Rebeca Alves Weigel

**Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de
ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratimolibdato e vitaminas
antioxidantes**

São Paulo
2008

REBECA ALVES WEIGEL

Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e vitaminas antioxidantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Médica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira

São Paulo
2008

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.2043
FMVZ

Weigel, Rebeca Alves

Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e vitaminas antioxidantes / Rebeca Alves Weigel. – São Paulo : R. A. Weigel, 2008.
100 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Médica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira.

1. Ruminante. 2. Intoxicação cumulativa por cobre. 3. Estresse oxidativo. 4. Avaliação anatomo-patológica. I. Título.

ERRATA

WEIGEL, R. A. **Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e vitaminas antioxidantes**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Resumo	2º	3ª	Antioxidandes	Antioxidantes
Abstract	2º	5ª	Antioxidandes	Antioxidantes
Ficha catalográfica	2º	3ª	Antioxidandes	Antioxidantes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da função renal e do metabolismo oxidativo de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e vitaminas antioxidantes", protocolo nº535/2004, utilizando 18 ovinos, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria Cláudia Araripe Sucupira Magalhães, 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 renal function and oxidative metabolism of intoxicated sheep for copper and treated with tetratiomolibdate and vitamins", protocol number 535/2004, utilizing 18 sheep's, under the responsibility of Profª Drª Maria Cláudia Araripe Sucupira Magalhães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 28 de abril de 2005

Profª Drª Julia Maria Matella
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WEIGEL, Rebeca Alves

Título: Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratimolibdato e vitaminas antioxidantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo Para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Este trabalho representa mais um passo muito importante na minha evolução pessoal e profissional. Assim, quero lembrar e honrar ícones importantes para mim neste momento, que continuarão a ser estrelas na minha história.

Ao grande tesouro que Deus depositou em minha confiança, dividido em dois volumes: um baú e um porta-jóias. Nathalia e Esteban, tudo de melhor que realizo e recebo é de, para e por vocês. Quero ser sempre melhor para cada dia merecer mais a confiança Deus quando os enviou a mim. Meus amores.

A pessoa que me guiou neste período, não restritamente no âmbito profissional, mas também e de forma tão importante quanto, no aspecto pessoal. Sempre norteando, apoiando e educando sabiamente em todos os instantes. Tua humanidade, dignidade e competência são exemplos para mim. Professora Maria Claudia, é uma honra ser a primogênita da “Família Sucupira” na pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação simboliza o final de uma fase extremamente rica de conhecimentos, experiências e emoções e muitas pessoas contribuíram para esta realização. Desde já agradeço a todos que, de alguma maneira, mesmo que apenas com um sorriso sincero, fizeram parte desta história de crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira que me recebeu desde o primeiro dia de braços abertos. Orientadora capaz, ativa e sempre presente em todos os momentos, dos mais difíceis aos mais alegres. Esta vitória é principalmente sua. Vencemos!!!

À equipe, ou melhor, à “Família Sucupira”: Aline, Cecília e Giovanna, Sempre dispostas a ajudar em qualquer situação e com muita competência e bom-humor, fiéis do primeiro dia às últimas análises e discussões.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP, pela concessão de auxílio à pesquisa, imprescindível para a realização desse trabalho.

À Clara Satsuki Mori, responsável pelo Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas. Profissional extremamente competente, companheira de todos os dias. Agradeço a amizade, paciência e ajuda irrestrita nas análises e resolução de todos os tipos de problemas. A realização deste trabalho seria impossível sem você.

Ao Prof. Dr Wilson Roberto Fernandes pela recepção, ajuda e apoio desde meus primeiros dias nesta faculdade

À Profa. Dra Alice Maria Melville Paiva Della Libera por todo apoio, ajuda e amizade, uma pessoa realmente muito especial para mim. Também à sua equipe de pós-graduandos sempre presentes, colegas e, principalmente, amigos.

Ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani e sua equipe de pós-graduandos pela grande ajuda e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka e seu orientado Caio pelas análises e imensa presteza e gentileza para ajudar na obtenção e formulação dos dados.

