHPx é obtida quando os efeitos não enzimáticos e independentes de hidroperóxidos ($\Delta A_{\text{controle}}/\text{min}$) são subtraídos da taxa de reação total ($\Delta A_{\text{teste}}/\text{min}$), de acordo com descrições da literatura (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). Como GSH é

determinar a atividade sérica de GSHPx, sendo 30 da raça Guzerá e 30 da raça Holandesa.

Todos os reagentes utilizados tinham um grau de pureza ACS e foram provenientes da *Sigma Chemical Company*.

O sangue dos animais analisados foi coletado em tubo de ensaio por punção da veia jugular e, após coagulação à temperatura ambiente, foi centrifugado para separação do soro sanguíneo utilizado nos testes.

O GSSG formado durante a reação de GSHPx foi instantaneamente e continuamente reduzido na presença de um excesso de glutathion redutase, para manutenção de um nível constante de GSH. A oxidação concomitante de NADPH foi monitorada fotometricamente pelo decaimento da absorção em 340 nm (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). Em um ensaio típico, eram pipetados para uma cubeta de 1 mL de capacidade: 500 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 100 μL da amostra; 100 μL de GSH redutase (0,24 U); e exatamente 100 μL de GSH a 10 mmol.L^{-1} . A mistura era pré-incubada por 10 minutos a 37 °C. Após a adição de 100 μL de NADPH, o decaimento da absorvância em 340 nm era seguido durante 3 minutos, para obtenção de uma reta controle do ensaio. A reação total era então iniciada pela adição de 100 μL de solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 mmol.L^{-1} , pré-aquecido a 37 °C, e o decréscimo na absorção em 340 nm era monitorado durante 5 minutos (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

Os valores de atividade da GSHPx, dados em $\mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (UI.mL^{-1}) foram determinados com o emprego da expressão (HOLME; PECK, 1993):

continuamente regenerado pela glutathion redutase, a concentração de GSH no ensaio é mantida no nível inicial. Conseqüentemente, a reação da GSHPx procede de acordo com uma cinética de ordem pseudo-zero.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 1** apresenta um típico gráfico com o decaimento da absorvância do NADPH + H⁺ em 340 nm com o tempo, utilizado na determinação do valor de GSHPx para o soro de cada animal considerado.

Para o grupo dos 60 animais considerados, o valor de referência normal da GSHPx foi de $7.070 \pm 2.240 \text{ UI.L}^{-1}$ de soro. Como o nível de significância de 0,95

compreende a variabilidade entre -2 e $+2$ desvios-padrões, a faixa de referência normal deve compreender o intervalo de 2.590 a 11.550 UI.L⁻¹.

Esses valores são próximos dos 5.512 ± 1.498 UI.L⁻¹ reportados para o soro humano (WEINBRENNER *et al.*, 2003), mas não iguais, pois há diferença entre as espécies, além de uma pequena diferença técnica no método empregado (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). Neste

trabalho, nós utilizamos peróxido de hidrogênio, enquanto naquele trabalho foi utilizado hidroperóxido de cumeno.

Embora haja valores determinados para os níveis de GSHPx no sangue bovino, eles são descritos por massa ou volume de eritrócitos ou leucócitos (MORE *et al.*, 1989; RICE; BLANCHFLOWER, 1986; THOMPSON *et al.*, 1981), o que inviabiliza uma comparação com os valores sorológicos de referência descritos neste trabalho.

