PIERRE CASTRO SOARES

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO CÚPRICA E DO TRATAMENTO COM
TETRATIOMOLIBDATO SOBRE A FUNÇÃO RENAL E O METABOLISMO
OXIDATIVO DE OVINOS**

**Tese apresentada ao
programa de pós-graduação
em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Doutor em Medicina
Veterinária.**

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

**São Paulo
2004**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1360
FMVZ

Soares, Pierre Castro

Efeito da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos / Pierre Castro Soares — São Paulo : P. C. Soares, 2004.
111 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2004.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Ovinos. 2. Cobre. 3. Intoxicação. 4. Tratamento.
5. Função renal de animal. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: SOARES, Pierre Castro

Título: EFEITOS DA INTOXICAÇÃO CÚPRICA E DO TRATAMENTO COM
TETRATIOMOLIBDATO SOBRE A FUNÇÃO RENAL E O METABOLISMO
OXIDATIVO DE OVINOS

Tese apresentada ao programa
de pós-graduação em Clínica
Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof.Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

RESUMO

SOARES, P.C. **Efeitos da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos.** [Effects of copper poisoning and its treatment with tetrathiomolybdate on renal function oxidative metabolism in lambs]. 2004. 111f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Para avaliar a influência da intoxicação cúprica cumulativa e do seu tratamento com tetratiomolibdato de amônia (TTM) sobre a função renal e sobre o metabolismo oxidativo, foram empregados 10 cordeiros da raça Santa Inês os quais receberam doses crescentes de sulfato de cobre, até o surgimento de hemoglobinúria macroscópica. Neste momento foram distribuídos ao acaso cinco ovinos para cada um dos dois grupos, onde foi o primeiro foi mantido como controle (C) e o grupo subsequente foram tratados diariamente, no decorrer de quatro dias, com 3,4 mg TTM por kg de peso vivo. Todos os ovinos do grupo C sucumbiram no decorrer de quatro dias, enquanto que tal fato só ocorreu em um animal tratado com TTM. A intoxicação provocou um quadro clínico típico, gerando grandes alterações na função renal como diminuição da taxa de filtração glomerular, a qual provocou oligúria ou anúria, proteinúria e uremia. O quadro tóxico ainda determinou drásticas diminuições na capacidade de reabsorção tubular manifestada por: glicosúria, menor densidade urinária, maiores excreções urinárias de fósforo, sódio, cloro, potássio, cobre e ferro, maior atividade da enzima NAG na urina. Uma acidúria também foi constatada. O tratamento com TTM promoveu melhora na maioria destas variáveis dentro do 2º ou 5º dias após o início do tratamento. No tocante ao metabolismo oxidativo o quadro tóxico provocou uma intensa formação de radicais livres, com concomitante redução no teor de glutathione reduzida eritrocitária, embora tenha aumentado a capacidade anti-oxidante no plasma, em parte por formação de ácido úrico. Quanto maior foi a formação de radicais livres menor foi a taxa de filtração glomerular. O tratamento com TTM reduziu de maneira significativa a formação de radicais livres, aumentando a concentração de glutathione reduzida eritrocitária.

Palavras Chaves: 1. Ovinos 2. Cobre 3. Intoxicação 4. Tratamento 5. Função renal de animais

ABSTRACT

SOARES, P.C. **Effects of copper poisoning and its treatment with tetrathiomolybdate on renal function oxidative metabolism in lambs.** [Efeito da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos] 2004. 111f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Twelve Santa Inês lambs were used to study the effects of cumulative copper poisoning and the treatment with ammonium tetrathiomolybdate (TTM) on renal function and oxidative metabolism. The lambs were drenched with increasing doses of copper sulfate until the onset of macroscopic hemoglobinuria. So the lambs were randomly distributed in two groups of five sheep each and treated (TTM) or not (C) with tetrathiomolybdate (3.4 mg/kg BW/ per day, for four days). All sheep C succumbed in four days of hemoglobinuria, while only one lamb died in the other group. A typical clinical picture was observed in both groups causing a marked renal insufficiency with decreased glomerular filtration rate, which caused anuria or oliguria, proteinuria and uremia. The poisoning also generated an intense decrease in the tubular reabsorption capacity with higher urinary excretion of glucose, phosphorus, sodium, chloride, potassium, iron and copper, higher urinary NAG activity and lower urinary density. An aciduria was also detected. The treatment with TTM caused a marked improvement in the renal function within 2 to 5 days. As far as the oxidative is concerned, the poisoning caused a higher formation of free radicals and decreased the erythrocyte levels of reduced glutathione, although the plasma anti-oxidant capacity was increased, partially by production of uric acid. The higher the free radical formation, the lower the glomerular filtration rate. The treatment with TTM decreased significantly the amount of free radical formation and increased the levels of erythrocyte reduced glutathione.

Key Words: 1. Sheep 2. Copper 3. Poisoning 4. Treatment 5. Animal's renal function

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Composição bromatológica do feno de capim <i>Coast-cross</i> e do concentrado comercial oferecido aos ovinos durante o período experimental – São Paulo – 2004	27
Quadro 2	Variáveis do sedimento urinário dos ovinos induzidos a intoxicação cúprica cumulativa nos grupos controle e TTM – São Paulo – 2004	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação, dose acumulada de cobre (g) e total de dias necessários para ocorrência da intoxicação dos ovinos dos grupos controle e TTM – São Paulo – 2004	43
Tabela 2	Valores médios e desvios padrão do hematócrito (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	44
Tabela 3	Valores de mediana e limites inferior e superior da concentração sérica de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	45
Tabela 4	Valores de mediana e limites inferior e superior da concentração sérica de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	46
Tabela 5	Valores de medianas e limites inferior e superior do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	47
Tabela 6	Valores individuais de cobre e ferro dos tecidos hepático e renal dos ovinos induzidos à intoxicação cúprica cumulativa, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004	48
Tabela 7	Valores médios e desvios-padrão do pH urinário dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	49
Tabela 8	Valores médios e desvios-padrão da densidade urinária dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	50
Tabela 9	Valores medianos e limites inferior e superior da taxa de depuração endógena de creatinina (mL/min/PMet.) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa. São Paulo, 2004	52
Tabela 10	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	53

Tabela 11	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de glicose (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	54
Tabela 12	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de proteína (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	55
Tabela 13	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de fósforo (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	56
Tabela 14	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de sódio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	57
Tabela 15	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de potássio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	58
Tabela 16	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de cloro (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	59
Tabela 17	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de cobre (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	60
Tabela 18	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de ferro (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	62

Tabela 19	Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de molibdênio (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	63
Tabela 20	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de uréia urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	64
Tabela 21	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de glicose urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	65
Tabela 22	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de proteína urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	66
Tabela 23	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de fósforo (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	67
Tabela 24	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de sódio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	68
Tabela 25	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de potássio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	69
Tabela 26	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de cloro (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	70
Tabela 27	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de cobre (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	71

Tabela 28	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da atividade enzimática urinária de NAG (U/l) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	72
Tabela 29	Escores individuais das variáveis hemoglobina e proteína urinárias (Combur Test) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	74
Tabela 30	Valores médios e desvios-padrão da concentração sérica do malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	78
Tabela 31	Valores médios e desvios-padrão da concentração da glutathiona reduzida (mg de GSH/mL de sangue) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	80
Tabela 32	Valores de mediana e limites inferiores e superiores do método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	81
Tabela 33	Valores médios e desvios-padrão da atividade da G-6-PD (U/g Hb) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	82
Tabela 34	Valores médios e desvios-padrão do ácido úrico sérico (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Valores médios e desvios-padrão do hematócrito (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	44
Gráfico 2	Valores de mediana da concentração sérica de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	45
Gráfico 3	Valores de mediana da concentração sérica de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	46
Gráfico 4	Valores de mediana da concentração sérica de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	47
Gráfico 5	Valores médios e desvios-padrão do pH urinário dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	50
Gráfico 6	Valores médios e desvios-padrão da densidade urinária dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	51
Gráfico 7	Valores médios e desvios-padrão da concentração urinária de creatinina (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa. São Paulo, 2004	52
Gráfico 8	Valores de medianas do índice de excreção urinária de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	53
Gráfico 9	Valores de medianas do índice de excreção urinária de glicose (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	54

Gráfico10	Valores de medianas do índice de excreção urinária de proteína (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	55
Gráfico11	Valores de medianas do índice de excreção urinária de fósforo (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	56
Gráfico12	Valores de medianas do índice de excreção urinária de sódio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	57
Gráfico13	Valores de medianas do índice de excreção urinária de potássio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	58
Gráfico14	Valores de medianas do índice de excreção urinária de cloro (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	59
Gráfico15	Valores de medianas do índice de excreção urinária de cobre (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	61
Gráfico16	Valores de medianas do índice de excreção urinária de ferro (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	62
Gráfico17	Valores de medianas do índice de excreção urinária de molibdênio (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	63
Gráfico18	Valores de medianas da taxa de excreção fracional de uréia urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	64

Gráfico19	Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de glicose urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	65
Gráfico20	Valores de medianas da taxa de excreção fracional de proteína urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	66
Gráfico21	Valores de medianas da taxa de excreção fracional de fósforo (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	67
Gráfico22	Valores de medianas da taxa de excreção fracional de sódio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	68
Gráfico23	Valores de medianas da taxa de excreção fracional de potássio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	69
Gráfico24	Valores de medianas da taxa de excreção fracional de cloro (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	70
Gráfico25	Valores de medianas da taxa de excreção fracional de cobre (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	71
Gráfico26	Valores de medianas da atividade enzimática de NAG (U/l) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	72
Gráfico27	Relação entre a taxa de depuração endógena de creatinina (TDECr) (mL/min/Pmet.) e o método pH urinário dos ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004	73

Gráfico28	Relação entre a taxa de depuração endógena de creatinina (TDECr) (mL/min/Pmet.) e a taxa de excreção fracional de sódio (%) dos ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004	73
Gráfico29	Valores médios e desvios-padrão da concentração sérica do malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	79
Gráfico30	Valores médios e desvios-padrão da concentração da glutathiona reduzida (mg de GSH/ml de sangue) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	80
Gráfico31	Valores de mediana da atividade do HRFP ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	81
Gráfico32	Valores médios e desvios-padrão da atividade da G-6-PD (U/g Hb) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	82
Gráfico33	Valores médios e desvios-padrão do ácido úrico sérico (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004	83
Gráfico34	Relação entre o MDA ($\mu\text{mol/L}$) e o método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004	84
Gráfico35	Relação entre o ácido úrico do soro (mg/dL) e o método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004	85
Gráfico36	Relação entre o cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) e o MDA ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004	85
Gráfico37	Relação entre o MDA ($\mu\text{mol/L}$) e a taxa de depuração endógena de creatinina (TDECr) (mL/min/Pmet.) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fígado de ovino (animal nº 7). A – Colangite intensa com infiltração histiocitária caracterizada por grande acúmulo de macrófagos espumosos (seta) H&E 400X. B – Macrófagos espumosos no parênquima (seta) H&E 400X. C - Depósitos de cobre na região centrolobular (seta). Ulzman 250X. D - Depósitos de cobre no interior de macrófagos (seta) Ulzman 1000X. E - Fibroplasia moderada na região periportal. Tricrômico de Mallory 250X. F - Fibroplasia intensa na região periportal. Tricrômico de Mallory 400X.
- Figura 2** Fígado de ovino (animal nº 10). A – Colangite intensa com infiltração histiocitária caracterizada por grande acúmulo de macrófagos espumosos (seta) H&E 400X. B – Macrófagos espumosos no parênquima (seta) H&E 400X. C - Depósitos de cobre na região centrolobular (seta). Ulzman 250X. D - Depósitos de cobre no interior de macrófagos (seta) Ulzman 1000X. E - Fibroplasia leve na região periportal. Tricrômico de Mallory 250X. F - Fibroplasia moderada na região periportal. Tricrômico de Mallory 400X.
- Figura 3** Rim de ovino (animal nº 10). A – Presença de material acídófilo na luz tubular (*) H&E 400X. B. C e D - Acúmulo de cobre nas células tubulares renais evidenciados pela histoquímica. Ulzman 400X. E e F Aumento das fibras colágenas na região periglomerular e peritubular. Tricrômico de Mallory 1000X.
- Figura 4** Fígado de ovino (animais do grupo controle nº 1 e 2). A e B (nº 1) e C e D (nº 2) – Presença de depósitos de cobre no parênquima. Ulzman 250X (C), 400X (A e D) e 1000X (B).
- Figura 5** Rim de ovino (animal do grupo controle nº 6). Presença de depósitos de cobre no interior das células tubulares renais. Ulzman 250X (A) e 1000X (B).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATEIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Amimais.....	26
3.2. Alimentos e alimentação.....	26
3.3. Delineamento experimental e modelo de indução da intoxicação cúprica.....	27
3.4. Tratamento dos animais.....	28
3.5. Coleta de materiais biológicos.....	29
3.5.1. Amostras de sangue.....	29
3.5.2. Amostras de urina.....	30
3.5.3. Amostras de fígado e rins.....	30
3.6. Métodos analíticos.....	31
3.6.1. Amostras de sangue (soro, plasma, e sangue total).....	31
3.6.1.1. Hematócrito.....	31
3.6.1.2. Concentração sérica de creatinina.....	31
3.6.1.3. Concentração sérica de uréia.....	31
3.6.1.4. Concentração sérica de glicose.....	32
3.6.1.5. Concentração sérica de fósforo.....	32
3.6.1.6. Concentração sérica de sódio, potássio e cloro.....	32
3.6.1.7. Concentração sérica de cobre.....	32
3.6.1.8. Concentração sérica de proteína.....	32
3.6.1.9. Concentração sérica de ácido úrico.....	33

3.6.1.10. Teor sérico de malondialdeído (MDA).....	33
3.6.1.11. Atividade da glutathiona reduzida (GSH).....	33
3.6.1.12. Atividade da glicose-6-fosfatodesidrogenase (G-6-PD).....	34
3.6.1.13. Habilidade de redução férrica plasmática (HRFP).....	34
3.6.2. Amostras de urina.....	35
3.6.2.1. Exame físico-químico.....	35
3.6.2.2. Sedimentoscopia.....	35
3.6.2.3. Concentração urinária de creatinina.....	35
3.6.2.4. Concentração urinária de uréia.....	36
3.6.2.5. Concentração urinária de glicose.....	36
3.6.2.6. Concentração urinária de proteína.....	36
3.6.2.7. Concentração urinária de fósforo.....	36
3.6.2.8. Concentração urinária de sódio, potássio e cloro.....	36
3.6.2.9. Concentração urinária de NAG	37
3.6.2.10. Concentração urinária de Determinação dos índices urinários...	37
3.6.2.11. Determinação de cobre, ferro, molibdênio na urina; fígado, rins, concentrado e feno.....	38
3.6.3.Exames histológicos.....	39
3.7. Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
5 DISCUSSÃO.....	87
6 CONCLUSÕES.....	106
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	108

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A ovinocultura tem se expandido nesta última década nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Muitos criadores têm melhorado o sistema de criação introduzindo novas raças e técnicas de alimentação para intensificar a produção de cordeiros para o abate.

O cobre, assim, como o flúor, ferro, zinco, manganês, iodo, cobalto e selênio, é um microelemento essencial para os animais. Este elemento está presente no sítio ativo de 26 metaloenzimas, destacando-se entre elas as seguintes: citocromo c-oxidase, lisiloxidase, ceramíde galactosil transferase e polifeniloxidase. Algumas metaloproteínas, como a ceruloplasmina e a metalotioneína, também apresentam o cobre em suas composições (ORTOLANI, 2002).

A absorção do cobre disponível no alimento ocorre no intestino delgado, onde o cobre solúvel se liga, ainda na luz intestinal, a determinados L-aminoácidos secretados pelos enterócitos, que carregam o cobre para o interior do organismo. O controle da absorção deste mineral é feito pela metalotioneína que está presente nos enterócitos. No organismo, o cobre se liga a albumina e é carregado para o fígado, que é o principal órgão estoque (SANSINANEIA et al., 1993; ORTOLANI, 2002).

A partir deste órgão, este mineral pode seguir três vias: integrar o estoque prolongado no interior dos hepatócitos; permanecer no estoque-temporário, onde o elemento se liga a ceruloplasmina e pode ser distribuído a toda economia; ou ser excretado pela secreção biliar, ligado a metalotioneína hepática, que é a

principal via de excreção do cobre no organismo. A distribuição do cobre varia de acordo com a forma química deste elemento nos alimentos. De forma geral, nos capins a disponibilidade é menor que nos alimentos concentrados, pois nos primeiros grande parte se apresenta como cobre metálico, enquanto que nos concentrados está ligado às proteínas (ORTOLANI, 2002).

Entre as espécies de animais domésticos os ovinos são, sem qualquer dúvida, os mais sujeitos a apresentarem tanto deficiência como quadro de intoxicação pelo cobre (GOONERATNER et al., 1981; SANSINANE et al., 1993). O primeiro quadro está ligado a menor capacidade de absorção de cobre presente em certas raças ovinas, e a intoxicação cúprica relacionada com a menor capacidade de conjugação do cobre e a metalotioneína, diminuindo a excreção deste elemento do organismo, o qual se acumula no fígado de algumas importantes raças ovinas, tais como Suffolk e Texel.