Ao Prof. Dr. Stefano Carlo Filippo Hagen pela ajuda e amizade sempre humoradas ao seu estilo bem pessoal.

Às técnicas dos laboratórios Claudia, Marly e Samantha pelas ajudas nas análises e companheirismo de sempre.

Aos ex-residentes Frederico, Enoch e Tales pelas tantas ajudas durante o experimento com os animais e ainda se tornaram companheiros de estudo.

Aos amigos Andréia, Patrícia Mariana e Maurício o apoio e amizade de vocês no momento mais contraditório da minha vida _ de extrema felicidade e angústia _ foram essenciais para mim. Nunca poderei esquecer de vocês!

Aos amigos Bárbara, Fernando, Carolina (irmã Sucupira) e Tatiana o apoio de que recebi no momento mais triste é impagável e me permitiram seguir adiante. Seus conselhos sinceros e carinho imenso foram ouro e estão guardados no meu coração.

A todos os colegas e amigos de pós-graduação: Ângela, Magda, Ana Guiomar, Thaís (VCI), Maiara, Milton, Claudia Pestana, Danielle Yuri, Huber, João Ari, Marcelo, Fernanda, Raquel, Marjorie, Humberto, Barreto, Alexandre, também àqueles do campus Pirassununga, que estiveram envolvidos junto comigo em pesquisas, aulas, estudos, conversas e risadas.

Às secretarias do departamento de clínica médica, Adelaide, Cida e Silvana pela paciência, ajuda, convívio agradável e carinho.

Aos funcionários dos hospitais de ruminantes e de eqüinos por toda ajuda e presença nas horas mais necessárias dos experimentos; sua atenção é primordial para todos os estudantes e pesquisadores destas áreas.

Principalmente aos ovinos que participaram involuntariamente desta pesquisa e contribuíram para melhorar a condição de vida de sua espécie em função do homem.

Finalmente, mas com muito apreço e carinho, à faculdade onde me graduei FMVZ – UNESP campus Botucatu. A bagagem de aprendizado que adquiri nesta formação é e sempre será essencial para meu aprimoramento profissional e crescimento como ser humano.

À minha família que sempre, de alguma forma, está ao meu lado em todas as novas empreitadas e projetos.

A todos os que não foram nomeados aqui, sintam-se lembrados e cobertos de carinho, pois é assim que os tenho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

WEIGEL, R. A. **Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e vitaminas antioxidantes** [Evaluation of the oxidative metabolism and kidney and liver histopathology in copper intoxicated lambs treated with tetrathiomolybdate and/or antioxidative vitamins]. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Para avaliar o benefício da utilização parenteral das vitaminas C e/ou E associadas ao quelante de cobre, tetratiomolibdato de amônio (TTM), na recuperação de ovinos com intoxicação cumulativa por cobre (ICC), foram analisados os parâmetros vitais; o metabolismo oxidativo, através das concentrações séricas de ácido úrico e malondialdeído, atividade sanguínea da glutatona reduzida, habilidade de redução férrica plasmática, atividade urinária de N-acetil- β -D-glucosamidase; peso vivo, hematócrito, concentração sérica de cobre, uréia, creatinina e as alterações anatomo-patológicas de 26 ovinos da raça Santa Inês, machos, com peso médio de 25 kg e distribuídos em quatro tratamentos: apenas com TTM, TTM + vitamina C (TTM+VC), TTM + vitamina E (TTM+VE) e TTM + vitaminas C e E (TTM+VCE). A associação das duas vitaminas aumentou o tempo de recuperação renal, porém reduziu a concentração sérica de cobre. A vitamina E mostrou efeito adverso ao esperado em relação à glutatona reduzida e ao malondialdeído séricos. Em algumas variáveis, como concentração sérica de creatinina e glutatona reduzida a utilização da vitamina C proporcionou tendência para melhores resultados em relação aos demais grupos, principalmente ao que possuíam vitamina E no tratamento, coincidentemente os animais deste grupo (TTM+VC) apresentaram a maior taxa de sobrevivência. Os estudos histopatológicos e histoquímicos revelaram que a principal lesão hepática encontrada foi infiltrado inflamatório. Nos rins foram freqüentes o infiltrado inflamatório, glomerulonefrite e pigmentos. Constatou-se que, embora tenham ocorrido algumas variações pontuais entre os grupos, o tratamento com TTM associado às vitaminas C e/ou E não surtiu benefícios na recuperação física dos animais nem na redução do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Ruminante. Intoxicação cumulativa por cobre. Estresse oxidativo.
Avaliação anatomo-patológica.

