FREDERICO AUGUSTO MAZZOCCA LOPES RODRIGUES

**Avaliação do potencial da monensina em predispor o
acúmulo hepático de cobre em ovinos**

USP

São Paulo
2014

FREDERICO AUGUSTO MAZZOCCA LOPES RODRIGUES

**Avaliação do potencial da monensina em predispor o acúmulo
hepático de cobre em 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 Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3021
FMVZ

Rodrigues, Frederico Augusto Mazzocca Lopes
Avaliação do potencial da monensina em predispor o acúmulo hepático de cobre em
ovinos / Frederico Augusto Mazzocca Lopes Rodrigues. -- 2014.
73 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Ionóforos. 2. Intoxicação cúprica. 3. Ruminantes. 4. Aditivos promotores de crescimento.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do potencial da monensina em predispor o acúmulo hepático de cobre em ovinos", protocolado sob o nº1539/2008, utilizando 32 (trinta e dois) ovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortoloni, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Evaluation of sodium monensin potential in the predisposition of liver copper accumulation in sheep", protocol number 1539/2008, utilizing 32 (thirty two) sheep, under the responsibility Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 12 de janeiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Frederico Augusto Mazzocca Lopes

Título: **Avaliação do potencial da monensina em predispor o acúmulo hepático de cobre em 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 Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Ao meu Sublime Deus, a minha Amada Família, meus Admirados Mestres, meus Queridos amigos; por lapidarem o meu ser, transcendendo minha existência.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por me afortunar com o sopro da vida, me permitindo vivenciar as vicissitudes da vida e regozijar de sua natureza jubilante de beleza infinita, seja nos animais que nos inspiram ou na singela semente com seu universo adormecido a árvore do porvir.

A sociedade que ofereceu meios para realização de meus estudos representada no órgão de fomento **FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP**, pela concessão de bolsa de doutorado e auxílio pesquisa, imprescindíveis ao desenvolvimento desta pesquisa, bem como a divulgação do mesmo em outros rincões.

Ao **Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani**, pelo privilégio de participar desta família, sendo o patriarca auspicioso de uma família frondosa, de filogenia ímpar.

A Estimada Família Ortolani: Barretinho, Clara, Macau, Celso, Zangado, Alessandra, Humberto, Frasson, Carol, Oliveira, Rejane, por fazerem diferença em minha vida.

Meus exemplares mestres em especial desta universidade e do departamento de clínica médica da FMVZ-USP.

A todos funcionários e amigos a que participaram desta jornada, vou agradecer a todos pessoalmente.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP que oferece condições favoráveis para a execução de pesquisa e pela minha formação.

E principalmente a todos os **ovinos**, que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado a minha eterna gratidão.

I don't know where I'm going,
but I'm on my way.

-Carl Sagan

RESUMO

RODRIGUEZ, F. A. M. L. **Avaliação do potencial da monensina em predispor o acúmulo hepático de cobre em ovinos.** [Evaluation of monesin potential in the predisposition of liver cooper accumulation in sheep]. 2014. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Objetivou-se avaliar a influência da monensina sódica sobre o acúmulo hepático de cobre em ovinos. Haja vista, que ionóforos podem alterar a absorção, disponibilidade e distribuição tecidual de minerais em muitos tecidos do organismo. Foram utilizados 24 ovinos mestiços das raças Santa Inês x Dorper com média de três meses de idade e peso medio de 30 kg ao início do experimento, que receberam dieta basal calculada em 2,75% do peso corpóreo, sendo 50% de concentrado comercial (7,13 ppm de Cu) e 50% de feno de capim coast-cross (3,72 ppm de Cu) e 10 gramas de sal mineral (5,9 ppm de Cu). Os cordeiros foram distribuídos em quatro grupos distintos, sendo: Controle – apenas dieta basal; Monensina (Mon) - dieta basal e 30 ppm de monensina sódica; Cobre (Cu) - dieta basal acrescida de 10 mg/kg P.V./dia de cobre, na forma de sulfato de cobre pentahidratado; e grupo Monensina+Cobre (MonCu) - dieta basal acrescida de 10 mg/kg P.V./dia de cobre e 30 ppm de monensina sódica. O período experimental teve duração de 14 semanas. Foram coletadas amostras de fígado e bile no início por biópsia, e ao final do experimento por necropsia, para determinação de minerais, assim como amostras semanais de sangue para avaliação bioquímica, hematológica e mineral. Foi realizada análise estatística por meio de fatorial 2x2 considerando como fatores a inclusão ou não de cobre e monensina na dieta. Somente um animal apresentou quadro clínico de intoxicação cúprica acumulativa. As concentrações de cobre no fígado no início do experimento variaram entre 243,8 e 345,4 ppm não havendo diferença entre os grupos experimentais. As concentrações médias e desvios-padrão em ppm do cobre hepático ao final do experimento foram 3.363 ± 576 para o grupo MonCu; 2560 ± 524 para o grupo Cu; 562 ± 168 para o grupo Mon e 253 ± 131 para o grupo Controle. Ao final do estudo a concentração de cobre hepático foi influenciada pela suplementação com cobre ($P = 0,0001$) e monensina ($P = 0,0003$). Os grupos suplementados com cobre tiveram redução dos teores de ferro hepático ($P = 0,0287$) e aumento das concentrações de cobre na bile. A avaliação bioquímica demonstrou elevação da atividade sérica da GGT e AST ($P < 0,05$) nos grupos Cu e MonCu a partir da décima primeira semana do experimento em relação

aos grupos Controle e Mon. O aumento da atividade destas enzimas foram influenciadas pela suplementação de cobre ($P = 0,0340$), enquanto os grupos suplementados com monensina apresentaram menores valores de creatinina quinase. Os resultados obtidos permitem concluir que a monensina interfere positivamente com o acúmulo hepático de cobre sendo que a suplementação deste aditivo pode predispor a quadros de intoxicações cúprica em ovinos.

Palavras-chave: Ionóforos. Intoxicação cúprica. Ruminantes. Aditivos promotores de crescimento

ABSTRACT

RODRIGUEZ, F. A. M. L. **Evaluation of monesin potential in the predisposition of liver cooper accumulation in sheep.** [Avaliação do potencial da monensina em predispor o acúmulo hepático de cobre em ovinos]. 2014. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The aim of this study was to verify if monensin can change the accumulation of cooper in the liver of sheep, in view of ionophores can alter the absorption, availability, tiissue distribution of many minerals in the body. Twenty four crossbred Dorper X Santa Inês lambs wiht mean age of 3 months and wheitgh 30 kg at the begining of trial recived a basal diete calculated by 2,75% of body wheigh of 50% concentrade (7,13 ppm of Cu) and 50% cost-cross hay (3,72 ppm of Cu) and 10 g of mineral salt (5,9 ppm of Cu). Lambs were randomly distributed in four groups: Control: basal diet, Mon Group reciving basal diet plus 30 mg of monensin; Cu group: basal diet plus 10 mg Cu B.W of CuSO₄.5H₂O solution; Group CuMon: basal diet plus 30 mg of monensin and 10 mg of Cu B.W. The exeperimental period lasted for fourteen weeks. Liver samples were obtined by liver biopsy initially and at the end by necropsy when lambs were slaughterd. Blood samples were obtained weekly for determination of biochemical, hematological and mineral. Statistical analysis using a 2x2 factorial was conducted considering the factors copper and monensin in the diet and the interaction between them to evaluate the hepatic copper at the beginning and at the end of the study. Only one of animal of group MonCu exhibit clinical sings of copper toxicosis. Copper concentrations in the liver at the beginning of the experiment ranged between 243,8 and 345,4 ppm with no difference between experimental groups. Mean concentrations and standard deviations in ppm of hepatic copper at the end of the experiment were 3,363 ± 576 for MonCu group; 2560 ± 524 for Cu group; 562 ± 168 for the Mon group and 2538 ± 131 for the control group. At the end of the study liver concentrations and total hepatic copper accumulation were influenced both by the amount of dietary copper ($P = 0.0001$) and of monensin ($P = 0.0003$). The groups supplemented with copper had reduced levels of hepatic iron ($P = 0.0287$) and increased concentrations of copper in the bile. The biochemical evaluation demonstrated elevated serum AST and GGT activity ($P < 0.05$) with Cu and MonCu from the eleventh week of the experiment compared to the control groups and Mon. The increased activity of these enzymes were influenced by copper supplementation ($P = 0.0340$), while group

monensin had lower values of creatinine kinase. The results indicate that monensin interferes positively with hepatic copper accumulation and supplementation of this additive can predispose cupric poisoning in sheep.

Keywords: Ionophore. Cupric toxicosis. Ruminant. Additive as growth promoter.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição bromatológica do feno de capim Coast-Cross e do concentrado comercial oferecido aos ovinos, durante o período experimental, São Paulo – 2014.....	30
Quadro 2 - Quantidade de macro e micro minerais por kg de sal mineral oferecido aos ovinos, durante o período experimental, São Paulo – 2014.....	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores médios do cobre hepático (ppm) em ovinos dos diferentes grupos experimentais no início e final do experimento - São Paulo - 2014	41
Gráfico 2 -	Atividade sérica média da GGT nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014.....	47
Gráfico 3 -	Atividade sérica média da AST (U/L) nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014.....	48
Gráfico 4 -	Atividade sérica média da CK (U/L) (30°) nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014	50
Gráfico 5 -	Concentração média de uréia sérica (mmol/L nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014	51
Gráfico 6 -	Concentração média da creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014	52
Gráfico 7 -	Correlação entre as concentrações de cobre e ferro hepático em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	57
Gráfico 8 -	Correlação entre as concentrações de cobre hepático e a atividade da GGT em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	58
Gráfico 9 -	Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo da GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos - São Paulo - 2014	59
Gráfico 10 -	Correlação entre as concentrações de cobre hepático e a atividade da AST em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	60
Gráfico 11 -	- Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos - São Paulo - 2014	61
Gráfico 12 -	Correlação entre a atividade da CK e AST em ovinos do grupo suplementado com monensina e cobre - São Paulo - 2014	62

Gráfico 13 - Correlação entre a atividade da CK e AST em ovinos do grupo suplementado com cobre - São Paulo - 2014	63
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração hepática de cobre (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	40
Tabela 2 -	Concentração média e desvio-padrão do cobre hepático (ppm) dos diferentes grupos experimentais no início e ao final do estudo - São Paulo - 2014	40
Tabela 3 -	Mediana do acúmulo hepático de cobre (ppm) dos grupos que receberam apenas dieta basal, sem suplementação adicional de cobre, com e sem adição de monensina sódica à dieta - São Paulo - 2014	41
Tabela 4 -	Concentração hepática de zinco (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	42
Tabela 5 -	Concentração hepática de ferro (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre – São Paulo - 2014.....	42
Tabela 6 -	Concentração de cobre biliar (PPM/mL) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre – São Paulo - 2014.....	43
Tabela 7 -	Concentração total de cobre biliar (mg/L) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	43
Tabela 8 -	Concentração de ferro biliar (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre – São Paulo - 2014.....	44
Tabela 9 -	Concentração de zinco (ppm) biliar em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	44
Tabela 10 -	Concentração sanguínea média de cobre sanguíneo ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	45
Tabela 11 -	Concentração sanguínea média de zinco sanguíneo ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	46
Tabela 12 -	Atividade (U/L) da enzima gama glutamiltransferase (GGT) (30°C) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre – São Paulo - 2014	46