No Brasil, já foram descritos vários surtos de intoxicação cúprica nesta espécie (RIET-CORREA et al., 1989; RIBEIRO et al., 1995; LEMOS et al., 1997; MAIORKA et al., 1998; PEREIRA et al., 1999 e SANTOS et al., 1999). Como a maioria dos ovinos acometidos é de grande valor zootécnico e como a letalidade é superior a 80% as perdas econômicas causadas por esta intoxicação são bastante expressivas em nosso meio (ORTOLANI, 2002).

A intoxicação cúprica ocorre de forma aguda ou acumulativa por razões multifatoriais e está intimamente ligada à ingestão de altas concentrações dietéticas de cobre. As principais fontes são os alimentos e água que contenham altas quantidades de cobre, como contaminante ou presentes naturalmente em suas composições, e também os medicamentos ricos em cobre (ORTOLANI,

1996). A disponibilidade do cobre no tubo gastrointestinal sofre forte influência dos teores dietéticos do molibdênio (Mo), enxofre (S), e ferro (Fe). De maneira geral tais elementos antagonizam a disponibilidade do cobre; tal assunto foi amplamente discutido por Underwood e Suttle (1999). Quando os ovinos são alimentados com dieta rica em concentrados energéticos, os quais são pobres em Mo e S, aumenta significativamente o risco de intoxicação cúprica devida a maior disponibilidade do cobre dietético (UNDERWOOD E SUTTLE, 1999; ORTOLANI, 2002). Quase que a maioria dos ovinos intoxicados por cobre em nossas condições ingeriram anteriormente altas quantidades de concentrados energéticos (ORTOLANI, 1996).

Esta enfermidade pode ser dividida em duas formas, de acordo com o quadro evolutivo: intoxicação aguda, decorrente da ingestão abrupta de grandes quantidades de cobre, dentro de um curto espaço de tempo; e intoxicação cúprica acumulativa, onde o acúmulo de cobre hepático é progressivo, podendo durar de meses a anos, até o desencadeamento do quadro hemolítico (ORTOLANI, 1996).

A patogenia da intoxicação crônica cúprica acumulativa em ovinos está bem documentada e se caracteriza por três fases distintas: pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica (HOWELL E GOONERATNE, 1987). Durante a fase pré-hemolítica, ocorre o acúmulo de cobre no fígado, localizando-se inicialmente nos hepatócitos periféricos às células da veia central e posteriormente em outras áreas do fígado (GOONERATNE et al., 1981; ORTOLANI, 2002). Durante este período, o animal tem um desempenho normal, com exceção das últimas duas semanas, antes da crise hemolítica, quando o apetite seletivo se instala, com a recusa de concentrados (MACHADO, 1998). Na fase pós-hemolítica, os poucos animais não

tratados, que sobrevivem as intensas injúrias desencadeadas na fase hemólise, apresentam sinais de recuperação clínica, com duração de duas a três semanas (MACHADO, 1998; ORTOLANI e MACHADO, 2002b).

Mas sem dúvida das três fases destaca-se a hemolítica, onde se desenrola uma série de complexas reações em cascata produzindo significativos processos danosos levando quase que infalivelmente a colapso. Muitos destes processos e suas conseqüências não estão completamente desvendadas merecendo ainda maiores estudos.

O desencadear da fase hemolítica ocorre quando os teores de cobre atingem valores máximos dentro dos hepatócitos, promovendo morte celular difusa destes e a liberação maciça de cobre livre e de lisossomos, os quais causam intensa injúria célula no fígado e em outros sítios do organismo. Após penetrar na hemácia o cobre livre oxida a glutathione, substância responsável pela integridade destas células, culminando com a hemólise, cerca de 24 horas após. Mas sem qualquer dúvida, as injúrias mais significativas ao organismo tanto causado pelo cobre, como pela hemoglobina e as lisosimas livres são as graves degenerações e necroses dos vasos renais, glomérulos e dos néfrons levando a uma intensa disfunção renal e o estabelecimento de um estado de uremia (ORTOLANI, 2002). O cobre ionizado se liga à hemoglobina livre e as lisosimas formando um complexo altamente danoso ao epitélio renal. Segundo Machado (1998) e Ortolani e Machado (2002c), a causa-mortis num ovino intoxicado por cobre não é o dano hepático, nem a anemia, que se segue à crise hemolítica, mas sim a grave insuficiência renal resultante do quadro. Isto foi constatado pelo

encontro de concentrações de uréia e creatinina séricas seis vezes maiores nos ovinos que sucumbiram que nos sobreviventes (MACHADO, 1998).

Embora vários trabalhos tenham indicado ultraestruturalmente ou bioquimicamente o comprometimento renal no caso da intoxicação (GOONERATNE et al, 1986; HOWELL e GOONERATNE, 1987; SANSINANEA et al. 1993; ORTOLANI e MACHADO, 2002a), faltam estudos que demonstrem a relação entre a intensidade da intoxicação cúprica e o grau de funcionalidade dos rins, em especial no concernente a filtração glomerular e função tubular, que atestem e quantifiquem a insuficiência renal.

A terapia da intoxicação cúprica pode ser extremamente eficiente se for iniciada precocemente no decorrer do 1º ao 2º dia após o início da hemoglobinúria, e se for utilizado antídoto específico à base de tetratiomolibdato (TTM), na dose de 3,4 mg/kg PV (MACHADO, 1998). Este fantástico antídoto tem grande capacidade de quelar o cobre livre, como o cobre presente nos estoques, bloqueando assim seus efeitos imediatos. Gooneratne et al. (1986) também identificaram que o TTM se liga ao cobre livre presente no complexo cobre-hemoglobina-lisossomo reduzindo ou praticamente inativando o efeito deste composto como agente nefrotóxico. Embora Machado (1998) tenha comprovado a redução dos teores de uréia e creatinina sérica após o emprego de TTM, tanto ele como os outros autores não estudaram com detalhes o efeito desse medicamento na melhora da função renal de ovinos com intoxicação cúprica, análise esta que se comparada à mesma função de animais não-tratados poderia fornecer importantes detalhes dos locais de lesão funcional nos rins assim como outros

importantes mecanismos envolvidos na recuperação da insuficiência renal nesta enfermidade.

Diferentes métodos de avaliação de lesões renais e função são utilizados. Um método comum para avaliar a lesão renal de rotina é o exame de urina, porém há limitações do uso, principalmente quanto à identificação precisa do local da lesão. Nestes casos a mensuração da atividade enzimática urinária pode prover informações a respeito da lesão celular renal (MENGOLI et al., 1983; KOGIKA, 1995).

Dentre as atividades de enzimas detectadas na urina, algumas foram muito estudadas e relacionadas com certas enfermidades renais, que não a causada pela intoxicação cúprica. As avaliações dessas atividades trazem importantes informações sobre a intensidade e o grau de lesão em diferentes pontos do néfron, como citados a seguir: membranas dos bordos tubulares (Gama glutamiltransferase - GGT); membrana lisossomal (Beta glucoronidade - GRS e Beta – N- acetil – glucorosaminidase - NAG) e citosol (lactato desidrogenase - LDH e fosfatase alcalina - FA) (GARY et al, 1990a; MIRANDOLA, 1996).

Segundo Garry et al (1990a), dosagens de creatinina sérica e urinária e concentração de eletrólitos tais como sódio, cloro e potássio, seguidos dos cálculos de “clearance” endógeno de creatinina e taxas de excreção de eletrólitos, além da osmolalidade ou densidade específica de amostras pareadas de soro e urina, permite um maior acesso à função renal de animais sadios e doentes, e que a avaliação de creatinina pareada representa a melhor substância endógena para a avaliação da taxa de fluxo glomerular. As doenças renais agudas podem determinar taxas de excreções anormais de muitas substâncias, incluindo

eletrólitos. O aumento da atividade enzimática urinária pode refletir em alteração da permeabilidade da membrana da célula tubular, permitindo a passagem do fluido luminal para o interstício.

Geralmente há um aumento de atividade enzimática urinária ou mesmo de concentração das proteínas de baixo peso molecular quando há uma esfoliação de células, picrose reversa ou alterações na filtração glomerular. Uma das justificativas para o uso de enzimas e proteínas urinárias como indicadores de lesão renal precoce é a própria habilidade dos rins para compensar danos, não detectáveis pelas provas clássicas utilizadas rotineiramente, a menos que o compartimento funcional dos mesmos esteja muito elevado, ou seja, quando há uma diminuição acentuada da massa de néfron efetiva, além de que a distribuição diferenciada da atividade enzimática nos vários segmentos do néfron poderia dar indícios de localização da região lesada (MIRANDOLA, 1996).

A relação entre taxas de excreção total (TET) e excreção fracional (TEF) para metabólitos urinários com desenvolvimento de doenças renais não têm sido bem estudada. Como indicadores de lesão renal tanto quanto função, mudanças podem ocorrer nessas medidas antes do desenvolvimento de outras anormalidades mensuráveis, indicando precocemente a doença (GARY et al., 1990a).

Durante a fase hemolítica é marcante a alta presença de cobre livre no organismo. Esta substância marcadamente reativa combina-se com uma série de compostos presentes nas membranas dos eritrócitos e outras células gerando neste processo grande quantidade de radicais livres, em especial superóxido, sendo este precursor de outras substâncias reativas tais como: peróxido de

hidrogênio e radical hidroxila. Estas substâncias provocam severos danos à membrana celular e ao DNA, podendo levar a diferentes graus de injúria celular, assim como necrose (BREMNER, 1998; SANSINANEA et al., 1993; SANSINANEA et al., 1998).

Embora o tratamento com TTM promova reconhecida melhora no estado clínico dos ovinos intoxicados até o momento não foram realizados estudos críticos que avaliassem o real papel que aquele fármaco tem como antagonista na formação de radicais livres, assim como sobre os seus efeitos deletérios celulares. É de se esperar que a ação do TTM reduza a formação de radicais livres por meio da sua combinação com o cobre livre, reduzindo assim a reação em cascata desencadeada por este íon altamente reativo. Sabe-se, contudo, que para prevenir a ação peroxidativa, as células são equipadas com um sistema de rastreamento (SIES, 1993), constituído de antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathione redutase (GSH) ou a G-6-PD (WRIGHT et al, 1981; SIES, 1993; HOLOVSKÁ et al., 1996), bem como dos produtos de oxidação, como o malonilaldeído (SANSINANEA et al., 1993; BREMNER, 1998; TEMPLER, 2000).

Ressalta-se, portanto, a necessidade de estudos sobre o assunto, utilizando-se provas laboratoriais sensíveis que possam melhor elucidar a patogênese da nefrotoxicidade induzida pelo Cu em ovinos.

2 .OBJETIVOS

Avaliar a lesão e função renal, verificando-se a atividade de diferentes enzimas urinárias, índices urinários e exames pareados de urina, no decorrer das fases pré-hemolítica e hemolíticas, em ovinos intoxicados experimentalmente com cobre e tratados ou não com tetratiomolibdato.

Verificar a ação do tratamento com tetratiomolibdato no processo de formação de radicais livres e na diminuição de danos oxidativos no decorrer da intoxicação cúprica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 10 ovinos da raça Santa Inês, machos, com idade aproximada de seis meses e com peso corporal médio de 35 kg, ao início do experimento.

O experimento foi realizado nas dependências do Galpão de Experimentação em Clínica de Ruminantes, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Todos os animais foram vermifugados no início do período de adaptação e mantidos em gaiolas metabólicas metálicas individuais, para adaptação às instalações e ao novo manejo alimentar.

3.2. Alimentos e Alimentação

Durante o período de adaptação e experimentação, os animais receberam uma dieta composta de feno de capim *Coast-cross* (*Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*, além de 200 g de ração comercial. A respectiva dieta foi fornecida uma vez ao dia. Todo o concentrado oferecido era consumido de pronto pelos ovinos e em média o consumo de matéria seca de feno era de 600 g MS/cabeça, que fornecia diariamente na dieta cerca de 11 ppm de cobre.

O resultado da análise bromatológica dos componentes da dieta encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição bromatológica do feno de capim *Coast-cross* e do concentrado comercial oferecido aos ovinos durante o período experimental – São Paulo – 2004

Componentes	Fenos de capim <i>Coast-cross</i>	Concentrado
Proteína Bruta (%)	6.12	18.50
Matéria Seca (%)	87.03	85.26
Matéria Mineral (%)	7.59	13.34
Fibra Bruta (%)	32.70	4.68
Extrato Etéreo (%)	1.74	5.96
Extrato Não Nitrogenado (%)	51,85	57,52
Fibra em Detergente Neutro (%)	39.23	7.46
Fibra em Detergente Ácido (%)	77.34	19.88
Cálcio (%)	0.27	1.48
Fósforo (%)	0.13	0.95
Cobre (ppm)	14,45	23,01
Ferro (ppm)	138,26	146,02
Molibdênio (ppm)	1,15	0,30

Fonte: Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) do Estado de São Paulo.

3.3. Delineamento e Modelo de Indução da Intoxicação Cúprica Cumulativa

O experimento seguiu um delineamento em blocos ao acaso, onde todos os animais foram intoxicados, sendo que metade deles foi tratada com TTM (n=5; Grupo TTM) e a outra metade mantida sem tratamento específico (n=5; Grupo Controle), recebendo apenas um placebo. As variáveis estudadas foram coletadas e avaliadas nos seguintes momentos:

M0. Momento basal, antes do início da intoxicação;

M1. Uma semana antes da crise hemolítica (hemoglobinúria macroscópica);

M2. Crise hemolítica;

M3. 48 horas após a crise hemolítica;

M4. 120 horas após a crise hemolítica, correspondendo 24 horas após a última dose do tratamento proposto;

M5. Trigésimo dia após a crise hemolítica.

Todos os animais intoxicados receberam, por via oral, uma solução de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, MERCK®).

O modelo de intoxicação seguiu as orientações descritas por Machado (1998). Todos os animais receberam inicialmente doses de 3mg Cu/ kg / PV/d, no decorrer da primeira semana e semanalmente caso não ocorresse intoxicação a dose era acrescida de mais 3mg Cu, até a obtenção do quadro de hemoglobinúria, quando a administração era sumariamente interrompida. Para a correção da dose, os animais eram pesados sempre no dia anterior a administração da dose corrigida.

3.4. Tratamento dos animais

Após a detecção da hemoglobinúria, iniciava-se o período de tratamento, com a injeção intravenosa de TTM na dose de 3,4 mg/ kg do peso vivo. O TTM era pesado e diluído em 20 ml de solução salina estéril, a qual era previamente aquecida a 40°C, conforme descrito por Machado (1998). Esta solução era infundida, lentamente, por venopunção jugular. O tratamento foi realizado uma vez

ao dia, no decorrer dos quatro dias seguintes à hemoglobinúria. Nestes mesmos dias o grupo controle recebia idêntica dose de solução salina isotônica, aplicada pela mesma via.

3.5. Coleta de Materiais Biológicos

As coletas de fluidos biológicos foram realizadas segundo os momentos descritos anteriormente neste capítulo, sendo concomitante no grupo controle, com exceção da última coleta (M4) quando todos os ovinos deste último grupo já tinham sucumbido.

3.5.1. Amostras de Sangue

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular, em tubos siliconizados vacutainer[®], sem e com os seguintes anticoagulantes, fluoreto e ácido dietileno diamino tetracético – EDTA, para obtenção de soro, plasma e sangue total, respectivamente.

As amostras de sangue sem anticoagulante foram mantidas à temperatura ambiente, enquanto que as demais com anticoagulante foram homogeneizadas, prontamente refrigeradas e conduzidas ao laboratório para posterior processamento. Todos esses tubos foram submetidos à centrifugação, por período de 15 minutos a 500 G. As alíquotas de soro e plasma foram, posteriormente, condicionadas em Eppendorfes[®] e armazenadas à temperatura de –20° C.

3.5.2. Amostras de Urina

A obtenção das amostras de urina foi feita por micção espontânea dos animais, utilizando-se bolsa plástica empregada em colonostomia, a qual apresenta orifício central com diâmetro de 50 mm de raio, com capacidade para 500 mL (Mark Med[®]) e foi aplicada na região prepucial por adesão com cola adesiva. Imediatamente após a micção, a urina foi condicionada em recipiente coletor estéril de urina (Cral-Plast[®]), com capacidade para 100 mL, o qual era mantido em isopor contendo gelo reciclável, até o processamento laboratorial.

Para a determinação da taxa de excreção endógena de creatinina, a urina foi coletada em período de três horas, sempre no mesmo horário, conforme protocolo de coleta temporal de urina descrito por Garry et al. (1990a).

Uma fração desta urina foi centrifugada por período de 5 min a 250 G e aliqotada em tubos KMA, seguida de armazenamento a -20°C, enquanto que outra fração foi submetida a urinálise, no mesmo dia da coleta.