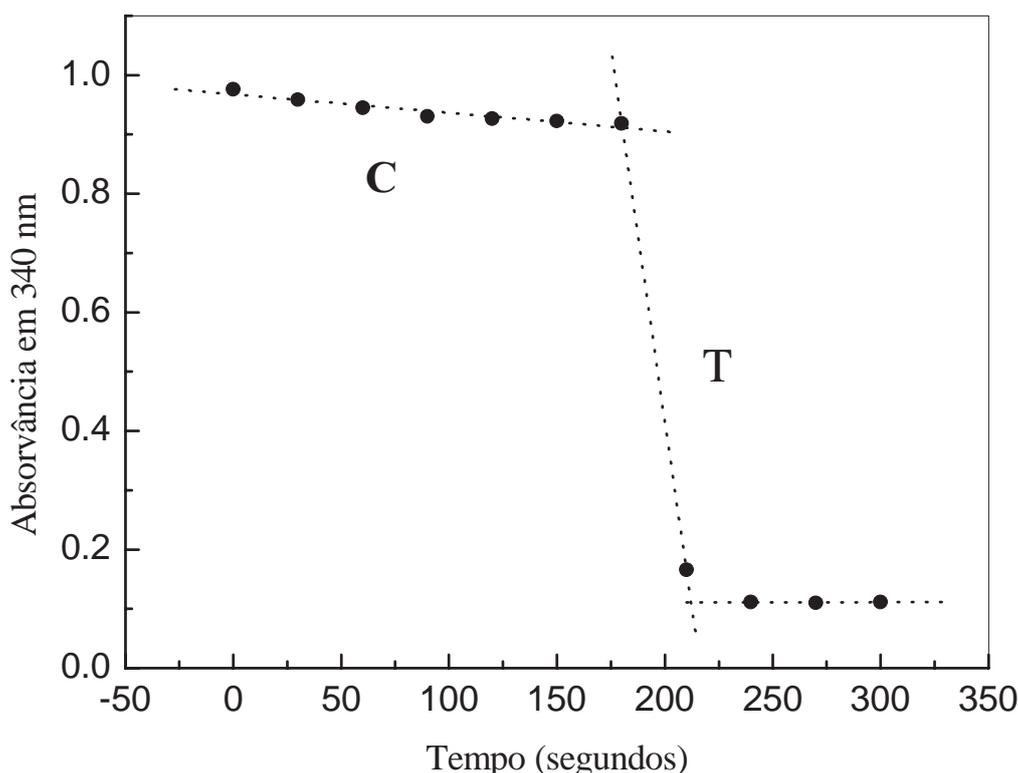


Figura 1. Determinação da atividade da GSHPx no soro de bovinos saudios. A letra C se refere à linha usada como controle da oxidação inespecífica de NADPH + H⁺, enquanto a linha T se refere à linha produzida pela oxidação específica do NADPH + H⁺ pela GSHPx.

CONCLUSÃO

A faixa de referência normal para bovinos saudios das raças Guzerá e Holandesa variou de 2.590 a 11.550 UI.L⁻¹.

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com suporte financeiro da PROPP-UFU e FUNDAP-UFU.

ABSTRACT: Reactive oxygen metabolites (ROM) are able to react with several different kinds of biomolecules, especially polyunsaturated fatty acids of biological membranes, producing peroxiradicals, that will generate oxidative cytotoxic reactions. Living organisms are naturally protected against the action of ROM by endogenous antioxidants, as the enzyme glutathione peroxidase (GSHPx). The objective of this work was to determine the reference range of GSHPx in the serum of healthy bovines, using 30 Netherland and 30 Guzera dairy cows. GSHPx activity was monitored by formation of oxidized glutathione (GSSG). The determined reference value for GSHPx in the serum of healthy bovines was $7,070 \pm 2,240$ IU.L⁻¹.

UNITERMS: Glutathione peroxidase, Reference range, Bovine serum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉS, S.; MAÑÉ, M. C.; SÁNCHEZ, J.; BARRERA, R.; ZARAGOZA, C.; JIMENEZ, A. Response to barium selenate supplementation in sheep kept at pasture in the Mediterranean area. **Veterinary Research**, Paris, v. 28, n. 6, p. 539-545, Dec. 1997.

BAGCHI, D.; VUCHETICH, P. J.; BAGCHI, M.; TRAN, M. X.; KROHN, R. L.; RAY, S. D.; STOHS, S. J. Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathione depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice. **General Pharmacology**, New York, v. 30, n. 1, p. 43-50, Jan. 1998.

COUNOTTE, G. H. M.; HARTMANS, J. Relation between selenium content and glutathione-peroxidase activity in blood of cattle. **The Veterinary Quarterly**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 155-161, July 1989.

ERSKINE, R. J.; EBERHART, R. J.; HUTCHINSON, L. J.; SCHOLZ, R. W. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 190, n. 11, p. 1417-1421, June 1987.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. In: SIES, H. (Ed). **Methods in Enzymology**. New York, Academic, 1984. p. 114-121.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A.; LANDESTEIN, R. Glutathione peroxidase. In: ARIAS, I. M.; JAKOBY, W. B. (Ed.). **Glutathione metabolism and function**. New York: Raven, 1976. p. 115-136.