Tabela 13 -	Atividade da enzima AST (U/L) (30°C) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	48
Tabela 14 -	Atividade da enzima CK (U/L) (30°) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	49
Tabela 15 -	Atividade da ureia (mmol/L) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	50
Tabela 16 -	Atividade da creatinina (μmol/L) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	51
Tabela 17 -	Valor Volume Globular Médio (%) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.	53
Tabela 18 -	Número de hemácias (μL) de ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	53
Tabela 19 -	Concentração da hemoglobina total (g/dL) de ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	54
Tabela 20 -	Número de leucócitos (μL) de ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	54
Tabela 21 -	Frequência cardíaca média em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	55
Tabela 22 -	Frequência Respiratória (mov/min) média em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.....	55
Tabela 23 -	Movimentos Ruminais médios em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014	56
Tabela 24 -	Temperatura média, em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre. São Paulo -2014	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES	22
3.2	UTILIZAÇÃO DA MONENSINA SÓDICA	23
3.3	INTERAÇÃO COBRE X MONENSINA SÓDICA	24
3.4	IMPORTANCIA BIOLÓGICA DO COBRE	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO	29
4.2	INSTALAÇÕES	31
4.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	31
4.4	DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL	32
4.5	COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS E ANÁLISES LABORATORIAIS	33
4.6	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	33
4.6.1	Determinação da atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST)	34
4.6.2	Determinação da atividade sérica de gama glutamiltransferase (GGT)	34
4.6.3	Determinação Concentração sérica de uréia	34
4.6.4	Determinação Concentração sérica de creatinina	34
4.7	COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO E BILE	35
4.8	DIGESTÃO ÁCIDA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	35
4.8.1	Digestão das amostras de fígado	35
4.8.2	Digestão das amostras de sangue total	36
4.9	EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS	37
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	39
5.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	39
5.2	CONCENTRAÇÃO DE MICROELEMENTOS NO FÍGADO	39
5.2.1	Concentração de cobre	39
5.2.2	Concentração de zinco	42
5.2.3	Concentração de ferro	42
5.3	CONCENTRAÇÃO DE MICROELEMENTOS NA BILE	43

5.3.1	Concentração de cobre	43
5.3.2	Concentração de ferro	44
5.3.3	Concentração de zinco	44
5.4	CONCENTRAÇÃO DE MICROELEMENTOS SANGUÍNEA	45
5.4.1	Concentração de cobre	45
5.4.2	Concentração de zinco	45
5.5	BIOQUÍMICA SÉRICA	46
5.5.1	Atividade da gama glutamil transferase (GGT)	46
5.5.2	Atividade da aspartato aminotransferase (AST)	47
5.5.3	Atividade da creatina quinase (CK)	49
5.5.4	Concentração sérica de uréia	50
5.5.5	Concentração sérica creatinina	51
5.6	VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS	52
5.6.1	Volume globular	52
5.6.2	Hemácias	53
5.6.3	Hemoglobina	53
5.6.4	Leucócitos	54
5.7	VARIÁVEIS CLÍNICAS	55
5.7.1	Frequência cardíaca	55
5.7.2	Frequência respiratória	55
5.7.3	Movimentos ruminais	56
5.7.4	Temperatura corporal	56
5.8	RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS	57
5.8.1	Concentração de cobre e ferro hepático	57
5.8.2	Concentração de cobre hepático e atividade da GGT	58
5.8.3	Concentração de cobre e atividade da AST	59
5.8.4	Atividade da CK e AST no grupo suplementado com monensina e cobre	61
5.5.5	Atividade da CK e AST no grupo suplementado com cobre	62
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos encontram-se nas diversas partes do mundo, participando do desenvolvimento social e econômico de países como Austrália e Nova Zelândia, no Brasil a espécie ovina como produtora de carne ocupa posição intermediária em relação as demais, sendo sua maior contribuição não no sentido quantitativo mas sim no sentido social, pois atua como meio efetivo de fixação do homem no campo.

Recentemente a atividade vem passando por profundas transformações, enquanto ainda persistem em muitas regiões processos produtivos tradicionais que mal remuneram os custos produtivos, em outras começam a emergir novas formas de organização influenciadas pelos modos de produção do agronegócio, com aumento de consumo das classes de rendas mais altas nos centros urbanos.

O mercado consumidor brasileiro não tem grande tradição no consumo de carne ovina, é influenciado pela sazonalidade da oferta e variação na qualidade do produto assim se faz mister melhorias nas condições de criação e abate, disponibilizando categorias mais jovens, de forma a mudar de maneira favorável a concepção dos consumidores.

Nesse contexto, a ovinocultura tem se expandido nesta última década nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil e mais recentemente na Região centro oeste. Com melhoras no sistema de criação para intensificar a produção de cordeiros para o abate. Esta prática leva ao aparecimento de várias enfermidades, sendo uma delas a intoxicação cúprica acumulativa (ICA) (RISSI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013).

Na intoxicação cúprica acumulativa o cobre vai gradativamente se depositando no fígado, e quanto maior for este armazenamento mais se pode afirmar que os animais serão susceptíveis a futuramente apresentarem a crise hemolítica de caráter superagudo. Outro fator importante em relação à susceptibilidade é a capacidade do ruminante de excretar cobre pela bile, através de sua ligação com a metalotioneína no fígado, quando comparado com monogástricos (COUSINS, 1985; LOPEZ-ALONZO et al., 2005).

O fígado é o órgão de eleição para a avaliação do acúmulo de cobre no organismo, pois este microelemento se deposita no interior dos hepatócitos em grandes quantidades, até que, quando as células chegam ao seu limite, todo o Cu é

liberado na corrente sanguínea, causando assim a crise hemolítica observada na intoxicação acumulativa (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; ORTOLANI, 2003).

Estudos clássicos demonstraram que os ovinos acumulam mais cobre no fígado que os demais ruminantes e que existem diferenças inclusive entre as diversas raças ovinas, sendo que algumas delas são mais predispostas a essa intoxicação (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; HUMANN-ZIEHANK et al., 2001; HAYWOOD et al., 2005). Estas variações observadas provam a variabilidade entre a absorção e excreção do Cu e a diferente susceptibilidade à ICA. Contudo, não se conhece profundamente qual o mecanismo de excreção e absorção de Cu e seus antagonistas que provoca esta diferença de susceptibilidade sendo que esta resposta é de fundamental importância no entendimento desta enfermidade.

A ICA provoca grandes prejuízos econômicos, pois a maioria dos animais acometidos é de alto valor e com grande potencial zootécnico. A intensificação do sistema de criação também trouxe para a ovinocultura a utilização dos antibióticos ionóforos, como a monensina sódica. Esta substância é um agente antimicrobiano produzida por várias cepas de *Streptomyces* sp as quais podem ter diferentes tipos de ação, prevenindo a coccidiose, além de modificar também a microbiota ruminal, melhorando o ganho de peso e a conversão alimentar. É o ionóforo mais utilizado na alimentação de ruminantes com seus incrementos na produtividade e sanidade animal extensamente demonstrado (RUSSEL; RYCHLIK, 2001).

Numerosos estudos apontam que ionóforos afetam a absorção aparente de certos minerais. Esta mudança na acumulação e distribuição de determinados íons na circulação sanguínea e tecidos podem sobrevir durante a suplementação com aditivos promotores de crescimento na alimentação animal.

A diferente afinidade dos ionóforos na sua seletividade por diferentes cátions, necessita de estudos que avaliem essa alteração em especial ao cátion cobre. A elevação na retenção de cobre pelo organismo em ovinos é de extrema relevância na hora de decidir ou não pela utilização deste antimicrobiano como aditivo alimentar, em razão do seu particular mecanismo de ação em determinados íons com mudanças fisiológicas no metabolismo mineral, fato esse que pode ter repercussão clínica decorrente de uma possível predisposição a ICA.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o potencial da monensina sódica em promover acúmulo de cobre no organismo e consequentemente no aumento da predisposição da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos.
- Determinar a concentração de cobre nos estoques hepáticos e o quadro clínico-laboratorial de ovinos jovens que recebam por um período relativamente prolongado dietas com teores normais ou altos de cobre, e suplementados ou não com monensina sódica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi elaborada a partir dos principais trabalhos e pesquisas realizadas com foco na intoxicação por cobre e aditivos promotores de crescimento, com enfoque para o ionóforo monensina sódica.

3.1 UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

Data de 1950 o início da utilização de antibióticos na nutrição de ruminantes, as evidências do uso de antibióticos em baixas dosagens como promotores de crescimento foram se sucedendo, de tal forma que em 1951 o Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aprovou o seu uso na alimentação animal sem prescrição veterinária (GONZALES et al., 2012).

Como as condições sanitárias da época eram inferiores quando comparadas as atuais, os resultados foram extremamente positivos, resultando em uma melhoria expressiva na eficiência alimentar dos animais. Nesse contexto antibióticos promotores de crescimento foram utilizados massivamente ao longo das últimas 5 décadas, propiciando um papel significativo no desenvolvimento da produção pecuária intensiva em muitos países.

De forma geral, os desafios contemporâneos enfrentados pela produção animal podem ser definidos, na necessidade de produzir grandes quantidades de alimento para abastecer a população mundial, os quais devem ser seguros para os consumidores e produzidos de forma ética do ponto de vista do bem-estar animal e do impacto ambiental. Filosoficamente, estes desafios servem para demonstrar o papel nobre da produção animal, entretanto em termos práticos estes desafios demonstram a dificuldade crescente em produzir alimentos de origem animal (THORNTON, 2010).

A transformação que vem ocorrendo na indústria de produção animal mundial é inquestionável. A atenção atribuída pelo público cresceu substancialmente, e a sua percepção mesmo que desinformada ou equivocada, influencia cada vez mais o que é aceitável, ou não, nos sistemas de produção. Simultaneamente, a competitividade

do mercado aumenta a pressão sobre os sistemas de produtivos, que passam a depender cada vez mais de níveis ótimos de desempenho.

Durante a última década, o papel dos antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento na emergência de bactérias resistentes em humanos vem sendo intensamente questionado (COLLINGNON et al., 2009).