3.5.3. Amostras de Fígado e Rins

Amostras de fígado e rins foram obtidas dos animais do grupo controle imediatamente após o óbito, e do grupo TTM decorridos 30 dias da crise hemolítica, após sacrifício por meio de aplicação de medicação pré-anestésica utilizando o cloridrato de acepromazina e seguida de indução anestesia com tiopental sódico. As amostras de fígado e rins foram coletadas para posterior análise histopatológica, histoquímica e determinação de alguns microelementos

(Cu, Fe, Mo), sendo conservados em recipientes contendo solução de formol a 10%.

3.6 - Métodos Analíticos

3.6.1. Amostras de Sangue (soro, plasma e sangue total)

3.6.1.1 Hematócrito

O hematócrito foi realizado em tubos capilares de 75 mm onde as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 13.000 G.

3.6.1.2 Concentração Sérica de Creatinina

Foi determinada pelo método cinético descrito por Lutsgarten e Wenk (1972), utilizando-se kit comercial Sigma[®] (nº 555), sendo processada em analisador bioquímico automático marca MAS[®], modelo Lyasis.

3.6.1.3 Concentração Sérica de Uréia

Foi realizada baseada em atividade cinética descrita por Talke e Schubert (1965), utilizando-se kit comercial Bayer[®] (nº T-011821-56), sendo processada em analisador bioquímico automático marca, MAS[®], modelo Lyasis.

3.6.1.4 Concentração Plasmática de Glicose

Foi determinada por método cinético, utilizando-se kit comercial Sigma® (nº 315-100), segundo técnica descrita por Trinder (1969), processada em analisador bioquímico automático marca MAS®, modelo Lyasis.

3.6.1.5 Concentração Sérica de Fósforo

Foi determinada por método cinético, utilizando-se kit comercial Biosystem® (nº 11508), processado em analisador bioquímico automático marca, MAS®, modelo Lyasis.

3.6.1.6 Determinação Sérica de Sódio, Potássio e Cloro

Os eletrólitos sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama (Aparelho Celm FC-130) e o cloro (Aparelho Corning chloride Analyser-925).

3.6.1.7 Concentração Sérica do Cobre

Foi determinado por método colorimétrico, utilizando-se kit comercial Merck® (nº 3319), após desproteinização da amostra com adição de batocuproína sulfonada, como reagente específico para o cobre.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro digital, marca Micronal® - modelo B34211, em comprimento de onda de 480 nm.

3.6.2.8 Concentração Sérica de Proteína

Foi determinada pelo método do biureto e processada no analisador bioquímico automatizado Liasys, marca AMS®.

3.6.1.9 Concentração Sérica do Ácido Úrico

Foi determinada por método cinético descrito por Fossati et al. (1980), utilizando-se kit comercial ByoSystems® (nº 11821), sendo processado em analisador bioquímico automático marca MAS®, modelo Lyasis.

3.6.1.10 Índice de Peroxidação Lipídica, Avaliado pelo Teor de Malondialdeído (MDA)

Foi determinada pelo método do ácido tiobarbitúrico, descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). O referido método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico, em meio aquecido, quando este é submetido ao posterior resfriamento e mensurado em absorbância com comprimento de onda de 532 nm.

3.6.1.11 Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH)

Tal metabólito foi determinado por método colorimétrico, descrito por Beutler et al. (1963), As leituras foram feitas em espectrofotômetro digital, marca Micronal® - modelo B34211, em comprimento de onda de 412 nm.

Como esta técnica fornece resultado em densidade óptica o mesmo foi transformado em mg/ mL de sangue, realizando-se o seguinte cálculo:

$$\text{GSH (mg/ mL)} = (\text{OD1} - \text{OD2}) \times 31040/\text{VG}$$

Onde,

OD1 = Densidade ótica inicial

OD2 = Densidade ótica final

VG = Volume globular da amostra

3.6.1.12 Atividade Enzimática da Glicose-6-Fosfatodesidrogenase (G-6-PD)

Foi determinada por método enzimático, descrito por Kornberg (1955), utilizando-se kit comercial Randox[®] (E.C.-1.1.1.49) e processada em analisador bioquímico automático marca MAS[®], modelo Lyasis. Antes da leitura foi realizado um processamento manual das amostras da seguinte fórmula: uma alíquota de 400 µL de sangue total foi adicionada a 4000µL de solução salina a 0,9%. Em seguida foi centrifugada a 250G por período de cinco minutos, quando o sobrenadante era desprezado e nova solução salina era adicionada as hemácias, repetindo-se três vezes este processo. Após as lavagens, a papa de hemácias foi adicionada a 1000 µL de água purificada, para obtenção de hemolisado, homegeneizada e condicionada a temperatura de a -20°C, por período de 10 min. Nova centrifugação foi efetivada, sendo esta com obtenção de 500G, por período de 10 min. O sobrenadante foi condicionado em tubos eppendorf e, estes, armazenados em freezer a -70 °C.

Para calcular a atividade desta enzima em UI/g de hemoglobina, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{G-6-PD UI/g Hb} = \frac{\text{mU/eritrócitos por mL} \times 100}{\text{Hb (g/dL)}}$$

Onde,

100 = Fator de conversão da atividade por 100 mL

Hb (g/dL) = Concentração de hemoglobina da amostra

3.6.1.13 Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)

Foi determinada pelo método colorimétrico, descrito por Benzie (1996), o qual descreve a HRFP, a baixo pH, reduzindo o complexo tripiridiltiazina férrica

(Fe^{III} – TPTZ) à forma ferrosa (Fe^{II}), formando um azul intenso, com possibilidade de leitura em absorvância de 593nm.

3.6.2 Amostras de Urina

3.6.2.1 Exame Físico-Químico

No exame físico foram avaliadas as seguintes variáveis: cor, aspecto e densidade (refratometria). Já no exame químico tais exames foram determinados: pH (potenciômetro digital de mesa marca Celm®, modelo pH – 10, com sensibilidade de 0,01 grau, acoplado em eletrodo íon específico, marca Sensotec®, modelo 2.13) e os teores de hemoglobina detectados tiras reativas comerciais (Combur Teste – Roche®).

3.6.2.2 Sedimentoscopia

Após a centrifugação (250 G) da urina, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento colocado entre lâmina e lamínula e examinada por microscopia ótica, com aumentos de 100 e 400 vezes.

3.6.2.3 Concentração Urinária de Creatinina

Foi determinado pelo método cinético descrito por Lutsgarten e Wenk (1972), utilizando-se kit comercial Sigma® (nº 555), sendo processada em analisador bioquímico automático marca, MAS®, modelo Lyasis.

3.6.2.4 Concentração Urinária de Uréia

Foi determinada por método cinético, utilizando-se kit comercial Diasys® (nº 131019910026), processada em analisador bioquímico automático marca, MAS®, modelo Lyasis.

3.6.2.5 Determinação Urinária de Glicose

Foi determinada por método cinético, utilizando-se kit comercial Sigma® (nº 315-100), segundo técnica descrita por Trinder (1969), processada em analisador bioquímico automático marca MAS®, modelo Lyasis.

3.6.2.6 Concentração Urinária de Proteína

Foi determinada por meio do método *Coumassie Brilliant Blue*, preconizado pelo Laboratório de Análises Clínicas do College of Veterinary Medicine – The Ohio State University (Kogika, 1995).

3.6.2.7 Concentração Urinária de Fósforo

Foi determinada por método cinético, utilizando-se kit comercial Biosystem® (nº 11508), processado em analisador bioquímico automático marca, MAS®, modelo Lyasis.

3.6.2.8 Concentração Urinária de Sódio, Potássio e Cloro

Os eletrólitos sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama (Aparelho Celm FC-130) e cloro (Aparelho Corning chloride Analyser-925).

3.6.2.9 Atividade Urinária de N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG)

Foi determinada utilizando-se Kit comercial Boehringer Mannheim® (nº 875.406). A NAG catalisa a reação em que o sal sódico da 3-cresolsulfonaftaleinil – N – acetil β – D – glicosaminida, a 37 °C, libera a 3-cresolsulfonaftaleína (púrpura de 3-cresol), que, em meio alcalino, dá origem a um composto de coloração âmbar, cuja absorbância é determinada contra um branco de reativo, em 580 nm. O resultado foi expresso em relação à concentração de creatinina urinária em mg/dL (Mirandola, 1996).

3.6.2.10 Determinação dos Índices Urinários

Os índices foram obtidos por meio de fórmulas descritas por Garry et al. (1990a), Paul Lunn e McGuirk (1990) e Brito (1998). Determinou-se, portanto, a taxa de depuração endógena de creatinina; índice de excreção urinária de y substância e taxa de excreção fracional de Y substâncias, tais como: uréia, glicose, proteína, fósforo, sódio, potássio, cloro, cobre, ferro e molibdênio. Em todas as fórmulas em que o peso vivo era expresso em kg, optou-se por modificar para peso vivo metabólico ($PV^{0,75}$), que segundo Chen (1990) apresenta melhor correção dos dados. Para a determinação dos respectivos índices, as análises das variáveis (Y substância) tiveram que ser determinadas tanto no soro quanto na urina, conforme fórmulas preconizadas pelos autores citados, ou seja:

1. Índice de Excreção Urinária de uma (y) Substância

$$IEUr_Y \text{ (mMol/L)} = (Ur_Y/CrUr) \times PV^{0,75}$$

O IEU_r corresponde a quantidade eliminada de uma substância na urina corrigida pela creatinina urinária e peso (Fleming et al, 1991).

2. Taxa de Depuração de Creatinina Endógena (TDECr)

$$TDECr \text{ (mL/min/Pmet.)} = [(CrUr \times V_{Ur}) / CrSr] / PV^{0,75}$$

3. Taxa de Excreção Fracional de (y) Substância

$$TE_y (\%) = [(U_r/S_r) / (CrUr/CrSr)] \times 100$$

Onde,

U_r – Y substância determinada na Urina

S_r – Y substância determinada no soro

$CrUr$ – Creatinina urinária

$CrSr$ – Creatinina sérica

$PV^{0,75}$ – Peso metabólico

A TE_y refere-se a fração de material filtrado pelo glomérulo que é eliminado na urina. Essa taxa de qualquer substância reflete tanto o esforço dos rins em manter a homeostase como os defeitos da habilidade de realizar tal função (Kaneko, 1997).

3.6.2.11 Determinação do Cobre, Ferro e Molibdênio na Urina, Fígado, Rins, Concentrado e Feno

Todos os elementos, com exceção do molibdênio foram determinados por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivo (CPOS). O molibdênio foi determinado por método catalítico (Quin e Woods, 1979). Para tal fim, os fragmentos de fígado e rins foram previamente preparados por meio de secagem em estufa a 103°C, por 24 horas e, em seguida, submetidos à digestão

úmida com ácido nítrico e perclórico (4:1 v/v), para posterior análise (Krug et al, 1977). As referidas análises foram efetivadas no Centro de Laseres e Aplicações (CLA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) do Estado de São Paulo.

3.6.3. Exame Histológico

Foram coletadas amostras de rim e fígado de ambos os grupos (controle e teste) para estudo histopatológico. Imediatamente após a coleta dos fragmentos, os mesmos foram acondicionados em recipientes de boca larga, devidamente identificados, contendo solução fixadora aquosa de formol a 10% neutro e tamponado (Luna, 1968; Santos e Mello, 1986), na proporção de vinte vezes o volume do fixador em relação ao volume dos fragmentos (Santos e Mello, 1986). Nesta solução permaneceram por um período de dezoito horas para a total fixação do tecido.

Após este período foi realizado o recorte dos fragmentos em partes menores, de aproximadamente um centímetro de espessura para uma perfeita penetração do fixador no tecido. Em seguida, foram acondicionados em cassetes de processamento histológico, devidamente identificados e mergulhados em uma nova solução fixadora, nela permanecendo por um período de vinte. Amostras reservas de todos os fragmentos foram colhidos e acondicionados em frascos de vidro contendo álcool a 70°GL, em volume de vinte vezes superiores ao volume dos fragmentos (Fernandes, 1949).

Após a completa fixação, os fragmentos foram submetidos a processo de lavagem em água corrente, durante dez minutos, com a finalidade de retirar o excesso da solução fixadora.

Para as etapas seguintes do processamento histológico utilizaram-se os métodos descritos por Fernandes (1949); Luna (1968); Behmer *et al.* (1976) que consiste em desidratação dos fragmentos através de progressivas passagens em álcoois de concentrações crescentes de 70° GL, 80° GL, 90° GL e álcool absoluto. Em cada um e em cada passagem permaneciam por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida os fragmentos foram submetidos a diafanização em duas passagens em xilol, de meia hora cada, em temperatura ambiente. Posteriormente foram embebidos em parafina histológica líquida mantida em estufa com temperatura entre 56°C, por duas horas. Finalmente os fragmentos foram incluídos em moldes de papel contendo parafina histológica líquida aquecida à temperatura de 56°C, obtendo-se desta forma os blocos.

Procedia-se então o seccionamento desses fragmentos com espessura de cinco e seis micrômetros utilizando-se micrótomo rotativo, marca American-Optical®, modelo Spencer 820 e navalhas descartáveis marca Leica®.

Após a laminação os fragmentos de 5 µm foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Mallory (Luna, 1968; Bancroft e Stevens, 1996) e os de 6 µm corados pela técnica de Uzman para cobre. Para a leitura das lâminas foi utilizando microscópio óptico, marca Carl Zeiss®, modelo Jenaval. Todo o processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia Animal do Departamento de Medicina

Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito.

3.7. Análise Estatística

Os parâmetros foram testados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que não atenderem a estas premissas foram submetidos à transformação com base logarítmica ($\log x+1$) ou pela raiz quadrada [$RQ (x+1/2)$], segundo recomendações de Sampaio (1998).

Os dados que atenderem as premissas de normalidade ou transformados foram submetidos à análise de variância (Teste F) que separou, como causa de variação, o efeito de momentos de coleta, dentro de cada grupo. Caso existisse significância no teste F as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Duncan (Sampaio, 1998).

Para as variáveis com distribuição não-paramétrica, foram empregados os seguintes testes: de Friedman para dados dependentes e Manny-Whitney para dados independentes. Realizaram-se, também, análises de regressão e seus respectivos coeficientes de correlação, para verificar a relação entre pares de variáveis. A significância obtida na regressão linear foi avaliada por meio do Teste F.

Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institut Inc., 2000), para as variáveis paramétricas, e programa MINITAB RELEASE 13, 2000, para as variáveis não-paramétricas. Para todos as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

4. RESULTADOS

Todos os cordeiros apresentaram um quadro característico de intoxicação cúprica acumulativa após receberem diferentes quantidades de cobre no decorrer de no mínimo 4 semanas, como esta relacionada na Tabela 1.

Antes dos animais desenvolverem a crise hemolítica ocorria uma nítida diminuição na ingestão de alimentos, deixando de ingerir inicialmente a ração concentrada, seguida do feno, com anorexia evidente entre 48 a 36 horas antes da hemoglobinúria. Cerca de quatro dias antes da crise todos os animais passaram a eliminar fezes amolecidas, perdendo o aspecto de síbala, e presença de muco em um ou outro caso.

Após a detecção da intoxicação os cordeiros apresentaram, além da hemoglobinúria, o seguinte quadro: apatia e estado de sonolência, decúbito esternal, anorexia, oligodipsia ou adipsia, oligúria, taquicardia, diminuição da frequência respiratória e dos movimentos do rúmen, chegando em muitos casos à atonia ruminal, aumento da temperatura retal, diarreia discreta em alguns casos e em outros pronunciada, com fezes ligeiramente hipercólicas com uma nítida coloração verde-escuro brilhante, com presença de grande quantidade de muco. As mucosas se apresentavam em parte dos animais com coloração achocolatada inicialmente (um a dois dias); alguns ovinos já exibiam coloração amarelada já no início da crise hemolítica, enquanto os demais desenvolviam tal tonalidade a partir do 2º ou 3º dia mantendo este tom até o 10º dia; quando sobreviviam as mucosas se tornavam esbranquiçadas no decorrer de 10 a 12 dias, sendo que ao término do experimento se tornavam normocoradas. Os vasos episclerais nos primeiros

dois ou três dias estavam aumentados em número e calibre, apresentando em seguida um quadro reverso, o qual se normalizava ao término do experimento.

Todos os cordeiros não tratados sucumbiram dentro de cinco dias, sendo que dois animais morreram ao redor de 55 h após a detecção da hemoglobinúria, um outro no 3º dia e os dois derradeiros ao término do 5º dia. Durante toda a evolução do quadro os ovinos se mantiveram em grande apatia e decúbito esternal se mantendo em anorexia, oligúria e adipsia.

Dos cinco cordeiros tratados com TTM quatro sobreviveram ao término do experimento, sendo que um deles sucumbiu no início do 3º dia, após uma evolução clínica semelhante ao descrito no grupo controle. Os ovinos que sobreviveram apresentaram nítida melhora do quadro clínico no início do 4º dia, passando a ingerir inicialmente feno e água e após alguns dias ração. Contudo, a completa normalização de todas funções orgânicas foi gradativa no decorrer da primeira quinzena. Era digna de nota a modificação na consistência das fezes, que deixava ser diarréica ou amolecida ao redor do 3º ou 4º dia voltando a apresentar o formato de síbala ao redor do 7º dia de evolução.