ABSTRACT

WEIGEL, R. A. **Evaluation of the oxidative metabolism and kidney and liver histopathology in copper intoxicated lambs treated with tetrathiomolybdate and/or antioxidative vitamins.** [Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e vitaminas antioxidantes]. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The efficiency of intra muscular vitamin C (VC) and/or E (VE) associated with the classical copper chelate tetrathiomolybdate (TTM) in cumulative copper poisoning treatment was evaluated. Twenty six Santa Inês male lambs weighting 25 kg were distributed in four treatment groups (TTM; TTM+VC; TTM+VE; TTM+VCE). The oxidative metabolism was analyzed through measurement of: serum concentrations of uric acid, malondialdehyde (MDA), blood reduced glutathione, ferric reducing ability of plasma and urinary activity of N-acetyl- β -D-glucosamidase. Live weight, hematocrit; copper, urea and creatinine serum concentrations and histopathological changes were determinated. Vitamins C and E association increased the time of renal recuperation, but reduced copper serum concentration. Serum MDA raised and blood reduced glutathione concentrations diminished in animals of TTM+VE group. Serum creatinine and blood reduced glutathione concentrations had tendency of better results in TTM+VC than TTM+VE and TTM+VCE. Survival index was greater in TTM+VC. Histopathology and histochemistry showed inflammatory infiltrate in liver as well as Glomerulonephritis, inflammatory infiltrate and pigments in the kidneys, in almost all animals. The association of TTM with vitamins C and/or E didn't reduce oxidative stress and had no positive effect on treatment.

Keywords: Ruminant. Copper cumulative poisoning. Oxidative Stress. Pathological Anatomy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Relação entre o tempo (dias) e a quantidade de cobre (g) administrada para o desencadeamento da Crise Hemolítica (CH), utilizando os 30 animais deste experimento. São Paulo, 2008.....	46
Figura 2 - Valores de mediana para frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008	48
Figura 3 - Valores de mediana para frequência respiratória (FR) em movimentos por minuto (mpm) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008	50
Figura 4 - Valores de mediana para temperatura corporal (°C), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008	50
Figura 5 - Valores de mediana de movimentos ruminais (MR) em três minutos, de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.....	51
Figura 6 - Valores de mediana para evolução do peso vivo durante as fases pré e pós de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado ambas as vitaminas (TTM+VCE).São Paulo,2008..	53
Figura 7 - Valores de mediana cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com	

tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado ambas as vitaminas (TTM+VCE) .SãoPaulo,2008.....	57
Figura 8 - Valores de mediana hematócrito (%) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado ambas as vitaminas (TTM+VCE) .SãoPaulo,2008.....	59
Figura 9 - Valores de mediana uréia sérica (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado ambas as vitaminas (TTM+VCE) .SãoPaulo,2008.....	61
Figura 10 - Valores de mediana para creatinina sérica (μ mol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE), São Paulo, 2008.	63
Figura 11 - Valores de mediana para malondialdeído sérico (μ mol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE), São Paulo, 2008.....	63
Figura 12 - Valores de mediana para da atividade da glutathiona reduzida (mg/dL) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE), São Paulo, 2008.....	67
Figura 13 - Valores de mediana para da concentração de ácido úrico sérico (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE), São Paulo, 2008	69