Em função estas discussões e com base no princípio da precaução, diversos países determinaram a proibição desta forma de utilização dos antimicrobianos na produção animal.

O presumido aumento da incidência de infecções por bactérias resistentes a antimicrobianos em humanos constitui a justificativa fundamental para o questionamento da utilização destes promotores de crescimento. Uma grande quantidade de estudos epidemiológicos já foram realizados com o objetivo de determinar essa presumida associação, entretanto, até o momento não há evidência concreta dessa associação (PHILLIPS, 2004).

3.2 UTILIZAÇÃO DA MONENSINA SÓDICA

A resistência dos parasitas gastrointestinais aos diferentes princípios ativos, associada ao sistema intensivo de criação, resulta em alta contaminação das pastagens constituindo um grave problema para a criação ovinos. O confinamento de categorias mais sensíveis (cordeiros desmamados e ovelhas em lactação) pode ser uma importante alternativa para o controle destes parasitas. Porém, quando confinamos ovinos, tornamos exacerbado o problema de infecções por *Eimeria*, que é a causa mais comum de diarreia em pequenos ruminantes jovens, entre 3 semanas e 5 meses de idade. Os animais acometidos apresentam uma sensível diminuição no crescimento, devido a lesões irreversíveis na mucosa intestinal, acarretando em perdas econômicas expressivas, além de levar o animal à morte em alguns casos (AMARANTE et al., 1993).

A monensina sódica, um componente biologicamente ativo produzido pelo *Streptomyces cinnamonensis*, pertence à classe geral de compostos denominados ionóforos (HANEY JR; HOEHN, 1967), e é descrita como efetiva no controle da coccidiose ovina, tanto natural quanto induzida artificialmente, apresentando também

efeito de promotor de crescimento. Originalmente a monensina foi usada como coccidiostático em rações de aves. A monensina é o ionóforo mais conhecido até o momento, quanto aos seus efeitos sobre o padrão de fermentação ruminal e suas consequências na produção animal (SPEARS, 1990). A concentração de monensina sódica na dieta total dos cordeiros pode ser ao redor de 30 ppm (AFONSO et al., 2002).

Estudo realizado por Schelling (1984) propôs sete modos de ação, através dos quais, a monensina melhora o desempenho de ruminantes: modificação na produção de ácidos graxos voláteis; alteração no consumo de alimentos; alteração na produção de gases; modificação na digestibilidade dos alimentos; alteração no enchimento do rúmen e na taxa de passagem; alteração na utilização de proteína; outros modos de ação.

Os efeitos da monensina sobre a fermentação ruminal são devido à mudanças na microbiota ruminal (RUSSEL; RYCHLIK, 2002), onde as bactérias gram-positivas produtoras primárias de acetato, butirato e H_2 , são inibidas em presença de monensina. As espécies gram-negativas, muitas das quais produzem succinato, que é o precursor do propionato são mais resistentes. As bactérias metanogênicas são diretamente inibidas, através da utilização de H_2 metabólico para a produção de propionato por outras bactérias, diminuindo assim a produção de metano (BERGEN; BATES, 1984).

3.3 INTERAÇÃO COBRE X MONENSINA SÓDICA

Os ionóforos, como a monensina, ligam-se a cátions mono e divalentes, formando complexos diméricos lipossolúveis que facilitam a passagem dos íons metálicos através de membranas biológicas (ELSASSER, 1984). A afinidade do ionóforo pelo íon metálico varia, assim como a taxa de transporte do complexo dimérico através de membranas celulares, influenciada em parte pelo ambiente onde ocorre a ligação além de outros fatores físicos. O cobre, ao se dissociar, é um íon divalente, e por isso tem seu fluxo, através de membranas celulares, alterado pela monensina. Este fenômeno já foi registrado por alguns pesquisadores, onde o teor de

cobre em alguns tecidos foi significativamente maior em animais que receberam monensina.

De acordo com Elsasser (1984), a disponibilidade do cobre ingerido para absorção intestinal em ovinos eleva-se quando é realizada suplementação dietética de monensina. O referido autor encontrou teores hepáticos de cobre mais elevados em ovinos que receberam monensina ($198,6 \pm 42,4$ ppm), quando comparados com animais que não foram suplementados com este ionóforo ($136,0 \pm 18,1$). Em outro estudo, garrotes suplementados com monensina apresentaram teores séricos de cobre superiores ao de animais que não receberam o suplemento (100 e 93 $\mu\text{g}/100$ ml, respectivamente) (STARNES et al., 1984), mas os autores não conseguiram determinar qual a causa deste aumento deste cobre sérico.

Em um estudo utilizando cama de frango e monensina, observou-se também um maior acúmulo de cobre hepático em ovinos que receberam monensina (VAN RYSEN, 1991). Ivan et al. (1992) mostraram que ovinos suplementados com monensina apresentaram uma maior solubilidade de cobre no conteúdo ruminal, e um maior teor sérico e hepático de cobre, em animais com deficiência de flora ruminal.

Entretanto, foi realizado um estudo que mostrou que a adição de monensina não alterou a absorção aparente ou retenção de cobre (KIRK et al., 1994). Em todos os grupos estudados, a absorção aparente de cobre foi aproximadamente 95% do cobre total ingerido. Contudo, a quantidade de cobre ingerida diariamente pelos animais era baixa, não sendo suficiente para realizar um desafio de maior absorção deste elemento.

Nesse contexto, o potencial da monensina sódica precisa ser melhor avaliada quanto a influencia na absorção e retenção de cobre pelos ovinos, e consequente aumento na predisposição destes a apresentar intoxicação cúprica acumulativa, principalmente quando a monensina é oferecida conjuntamente com uma dieta rica em concentrados contendo cobre altamente disponível.

3.4 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO COBRE

O cobre é requerido para o normal funcionamento de plantas, animais e muitos microrganismos para uma vasta gama de processos metabólicos, podendo ser considerado um protótipo para a emergência de importantes sistemas funcionais

biológicos. Como metal maleável, é amplamente utilizado pra fins domésticos e industriais pelo homem além de medicinais. Egípcios e chineses por exemplo utilizavam com esta finalidade terapêutica 2000 anos atrás. Foram os gregos os primeiros a descobrir o cobre na ilha de Kyprus, etimologicamente sua origem é pelo fato dos romanos chamarem a ilha de Chipre (Kyprus), que detinham grandes quantidades deste metal (INTERNATIONAL COOPER ASSOCIATION, 1995).

A atuação e a importância do cobre em sistemas enzimáticos no metabolismo dos ruminantes já são bem conhecidas. O cobre tem como característica a facilidade de se oxidar ou reduzir, fundamental para as 26 metaloenzimas cúpricas que catalisam reações de óxido-redução. Também está presente em algumas metaloproteínas como a ceruloplasmina, que regula a atividade da transferrina, e a metalotioneína, que entre outras funções regula a absorção do próprio cobre pelo organismo. (ORTOLANI; MINERVINO, 2010).

O excesso ou a falta de cobre, semelhante a outros macro e microelementos, pode provocar a intoxicação como a carência em animais, respectivamente. Dentre as espécies domésticas, sem dúvida a ovina é a mais predisposta a desenvolver tanto o quadro carencial como a intoxicação. Estes quadros estão ligados a diferenças marcantes no metabolismo do cobre segundo a raça de ovinos, pois enquanto algumas têm menores capacidades de retenção do cobre em seus estoques orgânicos, outras o acumulam em demasia (ORTOLANI; MINERVINO, 2010). Também é reconhecido que ovinos jovens em crescimento são muito mais susceptíveis a desenvolverem quadros de intoxicação por cobre, pois podem absorver o cobre dietético de duas a três vezes mais eficientemente que os adultos (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

O cobre disponível nos alimentos é absorvido principalmente no intestino delgado, sendo que para tal o cobre solúvel liga-se a determinados aminoácidos que funcionam como carreadores de cobre para o interior do organismo. Após entrar no interior do organismo o cobre se liga a albumina, sendo levado ao fígado, principal local de estoque. A partir do fígado, o cobre pode ter três destinos: integrar o estoque hepático no interior dos hepatócitos; permanecer no estoque temporário ligado a ceruloplasmina; ou ser excretado principalmente pela secreção biliar (COUSINS, 1985).

A disponibilidade do cobre dietético também está intimamente ligada à forma química com que o cobre se acha presente no alimento. Quando o elemento se

apresenta na forma metálica a disponibilidade é muita baixa, já quando se combina com proteínas ou aminoácidos a absorção pode estar algumas vezes aumentada, e sendo muito alta na forma de sal (sulfato, carbonato, edato etc). Curiosamente, os capins in natura apresentam o cobre na forma metálica, enquanto que o processo de fenação ou ensilagem do mesmo capim faz com que parte deste elemento se combine com proteínas (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

A patogenia da intoxicação cúprica acumulativa (ICA) em ovinos tem uma sequência determinada de eventos bioquímicos, apresentando duas fases distintas: pré-hemolítica e hemolítica. No decorrer de meses ou mesmo anos após a ingestão de dietas ricas em cobre vai ocorrendo o acúmulo do mesmo no organismo, principalmente nos hepatócitos periféricos à veia central e na zona pericanular. Com o aumento do acúmulo nos hepatócitos, a distribuição do cobre se modifica nas células. Em condições normais este microelemento está em maior quantidade dentro do núcleo, mas com o acúmulo ele passa a ser estocado também nos lisossomos, os quais aumentam de tamanho e número dentro das células hepáticas. Quando os estoques hepáticos de cobre ultrapassam um determinado limite, geralmente superior a 1400 ppm, pode ocorrer um rompimento dos lisossomos provocando necrose intracelular, podendo resultar em morte celular de um número muito mais alto de hepatócitos, ocorrendo uma súbita liberação do elemento livre cobre para o organismo, que em pouco tempo migra aos eritrócitos provocando intensa hemólise e severos danos renais, que constituem a principal causa mortis (LE MOS, 1997; HEADLEY, 2008; ORTOLANI; MINERVINO, 2010).

Na maior parte da fase pré-hemolítica não há quaisquer sinais clínicos. A partir da ocorrência da hemoglobinúria, sinais clínicos como anorexia, depressão, fraqueza, taquipnéia, mucosas ictéricas tornam-se evidentes nos ovinos intoxicados (LE MOS et al., 1997; ELGERWI et al., 1999).

Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul a partir de 618 necropsias demonstrou-se que a ICA é considerada a 2ª principal causa de morte em rebanhos ovinos com 15,5%, depois das gastroenterites parasitárias (16,5%) (RIBEIRO, 2000). Geralmente, os ovinos acometidos pela ICA são de alto valor econômico, para não dizer também de grande potencial zootécnico, o que torna os prejuízos da intoxicação ainda mais significativos (ORTOLANI; MINERVINO, 2010).