Tabela 1 – Identificação, dose acumulada de cobre (g) e total de dias necessários para ocorrência da intoxicação dos ovinos dos grupos controle e TTM – São Paulo – 2004

CONTROLE			TTM		
Animais	Dose Acumulada de Cu (g) ⁽¹⁾	Dias	Animais	Dose Acumulada de Cu (g)	Dias
A	15,3	30	F	17,5	33
B	15,0	31	G	29,4	57
C	16,0	30	H	66,5	89
D	15,0	30	I	26,6	55
E	50,3	77	J	77,0	96
	15,3 ^a (15,0;50,3)			29,4 ^a (17,5;77,0)	

Nota: (1) Valores de medianas e limites inferior e superior das doses de cobre entre grupos controle e tratados com TTM (p>0,06).

4.1 VARIÁVEIS DO SANGUE

4.1.1 Hematócrito

Não existiram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,43$). Apenas foi verificado menor valor do hematócrito dentro do grupo controle no M3 em relação aos momentos M2, M1 e M0 ($p < 0,05$) (Tabela 2 e Gráfico 1). Já no grupo TTM, menores valores foram registrados nos momentos 3 e 4, seguidos do M1 e M2 e que estes forma inferiores aos momentos M0 e M5 ($p < 0,04$)

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão do hematócrito (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{aA} 32 ±2	^{bA} 26 ±4	^{bA} 24 ±4	^{bA} 17 ±5		
TTM ⁽⁷⁾	^{aA} 32 ±2	^{bA} 25 ±4	^{cA} 21 ±3	^{cdA} 19 ±4	^d 13 ±5	^a 31 ±2

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 1 – Valores médios e desvios-padrão d hematócrito (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.1.2 Creatinina Sérica

Maiores teores de creatinina sérica foram detectados no momento 3 no grupo controle, em relação ao tratado com TTM ($p < 0,05$). Dentro dos grupos controle e TTM as concentrações de creatinina se mostraram mais elevadas nos momentos 2 e 3, em relação ao tempo basal (M0) e ao M1. No grupo TTM o maior valor foi encontrado no M2, sendo este superior aos demais momentos antes e depois da crise hemolítica ($p < 0,02$) (Tabela 3, Gráfico 2).

Tabela 3 – Valores de mediana e limites inferior e superior da concentração sérica de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	bA 120 (109;123)	bA 120 (88;129)	aA 310 (129;486)	aA 430 (161;975)		
TTM⁽⁷⁾	bA 120 (107;129)	bA 120 (99;130)	aA 420 (106;863)	bB 210 (157;680)	b 220 (103;385)	b 120 (101;160)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 2 – Valores de mediana da concentração sérica de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.1.3 Uréia Sérica

A análise entre os tratamentos revelou que maiores teores de uréia sérica foi constatado no momento M3 nos animais do grupo controle. Dentro do grupo controle maiores valores de uréia foram obtidos no M3, seguido pelo M2, o qual foi superior a M1 e M0; não ocorreram diferenças significativas dentro do grupo TTM ($p > 0,05$) (Tabela 4 e Gráfico 3).

Tabela 4 – Valores de mediana e limites inferior e superior da concentração sérica de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{cA} 6,6 (6;10)	^{cA} 4,8 (4;8)	^{bA} 12,5 (2;8)	^{aA} 20,4 (6;31)		
TTM ⁽⁷⁾	^{aA} 6,0 (6;8)	^{aA} 5,8 (4;9)	^{aA} 8,1 (6;27)	^{aB} 8,4 (6;45)	^a 9,3 (5;31)	^a 8,0 (5;9)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 3 – Valores de mediana da concentração sérica de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.1.4 Cobre Sérico

Maiores valores de cobre sérico foram encontrados no grupo controle em relação ao tratado com TTM apenas no momento M3 ($p < 0.04$). Dentro do grupo controle detectaram-se maiores valores teores de cobre no M3, seguido do M2 o qual foi superior ao M0 e M1; no grupo TTM maiores concentrações de cobre foram verificadas no M2 e M3, seguida do M1 e M4, os quais foram superiores a M0 e M5 ($p < 0.03$) (Tabela 5 e Gráfico 4).

Tabela 5 – Valores de medianas e limites inferior e superior do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	15,2 ^{CA} (13;20)	22,0 ^{BA} (8;43)	64,2 ^{AA} (18;108)	70,7 ^{AA} (51;119)		
TTM ⁽⁷⁾	15,8 ^{CA} (15;17)	24,9 ^{BA} (12; 29)	52,7 ^{AA} (19;93)	41,0 ^{AB} (30;61)	27,0 ^b (16;30)	15,6 ^c (14;18)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 4 – Valores de mediana da concentração sérica de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.2 TEORES DE COBRE E FERRO NO FÍGADO E RINS

Os teores de cobre tanto no fígado ($p < 0,04$) como nos rins ($p < 0,02$) foram maiores nos ovinos do grupo controle que no tratado com TTM; não existiu diferença na concentração de ferro no fígado entre os grupos ($p > 0,77$), porém maior média foi detectado nos rins dos animais controle ($p < 0,03$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores individuais de cobre e ferro dos tecidos hepático e renal dos ovinos induzidos à intoxicação cúprica cumulativa, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004

Fígado	Animais	Cobre (ppm/MS)	Ferro (ppm/MS)
Controle⁽¹⁾	1	1.395,2	800,0
	2	3.017,8	265,01
	3	2.911,0	644,9
	X $\bar{x}$ s ou Md	^a 2543,0 $\bar{x}$ 732,0	^a 645,0
TTM⁽²⁾	4	481,4	399,9
	5	556,6	866,4
	X $\bar{x}$ s ou Md	^b 519,0 $\bar{x}$ 53,7	^a 635,0
Rins			
Controle	1	1.218,6	1.866,7
	2	1.934,2	2.738,5
	3	1.480,0	2.597,9
	X $\bar{x}$ s	^a 1551,0 $\bar{x}$ 360,0	^a 2413,0 $\bar{x}$ 450,0
TTM	4	150,8	817,9
	5	147,2	797,7
	X $\bar{x}$ s	^b 148,5 $\bar{x}$ 2,1	^b 810,0 $\bar{x}$ 14,1

Nota: Determinações feitas (1) após a morte e (2) 30 dias após a detecção da hemoglobinúria
Letras distintas na mesma coluna são diferentes a nível de $p < 0,05$.

4.3 VARIÁVEIS DA URINA

4.3.1 pH Urinário

Com exceção do tempo M3 em que o grupo controle apresentou menor pH urinário que o grupo tratado com TTM, nos demais momentos não existiu diferença significativa. Dentro do grupo controle constatou-se uma acidificação no pH nos momentos M3, M2 e M1 em relação ao tempo basal (M0); menores valores de pH foram detectados nos momentos 1 e 2 em relação aos demais estudados no grupo medicado com TTM ($p < 0,021$) (Tabela 7 e Gráfico 5).

Tabela 7 – Valores médios e desvios-padrão do pH urinário dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{aA} 7,6±1,0	^{bA} 5,9±0,8	^{bA} 5,5±0,3	^{bB} 5,9±0,3		
TTM⁽⁷⁾	^{aA} 7,9±0,3	^{cA} 5,5±0,3	^{cA} 5,5±0,5	^{bA} 7,0±0,6	^b 7,1±0,1	^a 7,6±0,5

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 5 – Valores médios e desvios-padrão do pH urinário dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.2 Densidade Urinária

Não existiram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Apenas foi verificada maior densidade urinária dentro do grupo controle, entre o tempo basal (M0) e os demais momentos consecutivos ($p < 0,05$) (tabela 8 e Gráfico 6).

Tabela 8 – Valores médios e desvios-padrão da densidade urinária dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	aA 1,024 ±0,001	bA 1,009 ±0,005	bA 1,008 ±0,003	bA 1,014 ±0,007		
TTM⁽⁷⁾	aA 1,019 ±0,002	aA 1,014 ±0,005	aA 1,010 ±0,008	aA 1,019 ±0,006	a 1,018 ±0,003	a 1,014 ±0,006

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 6 – Valores médios e desvios-padrão da densidade urinária dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.3 Taxa de Depuração Endógena de Creatinina Urinária

Com exceção do M3 em que a taxa de depuração de creatinina urinária foi menor no grupo controle, em todos os demais momentos de coleta ocorreu semelhança entre os dois tratamentos. Menores teores de creatinina urinária foram constatados nos momentos M1, M2 e M3 em relação ao tempo M0 no grupo controle ($p < 0,03$); no grupo TTM menores teores de creatinina foram encontrados nos momentos M2 e M3, seguido do M4, os quais foram inferiores ao M1 e M5 em relação ao tempo basal (M0) ($p < 0,05$) (Tabela 9, Gráfico 7).

Tabela 9 – Valores medianos e limites inferior e superior da taxa de depuração endógena de creatinina (mL/min/PMet.) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa. São Paulo, 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{aA} 10,11 (5;14)	^{bA} 4,52 (1;7)	^{cA} 0,29 (0,2;1)	^{cA} 0,54 (0,1;2)		
TTM ⁽⁷⁾	^{aA} 9,50 (7;11)	^{bA} 4,8 (2;9)	^{dA} 0,26 (0,1;1)	^{dA} 0,30 (0,03;1)	^c 1,94 (1;2)	^{abc} 4,60 (1;10)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 7 – Valores médios e desvios-padrão da concentração urinária de creatinina (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa. São Paulo, 2004

4.3.4 Índice de Excreção Urinária de Uréia

Menores valores no índice de excreção urinária de uréia foram constatados no momento M3 no grupo controle em relação ao grupo TTM ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle existiu uma diminuição significativa no índice obtido nos momentos 2 e 3 em relação aos momentos 0 e 1 ($p < 0,02$); já no grupo TTM este índice diminuiu significativamente no M2 em relação aos momentos 0, 1 e também em relação aos momentos 3, 4 e 5 ($p < 0,03$) (Tabela 10 e Gráfico 8).

Tabela 10 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	aA 888,1 (858,3;982,9)	aA 731,6 (722,8;1133,9)	bA 242,6 (181,5;344,0)	cB 155,8 (51,5;577,3)		
TTM⁽⁷⁾	aA 834,1 (652,5;1255,4)	aA 901,2 (808,2;1334,0)	cA 263,4 (260 ;614,3)	bA 525,8 (391;1744,5)	b 568,3 (507,8;918,3)	b 533,6 (437,4;992,6)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 8 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de uréia (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.5 Índice de Excreção Urinária de Glicose

Apenas no momento 3 foi encontrado um maior valor no índice de excreção urinária de glicose no grupo controle em relação ao grupo medicado com TTM ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle, foi constatado um maior índice nos momentos 3 e 4 em relação aos M0 e M1 ($p < 0,02$); no grupo TTM foi encontrado um maior índice nos momentos 2, 3 e 4 em relação ao basal (M0) e M1 ($p < 0,02$) (Tabela 11 e Gráfico 9).

Tabela 11 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de glicose (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{cA} 0,34 (0,1;0,4)	^{cA} 0,52 (0,4;0,5)	^{bA} 1,79 (1,2;2,5)	^{aA} 3,17 (1,3;34,4)		
TTM⁽⁷⁾	^{cA} 0,31 (0,3;0,3)	^{cA} 0,42 (0,4;0,7)	^{bA} 0,91 (0,2;3,5)	^{aB} 1,36 (0,5;3,1)	^a 1,97 (0,9;2,5)	^b 1,22 (0,1;3,3)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos.

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 9 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de glicose (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.6 Índice de Excreção Urinária de Proteína

Maior índice de excreção foi constatado no grupo controle no momento 3 ($p < 0,001$). Dentro do grupo controle foram detectados maiores índices no M2 e M3, seguido pelo momento 1, que foi superior ao momento 0 ($p < 0,002$). Dentro do grupo medicado com TTM maiores índices foram detectados no M2 e M3, seguido pelo M1, o qual foi superior aos demais ($p < 0,003$) (Tabela 12 e Gráfico 10).

Tabela 12 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de proteína (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{cA} 89,4 (19;116)	^{bA} 991,1 (152;1157)	^{aA} 6594,1 (460;321262)	^{aA} 7844,8 (3355;152172)		
TTM ⁽⁷⁾	^{dA} 24,5 (2;118)	^{bA} 927,0 (59;136)	^{aA} 5457,0 (791;15833)	^{aB} 2511,5 (1235;12332)	^c 427,7 (283;1757)	^{cd} 82,1 (10;383)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Tabela 10 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de proteína (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.7 Índice de Excreção Urinária de Fósforo

Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos nos diferentes momentos de coleta; contudo dentro do grupo TTM foram verificados maiores valores de índice de excreção urinário de fósforo nos momento 4 e 5 em relação aos demais estudados ($p < 0,05$) (Tabela 13 e Gráfico 11)

Tabela 13 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de fósforo (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	aA 3,2 (2;6)	aA 4,7 (3;7)	aA 7,1 (2;14)	aA 6,8 (2;133)		
TTM ⁽⁷⁾	bA 4,7 (3;19)	bA 8,1 (3;29)	bA 6,7 (2;53)	bA 6,54 (4;39)	a 27,4 (3;49)	a 27,9 (5;83)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetraimolibdato de amônio.

Gráfico 11 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de fósforo (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.8 Índice de Excreção Urinária de Sódio

Apenas no momento 3 é que foi verificada um maior valor neste índice no grupo controle em relação ao TTM ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle maiores valores do índice de excreção urinário de sódio foram constatados no momento M3 em relação aos demais, ocorrendo o mesmo fato no momento 5 do grupo TTM ($p < 0,04$) (Tabela 14 e Gráfico 12).

Tabela 14 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de sódio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	bA 91,8 (85;97)	bA 54,0 (31;82)	bA 154,1 (88;541)	aA 223,3 (115;524)		
TTM ⁽⁷⁾	bA 90,2 (90;581)	bA 53,1 (23;94)	bA 194,9 (33;577)	bB 103,0 (60;406)	b 142,2 (54;156)	a 360,6 (65;549)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 12 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de sódio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.9 Índice de Excreção Urinária de Potássio

Não existiram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,38$). Contudo, maiores valores foram determinados no momento 0 em relação aos momentos M1 e M2 dentro dos grupos controle ($p < 0,03$), sendo este semelhante ao M3 ($p > 0,05$). No grupo TTM foi registrado maior índice no M5 seguido do M0, M3, M4, M2 e por fim o M1, o qual revelou o menor índice ($p < 0,04$) (Tabela 15 e Gráfico 13).

Tabela 15 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de potássio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	aA 265,1 (190;788)	bA 170,1 (131;195)	bA 152,0 (135;792)	abA 200,0 (143;534)		
TTM ⁽⁷⁾	bA 336,2 (116;905)	cA 147,8 (114;576)	bcA 193,3 (96;221)	bcA 218,0 (119;294)	bc 203,0 (152;244)	a 887,7 (295;1946)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 13 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de potássio (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.10 Índice de Excreção Urinária de Cloro

Não existiram diferenças significativas entre os tratamentos ($p>1000$). Contudo, dentro do grupo controle foram determinados maiores valores nos momentos 3, 0 e 2 em relação ao momento 1 ($p<0,02$); no grupo TTM o maior valor deste índice foi registrado no M5, seguido dos momentos 0, 1, 2, 3 e 4 ($p<0,03$) (Tabela 16 e Gráfico 14).

Tabela 16 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de cloro (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	aA 379,6 (264;538)	bA 148,9 (101;185)	aA 323,8 (113;759)	aA 386,8 (177;429)		
TTM ⁽⁷⁾	bA 326,6 (179;560)	bcA 218,1 (55;592)	bcA 264,8 (11;420)	bcA 284,4 (89;366)	c 202,8 (169;247)	a 978,4 (253;1497)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 14 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de cloro (mmol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.11 Índice de Excreção Urinária de Cobre

Maiores valores deste índice foram constatados no momento 3 no grupo controle, em relação ao submetido ao tratamento com TTM ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle encontraram-se maiores índices nos momentos 3, seguido do 2, que foi superior ao 1 e o M0 ($p < 0,01$). Dentro do grupo TTM os mais baixos índices foram detectados no M0, seguido pelos momentos 1, 4 e 5, os quais foram inferiores ao M3, sendo este suplantado pelo M2 ($p < 0,03$) (Tabela 17 e Gráfico 15).

Tabela 17 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de cobre (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{dA} 2,2 (1;4)	^{cA} 39,0 (10;353)	^{bA} 298,9 (21;809)	^{aA} 334,2 (69;840)		
TTM⁽⁷⁾	^{dA} 2,4 (2;5)	^{cA} 20,6 (36;63)	^{aA} 131,2 (39;799)	^{bB} 61,7 (9;94)	^c 8,0 (5;16)	^c 8,0 (1;305)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 15 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de cobre (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.12 Índice de Excreção Urinária de Ferro

Maiores valores deste índice foram constatados no momento 3 no grupo controle, em relação ao TTM ($p < 0,04$). Dentro do grupo controle encontrou-se maior índice no momento 3, seguido do 2 que foi superior ao M0 e M1 ($p < 0,02$). Dentro do grupo TTM o mais alto índice foi detectado no M3, seguido pelo M2, o qual foi superior aos demais (M0, M1, M4 e M5) ($p < 0,03$) (Tabela 18 e Gráfico 16).