Figura 14 - Valores de mediana para da habilidade de redução férrica plasmática ($\times 10^3 \mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE), São Paulo, 2008.	71
Figura 15 - Valores de mediana para da atividade urinária de N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (U/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE), São Paulo, 2008.	74
Figura 16 - Relação entre a frequência cardíaca (bpm) e o hematócrito (%) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008	74
Figura 17- Fígado de ovino. A – depósitos de cobre rodamina 10 x. B – depósitos de cobre rodamina 40 x. C – depósitos de sais de ferro 40 x. D – hemorragia H&E 10 x. E e F – Infiltrado inflamatório com presença de macrófagos espumosos 40 x.	76
Figura 18 - Rim de ovino. A – Depósitos de cobre, rodamina 10x. B – Depósitos de cobre, rodamina 40x. C – Depósito de sais de ferro, Pearls 10x. D – Glomérulonefrite em estágio avançado, H&E 10x. E – Hemorragia, H&E 10x. F – hemorragia e necrose tubular e glomerulonefrite, H&E 10x.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores individuais para o aparecimento da crise hemolítica, em dias e valores da dose de cobre total administrada (g) com seus respectivos valores médios e desvios padrão dos ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre. São Paulo, 2008.	45
Tabela 2 - Valores de mediana e limites superior e inferior da frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	48
Tabela 3 - Valores de mediana e limites superior e inferior da frequência respiratória (FR), em movimentos por minuto (mpm), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	49
Tabela 4 - Valores de mediana e limites superior e inferior da temperatura corporal (°C), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	51
Tabela 5 - Valores de mediana e limites superior e inferior de movimentos ruminais (MR) em três minutos, de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	52
Tabela 6 - Valores de mediana e limites superior e inferior do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	56

Tabela 7 - Valores de mediana e limites superior e inferior da hematócrito (%) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	58
Tabela 8 - Valores de mediana e limites superior e inferior da uréia sérica (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	60
Tabela 9 - Valores de mediana e limites superior e inferior do creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	62
Tabela 10 - Valores de mediana e limites superior e inferior do malondialdeído sérico ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	64
Tabela 11 - Valores de mediana e limites superior e inferior da atividade da glutatona reduzida (mg/dL) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	66
Tabela 12 - Valores de mediana e limites superior e inferior da concentração de ácido úrico sérico (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008.	68
Tabela 13 - Valores de mediana e limites superior e inferior da habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça	

Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008. 70

Tabela 14 - Valores de mediana e limites superior e inferior da atividade urinária de N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (U/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008. 72

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Valores de mediana de peso vivo (kg) nas fases de pré e pós-intoxicação de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008. 54
- Quadro 2 - Ocorrência de lesões hepáticas e renais (%) distribuídas segundo o grupo de tratamento de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE). São Paulo, 2008. 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bpm	Batimentos por minuto
CH	Crise hemolítica
Cu	Cobre
dL	Decilitro
EDTA	Ácido dietileno diamino tetracético
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
G	Gravidade
g	Gramas
GSH	Glutathione reduzida
h	Hora
H&E	Hematoxilina e eosina
HM	Hemoglobinúria Macroscópica
HRFP	Habilidade de Redução Férrica Plasmática
ICC	Intoxicação cúprica cumulativa
kg	Kilogramas
L	Litro
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
min	Minutos
mm	Milímetros
mmol	Milimol
mpm	Movimentos por minuto
MR	Movimentos ruminais
NAG	N-Acetyl- β -D-glucosaminidase
nm	nanômetros
PV	Peso vivo
TTM	Tetretiomolibdato de amônio
U	Unidade
VC	Vitamina C
VE	Vitamina E

VEC	Vitamina E e vitamina C
°C	Graus Celsius
μmol	Micromol
%	Porcentagem
®	Marca registrada
<	Menor
>	Maior