O aumento na incidência da ICA no decorrer das últimas décadas está ligada às mudanças de manejo realizadas pelos ovinocultores, os quais têm fornecido a seus

rebanhos dietas com altos teores de cobre, em especial com o uso de sais minerais formulados para bovinos, que contém até 5000 ppm deste elemento. Associa-se também o fato, na grande maioria dos casos, dos criadores alimentarem os ovinos com altas quantidades de rações concentradas, a base de grãos como o trigo, milho e soja. Embora a quantidade de cobre presente nestes alimentos não seja tão alta, a sua disponibilidade o é, pois o cobre está ligado às proteínas facilitando a sua absorção pelos ovinos (ORTOLANI et al., 2004). Além de que esses concentrados ricos em energia são muito pobres em molibdênio e enxofre, antagonistas do cobre, aumentando ainda mais a disponibilidade do cobre neles presente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos abordarão os temas relacionados ao manejo e execução deste trabalho, assim como as metodologias empregadas para análise estatística.

4.1 ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados 24 ovinos, machos, meio sangue Dorper x Santa Inês, pesando em média 32 kg. Os carneiros foram vermifugados três vezes consecutivas com intervalo de 20 dias entre cada aplicação, sendo utilizado a Moxidectina (Cydectin®, Zoetis, São Paulo, Brasil) injetável a 1% na dose de 1 mL para 50 kg de peso vivo na primeira e terceira aplicação, sendo usado para a segunda vermifugação cloridrato de levamisol a 5% (Ripercol® oral, Zoetis, São Paulo, Brasil) via oral na dose de 1 mL para cada 10 kg e peso vivo. Tal protocolo garantiu a completa eliminação dos endoparasitas, comprovada por exame copro-parasitológico posterior a vermifugação.

Assim que foram adquiridos os animais receberam aplicação de polivitamínico mineral via subcutânea (Potenay® injetável, Zoetis, São Paulo, Brasil) na dose de 5 mL por animal e passaram a ser alimentados com dieta composta de feno de capim coast-cross e ração comercial (FriRib - ovinos 16/70, Nutreco Brasil Nutrição Animal Ltda, São Paulo, Brasil) para ovinos com 16% de proteína bruta além de sal mineral (Ovinofós®, Tortuga, Mairinque, São Paulo, Brasil) específico para a espécie na dosagem de 10g/cordeiro, correspondente a 5,9 ppm/Cu/dia.

A quantidade total de matéria seca (MS) oferecida foi correspondente a 2,75% do peso corpóreo, corrigida no decorrer do experimento, sendo constituída de 50% de concentrado comercial e 50% de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylum*), sendo esta a dieta basal, totalizando um consumo de 11 ppm de Cu na alimentação em conjunto com 5,9 ppm do sal mineral, somando 16,9 ppm de Cu/dia.

O quadro 1 apresenta a composição bromatológica dos alimentos oferecidos.

Quadro 1 - Composição bromatológica média e de macro e microelementos nos alimentos oferecidos aos ovinos durante o experimento - São Paulo - 2014

COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA	FENO	CONCENTRADO
% MS (matéria seca)	86,8	87,0
% FB (fibra bruta)	32,4	16,0
% PB (proteína bruta)	7,8	16,0
% EE (extrato etéreo)	1,8	2,0
% MM (matéria mineral)	6,3	16,0
% ENN (extrato não nitrogenado)	51,7	52,0
Cobre (ppm)	3,72	7,13
Ferro (ppm)	127,34	774,0
Zinco (ppm)	33,75	133,58
Molibdênio (ppm)	0,02	0,52
Enxofre (ppm)	0,06	0,20

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Quadro 2 – Quantidade de macro e micro minerais por kg de sal mineral oferecido aos ovinos durante o experimento - São Paulo - 2014

COMPOSIÇÃO	SAL MINERAL
Cálcio (%)	12,0
Fósforo (%)	8,7
Sódio (%)	147,0
Enxofre (mg/kg)	1,8
Cobre (mg/kg)	590,0
Molibdênio (mg/kg)	300,0
Zinco (mg/kg)	3800,0
Ferro (mg/kg)	1.800,0
Cobalto (mg/kg)	40,0
Iodo (mg/kg)	80,0
Flúor (mg/kg)	880,0
Manganês (mg/kg)	1.300,0
Selênio (mg/kg)	15,0

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

4.2 INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado nas dependências do Centro de Pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade de São Paulo - USP. Os animais foram mantidos em baias coletivas contendo bebedouro plástico com alimentação automática e cochos coletivos, sendo seis animais alojados em cada baia.

4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Após um período de dois meses de adaptação os animais foram submetidos a biópsia hepática e implantação de cânula ruminal segundo metodologia Mohamed Nour et al. (1998). Para otimizar os procedimentos, resguardar os animais de dois pós-operatórios e reduzir gastos com medicamentos, a biópsia de fígado inicial foi realizada juntamente com a cirurgia para implantação da cânula ruminal, conforme os procedimentos relatados a seguir:

Foi realizada tricotomia nos flancos direito (na região caudal à última costela no terço médio e superior) e esquerdo (na fossa paralombar esquerda) e assepsia do local com álcool iodado na concentração de 5%. Posteriormente, os animais foram tranquilizados com cloridrato de xilazina e anestesiados com quetamina na dose recomendada pelo fabricante.

Para execução da biópsia hepática, utilizou-se técnica descrita por Minervino et al. (2009). Foi realizada laparotomia com incisão dorso ventral de 10 cm no flanco direito do animal, caudal a 12ª costela. A biópsia hepática foi executada por meio do pinçamento do bordo do lobo caudal do fígado com uma pinça de Doyen. Após 5 minutos de hemostasia mecânica, o segmento pinçado foi seccionado e retirado. Procedeu-se o fechamento da cavidade abdominal com três linhas de sutura, como de rotina.

Em todas as feridas cirúrgicas, após cada linha de sutura, foi realizada aplicação de Terramicina associada a Dexametazona (Terracotril Spray®, Zoetis, São Paulo, Brasil) para reduzir o risco de reação inflamatória local. Nas duas semanas

posteriores as cirurgias, foi realizado curativo spray cicatrizante comercial o que permitiu uma cicatrização rápida e impediu a ocorrência de miíases nas feridas cirúrgicas.

No dia da cirurgia foi feita aplicação de antibiótico e antiinflamatório (Oxitetraciclina e Diclofenaco) em formulação de longa ação (Reverin® LA, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) em via intramuscular, com repetição da mesma dosagem após 72 horas, ficando os animais sob efeito do medicamento por seis dias.

4.4 DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Este experimento seguiu um delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema multifatorial (2 x 2) (cobre dietético basal e alto e suplementação com e sem monensina sódica. Os 24 ovinos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, de seis animais cada, e receberam os seguintes tratamentos dietéticos:

- 1- GRUPO CONTROLE – Recebeu dieta basal e 10 g/dia de sal mineral;
- 2- GRUPO MONENSINA - Dieta basal e 30ppm de monensina sódica/ dia administrada diretamente no rúmen;
- 3- GRUPO COBRE - Dieta basal acrescida de 10 mg/kg P.V./dia de cobre, na forma de solução de sulfato de cobre pentahidratado administrada diretamente no rúmen;
- 4- GRUPO COBRE COM MONENSINA - Dieta basal acrescida de 30ppm de monensina sódica/dia e 10 mg/kg P.V./dia de cobre, na forma de solução de sulfato de cobre pentahidratado administrada diretamente no rúmen.

Os animais do grupo monensina receberam 30ppm de monensina sódica (Rumensin 100®, Elanco, Indianápolis, Estados Unidos) segundo recomendações de Afonso et al. (2002).

Os animais receberam essas dietas no decorrer de 14 semanas. Todos os animais foram pesados uma vez por semana no decorrer do experimento em balança para pequenos ruminantes (Modelo ICS-300, Coima®, São Paulo, Brasil) com capacidade para 300 kg e sensibilidade de 100 gramas.

4.5 COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS E ANÁLISES LABORATORIAIS

Os animais foram observados diariamente no decorrer do experimento. Amostras de sangue foram coletadas semanalmente durante o período experimental por meio de venopunção jugular, em tubos siliconados de coleta a vácuo (Vacutainer®, BD, São Paulo, Brasil), com heparina para obtenção de sangue total para a análise de microelementos minerais, com EDTA para análises hematológicas e sem anticoagulantes para obtenção de soro. As amostras de soro e sangue total heparinizado foram acondicionadas em tubos plásticos tipo eppendorf® e congeladas à temperatura de -20°C até o momento da análise.

As amostras de sangue coletas em tubos com EDTA, foram utilizadas para realização do hemograma em aparelho hematológico Mindray BC 2800 Vet® (São Paulo, Brasil).

4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Amostras de soro foram utilizadas para as determinações bioquímicas segundo metodologias abaixo descritas.

4.6.1 Determinação da atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST)

A concentração sérica da AST foi determinada no analisador bioquímico automático (modelo Daytona, Randox®, São Paulo, Brasil). Os resultados das atividades das enzimas foram determinados em 30°C, segundo recomendação de Kaneko et al. (1997).

4.6.2 Determinação da atividade sérica de gama glutamiltransferase (GGT)

A concentração sérica da GGT foi determinada no analisador bioquímico automático (modelo Daytona, Randox®, São Paulo, Brasil). Os resultados das atividades das enzimas foram determinados em 30°C, segundo recomendação de Kaneko et al. (1997).

4.6.3 Determinação Concentração sérica de ureia

A concentração sérica de ureia foi determinada no analisador bioquímico automático (modelo Daytona, Randox®, São Paulo, Brasil).

4.6.4 Determinação Concentração sérica de creatinina

A concentração de creatinina foi determinada no analisador bioquímico automático (modelo Daytona, Randox®, São Paulo, Brasil).

4.7 COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO E BILE

Após a retirada de fragmento hepático por procedimento cirúrgico, o mesmo foi acondicionado em tubo plástico tipo KMA e congelada a 80°C negativos. Ao final do experimento, durante o abate dos animais, o mesmo procedimento foi adotado para obtenção de outro fragmento hepático. Durante o procedimento cirúrgico foi retirado também 1mL de bile da vesícula biliar com auxílio de uma agulha acoplada a seringa, após esta punção foi realizado sutura para evitar possível derramamento da bile. Ao final do experimento foi coletado uma nova alíquota de bile na mesma quantidade. As amostras de bile foram armazenadas em tubos KMA e refrigeradas a 80°C até o momento da digestão para dosagem de cobre, ferro e zinco.

4.8 DIGESTÃO ÁCIDA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para determinação das concentrações dos elementos minerais no sangue total, fígado e bile, as amostras orgânicas foram digeridas até a obtenção de solução líquida, sem a presença de partículas que podem entupir os capilares do espectrômetro e assim impedir a leitura.