Tabela 18 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de ferro (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	cA 2,2 (1;24)	cA 4,4 (3;11)	bA 45,0 (3;3927)	aA 277,3 (3;8836)		
TTM⁽⁷⁾	cA 2,2 (1;36)	cA 3,7 (1;22)	bA 47,3 (4;2613)	aB 131,5 (2;614)	c 7,4 (1;17)	c 1,5 (1;10)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 16 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de ferro (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.13 Índice de Excreção Urinária de Molibdênio

Maiores valores deste índice foram constatados no momento 3 no grupo TTM, em relação ao submetido ao controle ($p < 0,01$). Dentro do grupo controle não existiram diferenças nos valores de índice entre os momentos estudados ($p >$

0,1000). Dentro do grupo TTM o mais alto índice foi detectado no M4, seguido pelo M3, o qual foi superior ao M0, M1, M2 e M5 ($p < 0,04$) (Tabela 19 e Gráfico 17).

Tabela 19 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores do índice de excreção urinária de molibdênio (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	aA 4,1 (3;35)	aA 6,6 (3;14)	aA 4,2 (2;6)	aB 6,2 (1;179)		
TTM⁽⁷⁾	cA 3,5 (1;48)	cA 3,4 (2;24)	cA 2,3 (1;7)	bA 46,1 (4;11)	a 125,7 (3;813)	c 7,0 (1;12)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 17 – Valores de medianas do índice de excreção urinária de molibdênio (nMol/L) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.14 Taxa de Excreção Fracional de Uréia Urinária

Maiores taxas foram determinadas no M3 no grupo tratado com em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle maiores taxas foram anotadas no M0 e M1, seguida pelo M2, o qual foi superior ao M3 ($p < 0,04$). Dentro do grupo TTM não foram detectadas diferenças entre os vários momentos estudados ($p > 0,1000$) (Tabela 20 e Gráfico 18).

Tabela 20 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de uréia urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{aA} 85,0 (49;101)	^{aA} 104,8 (80;365)	^{bA} 48,9 (25;79)	^{cB} 15,9 (9;87)		
TTM ⁽⁷⁾	^{aA} 99,0 (55;228)	^{aA} 109,7 (83;667)	^{aA} 64,1 (17;379)	^{aA} 64,3 (51;767)	^a 66,5 (48;225)	^a 76,4 (61;210)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 18 – Valores de medianas da taxa de excreção fracional de uréia urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.15 Taxa de Excreção Fracional de Glicose Urinária

Não existiram diferenças entre as taxas fracionais de glicose entre os dois tratamentos. Dentro do grupo controle maiores taxas foram detectadas no M3 e M2, os quais foram superiores ao M0 e M1 ($p < 0,02$). Dentro do grupo TTM maiores taxas foram verificadas no M2, M3 e M4, seguido do M0, M1 e M5 (Tabela 21 e Gráfico 19).

Tabela 21 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de glicose urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{bA} 0,08 (0,03;0,1)	^{bA} 0,07 (0,02;0,1)	^{aA} 0,73 (0,1;8)	^{aA} 0,79 (0,4;27)		
TTM ⁽⁷⁾	^{bA} 0,05 (0,01;0,1)	^{bA} 0,09 (0,01;0,1)	^{aA} 0,55 (0,03;4)	^{aA} 0,58 (0,2;6)	^a 0,45 (0,1;2)	^b 0,07 (0,02;0,30)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Tabela 19 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de glicose urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.16 Taxa de Excreção Fracional de Proteína Urinária

Maior taxa fracional de proteína urinária foi observada no momento M3 no grupo controle, em relação ao tratado com TTM ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle maiores taxas foram detectadas no M3 e M2, os quais foram superiores ao M1, que foi maior que o M0 ($p < 0,04$). Dentro do grupo TTM maiores taxas foram verificadas no M2 e M3 seguido dos momentos 4, que foi maior que os demais momentos (M0, M1 e M5) ($p < 0,05$) (Tabela 22 e Gráfico 20).

Tabela 22 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de proteína urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{dA} 0,01 (0,003;0,02)	^{cA} 0,13 (0,02;0,2)	^{aA} 1,74 (0,2;6)	^{aA} 5,13 (0,1;177)		
TTM ⁽⁷⁾	^{cA} 0,003 (0,0001;0,01)	^{cA} 0,1 (0,01;0,04)	^{aA} 1,75 (0,3;5)	^{aB} 2,18 (1;4)	^b 0,11 (0,1;1)	^c 0,01 (0,001;0,1)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Tabela 20 – Valores de medianas da taxa de excreção fracional de proteína urinária (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.17 Taxa de Excreção Fracional de Fósforo Urinário

Maiores taxas foram determinadas no M3 no grupo controle em relação ao grupo TTM ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle maiores taxas foram anotadas no M3, seguida pelo M2, o qual foi superior ao M0 e M1 ($p < 0,05$). Dentro do grupo TTM maiores taxas foram verificadas no M3, M4 e M5, seguidas do M1 e M3, os quais foram superiores ao M0 ($p < 0,04$) (Tabela 23 e Gráfico 21).

Tabela 23 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de fósforo (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{cA} 2,7 (2;3)	^{cA} 5,3 (4;6)	^{bA} 24,7 (8;33)	^{aA} 33,6 (1;457)		
TTM ⁽⁷⁾	^{cA} 2,8 (4;10)	^{bA} 7,7 (6;11)	^{aA} 29,9 (52;191)	^{bB} 17,4 (7;81)	^a 35,6 (8;69)	^a 46,3 (24;294)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 21 – Valores de medianas da taxa de excreção fracional de fósforo (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.18 Taxa de Excreção Fracional de Sódio Urinário

Maior taxa fracional foi observada no momento M3 no grupo controle, em relação ao tratado com TTM ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle maiores taxas foram detectadas no M3, seguida pelo M2, o qual foi superior ao M0 e M1 ($p < 0,04$). Dentro do grupo TTM maiores taxas foram verificadas no M5, seguido dos momentos 2 e 3, os quais foram superiores ao M0, M1 e M4 (Tabela 24 e Gráfico 22).

Tabela 24 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de sódio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	cA 1,1 (0,7;2)	cA 1,1 (0,7;2)	bA 20,1 (6;46)	aA 36,4 (2;100)		
TTM ⁽⁷⁾	cA 1,4 (1;2)	cA 1,2 (0,4;3)	bA 10,8 (1;200)	bB 7,2 (2;1231)	c 4,3 (2;10)	a 37,3 (2;71)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Tabela 22 – Valores de medianas da taxa de excreção fracional de sódio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.19 Taxa de Excreção Fracional de Potássio Urinário

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($p>0,89$), porém maior índice foi registrado no M3, seguido do M2 e este dos momentos M1 e M0 do grupo controle ($p<0,17$). Com relação ao grupo TTM maior taxa foi constatada no momento 3, seguido do M5, M2, M0 e M1, os quais foram superiores ao M4 ($p<0,12$) (Tabela 25 e Gráfico 23).

Tabela 25 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de potássio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	bcA 298,2 (108;312)	cA 131,7 (82;209)	bA 355,7 (112;1418)	aA 647,4 (34;2525)		
TTM ⁽⁷⁾	bA 341,0 (122;2479)	bcA 237,5 (66;852)	bA 572,7 (23;1231)	aA 1100,8 (115;2134)	c 184,5 (164;621)	b 629,8 (282;955)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 23 – Valores de medianas da taxa de excreção fracional de potássio (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.20 Taxa de Excreção Fracional de Cloro Urinário

Não foram observadas diferenças da taxa de excreção fracional de cloro entre os tratamentos ($p>0,90$). Maiores taxas foram verificadas no M3 e M2 no grupo controle em relação aos momentos 0 e 1 ($p<0,043$). Dentro do grupo TTM maior taxa foi registrada no M5, seguida do M2 e M3, os quais foram superiores ao M0, M1 e M4 ($p<0,036$) (Tabela 26 e Gráfico 24).

Tabela 26 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de cloro (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	bA 6,0 (3;10)	bA 5,4 (3;6)	aA 26,8 (2;70)	aA 38,6 (3;195)		
TTM ⁽⁷⁾	cA 6,8 (5;122)	cA 10,81 (1;31)	bA 35,2 (0,2;194)	bA 64,8 (3;361)	c 10,54 (5;22)	a 126,6 (39;209)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 24 – Valores de medianas da taxa de excreção fracional de cloro (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.21 Taxa de Excreção Fracional de Cobre Urinário

Maior taxa foi encontrada no M3 no grupo controle em relação ao medicado com TTM ($p < 0,03$). Dentro do grupo controle maior porcentagem de excreção fracional foi detectada nos momentos M2 e M3, seguida do M1, que foi superior ao M0 ($p < 0,05$). Dentro do grupo TTM foram constatadas maiores taxas no momento M2, seguido do momento M3, o qual foi superior ao M0, M1, M4 e M5 ($p < 0,05$) (Tabela 27 e Gráfico 25).

Tabela 27 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da taxa de excreção fracional de cobre (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	cA 0,1 (0,1;0,2)	bA 1,7 (1;6)	aA 6,1 (0,4;52)	aA 10,7 (0,5;47)		
TTM ⁽⁷⁾	cA 0,1 (0,1;0,2)	cA 0,5 (0,1;2)	aA 9,5 (1;59)	bB 1,8 (0,3;27)	c 0,6 (0,1;1)	c 0,5 (0,1;16)

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 25 – Valores de medianas da taxa de excreção fracional de cobre (%) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.3.22 Atividade Urinária de N-acetil β D glicosaminidase (NAG)

Maiores atividades de NAG foram constatadas no M3 no grupo controle em relação ao medicado com TTM ($p < 0,001$). Dentro do grupo controle maiores atividades foram registradas no momento M3, seguido pelo M2, o qual foi superior ao Mo e M1 ($p < 0,02$). No grupo TTT maiores atividades foram observadas nos momentos M2 e M3, seguidas pelos momentos M1 e M4, os quais foram superiores aos momentos M0 e M5 ($p < 0,005$) (Tabela 28 e Gráfico 26).

Tabela 28 – Valores de medianas e limites inferiores e superiores da atividade enzimática urinária de NAG (U/I) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	cA 0,7 (0,3;2)	cA 1,5 (0,7;11)	bA 29,0 (18;432)	aA 101,0 (12;736)		
TTM⁽⁷⁾	cA 1,0 (0,1;2)	bA 1,7 (1;7)	aA 33,0 (10;118)	aB 23,5 (31;166)	b 3,8 (1;27)	c 0,6 (0,2;1)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas columnas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 26 – Valores de medianas da atividade enzimática de NAG (U/I) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Gráfico 27 – Relação entre a taxa de depuração endógena de creatinina (TDECr) (mL/min/PMet.) e o método pH urinário dos ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004

Gráfico 28 – Relação entre a taxa de depuração endógena de creatinina (TDECr) (mL/min/PMet.) e a taxa de excreção fracional de sódio (%) dos ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004

Na tabela 29 estão exibidos os resultados obtidos na análise bioquímica da urina por meio de tiras reativas (Combur Test). Devido à intensa coloração da urina com tom preto-avermelhado, durante o período de hemoglobinúria, que interferiu com a leitura de algumas variáveis (pH, leucócitos, nitritos, glicose, corpos cetônicos, urobilinogênio e bilirrubina) os mesmos foram

desconsiderados. Mesmo assim, foi possível a detecção de hemoglobina e proteína, que embora sejam expressos em caráter relativo são de grande serventia no auxílio ao diagnóstico realizado em condições práticas, daí sua apresentação. Deve-se chamar a atenção que os teores de hemoglobina e de proteína tenderam a se expressar de maneira semelhante nos diferentes tempos. Tanto a proteína como a hemoglobina começaram a ser detectadas na urina no M1, tendo sua máxima excreção no M2 e M3, em ambos os grupos, contudo não foram perceptíveis no M4 no grupo medicado com TTM.

Tabela 29 – Escores individuais das variáveis hemoglobina e proteína urinárias (Combur Test) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

		Momentos					
Variáveis/Grupos		M0⁽¹⁾	M1⁽²⁾	M2⁽³⁾	M3⁽⁴⁾	M4⁽⁵⁾	M5⁽⁶⁾
Animais		Hemoglobina Urinária					
Controle	A	-	++	++++	++++		
	B	-	+	++++	++++	++++	
	C	-	-	++++	++++		
	D	-	+	++++	++++	++++	
	E	-	-	++++	++++		
TTM⁽⁷⁾	F	-	++	++++	++++	++++	-
	G	-	-	++++	++++	+++	-
	H	-	-	++++	++++		
	I	-	-	++++	++++	++++	-
	J	-	+	++++	++++	++++	-
Animais		Proteína Urinária					
Controle	A	-	+	+++	+++		
	B	-	+++	+++	+++	++	
	C	-	-	+++	+++		
	D	-	+	+++	+++	++	
	E	-	-	+++	+++		
TTM⁽⁷⁾	F	-	++	+++	+++	++	-
	G	-	++	+++	+++	+	-
	H	-	+	+++	+++		
	I	-	++	+++	+++	+++	-
	J	-	++	+++	+++	++	-

Nota: (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior a crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – #0 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Quadro 2 – Variáveis do sedimento urinário dos ovinos induzidos a intoxicação cúprica cumulativa nos grupos controle e TTM – São Paulo - 2004

Variáveis da Sedimentoscopia ⁽¹⁾		Grupos							
		Controle			TTM				
		Momento Basal	Crise Hemolítica	48h após a crise hemolítica	Momento Basal	Crise Hemolítica	48h após a crise hemolítica	120h após a crise hemolítica	30 dias após a crise hemolítica
Bactérias		R	+/+++	+/+++	R	+/+++	+/+++	+/+++	R
Hemácias		R	++	++	R	++	++	+	+
Leucócitos		+	++	++	+	++	++	++	+
Células									
	Descamação	(+)	++	+++	(+)	++	+++	+++	(+)
	Transição	R	+	++	R	+	++	+	(+)
	Epitélio Renal	R	(+)	+	R	+	+	+	R
Cilindros									
	Granulosos	-	++	++	-	(+)	+++	++	-
	Hialinos	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-
	Céreos	-	-	+	-	-	+	-	-
Impregnações de Bilirrubina		-	+	+	-	+	+	(+)	-
Cristais de Bilirrubina		-	-	+	-	-	-	-	-

R – Raros; (+) 0 a 1 por campo; + Todos os campos com pelo menos uma unidades; ++ Mais que três unidades por campo; +++ Campo cheio de células; (1) Laboratório de bioquímica e urinálise da FMVZ - USP

4.4 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

O exame microscópico das seções de fígado dos animais do grupo tratado com TTM, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E), revelou colangite difusa intensa por infiltração histiocitária caracterizada por grande acúmulo de macrófagos espumosos (Figura 1 A/B e Figura 2 A/B), inclusive distribuídos pelo parênquima. A coloração especial pela técnica de Mallory realizada nos fragmentos de fígado dos animais deste grupo mostrou aumento das fibras colágenas na região periportal, confirmando o processo de colangite (Figura 1 E/F e Figura 2 E/F). A histoquímica pela técnica de Ulzmann confirmou a presença de cobre no fígado caracterizado pelo acúmulo do mesmo no interior dos macrófagos de material amorfo de coloração variando do castanho ao negro (Figura 1 C/D e Figura 2 C/D).

O exame microscópico das seções de rins dos animais do grupo tratado com TTM, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E), revelou a presença de material acidófilo na luz tubular (Figura 3 A) e grande acúmulo de cobre nas células tubulares renais (Figura 3 B), confirmam pela histoquímica, onde a presença de cobre foi bastante evidente (Figura 3 C/D). A coloração especial pela técnica de Mallory realizada nos fragmentos de rins dos animais deste grupo mostrou aumento das fibras colágenas na região periglomerular e peritubular (Figura 3 E/F).

O exame microscópico das seções dos tecidos pela histoquímica revelou igualmente a presença do cobre tanto no parênquima renal quanto no hepático

caracterizados por acúmulo de material amorfo de coloração variando do castanho ao negro (Figuras 4 e 5).

Figura 1. Fígado de ovino (animal nº 7). A – Colangite intensa com infiltração histiocitária caracterizada por grande acúmulo de macrófagos espumosos (seta) H&E 400X. B – Macrófagos espumosos no parênquima (seta) H&E 400X. C - Depósitos de cobre na região centrolobular (seta). Ulzmann 250X. D - Depósitos de cobre no interior de macrófagos (seta) Ulzmann 1000X. E - Fibroplasia moderada na região periportal. Tricrômico de Mallory 250X. F - Fibroplasia intensa na região periportal. Tricrômico de Mallory 400X.