GUPTA, A.; GUPTA, A.; SHUKLA, G. S. Effects of neonatal quinalphos exposure and subsequent withdrawal on free radical generation and antioxidative defenses in developing rat brain. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 18, n. 1, p. 71-77, Jan./Feb. 1998.

HAMLIRI, A.; KHALLAAYOUNE, K.; JOHNSON, D. W.; KESSABI, M. The relationship between the concentration of selenium in the blood and the activity of glutathione peroxidase in the eritrocytes of the dromedary camel (*Camellus dromedrarius*). **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 27-30, Jan. 1990.

HOLME, D. J.; PECK, H. Enzymes. In: _____. **Analytical biochemistry**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 261-318.

KOLLER, L. D.; EXON, J. H. The two faces of selenium – deficiency and toxicity – are similar in animals and man. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 50, n. 3, p. 297-306, July 1986.

KOSOWER, E. M. Chemical properties of glutathione. In: ARIAS, I. M.; JAKOBY, W. B. (Ed.). **Glutathione metabolism and function**. New York: Raven, 1976. p. 1-15.

KOTT, R. W.; THOMAS, V. M.; HATFIELD, P. G.; EVANS, T.; DAVIS, D. C. Effects of dietary vitamin E supplementation during late pregnancy on lamb mortality and ewe productivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 212, n. 7, p. 997-1000, Apr. 1998.

LINDMARK-MANSSON, H.; CHEN, J.; PAULSSON, M.; ALDEN, G.; REN, B.; LADENSTEIN, R.; AKESSON, R. The effect of storage and heat treatment on glutathione peroxidase in bovine milk and whey. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 1-2, p. 71-81, Jan. 2001.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. Oxygen metabolism and oxygen toxicity. In: _____. **Basic medical biochemistry: a clinical approach**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 327-340.

MORE, T.; REDDY, G. R.; SHARMA, S. P.; SINGH, L. H. Enzymes of oxidant defense system of leukocytes and erythrocytes in bovine anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 31, n. 3-4, p. 333-337, June 1989.

RICE, D. A.; BLANCHFLOWER, W. J. Evaluation of a new test kit for measuring whole blood glutathione peroxidase using cattle blood. **Veterinary Record**, London, v. 118, n. 17, p. 479-480, Apr. 1986.

ROPSTAD, E.; FROSLIE, A.; LANDSVERK, K. Selenium levels and glutathione peroxidase activity in blood, plasma and reproductive organs in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 29, n. 3-4, p. 431-435, Mar./Apr. 1988.

SLAWETA, R.; LASKOWSKA, T.; SZYMANSKA, E. Lipid peroxides, spermatozoa quality and activity of glutathione peroxidase in bull semen. **Acta Physiologica Polonica**, Warszawa, v. 39, n. 3, p. 207-214, May/June 1988.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, New York, v. 273, n. 5271, p. 59-63, July 1996.

THOMPSON, K. G.; FRASER, A. J.; HARROP, B. M.; KIRK, J. A.; BULLIANS, J.; CORDES, D. O. Glutathione peroxidase activity and selenium concentration in bovine blood and liver as indicators of dietary selenium intake. **New Zeland Veterinary Journal**, Wellington, v. 29, n. 1-2, p. 3-6, Jan./Feb. 1981.

VAN HEUGTEN, E.; SWEET, L. A.; STUMPF, T. T.; RISLEY, C. R.; SCHELL, T. C. Effects of water supplementation with selenium and vitamin E on growth performance and blood selenium and serum vitamin E concentrations in weaning pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 211, n. 8, p. 1039-1042, Oct. 1997.

WEINBRENNER, T.; CLADELLAS, M.; COVAS, M. J.; FITÓ, M.; TOMÁS, M.; SENTI, M.; BRUGUERA, J.; MARRUGAT, J. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 99-106, May 2003.

WEISS, W. P.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; HOBLET, K. H. Relationships among selenium, vitamin E and mammary gland health in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 2, p. 381-390, Feb. 1990.

WHEATLEY, L. E.; BECK, N. F. G. The influence of season and husbandry on the selenium status of sheep in a deficient area. **The British Veterinary Journal**, London, v. 144, n. 3, p. 246-252, May/June 1988.

WILSON, J. X. Antioxidant defense of the brain: role for astrocytes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 75, n. 10-11, p. 1149-1163, Oct./Nov. 1997.