4.8.1 Digestão das amostras de fígado

Para digestão das amostras de fígado, optou-se pela realização de digestão nítrico-perclórica em sistema aberto. Após o descongelamento em temperatura ambiente de cada amostra orgânica, a mesma foi subdividida, quando necessário, em pequenos pedaços, sendo estes acondicionados em vidros de relógio, devidamente identificados e levados a estufa a 102°C por 24 horas. Após a secagem, esperavam-se as amostras esfriarem e então eram pesadas entre 0,2 e 0,4 g de amostra seca, usando balança de alta precisão. Esta sub-alíquota, era transferida para tubos de vidro

de 150 x 21 mm, onde foram adicionados 5 mL de uma solução de ácidos nítrico e perclórico, na proporção de 4:1, ambos os ácidos P.A.

Os tubos com as amostras e a solução de ácidos foram deixados em capela ventilada por 12 horas (overnight), sendo então iniciado o processo de digestão. Para tal os tubos foram acondicionados em bloco digestor, o qual foi acionado a uma temperatura inicial de 70 °C por duas horas, para que caso ainda existisse alguma partícula sólida de tecido, esta fosse prontamente solubilizada. Após este período, aumentou-se a temperatura para 150 °C e manteve-se assim até que a digestão estivesse concluída, que ocorria quando todo o ácido evaporava e restava apenas a matéria mineral, no fundo do tubo, que deve sempre apresentar coloração branca. Quando, após a evaporação do ácido, se tem uma coloração escura no tubo, se deve repetir o processo, pois ainda resta matéria orgânica a ser digerida, entretanto, em nossas amostras, não foi necessário repetir o processo, sendo que já no primeiro ciclo todas as amostras estavam em excelentes condições.

Após a digestão é adicionado em cada tubo 20 mL de uma solução de ácido clorídrico a 0,1 N. A solução então é homogeneizada vigorosamente e depois acondicionada em dois tubos tipo falcon® de 15 mL de capacidade, sendo colocado 10 mL de solução em cada tubo, tendo-se então duas alíquotas iguais da mesma amostra para leitura, analisando-se uma e a outra ficando de contra-prova. Foram determinadas as concentrações de cobre, zinco e ferro hepáticos, segundo recomendações de Lopez-Alonso et al. (2006), por espectrofotometria óptica por emissão de plasma (ICP-OES, Varian®, São Paulo, Brasil).

4.8.2 Digestão das amostras de sangue total e bile

Para as amostras de sangue total, coletadas com uso de anticoagulante heparina, assim como a bile o processo de digestão foi semelhante ao utilizado no item 4.9.1, excluindo-se a fase de secagem. Assim as amostras, após descongelamento, foram pesadas diretamente nos tubos de digestão, sendo pesada sempre uma alíquota de 1 mL de amostra, sendo considerado então o peso da amostras para determinação das concentrações de elementos minerais na matéria fresca. Após a digestão é adicionado em cada tubo 10 mL de uma solução de ácido

clorídrico a 0,1 N. A solução então é homogeneizada vigorosamente e depois acondicionada em tubos tipo falcon® de 15 mL de capacidade para posterior determinação dos elementos minerais. Nas amostras de sangue foram determinadas as concentrações de cobre e zinco, enquanto nas de bile foi determinado os teores de cobre, zinco e ferro, segundo recomendações de Lopez-Alonso et al. (2006), por espectrofotometria óptica por emissão de plasma (ICP-OES, Varian®, São Paulo, Brasil).

4.9 EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS

No exame físico semanal, avaliou-se a frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura e qualquer outra alteração clínica que por ventura ocorresse, segundo recomendações descritas por Radostitis et al. (2005).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi processada com auxílio do programa estatístico SAS 9.3 (2012). Os dados foram analisados considerando o desenho experimental como randomizado em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem suplementação com monensina x com e sem suplementação com cobre) pelo procedimento PROC GLM do SAS. Para serem submetidos a análise fatorial os dados foram avaliados quanto a sua distribuição, pela prova de Kolmogorov-Smirnov, sendo considerados dados com distribuição normal aqueles que tiveram $p > 0,05$ neste teste. Na análise fatorial foi avaliado o efeito da suplementação ou não com cobre e monensina, assim como a interação entre os fatores. Quando não houve interação entre os fatores, as medias dos grupos experimentais foram comparadas pelo teste de medias de Tukey. Os dados do acúmulo de cobre e ferro hepático não obedeceram à distribuição normal e foram submetidos ao teste não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre a concentração de cobre inicial e a final foi realizada por teste T, enquanto a

comparação entre os grupos nos momentos supracitados foi realizada por teste ANOVA.

Foi utilizado na análise fatorial os dados da 10^a, 11^a, 12^a, 13^a e 14^a para os microelementos sanguíneos (cobre e zinco), GGT, AST, CK, ureia, creatinina, volume globular, número de hemácias, hemoglobina total e número de leucócitos.

Tanto na análise fatorial como no teste não paramétrico de Wilcoxon, foram consideradas significativas as diferenças cujo valor de “p” apresentou valores iguais ou inferiores a 0,05. No estudo da relação entre duas variáveis foram calculados os coeficientes de correlação e obtidas às equações de regressão. Ficou estabelecido que existiu uma correlação de alta intensidade entre as variáveis quando $r \geq 0,60$; média intensidade quando $0,30 < r < 0,60$; e de baixa intensidade quando $r \leq 0,30$, considerando também que o nível de significância obtido nas correlações seja igual ou inferior a 5% .

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o experimento estão expressos por meio das médias, desvios padrão e medianas dos valores obtidos para as diferentes variáveis estudadas, e foram alocados em tabelas e gráficos com a finalidade de facilitar a leitura deste capítulo.

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Ao final do período experimental, nenhum animal apresentou quadro clínico de ICA, o que foi em virtude da adaptação do modelo experimental justamente por questões de bioética em pesquisa, para evitar o surgimento de quadro clínico desta enfermidade que causa sofrimento ao animal.

Entretanto, após a eutanásia dos animais, foi verificada alterações macroscópicas em um animal do grupo suplementado com monensina e cobre constatando-se intensa coloração amarelada em toda carcaça, em especial nas serosas, com o fígado de coloração laranja-amarelada, rins enegrecidos e presença de urina denotando hemoglobinúria. Tal icterícia e demais alterações são sugestivas da crise hemolítica da intoxicação cúprica acumulativa.

5.2 CONCENTRAÇÃO DE MICROELEMENTOS NO FÍGADO

Na secção abaixo apresentação dos minerais: cobre, zinco, ferro hepáticos

5.2.1 Concentração de cobre

A análise fatorial mostrou que a concentração de cobre hepática foi influenciada pela presença tanto de cobre como de monensina isoladamente, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Concentração hepática de cobre (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	Mon	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	253 ^c	562 ^c	407,5 ^B	0,0003	0,0001	0,2181
	+ Cu	2560 ^b	3363 ^a	2961,8 ^A			
Media		1339,7 ^B	1855,1 ^A				

Nota: Letras maiúsculas indicam diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina, enquanto letras minúsculas significam diferença entre tratamentos.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Verifica-se na tabela 2 que não existiu diferença entre os teores de cobre hepáticos no momento inicial ($P < 0,001$) entre os animais dos quatro grupos. O grupo Mon+Cu teve concentração hepática de cobre superior aos demais grupos, inclusive o tratamento que recebeu alta dose de cobre ($P < 0,001$).

Tabela 2 - Concentração média e desvio-padrão do cobre hepático (ppm) dos diferentes grupos experimentais no início e ao final do estudo - São Paulo - 2014

Grupos	N	Cobre hepático (ppm)			
		Início		Final	
		M	DP	M	DP
1 – Controle	6	243,8 ^{Aa}	142,1	253 ^{Ad}	131,3
2 – Monensina	6	291,2 ^{Ba}	114,5	562 ^{Ac}	167,8
3 – Cobre	6	310,7 ^{Ba}	117,6	2560 ^{Ab}	524,3
4 – Mon. + cobre	6	345,4 ^{Ba}	104,3	3363 ^{Aa}	575,9

Nota: Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa por ANOVA e teste T de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T pareado ($P < 0,05$).

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Gráfico 1 – Valores médios do cobre hepático (ppm) em ovinos dos diferentes grupos experimentais no início e final do experimento - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Para uma melhor avaliação dos efeitos da monensina, foi calculado o acúmulo de cobre no fígado dos animais, subtraindo-se o valor de cobre hepático no início do estudo do valor obtido ao final do experimento. A tabela 3 apresenta os resultados em mediana do acúmulo hepático de cobre nos ovinos dos diferentes grupos. O grupo controle foi inferior ao monensina, o qual foi menor que o cobre alto que por sua vez foi inferior ao cobre e monensina ($P < 0,04$).

Tabela 3 - Mediana do acúmulo hepático de cobre (ppm) dos grupos que receberam apenas dieta basal, sem suplementação adicional de cobre, com e sem adição de monensina sódica à dieta. São Paulo, 2014

Grupos	Acúmulo de Cu no fígado (ppm)
	Mediana
1 – Controle negativo	20,6 ^d
2 – Monensina	197 ^c
3 – Cobre	2.314 ^b
4 – Monensina + cobre	2.746 ^a

Nota: Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Análise estatística realizada por meio de teste não paramétrico de Wilcoxon.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.2.2 Concentração de zinco

As concentrações de zinco não foram influenciadas pela presença ou ausência de monensina e cobre na dieta (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração hepática de zinco (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	101	108	105,1	0,5677	0,3072	0,9866
	+ Cu	90	96	93,0			
Media		96,1	103,2				

Nota: Letras maiúsculas indicam diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina, enquanto letras minúsculas significam diferença entre tratamentos.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.2.3 Concentração de ferro

A concentração de ferro hepático foi menor nos animais que receberam suplementação com cobre, não sendo observada influência da suplementação de monensina ou da interação destas variáveis nas concentrações de ferro hepático (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração hepática de ferro (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	527 ^a	314 ^{ab}	385,0 ^A	0,1274	0,0287	0,2502
	+ Cu	254 ^b	223 ^b	237,4 ^B			
Media		345,2	265,0				

Nota: Letras minúsculas significam diferença entre tratamentos, enquanto letras maiúsculas diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.3 CONCENTRAÇÃO DE MICROELEMENTOS NA BILE

Na secção abaixo concentração de cobre, zinco e ferro na bile

5.3.1 Concentração de cobre

A concentração de cobre no líquido biliar assim como a concentração total de cobre biliar foi influenciada pela suplementação de cobre na dieta (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Concentração de cobre biliar (ppm/mL) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	0,55	0,48	0,51 ^B	0,0915	0,0002	0,4781
	+ Cu	0,86	0,71	0,78 ^A			
Media		0,72	0,60				

Nota: Letras maiúsculas significam diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Tabela 7 - Concentração total de cobre biliar (mg/L) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	1,52	1,43	1,47 ^B	0,8254	0,0175	0,9299
	+ Cu	2,20	2,16	2,18 ^A			
Media		1,93	1,80				

Nota: Letras maiúsculas significam diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.3.2 Concentração de ferro

A concentração de ferro na bile não foi alterada pela suplementação ou não com monensina ou cobre (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração de ferro biliar (ppm) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina		Media	P		
		0ppm	30ppm		M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	0,94	0,43	0,60	0,5171	0,4253	0,0511
	+ Cu	0,70	0,97	0,84			
Media		0,78	0,70				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.3.3 Concentração de zinco

A concentração de zinco biliar não foi alterada pela suplementação ou não com monensina ou cobre (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração de zinco (ppm) biliar em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina		Media	P		
		0ppm	30ppm		M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	0,26	0,68	0,55			
	+ Cu	0,58	1,17	0,87	0,1978	0,2966	0,8408
Media		0,47	0,91				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.4 CONCENTRAÇÃO DE MICROELEMENTOS SANGUÍNEA

Na secção abaixo concentração sanguínea dos minerais cobre e zinco.