Figura 2. Fígado de ovino (animal nº 10). A – Colangite intensa com infiltração histiocitária caracterizada por grande acúmulo de macrófagos espumosos (seta) H&E 400X. B – Macrófagos espumosos no parênquima (seta) H&E 400X. C - Depósitos de cobre na região centrolobular (seta). Ulzman 250X. D - Depósitos de cobre no interior de macrófagos (seta) Ulzman 1000X. E - Fibroplasia leve na região periportal. Tricrômico de Mallory 250X. F - Fibroplasia moderada na região periportal. Tricrômico de Mallory 400X.

Figura 3. Rim de ovino (animal nº 10). A – Presença de material acidófilo na luz tubular (*) H&E 400X. B. C e D - Acúmulo de cobre nas células tubulares renais evidenciado pela histoquímica. Ulzmann 400X. E e F Aumento das fibras colágenas na região periglomerular e peritubular. Tricrômico de Mallory 1000X. F-Presença de figuras de mitose.

Figura 4. Fígado de ovino (animais do grupo controle nº 1 e 2). A e B (nº 1) e C e D (nº 2) – Presença de depósitos de cobre no parênquima. Ulzman 250X (C), 400X (A e D) e 1000X (B).

Figura 5. Rim de ovino (animal do grupo controle nº 6). Presença de depósitos de cobre no interior das células tubulares renais. Ulzman 250X (A) e 1000X (B).

4.5 METABOLISMO OXIDATIVO SANGÜÍNEO

4.5.1 Teor Sangüíneo de Malonildialdeído (MDA)

Maior teor de malonildialdeído foi constatado no M3 no grupo controle em relação ao grupo tratado com TTM ($p < 0,001$). Dentro do grupo controle maior porcentagem de excreção fracional foi detectada no momento M3, seguida do M2, que foi superior ao M0 e M1 ($p < 0,0001$). Dentro do grupo TTM foram constatados maiores teores no momento M2, seguido do momento M3, M1 e M4, os quais foram superiores ao M5, que por sua vez foi maior que o M0 ($p < 0,001$) (Tabela 30 e Gráfico 27).

Tabela 30 – Valores médios e desvios-padrão da concentração sérica do malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{cA} 0,31 ±0,2	^{cA} 0,54 ±0,3	^{bA} 1,16 ±0,9	^{aA} 3,22 ±1,2		
TTM⁽⁷⁾	^{dA} 0,25 ±0,2	^{bA} 0,94 ±0,4	^{aA} 1,50 ±0,2	^{bB} 1,00 ±0,3	^b 0,94 ±0,2	^c 0,66 ±0,2

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 27 – Valores médios e desvios-padrão da concentração sérica do malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.5.2 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) nos Eritrócitos

Não existiram diferenças entre os teores de glutathiona entre os dois tratamentos ($p > 0,05$). Dentro do grupo controle maiores atividades desta enzima foram registradas nos momentos M0 e M1, seguidas do M2 e M3 ($p < 0,001$). Dentro do grupo TTM foram constatadas maiores atividades de GSH nos momentos M4 e M5, sendo que esta última foi semelhante ao M0 e M1, que foram maiores que o M2 e M3 ($p < 0,004$) (Tabela 31 e Gráfico 28).

Tabela 31 – Valores médios e desvios-padrão da concentração da glutatona reduzida (mg de GSH/mL de sangue) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{aA} 69,81 ±26,3	^{aA} 74,10 ±29,8	^{bA} 38,86 ±20,9	^{bA} 27,77 ±14,5		
TTM⁽⁷⁾	^{bA} 92,38 ±13,8	^{bA} 100,87 ±16,2	^{cA} 51,87 ±10,8	^{cA} 51,80 ±24,9	^a 120,95 ±28,3	^{ab} 115,14 ±16,7

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 28 – Valores médios e desvios-padrão da concentração da glutatona reduzida (mg de GSH/ml de sangue) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.5.3 Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)

Não foram registradas diferenças deste método entre os tratamentos. No grupo controle maior habilidade de redução férrica foi registrado no M3, seguido do M2, o qual foi superior aos momentos M0 e M1 ($p < 0,04$). No grupo TTM o maior valor também foi registrado no M3, seguido dos momentos M2 e M4, os quais foram superiores aos momentos M0, M1 e M5 ($p < 0,03$) (Tabela 32 e Gráfico 29).

Tabela 32 – Valores de mediana e limites inferiores e superiores do método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{cA} 581,6 (576;644)	^{cA} 595,6 (589;809)	^{bA} 2266,8 (2003;2537)	^{aA} 3270,3 (2589;5344)		
TTM⁽⁷⁾	^{cA} 533,6 (532;582)	^{cA} 573,6 (574;642)	^{bA} 1804,8 (910;1970)	^{aA} 2758,8 (2171;2830)	^b 1370,8 (761;2335)	^c 602,3 (589;626)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 29 – Valores de mediana da atividade do HRFP ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.5.4 Atividade da Glicose – 6- Fostatodesidrogenase (G-6-PD)

Maiores valores da atividade da enzima G6PD foi observada no momento 3 do grupo controle em relação aos animais do grupo tratado ($p < 0,004$). No grupo controle maior atividade foi observada no M3, seguida do M2, o qual foi maior que os momentos M1 e M0 ($p < 0,001$). Já no grupo TTM, observou-se que a menor atividade desta enzima foi observada no momento M0, seguida dos demais momentos ($p < 0,001$).

Tabela 33 – Valores médios e desvios-padrão da atividade da G-6-PD (UI/g Hb) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{cA} 0,6 ±0,1	^{cA} 0,9 ±0,1	^{bA} 1,5 ±0,6	^{aA} 2,4 ±0,2		
TTM⁽⁷⁾	^{bA} 0,4 ±0,2	^{Aab} 0,7 ±0,1	^{Aa} 1,1 ±0,3	^{aB} 1,0 ±0,09	^a 1,4 ±0,8	^a 1,1 ±0,5

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) TTM – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetraimolibdato de amônio.

Gráfico 30 – Valores médios e desvios-padrão da atividade da G-6-PD (UI/g Hb) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.5.5 Concentração Sérica do Ácido Úrico

Não foram observadas diferenças da concentração sérica do ácido úrico entre os grupos ($p>0,80$). No grupo controle maiores concentrações foram registradas nos momentos M1, M2 e M3, os quais foram diferentes da concentração no momento basal ($p<0,0001$). No grupo de animais tratados verificou-se que a maior concentração ocorreu no momento 3, seguido dos momentos M1, M2 e M4, os quais foram significativamente maiores que o M5 ($p<0,001$). Este último não diferiu do momento basal ($p>0,74$).

Tabela 34 – Valores médios e desvios-padrão do ácido úrico sérico (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	^{bA} 0,03 ±0,003	^{aA} 0,09 ±0,02	^{aA} 0,19 ±0,13	^{aA} 0,23 ±0,06		
TTM ⁽⁷⁾	^{bcA} 0,03 ±0,004	^{bA} 0,05 ±0,02	^{bA} 0,10 ±0,05	^{aA} 0,22 ±0,13	^b 0,07 ±0,007	^c 0,02 ±0,007

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos

(1) M0 – Momento basal; (2) M1 – semana anterior à crise hemolítica; (3) M2 – Crise hemolítica; (4) M3 – 48 horas após a crise hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

Gráfico 31 – Valores médios e desvios-padrão do ácido úrico sérico (mg/dL) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa – São Paulo – 2004

4.5.6 Análise de Relação entre Variáveis

A análise de relação entre o teor sérico de malondialdeído (MDA) e do método que avalia a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) evidenciou uma alta relação positiva ($r = 0,71$) nos animais que foram intoxicados pelo cobre, tratados ou não com TTM, e esta relação está expressa pela equação: **HRFP = - 6,2861_{MDA}² + 986,44x + 483,44** e ilustrada no gráfico 30.

Gráfico 32 – Relação entre o MDA ($\mu\text{mol/L}$) e o método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004

A análise da relação entre o ácido úrico sérico (ÁcÚrSr) e do método de avaliar a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) mostrou uma alta relação positiva ($r = 0,90$) nos ovinos intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão: **HRFP = - 18833_{ÁcÚrSr}² + 17128x + 88,852** e ilustradas nos gráficos 31.

Gráfico 33 – Relação entre o ácido úrico do soro (mg/dL) e o método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004

Ocorreu uma correlação significativa ($r=0,70$) para que quanto maior fosse a concentração sérica do cobre (CuSr), maior o teor sérico de malondialdeído (MDA) nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: $\text{MDA}=0,0227_{\text{CuSr}}+0,1948$ e demonstrada no gráfico 32.

Gráfico 34 – Relação entre o cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) e o MDA ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004

Ocorreu uma alta correlação ($r = -0,60$) para que quanto maior fosse o teor sérico de malondialdeído (MDA) menor a taxa de depuração endógena de creatinina urinária (TDECr), nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. Esta relação está representada pela equação: $TDECr = 1,0267 MDA^{-1,021}$ e demonstrada no gráfico 33.

Gráfico 35 – Relação entre o MDA (µmol/L) e a taxa de depuração endógena de creatinina (TDECr) (mL/min/Pmet.) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM – São Paulo – 2004

5 DISCUSSÃO

5. Achados Clínicos e Função Renal

O prolongado tempo de recebimento de cobre (Tabela 1), os altos teores de cobre sérico no momento da crise hemolítica M2 (Gráfico 4), em ambos os grupos, e as altas concentrações de cobre no fígado e nos rins (Tabela 6) nos animais do grupo controle, confirmam de maneira indelével a intoxicação cúprica cumulativa proposta neste estudo. Estas condições geraram em todos os ovinos um característico quadro clínico, desencadeando uma seqüência de eventos bioquímicos que determinaram tanto uma alteração nas funções renais, como uma modificação no perfil oxidativo sangüíneo, atingindo assim as premissas para se estudar os objetivos propostos.

Embora a distribuição dos ovinos tenha sido completamente casualizada, os animais tratados com TTM tiveram uma tendência ($p > 0,06$) de receber maiores quantidades de cobre acumulado que os do grupo controle (Tabela 1), e mesmo assim desenvolveram similar quadro clínico. Contudo, deve-se ressaltar que o ovino que sucumbiu mesmo sendo tratado com TTM recebeu altíssimas doses de cobre (67 g), acumulando no fígado (3068 ppm) e nos rins (1120 ppm), quantidades marcantes deste microelemento, o que deve ter interferido negativamente com a evolução do quadro.

O perfil clínico desenvolvido pelos animais neste experimento foi semelhante ao descrito por Machado (1998), em especial após a crise hemolítica. Contudo, alguns ovinos no presente estudo apresentaram uma maior severidade dos sintomas na fase prodrômica, que antecedeu a hemoglobinúria. Destaca-se a

eliminação de fezes amolecidas com presença de muco e anorexia cerca de quatro e dois dias antes da crise hemolítica, respectivamente. Enquanto que o primeiro sintoma não foi citado por Machado (1998), a anorexia só surgiu no dia anterior à crise hemolítica (ORTOLANI et al., 2003). Possivelmente, o aparecimento desses sintomas foi consequência das imensas quantidades de cobre administradas ao término do experimento em alguns dos animais (Tabela 1), provocando nestes uma enterite irritativa pelo cobre. Isto foi verificado em dois ovinos do grupo controle que foram necropsiados, quando foram encontradas ulcerações tanto no abomaso como nos intestinos. Essas altas doses de cobre também provocaram nos animais utilizados no presente experimento uma semana antes da intoxicação (M1) uma pequena diminuição significativa nos valores de hematócrito (Tabela 2) em ambos os grupos, indicando que já tinha ocorrido um ou mais episódios de hemólise intravascular de pequena monta.

O excesso de cobre sérico (Tabela 5), que teve seu auge na crise hemolítica, provocou uma sequência de reações em cadeia que desencadearam intensas alterações na função renal dos ovinos intoxicados, que passarão agora a ser discutidos.

Embora não existisse diferença significativa entre a grande maioria das variáveis estudada no momento 2 (crise hemolítica) entre o grupo controle e o tratado com TTM, foi constatado que este tratamento diminuiu de maneira significativa o grau de injúria e mau funcionamento dos rins, enquanto que a ausência de medicação levou a morte todos os ovinos do grupo controle. Assim, como era de se esperar tanto os teores de creatinina (Tabela 3) com de uréia (Tabela 4) sérica apresentaram já no segundo dia (M3) de tratamento, com TTM,

uma significativa melhora, em relação ao grupo controle e ao seu próprio valor da crise hemolítica, confirmando outros resultados anteriores obtidos por Machado (1998).

Alterações na hemodinâmica renal sempre precedem o aumento da concentração sérica de uréia e creatinina. O presente trabalho confirmou os achados de Gooneratne et al. (1986) que existe uma gigantesca diminuição na taxa de filtração glomerular durante o período de crise hemolítica, denominada neste trabalho de taxa de depuração endógena de creatinina (Tabela 9). Contudo, diferente do trabalho australiano, o presente trabalho determinou esta taxa em momentos mais cruciais da intoxicação, como no 2º e 5º dias pós-hemólise e na semana que antecede a crise, além dos presentes ovinos terem tido um quadro de intoxicação com maior gravidade que o anteriormente descrito, visto que todos os grupos ovinos do grupo controle sucumbiram, em relação aos 30% mortos no experimento australiano. Esses autores ainda não tinham estudado a ação do TTM sobre tal taxa. Os presentes resultados demonstraram que já uma semana antes da crise hemolítica ocorria uma menor filtração glomerular, da ordem de 50%. Esperava-se que este fato provoca-se um aumento nos teores de creatinina e uréia séricas, o que existiu. Tudo indica que exista uma resposta compensatória renal, visto que segundo Osbaldiston e Moore (1971) os teores de creatinina e uréia sangüíneos só aumentam quando a taxa de filtração glomerular estiver reduzida abaixo de 50% de sua capacidade normal. Os motivos desta redução da taxa de filtração glomerular indicam que ocorreram danos anteriores renais. Os mais baixos teores de hematócrito no tempo M1 em relação ao tempo M0 deixam claro que já tinham existido pequenas crises hemolíticas anteriores, as quais

foram capazes de reduzir a taxa de filtração glomerular. De certa forma, os atuais achados contrapõem as afirmações de Howell e Gawthorne (1987) que as lesões renais só se instalam a partir da crise hemolítica.

A drástica redução na taxa de filtração glomerular encontrada em ambos grupos teve como consequência clínica a marcante oligúria ou nos casos mais graves anúria. Enquanto os ovinos normais urinavam cerca de 200 a 300 mL em 3 horas, neste mesmo tempo a produção de urina durante a crise hemolítica girava em torno de 30 mL.

Essa menor taxa de filtração glomerular afetou diretamente a excreção de uréia pela urina (Tabela 10), que teve um declínio de mais de 80% no grupo controle. A taxa de excreção fracional (Tabela 20) refletiu identicamente esta queda na filtração de uréia. Esta substância normalmente é bastante eliminada pela urina, e passa livremente pelos glomérulos, sendo a maior parte dela excretada na urina. Uma quantidade menor de uréia, filtrada nos glomérulos, pode ser reabsorvida nos túbulos, desde que haja concomitante reabsorção de água neste mesmo segmento renal (BRENNER, 1991). Mas acredita-se que tal reabsorção tubular de uréia não tenha ocorrido, pois existiram indícios que a reabsorção de água tubular esteve incipiente durante a crise hemolítica. Mais à frente discutir-se-á alteração na capacidade de reabsorção frente às lesões tubulares.

Outro resultado que demonstrou alteração glomerular foi a presença de proteinúria, detectada de forma relativa tanto pelas tiras reativas (Combur test), como pela sedimentoscopia, e de forma absoluta pelo índice de excreção e pela taxa de excreção fracional de proteína. O índice de excreção de proteína (Tabela

12) demonstrou que durante a crise hemolítica o total destas macromoléculas na urina chegou a aumentar na ordem de 88 vezes, em relação ao momento basal. Contudo, a taxa de excreção fracional de proteína (Tabela 22) e de cobre (Tabela 27) confirmou que em média apenas cerca 5% e 10,7%, respectivamente, desta proteína e cobre filtrado eram excretados na urina, indicando que grande parte destas substâncias deve ter ficado estacionadas dentro dos túbulos, como já tem sido descrita classicamente por meio de exame histopatológico de tecidos renais (GOONERATNE et al., 1986; HOWELL e GAWTHORNE, 1987; GOPINATH et al., 1974)

Na urina de um animal normal deve ser encontrada a presença de traços de proteína. Um dos empecilhos de filtração de proteína pelo glomérulo é o grande tamanho da molécula protéica. Também representa importante barreira para a passagem das proteínas a presença de filtradores de carga elétrica (sialoproteínas) presentes nas três camadas da parede dos vasos capilares do glomérulo (KANEKO et al., 1997). Estes filtradores impedem a passagem de moléculas com cargas negativas (aniônicas), como se apresenta a maioria das proteínas. Se esta barreira química é removida poderá ocorrer proteinúria (KANEKO et al., 1997). Exames ultraestruturais do glomérulo de ovinos acometidos por intoxicação cúprica revelaram que a intensa presença de material denso, composto de debris eritrocitário, cobre, ferro e complexos de mercúrio, se acumulam sobre e sob a lâmina basal do glomérulo, interferindo com a sua capacidade seletiva de filtração (GOONERATNE et al., 1986 b). A presença do aumento de excreção urinária de cobre (Tabela 17) e de sua taxa de excreção fracional (Tabela 27) e de ferro (Tabela 18) no presente trabalho comprovam as

afirmações de Gooneratne et al 1986b. Embora os tratadistas não comentem, contribuiu para protenúria a presença de proteína oriundas de células de degeneração, necrose e descamação tubular dos rins, visto que tais debris foram detectados no exame de sedimentoscopia (Tabela 29). Outra prova cabal que parte da proteinúria é tubular é o aumento substancial de atividade da NAG urinária (Tabela 28) que foi máxima no 2º dia da crise hemolítica no grupo controle. Esta enzima, dentro do tecido renal, é específica do epitélio luminal dos túbulos contornados proximais e se apresenta altamente elevada em processos degenerativos tubulares, como o visto nos casos de intoxicação cúprica (GARY et al., 1990). Esta é primeira vez que a atividade desta enzima é determinada na urina de ovinos intoxicados pelo cobre.