5.4.1 Concentração de cobre

Não houve alterações das concentrações de cobre sanguíneo nos diferentes grupos (Tabela 10).

Tabela 10 - Concentração sanguínea média de cobre sanguíneo ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	10,0	11,0	10,5	0,4656	0,4132	0,1829
	+ Cu	12,0	11,5	11,7			
Media		11,0	11,2				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.4.2 Concentração de zinco

O zinco sérico não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 11.

Tabela 11 - Concentração sanguínea média de zinco sanguíneo ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	3,5	2,9	3,2	0,0979	0,6789	0,3356
	+ Cu	3,4	3,2	3,3			
Media		3,4	3,1				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.5 BIOQUÍMICA SÉRICA

Na secção abaixo variáveis bioquímicas: GGT, AST, CK, ureia e creatinina

5.5.1 Atividade da gama glutamiltransferase (GGT)

A partir da 11ª semana do experimento observaram-se alterações da atividade da GGT nos grupos suplementados com cobre (Tabela 12 e Gráfico 2).

Tabela 12 - Atividade da enzima gama glutamiltransferase (GGT) (30° C) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	25,1 ^b	25,1 ^b	25,1 ^B	0,7576	<0,0001	0,7704
	+ Cu	55,4 ^a	58,9 ^a	53,9 ^A			
Media		36,9	38,2				

Nota: Letras minúsculas significam diferença entre tratamentos, enquanto letras maiúsculas significam diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Gráfico 2 - Atividade sérica média da GGT nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.5.2 Atividade da aspartato aminotransferase (AST)

Os grupos que receberam dieta rica em cobre apresentaram uma elevação significativa da atividade sérica média da AST a partir da 11^a semana, em relação aos grupos que receberam dieta com teores normais de cobre (Tabela 13).

Tabela 13 - Atividade da enzima AST (U/L) (30°C) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	73,3 ^b	57,3 ^b	65,1 ^B	0,0625	0,0001	0,8136
	+ Cu	115,5 ^a	103,0 ^a	108,9 ^A			
Media		91,9	78,6				

Nota: Letras minúsculas significam diferença entre tratamentos, enquanto letras maiúsculas significam diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

O gráfico 3 apresenta a atividade sérica média da AST no decorrer do estudo.

Gráfico 3 - Atividade sérica média da AST (U/L) nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.5.3 Atividade da creatina quinase (CK)

Na análise fatorial observou-se efeito da monensina, sendo que os grupos suplementados com este aditivo apresentaram menores valores da atividade da enzima CK, como mostra a tabela 14 e gráfico 4.

Tabela 14 - Atividade da enzima CK (U/L) (30°) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	107,2 ^b	97,8 ^b	101,9	0,0340	0,5200	0,7600
	+ Cu	108,6 ^a	101,4 ^a	104,9			
Media		108,0 ^A	99,7 ^B				

Nota: Letras minúsculas significam diferença entre tratamentos, enquanto letras maiúsculas significam diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Gráfico 4 – Atividade sérica média da CK (U/L) (30°) nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.5.4 Concentração sérica de ureia

A concentração de ureia foi influenciada tanto pela suplementação de monensina como pela suplementação de cobre (Tabela 15 e Gráfico 5).

Tabela 15 - Atividade da ureia (mmol/L) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	2,89 ^b	3,83 ^{ab}	3,36 ^B	0,0052	0,0172	0,6967
	+ Cu	3,67 ^{ab}	4,93 ^a	4,30 ^A			
Media		3,28 ^B	4,38 ^A				

Nota: Letras minúsculas significam diferença entre tratamentos, enquanto letras maiúsculas diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Gráfico 5 - Concentração média de ureia sérica (mmol/L nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento) - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.5.5 Concentração sérica de creatinina

A concentração de creatinina foi influenciada pela suplementação com cobre (Tabela 16 e Gráfico 6).

Tabela 16 - Atividade da creatinina (μmol/L) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

Monensina				P			
	0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu	
Cobre	Basal	68,06	74,25	71,15 ^B	0,5842	0,0170	0,2240
	+ Cu	80,44	78,67	79,55 ^A			
Media				74,25	76,46		

Nota: Letras minúsculas significam diferença entre tratamentos, enquanto letras maiúsculas diferença entre as medias dos grupos suplementados ou não com cobre e monensina.

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Gráfico 6 - Concentração média da creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) nos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.6 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS

Na secção abaixo variáveis hematológicas: Volume globular, hemácias, hemoglobina e leucócitos.

5.6.1 Volume globular

O volume globular médio não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 17.

Tabela 17 – Valor Volume Globular Médio (%) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	30,9	29,4	30,2	0,0255	0,1038	0,7891
	+ Cu	32,3	30,4	31,3			
Media		31,6	29,9				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.6.2 Hemácias

O número de hemácias médio não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 18.

Tabela 18 - Número de hemácias (μL) de ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014.

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	8,5	8,4	8,4	0,2365	0,2405	0,2757
	+ Cu	8,9	8,5	8,7			
Media		8,7	8,4				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.6.3 Hemoglobina

A concentração de hemoglobina média não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 19.

Tabela 19 - Concentração da hemoglobina total (g/dL) de ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	10,7	9,9	10,3	0,1265	0,2009	0,8378
	+ Cu	11,1	10,2	10,7			
Media		11,0	10,1				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.6.4 Leucócitos

O número de leucócitos médio não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 20.

Tabela 20 - Número de leucócitos (μ L) de ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	7,1	10,5	8,9	0,2141	0,2156	0,4355
	+ Cu	7,5	7,8	7,6			
Media		7,3	9,1				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.7 VARIÁVEIS CLÍNICAS

5.7.1 Frequência cardíaca

A frequência cardíaca média não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 21.

Tabela 21 – Frequência cardíaca média (bat/min) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	88,0	79,0	83,5	0,1279	0,6789	0,3986
	+ Cu	81,0	89,0	81,0			
Media		84,5	84,0				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.7.2 Frequência respiratória

A frequência respiratória média não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 22.

Tabela 22 - Frequência Respiratória (mov/min) média em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	26	30	28	0,3779	0,1789	0,6552
	+ Cu	28	30	29			
Media		27	30				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.7.3. Movimentos ruminais

O movimento ruminal médio não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 23.

Tabela 23 – Movimentos Ruminais médios (mov/ 3 mim) em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	3,2	3,0	3,10	0,5579	0,2968	0,4999
	+ Cu	3,4	3,1	3,25			
Media		3,3	3,05				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.7.4 Temperatura corporal

A temperatura corporal média não apresentou variação significativa no decorrer do experimento entre os grupos, como mostra a tabela 24.

Tabela 24 - Temperatura média (°C), em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo -2014

		Monensina			P		
		0ppm	30ppm	Media	M	Cu	MonxCu
Cobre	Basal	39,3	39,7	39,50	0,0879	0,6789	0,4556
	+ Cu	39,4	39,5	39,45			
Media		39,35	39,60				

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.8 RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

5.8.1 Concentração de cobre e ferro hepáticos

Observou-se um coeficiente de correlação negativa ($r=0,67$) entre as concentrações de cobre e ferro hepático (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Correlação entre as concentrações de cobre e ferro hepático em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.8.2 Concentração de cobre hepático e atividade da GGT

Constatou-se uma alta correlação positiva ($r=0,83$) entre as concentrações de cobre hepático e a atividade da enzima GGT, na última semana do experimento (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Correlação entre as concentrações de cobre hepático e a atividade da GGT em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Considerando o valor de 1000 ppm sendo um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA buscou-se linha de corte da atividade da GGT para poder indica-la como teste diagnóstico. Para tal foram utilizados os valores preditivos positivos e negativos. O valor preditivo positivo foi máximo (100%) enquanto o negativo foi de 97% quando a atividade da GGT foi maior que 55 U/L, com uma sensibilidade de 88%, especificidade de 100% e acurácia de 97% (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Linha de corte ("cut-off line") indicativa do valor preditivo da GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.8.3 Concentração de cobre e atividade da AST

Ocorreu uma forte correlação positiva ($r=0,70$) entre as concentrações de cobre hepático e a atividade da AST (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Correlação entre as concentrações de cobre hepático e a atividade da AST em ovinos suplementados ou não com monensina e cobre - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

Também considerando o valor de 1000 ppm como sendo um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA buscou-se linha de corte da atividade da AST para poder indicá-la como teste diagnóstico. Para tal foram utilizados os valores preditivos positivos e negativos. O valor preditivo positivo foi de 71%, enquanto o negativo foi de 93% quando a atividade da AST foi maior que 120 U/L, com uma sensibilidade de 78%, especificidade de 9% e acurácia de 89% (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.8.4 Atividade da CK e AST no grupo suplementado com monensina e cobre

Ocorreu uma forte correlação entre a atividade da AST e CK ($r=0,67$) no grupo que foi suplementando com monensina e cobre na 14ª semana (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Correlação entre a atividade da CK e AST em ovinos do grupo suplementado com monensina e cobre - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

5.8.5 Atividade da CK e AST no grupo suplementado com cobre

Houve uma fraca correlação ($r=0,12$) entre os valores da atividade da CK e AST entre os animais suplementados com cobre (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Correlação entre a atividade da CK e AST em ovinos do grupo suplementado com cobre - São Paulo - 2014

Fonte: Rodrigues, F. A. M. L. (2014)

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho atingiu seus objetivos principais de avaliar os riscos da adição dietética de monensina sobre a possibilidade de intoxicação pelo cobre, relativamente comum em nosso meio.

Diferente dos resultados originais publicado por Van Ryssen e Barrowmam (1987), que deram origem a esse estudo, nenhum ovino morreu, enquanto no estudo sul-africano três animais sucumbiram. Isso provavelmente esteja ligada as raças empregadas, visto que naquele trabalho utilizaram Ile-de-France, enquanto o selecionado no presente estudo foi um cruzamento das raças Santa Inês-Dorper, muito presentes na ovinocultura paulista. Enquanto que raças como Texel, Ile-de-France e Suffolk são mais reconhecidas por apresentarem maior retenção hepática de cobre, outras como a Scottish Blackface, mais rústicas apresentam pequena retenção hepática, embora em condições de grande oferecimento de cobre também possam desenvolver intoxicação pelo cobre (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). A raça Santa Inês pela sua rusticidade se assemelha a Scottish Blackface e trabalhos anteriores feitos por este grupo de pesquisa identificaram que essa raça é menos predisposta à intoxicação, porém mais susceptível à carência de cobre, tal qual a Scottish Blackface (SOARES, 2007; MINERVINO, 2011).

Essa predisposição racial à intoxicação por cobre entre os presentes animais e os empregados por Van Ryssen e Barrowmam (1985), pode ser comparada pela quantidade total de cobre ingerido no decorrer dos dois experimentos. No sul-africano os animais receberam em média 2,4 g de cobre, enquanto os presentes ovinos receberam em média 27 g deste microelemento. Em experimento semelhante ao presente trabalho, empregando ovinos puros da raça Santa Inês, Minervino (2011) necessitou de quantidade média cima de 31,3 g de cobre para causar intoxicação.

Deve-se ressaltar que um animal do grupo monensina cobre alto apresentou ao término do experimento quadro compatível com fase pré-hemolítica de intoxicação cúprica. Esse ovino tinha 3103 ppm de cobre, porém outros quatro animais do mesmo grupo tinham concentrações hepáticas de cobre superior àquele descrito (3116; 3268; 3506 e 4213 ppm Cu). Pode-se afirmar que os animais empregados no presente experimento foram bastante resistentes a essa intoxicação, visto que Van Ryssen e Barrowmam (1987) teve quadros definitivos de ICA nos ovinos Ile-de-France

com quantidades de cobre hepático bem inferiores (2000 ppm). Não existem ainda trabalhos que correlacionam a resistência racial à ICA e a capacidade máxima de acúmulo de cobre no tecido hepático, necessitando ser melhor estudado.

Na tabela 1 encontram-se os teores de cobre hepático nos animais dos diferentes tratamentos. Ficou evidente que tanto a suplementação de cobre ($P < 0,0001$), como de monensina ($P < 0,0022$) influenciaram positivamente na retenção do cobre hepático.

A simples adição de monensina causou um aumento significativo na retenção de cobre no fígado, em relação ao grupo controle, na ordem de 23,9 % (Tabela 2). Esse resultado é inferior ao percentual calculado (35,85 %) no trabalho de Van Ryssen e Barrowmam (1987), provavelmente pelo fato de raças mais predisposta à ICA absorverem e reterem de maneira mais eficiente o cobre dietético. Em outras palavras, a monensina possivelmente atue na retenção de cobre de forma mais efetiva quanto maior for a predisposição racial à ICA, porém tal hipótese necessita ainda ser provada.

O mesmo efeito descrito acima foi constatado em animais que recebem cobre dietético em quantidades adequadas e limitadas (grupo controle) (Tabela 2). Nesse caso, a retenção hepática percentual de cobre no grupo monensina cobre normal foi 55% superior ao grupo desprovido deste aditivo.

Pela tabela 3 é possível inferir que os teores de cobre na dieta oferecida foram suficientes para manter as concentrações deste microelemento no tecido hepático, dentro dos valores normais. Porém, a simples adição de monensina na dieta já acresce esses teores para quantidades ainda dentro da normalidade, inferiores a 1000 ppm Cu /kg M.S. Porém, se associado a uma situação de alto oferecimento de cobre o risco de ICA pode sobrevir.

O conjunto destes resultados indica que o uso de monensina na dieta deve ser utilizado com muito cuidado para não predispor ovinos ao acumularem cobre e aumentarem o risco de um possível quadro de ICA no decorrer de ingestões continuadas deste aditivo.

A hipótese mais aceita para explicar a possível ação da monensina na predisposição dos ovinos à ICA foi proposta por Ivan et al. (1992). Segundo esses autores a monensina reduz a quantidade do número de protozoários ciliados ruminais, fato este realmente comprovado por Gyulai e Baran (1988). Esses protozoários ciliados são responsáveis por parte da geração de sulfetos no rúmen, os quais têm

grande capacidade de se ligar firmemente ao cobre no interior deste órgão e diminuir sua disponibilidade posteriormente nos intestinos (IVAN et al., 1992). Assim, a menor geração de sulfeto levará a um aumento proporcional do cobre disponível aos ovinos. Outra hipótese é a ligação de cobre com a molécula de monensina no próprio rúmen, tornando essas moléculas de cobre indisponíveis de serem ligadas ao sulfeto, e sulfito, e posteriormente aumentando a disponibilidade do mesmo nos intestinos (IVAN et al., 1992). Outra possível condição, é a reconhecida habilidade que a monensina tem de aumentar a disponibilidade da fração solúvel de certos íons metálicos bivalentes (como o magnésio e cobre) no intestino (KIRK et al., 1985; VAN RYSSSEN; BARROWMAN, 1987).

É digno de nota comparar a retenção de cobre hepática em ovinos puros Santa Inês, no experimento de protocolo muito semelhante realizado por Minervino (2011), e o cruzamento Santa Inês X Dorper, neste presente trabalho. No de Minervino (2011) os ovinos controle receberam no decorrer de 14 semanas em média 50,56 g de cobre, gerando uma concentração hepática de cobre de 2009 ppm. No presente trabalho foi oferecido ao grupo cobre, sem molibdênio, 36,26 g levando estes animais a apresentarem uma média de 2314 ppm de Cu hepático. Esses dados permitem calcular que nos animais puros Santa Inês a retenção hepática de cobre foi na ordem de 3,97 % enquanto que nos cruzados a retenção atingiu 6,38%, ou seja, um valor 60% superior. Em outras palavras, o cruzamento com ovinos Dorper aumenta de alguma forma a chance de acúmulo de cobre hepático, em relação aos animais puros, porém nada que gere neste cruzamento um alto risco de ICA.

Os grupos de ovinos suplementados com cobre possuíam maiores teores deste elemento na bile, tanto por ppm/mL como no total do fluido biliar do que o grupo controle ($P < 0,0002$; $P < 0,017$; Tabelas 6 e 7). A bile é a principal via de excreção de cobre nos ovinos (HOWARD; GAWTHORNE, 1987). Segundo um único trabalho na literatura, a alta suplementação de cobre dietético não proporcionou maiores eliminações de cobre na bile em ovinos (GOONERATNE et al., 1985). Contudo, essa aparente contradição nos resultados devem ser analisadas com cautela. Estudando o assunto de forma pormenorizada Gooneratne et al. (1988) avaliaram a influência de raças bovinas na excreção de cobre pela bile. Esses pesquisadores verificaram que a raça Simental, conhecida por ser predisposta à carência de cobre, eliminou mais que o dobro de cobre pela bile que a raça Angus mais predisposta à intoxicação. Deve-se lembrar que foi empregado no presente experimento cruzamento de ovinos Santa

Inês-Dorper menos predisposto à intoxicação que a raça Suffolk empregada por Gooneratne et al. (1985).

O presente estudo identificou que o excesso dietético de cobre provoca uma menor retenção de ferro no tecido hepático ($R^2 = 0,4229$), mas não existiu qualquer efeito da monensina (Tabela 5 e Gráfico 7). É bastante reconhecido que ovinos carentes em cobre podem desenvolver quadros de anemia associados a um excesso de retenção de ferro hepático. Essa anemia é ferropriva, pois o cobre está presente na molécula da α -globulina ceruloplasmina, com atividade de ferroxidase, diminuída no quadro carencial, que atua facilitando o transporte das reservas de ferro hepático para a eritropoiese (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Sugere-se neste trabalho que a atividade da ceruloplasmina poderia estar ligeiramente aumentada quando do oferecimento de quantidades abundantes de cobre, diminuindo assim os teores de ferro dessa reserva hepática. Porém, tal hipótese necessita ser provada. Os tratamentos também não alteraram a excreção ou a concentração total de ferro na bile (Tabela 8).

Encontrou-se neste presente trabalho a ausência de retenção de zinco em tecido hepático em ovinos suplementados com cobre e/ou monensina ($P > 0,56$, Tabela 4). Esse resultado foi idêntico aos descritos por em Van Ryssen e Barrowman (1987) e por Kirk et al. (1994). Embora se atribua a monensina o incremento na absorção de íons metálicos bivalentes como o zinco, Spers (1990), não encontrou tal efeito em ovinos e bovinos. Os dois aditivos dietéticos também não alteraram a excreção de zinco no fluido biliar (Tabela 9).

As atividades de GGT séricas aumentaram nos ovinos suplementados com cobre a partir da 11ª semana (Gráfico 2) e se correlacionaram com os teores de cobre hepático ao término do experimento ($R^2 = 0,69$; $r = 0,83$) (Gráfico 8). Considerando-se o valor de 1.000 ppm como um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA (HOWARD; GAWTHORNE, 1987; UNDERWOOD; SUTTLE, 1997) e linha de corte estabelecida para a atividade de GGT sérica de 55 U/L, muito próxima a empregada por Antonelli (2007) de 56,5 U/L de ovinos, obtiveram-se os seguintes resultados: sensibilidade de 90%, especificidade de 100%, acurácia de 97%, valor preditivo positivo 100% e valor preditivo negativo de 97% (Gráfico 9). Tal resultado foi idêntico aos obtidos por Antonelli (2007), e muito parecido com os gerados por Minervino (2011).

A atividade da AST sérica foi influenciada positivamente pela adição de cobre na dieta ($P < 0,0001$) e curiosamente ocorreu uma tendência da presença de valores inferiores de AST no grupo suplementado com monensina ($P > 0,0625$). Essa tendência será mais discutida a seguir.

Por outro lado, a atividade de CK sérica foi influenciada negativamente pela adição de monensina ($P < 0,034$), não existindo qualquer relação com a adição de cobre dietético ($P > 0,515$).