Deve-se dizer que neste trabalho também foi acompanhada a atividade de gamaglutamil transferase urinária, porém os resultados foram completamente inconstantes durante a presença de hemoglobinúria. A análise da atividade desta enzima seria importante, pois ela se encontra especificamente nas membranas dos bordos dos túbulos contornados proximais (GARRY et al., 1990; KANEKO et al., 1997; MIRANDOLA, 1996). Contudo, foi obtida informação posterior que a hemoglobina livre, encontrada abundantemente na urina durante a crise hemolítica, pode interferir na análise da atividade dessa enzima, explicando os maus resultados obtidos (BOGIN et al., 1989).

Ficou evidente que uma semana antes (M1) e no auge da crise hemolítica existiu uma acidúria (Tabela, 7), corrigida já no 2º dia pós-hemoglobinúria nos animais tratados com TTM. Um único trabalho, Gopinath et al (1974), acompanhou o pH urinário e detectou as mesmas modificações aqui descritas. Contudo, os

autores britânicos não se aventuraram na discussão expressar um único comentário ou explicar os mecanismos desta alteração bioquímica. Esta omissão dos autores fez com que em revisões posteriores o assunto nem fosse mencionado (SOLI, 1980; HOWEEL e GAWTHORNE, 1987).

No fundamentado experimento de Machado (1998) pela primeira vez foi descrito que na intoxicação cúprica acumulativa ocorria nos primeiros três dias de crise hemolítica uma moderada alcalose metabólica temporária, por retenção de bicarbonato sangüíneo, sendo maior a alcalose quanto mais intenso foi o grau de insuficiência renal. Contudo, nesse trabalho não foi mensurado o pH urinário. Por outro lado, o presente trabalho mensurou o pH urinário (Tabela 7), mas não acompanhou paralelamente o exame hemogasimétrico dos animais. Suspeita-se que deva existir neste em casos de intoxicação cúprica uma “acidúria paradoxal”, semelhante ao que ocorre em alguns transtornos de dilatação do abomaso em bovinos. Segundo Lunn e McGuirk (1990), a acidúria pode ocorrer em casos de menor taxa de filtração glomerular, como vistos em alguns tipos de insuficiência renal (KANEKO et al., 1997), existindo uma menor excreção renal de bicarbonato, causada por uma menor filtração glomerular deste tampão e/ou um aumento da reabsorção tubular de bicarbonato. No presente experimento foi encontrada uma correlação positiva entre a taxa de depuração endógena de creatinina e o pH urinário (Gráfico 27), indicando que o grau insuficiência renal interferiu no baixo pH urinário encontrado. Devido aos baixos valores de pH encontrado na urina (menor valor pH 4,9) é possível que os dois processos, acima mencionados, tenham ocorrido concomitantemente. A última possibilidade poderia indicar o baixo pH urinário obtido visto que para cada íon de bicarbonato produzido no túbulo renal e

reabsorvido ao reabsorvido há uma concomitante excreção de íon H^+ na urina (BREMNER, 1991, KANEKO et al., 1997).

Segundo vários autores as lesões renais nos casos de intoxicação cúprica são causadas pela própria ação do cobre livre, da hemoglobina livre, da ação do complexo de ambos, dos lisossomos liberados dos hepatócitos necrosados e possivelmente do ferro (HOWELL e GAWTHORNE, 1987; GOONERATNE et al., 1984, 1986 a,b). Nos processos hemolíticos a hemoglobina livre penetra no glomérulo se tornando mais concentrada no lúmen tubular renal, precipitando-se e provocando assim obstrução do néfron (OSBALDISTON e MOORE, 1971). Já o cobre e o ferro livre e os lisossomos provocam a geração de radicais livres que podem danificar as várias células. O cobre pode se ligar à hemoglobina, e aos lisossomos gerando um complexo protéico-lisossomal bastante injuriante aos túbulos renais (GOONERATNE e CRHISTIANSEN, 1984). Mas segundo Gooneratne et al., (1986) o TTM se liga ao complexo protéico-lisossomal diminuindo a ação lesiva.

Todos esses agentes tóxicos podem provocar marcantes lesões renais tanto nas microestruturas glomerulares, no epitélio tubular, em especial nos túbulos contornados proximais, e nos vasos sangüíneos capilares (GOONERATNE et al., 1986). Contudo, ovinos tratados com TTM apresentam tais lesões são bem mais atenuadas, com discretos acúmulos de material acidófilo na luz tubular, como visto neste trabalho na Figura 3A. A coloração histoquímica específica de Ulzmann indica que existiu um acúmulo maior de cobre no interior das células tubulares dos ovinos controles (Figura 4A), em relação ao grupo tratado com TTM (Figura 4B,C e D). Este fato foi comprovado de forma absoluta pela

detecção de maiores teores de cobre renal, mais de 10 vezes superior, nos animais do grupo controle em relação aos tratados. Deve-se chamar a atenção que os teores de cobre no tecido renal aqui encontrados foram cerca de 40 % superiores aos descritos por Gopinath et al. (1974) e Howell Gawthorne (1987), indicando que a intoxicação foi severa nos presentes ovinos.

Sem dúvida, grande parte das disfunções renais encontradas na intoxicação por cobre esteve concentrada nos túbulos contornados proximais, que podem se encontrar obstruídos, além de apresentarem necrose e degeneração das células epiteliais causadas pelos agentes lesivos, já descritos anteriormente (GOONERATNE et al., 1986, HOWELL e GAWTHORNE, 1987 e GOPINATH et al., 1974). Embora os autores tenham decantado tais achados, quase nada foi feito para quantificar as marcantes disfunções tubulares, bastante estudadas no presente trabalho. Vários foram os achados bioquímicos detectados neste trabalho que evidenciaram falhas na reabsorção ou filtração tubular. Uma das mais interessantes foi a glicosúria, constatada pelo marcante aumento no índice de excreção urinária de glicose (Tabela 11), que se tornou mais alta quanto mais avançada foi a disfunção renal (M2). Normalmente, a glicose sangüínea passa livremente pelo glomérulo renal, estando na mesma concentração sangüínea no filtrado glomerular, sendo em seguida altamente reabsorvida nos túbulos contornados proximais, a ponto de praticamente pouco ser detectada na urina (KANEKO et al., 1997). A taxa de excreção fracional de glicose urinária também esteve aumentada nesses mesmos tempos observados no índice de excreção desta substância (Tabela 21). A interpretação dos resultados da taxa fracional é aparentemente complexa. Mas considerando que ocorreu uma diminuta

percentagem de depuração de glicose do sangue, que não ultrapassou 7,94 %, e que não ocorreu hipoglicemia (dados não publicados) durante a crise hemolítica, leva a crer que pequena quantidade de glicose foi filtrada pelos glomérulos, sendo em boa parte excretada pela urina. Em outras palavras, é pressuposto que a maior taxa de excreção fracional de glicose indique ao mesmo tempo disfunção tubular como glomerular.

Outra evidência de disfunção tubular é a baixa densidade urinária (Tabela 8) encontrada no decorrer da crise hemolítica. O filtrado glomerular tem a mesma osmolaridade do sangue, mas este filtrado no decorrer de sua passagem pelos túbulos renais tem como resultado final a grande conservação de água, por meio de reabsorção da mesma (SWENSON, 2000; KANEKO et al., 1997). Geralmente durante um quadro de oligodipsia, como o encontrado nos ovinos intoxicados, era de se esperar uma grande tendência do organismo em poupar as perdas de água por meio de reabsorção de água, que leva quase que invariavelmente a uma urina mais concentrada (RADOSTITS et al., 2000). Mas no presente experimento o que se viu foi uma diminuição de densidade específica indicando falha na reabsorção tubular.

Segundo Garry et al. (1990), ovinos com insuficiência renal aguda, com nefrotoxicose, devido às altas doses de aminoglicosídeo, apresentaram uma diminuição na taxa de filtração glomerular associado a uma baixa densidade urinária, que atingiu valores bem inferiores aos valores mínimos considerados normais (1,015).

A intoxicação cúprica gerou nos cordeiros um quadro de hiperfostúria, detectado pelo índice de excreção urinária de fósforo (Tabela 13). Esta

hiperfosfatúria foi concomitante ao surgimento de maiores valores da taxa de excreção fracional, indicando assim que ocorreu uma menor capacidade de reabsorção tubular deste macroelemento. Esta hiperfosfatúria pode ser dividida em dois segmentos, ou seja: a inicial nos momentos 2, 3 e 4, e a intermediária no M5. A dinâmica da concentração urinária do fósforo é semelhante a já descrita para a uréia e a glicose, ou seja, passa livremente pelo glomérulo sendo parcialmente reabsorvida no túbulo contornado proximal. No primeiro segmento pode-se correlacionar a hiperfosfatúria a uma grande perda da capacidade funcional dos túbulos devido às injúrias advindas da intoxicação. Porém, tardiamente (M5) a maior taxa de excreção fracional (Tabela 23) poderia ser advinda de mecanismos compensatórios da perda de néfrons lesados (OSBORNE e FINCO, 1995) ou pela presença de um grande número de células tubulares jovens regeneradas (Figura 3F) com capacidade funcional mínima (KOGIKA, 1990).

O índice de excreção urinária de sódio (Tabela 14), assim como a sua taxa de excreção fracional (Tabela 24) apresentaram resultados que lembram de alguma forma os obtidos pelo fósforo, recém discutido, ou seja, existiu um aumento de ambos no decorrer da crise hemolítica que se elevou marcadamente ao final do experimento. A maior via de excreção de sódio do corpo é a urinária. Uma grande parte do sódio sangüíneo é filtrada pelo glomérulo, sendo que em condições normais cerca de 99% é reabsorvido em sua passagem pelo néfron, até ser eliminado na urina. A reabsorção ocorre de maneira passiva nos primeiros segmentos tubulares (túbulo contornado proximal e alça de Henle), sempre acompanhado com reabsorção de água. Nos segmentos posteriores (túbulo distal

e ducto coletor) passam a ter controle sobre a reabsorção do sódio um conjunto de sistemas homeostáticos orgânicos tais como: sistema renina-angiotensina-aldosterona, angiotensina II, peptídeos natriuréticos atriais etc (SWENSON 1977, OSBORNE e FINCO 1995, KANEKO et al., 1997). Segundo alguns autores, a insuficiência renal aguda, detectada na crise hemolítica, provocam marcante disfunção nos túbulos contornados proximais e alça de Henle deixando de ocorrer reabsorção de significativas quantidades de sódio, as quais ultrapassariam a capacidade homeostática de ser reabsorvida em segmentos posteriores. É digno de nota que isto deve ter ocorrido, pois existiu concomitantemente durante este período uma menor reabsorção de água, indicada pela baixa densidade urinária naqueles momentos (Tabela 8).

Cerca de 37% do sódio filtrado nos glomérulos foi excretado na urina dos ovinos sobreviventes no 30º dia pós-hemoglobinúria (Tabela 24). Para explicar esta expressiva excreção de sódio urinário comparar-se-á o presente quadro com a homeostase de sódio em animais portadores de insuficiência renal crônica. Nestes últimos existe uma definitiva diminuição do número de néfrons, devido às lesões anteriores, reduzindo também a taxa de filtração glomerular. O balanço normal de sódio e o volume de fluido extracelular corpóreo são mantidos de forma idêntica em animais normais e com insuficiência renal crônica. Nestes a homeostase de sódio, supondo que o animal ingira a mesma quantidade deste elemento na dieta que antes da insuficiência renal, é mantida por aumento da taxa de excreção fracional urinário de sódio em proporção ao declínio na taxa de filtração glomerular (BREMMER, 1991, OSBORNE e FINCO, 1995). No presente trabalho esta relação foi estudada nos ovinos, levando-se em conta o momento

zero (basal), M3 (instalação das lesões) e M5 (final) (Gráfico 28) encontrando-se uma típica curva exponencial com alta correlação negativa ($r = -0,84$) indicando que essa compensação homeostática realmente ocorreu em animais sobreviventes e que esta inversamente correlacionada com a taxa de filtração glomerular.

Se por um lado este resultado traz informação elucidativa, por outro permite questionamento se a intoxicação cúprica atenuada pelo tratamento trouxe como consequência perda definitiva de néfrons ou se os resultados obtidos no M5, especificamente de maior excreção de certas substâncias, seria apenas uma adaptação temporal para manter a homeostase destes metabólitos, ocorrendo em seguida uma gradual recuperação. Joga a favor da primeira hipótese a persistência de microlesões (Figuras 3E e 3F) glomerulares (presença fibras colágenas) e tubulares (presença de material acidófilo na luz dos túbulos e de fibras colágenas). Segundo Howeel e Gawthorne (1987) cortes histológicos de rins de ovinos intoxicados apresentaram lesões degenerativas e de necrose de diversos graus nas células das membranas basais dos túbulos contornados proximais. A necrose destas células pode implicar em perda definitiva do néfron (BREMNER, 1991, OSBORNE e FINCO, 1981). A confirmação da segunda hipótese, de adaptação gradual dos rins, só seria comprovada com a realização de idêntico experimento prolongando-se o mesmo para estudar o comportamento das mesmas provas funcionais aqui realizadas.

O índice de excreção urinária de potássio (Tabela 15) e sua taxa de excreção fracional (Tabela 25) indicaram uma menor reabsorção no auge da crise hemolítica (M3), assim como no 30º dia (M5). O potássio é livremente filtrado

pelos glomérulos sendo reabsorvido passivamente em cerca de 75% nos túbulo contornado proximal e na alça de Henle. Dependendo do grau do status do potássio e do sódio no organismo, o potássio pode ser reabsorvido ou excretado no túbulo distal e ducto coletor por meio da ação da aldosterona, hormônio antidiurético etc. Os mesmos argumento utilizados para explicar a maior eliminação do sódio na urina podem ser empregados para o potássio. Semelhantes mecanismos e argumentação poderiam ser utilizados para explicar a menor reabsorção tubular do cloro (Tabelas 16 e 26).

O índice de excreção urinária de cobre (Tabela 5) indicou que já na semana que antecede a crise hemolítica existiu um aumento da eliminação de cobre pela urina da ordem de 10 vezes superior aos valores basais, fato este não relatado na literatura consultada. Segundo Howeel e Gawthorne (1987) durante a fase pre-hemolítica o cobre se acumula nos tecidos renais com mínimas lesões estruturais neste órgão, não trazendo danos a sua função. Contudo, o presente estudo demonstrou que nesse momento já existe uma considerável diminuição na taxa de filtração glomerular (Tabela 9), acompanhada de aumento na excreção de proteína (Gráfico 12) e razoável diminuição na densidade urinária (Tabela 8). Antes do início da crise hemolítica existem pequenas liberações de cobre livre das reservas hepáticas, determinada por aumento de atividade de enzimas hepáticas no soro (ORTOLANI et al., 2003), que associadas com liberação de lisossimas poderiam causar as alterações renais acima descritas. Maiores estudos são necessários para confirmar tais suposições.

A hipercupremia aumentou consideravelmente o índice de excreção urinária de cobre, que normalmente é irrisória, no início da crise hemolítica (Tabela 17) em

ambos os grupos. Contudo, o efeito do tratamento com TTM já diminuiu sensivelmente a cuprúria no 2º (M3) dia de terapia. Este dado é de fundamental importância, pois significa um menor incremento das lesões renais já instaladas, diferentemente do grupo controle que teve um aumento desta variável naquele momento. O TTM tem a espetacular capacidade de formar uma ligação altamente estável com o cobre livre, fazendo com que a capacidade oxidante e corrosiva deste íon seja anulada (GOONERATNE et al., 1981). Estudos da farmacodinâmica deste complexo foram feitos por Gooneratne e Christensen (1984) e Botha et al. (1995) sendo demonstrado que na sua grande maioria é excretado pela bile e não pela urina. Mesmo assim, é possível que o teor de cobre residual presente na urina dos animais tratados seja aquele anteriormente ligado ao complexo protéico-lisossomal. A taxa de excreção fracional de cobre no momento 2, em ambos os grupos, e no M 3 do grupo controle sugere que boa parte do cobre filtrado no glomérulo não foi excretado na urina e que deve estar retido dentro dos túbulos renais junto com complexos protéico-lisossomal, descrito por Gooneratne et al. (1986b), se acumulando nos néfrons e interferindo com seu perfeito funcionamento. Deve-se manter em mente que estes cilindros acidófilos ainda estavam retidos nos túbulos renais dos animais sobreviventes 30 dias após o início da hemoglobinúria (Figura 3F).

O significativo aumento no índice de excreção urinário de molibdênio (Tabela 19) nos tempos 2 e 3, confirmou a excreção do TTM pela urina, como frisado acima. Normalmente, o TTM é mais excretado pela bile, sendo menos o achado de maior índice de excreção de molibdênio na urina no M3 que no M2 era

esperado já que neste intervalo o animal foi excretado com mais duas doses de TTM, existindo um efeito acumulativo e residual.

Maior quantidade de ferro foi excretado pela urina de animais com crise hemolítica, sendo que no momento M3 o grupo tratado com TTM excretou menor quantidade de ferro que o grupo controle. O alto teor de ferro urinário, que normalmente é eliminado em quantidades irrisórias, representa a quantidade do elemento presente na hemoglobina livre. Era de se esperar que no 2º dia os dois grupos apresentassem igual quantidade de ferro na urina, visto que o hematócrito (Tabela 2) diminuiu igualmente nos dois grupos, ocorrendo teoricamente igual teor de hemoglobina livre no sangue. Em experimento anterior Machado (1998) não encontrou diferenças entre os teores de hemoglobina livre sangüíneas no 2º dia pós-hemoglobinúria, desde que o TTM não interfere sobre o grau de hemólise. Se o teor de ferro urinário é menor no grupo tratado duas possibilidades podem então ter acontecido: A - A hemoglobina livre foi menos excretada na urina, podendo talvez ser mais excretada com o complexo protéico-lisossomal-cobre-molibdênio pela bile; cordeiros intoxicados e tratados com TTM acumularam menores concentrações de ferro no tecido renal que os não tratados e foi atribuído que o TTM poderia ter removido o “ferro” (sic) (GOONERATNE et al., 1981); no presente experimento os teores de ferro nos rins foram bem menores nos ovinos tratados com TTM (Tabela 6); reforça esta hipótese o presente achado que menor índice de excreção de proteína foi eliminado pela urina dos animais tratados com TTM, no 2º dia (M3) pós-hemoglobinúria, supondo que uma parte significativa da proteinúria é representada pela hemoglobina livre; B - O ferro ligado à hemoglobina livre ficou mais retida nos néfrons dos ovinos não tratadas. Contudo,

não foi realizada a taxa de excreção fracional de ferro e de hemoglobina que talvez pudesse dirimir esta dúvida. Maiores estudos são necessários para avaliar estas hipóteses.

5.2 Metabolismo oxidativo sanguíneo

Dentro daquilo que era esperado, durante o auge da crise hemolítica ocorreu uma diminuição na quantidade de glutathione reduzida eritrocitária (Tabela 31). Esta redução é causada pelo cobre livre que penetra na hemácia e se liga aos radicais sulfidrilas, presentes na membrana citoplasmática, formando disulfetos e em seguida os temíveis radicais livres, que danificam a parede celular, facilitando a hemólise por fragilidade osmótica (HOWEEL e GAWTHORNE, 1987). Os danos às hemácias serão menores em proporção à quantidade de glutathione reduzida presente dentro desta célula. Este peptídeo é um potente agente antioxidante que se liga ao radical livre impedindo a sua ação. Como fruto desta sua reação a glutathione se oxida, podendo novamente voltar a forma reduzida, sob catálise da enzima glutathione redutase. Para o pleno funcionamento desta enzima é necessária a formação de NADPH, produzida no eritrócito pela enzima glicose 6-fosfatodesidrogenase (G6-PD), presente dentro dos eritrócitos jovens em maior quantidade que em células velhas. Em outras palavras, os eritrócitos velhos são muito mais predispostos à hemólise, enquanto que os jovens são muito resistentes (HOWEEL e GAWTRORNE, 1987). O presente experimento comprovou que no 5º dia apenas os eritrócitos jovens sobreviveram à crise hemolítica já que a atividade da G6PD detectada era máxima (Tabela 33). Além destes eritrócitos deveriam

estar na corrente sangüínea reticulócitos recém advindos da medula que também tem altas quantidades de G6PD, pois Machado (1998) detectou um número máximo destas células exatamente no 5º e 6º dias pós-crise hemolítica. A alta atividade de G6PD nesse dia (Gráfico 32) confirma os idênticos resultados obtidos por Thompson e Todd (1976) e contrapõem os achados de Sansinanea et al. (1996).

Os altos teores de malonildialdeído (MDA) séricos (Tabela 30) confirmam a presença de danos oxidativos nos eritrócitos e de mais tecidos, pois esta substância é o produto de final da oxidação pelos radicais livres de alguns lipídeos. O achado importante do presente trabalho é que os teores de MDA foram bem inferiores no 2º dia pós-hemólise nos animais tratados com TTM, indicando que este medicamento reduziu a reação em cascata da formação de radicais livres por meio da queda nos teores de cobre livre que dão ao início ao processo. De fato, existiu uma relação altamente positiva ($r = 0,70$) entre os teores de cobre e os de MDA (Gráfico 36).

Outro fato de importância revelado neste trabalho foi à constatação que existiu uma relação negativa entre o MDA e o taxa de depuração endógena de creatinina ($r = - 0,60$) (Gráfico 37). Em outras palavras, os radicais livres foram também agentes importantes no surgimento das lesões renais, abrandadas quando do uso de TTM.

Pela primeira vez também foi realizado um ensaio testando a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) (Tabela 32) em ovinos intoxicados por cobre. A HRFP indica a capacidade antioxidante presente no plasma (Benzie e Strain, 1996). Maiores valores deste índice foram detectados

durante o auge da crise hemolítica. A interpretação deste resultado indica que o organismo do animal intoxicado teve uma resposta compensatória frente a um enorme desafio oxidante por meio de uma significativa atividade antioxidante. Isto fica comprovado pela alta correlação positiva ($r=0,71$) entre o MDA e a HRFP (Gráfico 34). Um antigo ensaio estudou *in vitro* o grau de hemólise que o cobre provocava em hemácias suspensas em solução salina isotônica e em plasma. Enquanto que 50 μg Cu/ 100 mL foram suficientes para provocar hemólise em hemácias suspensas em salina, quantidade muito superior foi necessária para o mesmo efeito em suspensão plasmática (HOWELL e GAWTHORNE et al., 1987). Os autores atribuíram esta proteção à presença de proteínas e aminoácidos plasmáticos que poderiam se combinar com o cobre livre, tornando-o complexado e atóxico. Coincidentemente, os teores de ácido úrico séricos (Tabela 34) foram mais altos durante o auge da crise hemolítica e sua correlação com o HRFP altíssima ($r = 0,90$) (Gráfico 35), indicando que ácido úrico é uma das substâncias antioxidantes presentes no plasma. Além de ser antioxidante o ácido úrico, derivado do catabolismo das purinas, tem a capacidade de formar complexos com o cobre e de prevenir a oxidação da vitamina C, outra substância antioxidante (CHIHUAILAF et al., 2002).

6 CONCLUSÕES

1- A intoxicação cúprica cumulativa realizada experimentalmente provocou, além de um típico quadro clínico, as seguintes alterações na função renal: diminuição acentuada na taxa de filtração glomerular, gerando marcada proteinúria, além de causar uma intensa redução na capacidade de reabsorção tubular, manifestada por glicosúria, menor densidade urinária, maior excreção urinária de fósforo, sódio, potássio, cloro, cobre, ferro, maior atividade da enzima NAG na urina. Foi ainda constatada uma acidúria. Este quadro gerou um estado de uremia, oligúria ou anúria que provocou morte de todos os ovinos do grupo controle.

2- O tratamento com o TTM promoveu a melhora gradual do quadro clínico, gerando já no 2º ou no 5º dia após o tratamento, significativa melhora na taxa de filtração glomerular, redução na glicosúria, melhora na densidade urinária e redução na atividade do NAG.

3- A intoxicação cúprica provocou grande formação de radicais livres, sendo menor a taxa de filtração glomerular quanto maior foi esta formação de radicais livres. Estes provocaram uma redução na quantidade de glutathione reduzida nos eritrócitos, embora tenham estimulado a capacidade antioxidante do plasma, aumentando assim a formação de ácido úrico.

4- O tratamento com o TTM diminuiu a concentração de radicais livres formados e aumentou a formação de glutathione reduzida eritrocitária.

6. REFERÊNCIAS

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v.61, n.5, p. 882-888, 1963.

BEUTLER, E.; BLUME, K.G.; KAPLAN, J.C.; LOHR, G.W. International committee for standardization in hematology: recommended screening test for glucose-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. **Br. J. Haematol.**, v. 43, p. 469-477, 1979.

BREMNER, I. Manifestations of copper excess. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67 (suppl), p. 1069S-1073S, 1998.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

GARRY, F.; CHEW, D.J.; RINGS, D.M.; TARR, M.J.; HOFFSIS, G.F. Renal excretion of creatinine, electrolytes, protein and enzymes in healthy sheep. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, n.3, p.414-419, 1990a.

GARRY, F.; CHEW, D.J.; HOFFSIS, G.F. Urinary indices of renal function in sheep with induced aminoglycoside nephrotoxicosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, n. 3, p. 420-426, 1990b.

GOONERATNE, S.R.; HOWELL, J.M.; KUMARATILAKE, J.S. Kidney function in copper toxicity in sheep. In: International symposium on trace element metabolism in man and animals, 4, 1981. **Anais...** Canberra, Austrália: Australian Academy of Science, 1981, p. 461-464.

GOONERATNE, S.R.; HOWELL, J.C.; AUGHEY, E. An ultrastructural study of the kidney normal, copper poisoned and thiomolybdate treated sheep. **J. Comp. Path.**, v. 96, n. 6, p. 593-612, 1986.

HOLOVSKÁ, K.; LENÁRTOVÁ, V.; PEDRAJAS, J.R.; PIENADO, J.; LÓPEZ-BAREA, J.; ROSIVAL, I.; LEGÁTH, J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in sheep organs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 115B, , 4, p. 451-456, 1996.

HOWELL, J.M.; GOPINATH, C. Copper toxicity in sheep: the effects of repeated intravenous injections of copper sulphate. **Res. Vet. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 86-94, 1977.

HOWELL, J.M.; GOONERATNE, S.R. **Copper in animals and man**. CRS Press, 1987, v.2, p. 53-78: the pathology of copper toxicity in animals.

KOGIKA, M.M. **Avaliações da hemodinâmica e da função renal em cães (*Canis familiaris*, Linneus, 1758) intoxicados experimentalmente pelo etileno**

glicol. São Paulo, 1995. 83f. (Doutorado em Clínica Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

LEMOS, R.A.A.; RANGEL, J.M.R.; OSÓRIO, A.L.A.R.; MORAES, S.S.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S.C.; MARTINS, S. Alterações clínicas, patológicas e laboratoriais na intoxicação crônica por cobre em ovinos. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 457-463, 1997.

LUNN, D.P.; MCGUIRK, S.M. Renal regulation of electrolyte and acid-base balance in ruminants. **Vet. Clin. North Amer.: Food Anim. Pract.**, v. 6, n. 1, p. 1-28, 1990.

LUTSGARTEN, J.A.; WENK, R.E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 1419-1422, 1972.

MAIORKA, P.C.; MASSOCO, C.O.; ALMEIDA, S.D.B.; GORNIK, S.L.; DAGLI, M.L.D. Copper toxicosis in sheep: a case report. **Vet. Hum. Toxic.**, v. 40, n. 2, p. 99-100.

MACHADO, C.H. **Uso de tetratimolibdato no tratamento de intoxicação cúprica experimental em ovinos: avaliações clínica e toxicológica**. São Paulo, 1998, 138f. (Doutorado em Clínica Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

MENGOLI, C.; LECHI, A.; AROSIO, E. et al. Contribution of four markers of tubular proteinuria in detecting upper urinary tract infections. **Nephron**, v. 32, p. 234-238, 1982.

MIRANDOLA, R.M.S. **Avaliação de alguns constituintes do soro sanguíneo e da urina em indivíduos acidentados por *Bothrops jararaca* (Wied, 1824)**. São Paulo, 1996. 78f. (Mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo.

ORTOLANI, E.L.; KNOX, D.; JACKSON, F.; COOP, N.F.; SUTTLE, N.F. Abomasal parasitism lowers liver Cu status and influences the Cu x Mo x S antagonism in lambs. **Trace Elements in Man and Animals**, v. 8, p. 331-332, 1993.

ORTOLANI, E.L. Intoxicações e doenças metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica, urinálise e toxemia da prenhez. In: SILVA SOBRINHO, A.G. **Nutrição de Ovinos**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. p. 241-258.

ORTOLANI, E.L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNADI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p 641-651.

ORTOLANI, E.L.; MACHADO, C.H. Assessment of some clinical and laboratory variables for early diagnosis of accumulative copper poisoning in lambs

(Encaminhado para publicação na revista **Human and Veterinary Toxicology**, 2002a).

ORTOLANI, E.L.; MACHADO, C.H. The clinical and biochemical profile of accumulative copper poisoning in sheep: 1 – respiratory, heart and rumen movement rates, rectal temperature and blood acid-base balance (Encaminhado para publicação na revista **Human and Veterinary Toxicology**, 2002b).

ORTOLANI, E.L.; MACHADO, C.H. The clinical and biochemical profile of accumulative copper poisoning in sheep: 2 – other clinical signs, hematological, urinary and biochemical changes (Encaminhado para publicação na revista **Human and Veterinary Toxicology**, 2002c).

OSBALDISTON, G.W.; MOORE, W.R. Renal function tests in cattle. **JAVMA**, v. 159, n. 3, p. 292-301, 1971.

PEREIRA, M.F.; SANTOS, N.V.M.; SOARES, P.C.; MAIA, F.C.L.; LIMA, A.M.A.; ALBUQUERQUE, C.A.F. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no estado de Pernambuco. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 9, 1999. **Anais...** Belo Horizonte: FEP – MVZ, 1999, p. 75.

RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUEZ, N.C.; NARDIN, N.S. Intoxicação crônica pelo cobre em ovinos no Rio Grande do Sul: histopatologia e toxicologia. In: Congresso estadual de medicina veterinária, 9, 1985. **Anais...** Santa Maria: SOVERGS, 1985, p. 71-72.

RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J.A.; GUESTA, S.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 9, n.3/4, p. 51-54, 1989.

SANTOS, N.V.M.; MOTA, R.A.; SOARES, P.C.; PEREIRA, M.F.; TEIXEIRA, M.N. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação crônica por cobre em ovinos. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, 4, 1999. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1999, p. 153-154.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino em medicina veterinária e zootecnia, 1998, 221p.

SANSINANE, A.S.; CERONE, S.I.; QUIROGA, M.; AUZA, N. Antioxidant capacity of erythrocytes from sheep chronically poisoned by copper. **Nutr. Res.** v. 13, 891-899, 1993.

SANSINANE, A.S.; CERONE, S.I.; STREITENBERGER, S.A.; GARCÍA, C.; AUZA, N. Efecto oxidativo de la sobrecarga hepática de cobre. **APPTLA**, v. 48, p. 25-31, 1998.

SAS INSTITUT. **SAS User's Guide**: Statistics Cary, 2000.

SCHOSINSKY, K.H.; LEHMANN, H.P.; BEELER, M.F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of dianisidine dihydrochloride. **Clin. Chem.**, v. 20, n. 12, p. 1556-1563, 1974.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **Eur. L. Biochem.** v. 215, p. 213-219, 1993.

TEMPLE, N.J. Antioxidants and disease: more question than answers. **Nutr. Res.**, v. 20, n. 3, p. 449-459, 2000.

WRIGHT, J.R.; COLBY, H.D.; MILES, P.R. Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 206, p. 296-304, 1981.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3. ed. Cabi Publishing: Wallingford, 1999. 614p.

VAN LENTE, F.; SUIT, P. Assessment of renal function by serum creatinine clearance: glomerular filtration rate estimated by four procedures. **Clin. Chem.** v. 35, n. 12, p. 2326-2330, 1989.

BANCROFT, D. J., STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 4ed., Toronto: Churchill Livingstone, 1996, 766p.

BEHMER, O. A., TOLOSA, E. M., FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART – Editora da Universidade de São Paulo. 1976, 257p.

FERNANDES, M. C. **Métodos escolhidos de técnica microscópica**. 2ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1949. 615p.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3ed., New York: McGraw-Hill, 1968, 258p.

SANTOS, J. A., MELLO, M. R. **Diagnóstico médico veterinário (colheita de material)**. 7ed. São Paulo: Nobel, 1986. 190p.