Os resultados de AST e CK acima descritos de alguma forma poderiam indicar que em condições normais a adição de monensina diminuiria a ocorrência de lesões musculares, visto que existiu uma correlação positiva entre estas variáveis em ovinos suplementados com monensina ($R^2 = 0,4687$) (Gráfico 12), mas não com animais que receberam só cobre ($R^2 = 0,0157$) (Gráfico 13). Tal achado não encontra similar na literatura consultada. Van Ryssen (1991) ofertando dieta com alto teor de cobre e monensina para ovinos encontrou resultado contrário em relação à atividade de CK, sem saber a explicação para tal achado. Ovinos intoxicados com monensina apresentam reconhecida lesão muscular favorecendo o aumento de atividade de CK.

Considerando-se o valor de 1.000 ppm como um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA e a linha de corte de 120 U/L de AST, considerada por Antonelli (2007) (Gráfico 11), obtiveram-se os seguintes resultados: sensibilidade de 78%, especificidade de 91%, acurácia de 89%, valor preditivo positivo de 71% e valor preditivo negativo de 93% (Gráficos 12). Tais resultados foram semelhantes aos descritos por Antonelli (2007), porém inferiores em relação à sensibilidade calculada (100%) por Minervino (2011). O presente trabalho ratifica os dados de Antonelli (2007) que a AST é menos sensível que a GGT, neste caso devidamente explicado pela ação da monensina afetando a sensibilidade do AST. Ou seja, deve-se priorizar o uso de GGT e apenas recomendar o AST quando a primeira variável não for passível de ser realizada.

As variáveis da avaliação hematológica e do exame clínico não foram alteradas pela suplementação com monensina e cobre, sendo importante no monitoramento para evitar o desencadeamento da ICA, atendendo demandas de bioética.

7 CONCLUSÕES

- A adição dietética de 30 ppm de monensina aumentou as concentrações de cobre hepático, tanto em ovinos recebendo dietas com teores normais e altos de cobre, predispondo estes últimos à desenvolverem ICA.

- O excesso de cobre dietético aumentou as concentrações hepáticas de cobre e a excreção de cobre pela via biliar, mas diminuiu os teores de ferro hepático.

- A partir da 11ª semana de suplementação adicional com cobre tanto as atividades séricas da GGT como AST aumentaram até o final do experimento, se correlacionando positivamente com o acúmulo de cobre hepático.

- A suplementação com monensina provocou diminuição na atividade da AST interferindo negativamente com a sensibilidade desta enzima em predizer o acúmulo de cobre hepático, sendo preconiza a análise da GGT como teste de eleição para suspeitas de ICA.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, J. A. B.; CIARLINI, P. C.; KUCHEMBUCK, M. R. G.; KUHAYAGAWA, A.; FELTRIN, L. P. Z.; PINOTI CIARLINI, L. D. R.; LAPOSY, L. B.; MENDONÇA, C. L.; TAKAHIRA, R. K. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de ovinos tratados com monensina sódica e experimentalmente submetidos à acidose ruminal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 129-134, 2002.
- ALMEIDA T. L.; BRUM, K. B.; LEMOS, R. A. A.; LEAL, C. R. B.; BORGES, F. A. Doenças de ovinos diagnosticadas no laboratório de anatomia patológica animal da Universidade Federal de Mato grosso do Sul (1996-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 21-29, 2013.
- AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA M. A.; SIQUEIRA, J. L. Coccidiose em cordeiros em Botucatu-SP, relato de dois casos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 13-74, 1993.
- ANTONELLI, A. C. **Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos**. 2007. 122 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.
- COLLINGNON P.; POWERS, J. H.; CHILLER, T. M.; AIDARA-KANE, A.; AARESTRUP, F. M. A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. **Clinical Infection Diseases**, v. 49, p. 132-141, 2009.
- COUSINS, R. J. Absorption, transport and hepatic metabolism of cooper and zinc with special reference to metallothionein and caeruloplasmin. **Physiological Reviews**, v. 65, p. 238-309, 1985.
- ELGERWI, A.; BIRES, J.; LEVKUT, M. Industrial cooper intoxication in sheep: Clinical and Pathological Finds. **Acta Veterinaria BRNO**, v. 68, p. 197-202, 1999.
- ELSASSER, T. H. Potential interactions of ionophore drugs with divalent cations and their function in the animal body. **Journal of Animal Science**, v. 59, n. 3, p. 845-853, 1984.
- GONZALES, E.; MELLO, H. H. C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, n. 13 p. 48-54, 2012.
- GOONERATNE, S. R.; HOWELL, J. M. Creatine kinase release and muscle changes in chronic copper poisoning in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 28, n. 4, p. 351-353, 1980.

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

GYULAI, F.; BARAN, M. Effect of monensin on rumen ciliate protozoa in sheep. *Archiv Fur Tierernahrung*. v. 38, n. 2, p. 153-157, 1988.

HANEY JR, M. E.; HOEHN, M. M. Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 7, p. 349-352, 1967.

HAYWOOD, S.; SIMPSON, D. M.; RODD, G.; BEYNON, R. J. The greater susceptibility of North Ronaldsay sheep compared with Cambridge sheep to copper-induced oxidative stress, mitochondrial damage and hepatic stellate cell activation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 114-127, 2005.

HEADLEY S. A.; REIS, A. C. F.; NAGAWARA, T. L. D. R.; BRACARENSE, A. P. F. L. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no norte do Paraná, Brazil: case report. **Semina: ciências agraria**, v. 29, n. 1, p. 179-184, 2008.

HOWELL, J. M.; GAWTHORNE, J. M. **Copper in animals and man**. Boca Ranton: CRC Press, 1987. 142 p.

HUMANN-ZIEHANK, E.; COENEN, M.; GANTER, M.; BICKHARDT, K. Long-term observation of subclinical chronic copper poisoning in two sheep breeds. **Journal of Veterinary Medicine: Series A**, v. 48, p. 429-439, 2001.

INTERNATIONAL COPPER ASSOCIATION **The biological importance of copper: a literature review**. Singapura: ICA PROJECT, 1995. (Final Report 233).

IVAN, M.; DAYRREL, S.; HIDIROGLOU, M. Effects of Bentonite and Monensin on selected elements in the stomach and liver of fauna-free and faunated sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 201-208, 1992.

JONES, H. B.; GOONERATNE, S. R.; HOWELL, J. M. X-Ray microanalysis of liver and kidney in copper loaded sheep with and without thiomolybdate administration. **Research in Veterinary Science**, v. 37, n. 3, p. 273-282, 1984.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. 932 p.

KIRK, D. J.; FONTENOT, J. P.; RAHNEMA, S. Effects of feeding lasalocid and monensin on digestive tract flow and partial absorption of minerals in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 4, p. 1029-1037, 1994.

KIRK, D.J.; GREENE, L. W.; SCHELLING, G. T.; BYERS, F. M. Effects of Monensin on Mg, Ca, P and Zn metabolism and tissue concentration in lambs. **Journal Animal Science**, v. 60, p. 1485-1490, 1985.

LEMOS, R. A. A.; RANGEL, J. M. R. 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. 457-63, 1997.

LÓPEZ-ALONSO, M.; PRIETO, F.; MIRANDA, M.; CASTILLO, C.; HERNANDÉZ, J.; BENEDITO, J. L. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 262-267, 2005.

MACHADO, C. H. **Uso do tetratiomolibdato no tratamento de intoxicação cúprica experimental em ovinos: avaliações clínica e toxicológica**. 1998. 138 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MINERVINO, A. H. H.; BARRETO JUNIOR, R. A.; RODRIGUES, F. A. M. L.; FERREIRA, R. N. F.; SAUT, J. P. E.; QUEIROZ, J. F.; REIS, L. F.; ORTOLANI, E. L. Biópsia hepática por laparotomia paracostal em bovinos e búfalos **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 798-802, 2009.

MINERVINO, A. H. H. **Avaliação de crescentes teores de zinco dietético no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos**. 2011. 69 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.

ORTOLANI, E. L.; MACHADO, C. H.; SUCUPIRA, M. C. A. Assessment of some clinical and laboratory variables for early diagnoses of cumulative copper poisoning in sheep. **Veterinary Human Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 289-293, 2003.

ORTOLANI, E. L.; ANTONELLI, A. C.; SARKIS, J. E. S. Acute sheep poisoning from a copper sulfate footbath. **Veterinary Human Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 315-318, 2004.

ORTOLANI, E. L.; MINERVINO, A. H. H. Copper toxicity in sheep. In: WORLD BUIATRIC CONGRESS, 26., **Annals...** Santiago: PRESS: Novodiseño, 2010 .

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX T.; DE GROOT B.; FRIIS C.; JONES R.; NIGHTINGALE C.; PRESTON R.; WADDELL J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 53, p. 28-52, 2004.

REZLER, U.; RIBEIRO, A. O.; DREYER, C. T.; LEHUGEUR, C. T.; CARNESELLA, S. CECIM. M. Cobre sérico e enzimas relacionadas ao seu metabolismo em ovinos no Rio Grande do Sul. **ARS Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 80-84, 2001.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 2156 p.

RIBEIRO, L. A. O. South América; pampas áreas. In: MARTIN, W. B.; AITKEN, I. D. **Diseases of sheep**. Abingdon: Blackwell Publishing, 2000. p. 446-454.

RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA FILHO, J. C.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L.F.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul: 361 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 21-28, 2010.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, p. 11-19, 2001.

SPEARS, J. W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 6, p. 632-638, 1990.

SARGISON, N. D.; SCOTT, P. R; PENNY, C. D.; PIRIE, R. S. Polioencephalomalacia associated with chronic copper poisoning in a Suffolk ram lamb. **The Veterinary Record**, v. 135, n. 23, p. 556-557, 1994.

SOARES, P. C. **Efeitos da intoxicação cúprica e do tratamento com Tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos**. 2004. 111 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SUTTLE, N. F. The nutritional requirement for copper in animals and man. In: HOWELL, J. M.; GAWTHORNE, J. M. **Copper in animals and man**. London: CRC Press, 1987. v. 1, p. 21-43.

SUTTLE, N. F. The interaction between copper, molybdenum and sulphur in ruminant nutrition. **Annual Review Nutrition**, v. 11, n. 3, p. 121-140, 1991.

SUTTLE, N. F. Cooper poisoning in ruminants. **The Moredun Foundation News Sheet**, v. 2, n. 7, p. 1-6, 1995.

THORNTON, P. K. Livestock production: recent trends, future prospects. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365. p. 2853-2867, 2010.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. Wallingford: Cabi Publishing, 1999. 614 p.

VAN RYSEN, J. B. J.; BARROWMAN, P. R. Effect of ionophores on the accumulation of copper in the livers of sheep. **Animal Production**, v. 44, p. 255-261, 1987.

VAN RYSEN J. B. J. Effect of monensin and its metabolites in broiler litter on sheep consuming the broiler litter. Tydskr. **South African Veterinary**, v. 62, n. 3, p. 94-99, 1991.

VAN SAUN, R. J. Copper toxicosis in sheep. **Modern Veterinary Practice**, v. 69, n. 1, p. 3-7, 1988.