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	INTOXICAÇÃO CUMULATIVA POR COBRE EM OVINOS	25
2.2	METABOLISMO OXIDATIVO	27
2.2.1	Radicais Livres	27
2.2.2	Peroxidação Lipídica	30
2.3	SISTEMAS ANTIOXIDANTES	32
2.3.1	Antioxidantes Endógenos	33
2.3.1.1	<i>Superóxido Dismutase</i>	34
2.3.1.2	<i>Peroxidades</i>	34
2.3.1.3	<i>Catalase</i>	35
2.3.2	Antioxidantes Exógenos	36
2.3.2.1	<i>Carotenóides (Vitamina A)</i>	36
2.3.2.2	<i>Ácido Ascórbico (Vitamina C)</i>	37
2.3.2.3	<i>Tocoferóis (Vitamina E)</i>	38
2.4	TRATAMENTO	40
3	HIPÓTESE	42
4	OBJETIVO	43
5	RESULTADOS	44
5.1	DOSE ACUMULADA DE COBRE	45
5.2	AVALIAÇÃO FÍSICA	46
5.3	VARIÁVEIS SANGUÍNEAS	55
5.4	VARIÁVEIS URINÁRIAS	71
5.5	RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS	73
5.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	74
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÃO	87
5.3	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

O aumento do número de ovinos no Brasil e no mundo reflete a importância crescente que esta espécie tem tido, especialmente na última década (BARBOSA, 2003). Acompanhando esta tendência atividade de ovinocultura vêm se consolidando no agronegócio brasileiro, em 2005 o rebanho de ovinos correspondeu a 16,05 milhões de cabeças. Segundo o IBGE (2005), a região Nordeste detém 56,3% dos rebanhos de ovinos, a região Sul possui 31,6% dos ovinos e a região Sudeste possui 3,4% do rebanho ovino brasileiro.

Entretanto, as atividades são desenvolvidas de forma diferenciada nas regiões geográficas do Brasil. Embora a região Nordeste possua tradição nesta atividade, a maior parte da produção é voltada para subsistência, sendo considerada importante fonte de alimento para as populações do meio rural, fornecendo carne, leite e derivados (VASCONCELOS, 2005). No Sul do país, existe a forte presença de ovinos lanados, que são mais adaptados a baixas temperaturas predominantes na região, onde a produção é destinada para produção de lã e carne. Na região Sudeste, os rebanhos de ovinos são direcionados para produtos com maior agregação de valor, destacando-se atualmente na produção de queijos e de carne com cortes especiais. O enfoque desta última forma de produção ocorre devido à proximidade da criação com a cidade de São Paulo, que é o maior e mais exigente mercado consumidor do país. Dessa forma, as atividades vêm crescendo nos últimos anos no Estado de São Paulo, tanto pelo aumento efetivo dos rebanhos quanto pelo incremento do número de propriedades rurais destinadas à atividade. O rebanho ovino do Estado de São Paulo, em 1996, era formado por 257,4 mil cabeças, já em 2005, passou a 324,7 mil cabeças de ovinos (aumento de 26,1%) (VASCONCELOS, 2005).

Associando-se estes fatores à crise mundial da lã no início da década de 90, o crescimento da ovinocultura ocorre principalmente pela participação de animais com aptidão para produção de carne (MORAIS, 2001), mais especificamente os da raça Suffolk, Texel e Ile de France. Neste contexto, um número considerável de

criadores utiliza o sistema intensivo de criação, que, embora proporcione a melhora dos índices de produtividade, aumenta a frequência de certas doenças metabólicas, como a urolitíase em machos, toxemia da prenhez em fêmeas e a intoxicação por cobre em animais de ambos os sexos (ORTOLANI, 1996).

Ribeiro (2000) citou que em 618 necropsias realizadas em ovinos no Rio Grande do Sul, a intoxicação cúprica representou a segunda maior causa de morte de ovinos (15,5%), ficando atrás apenas das gastroenterites parasitárias (16,5%). Ortolani (2003) descreve que no Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ/USP – São Paulo, a frequência desta enfermidade passou de 1,5% na década de 70 para mais de 6% na atual década, constituindo-se na principal doença metabólica. Destes casos, 95% foram caracterizados como intoxicação cumulativa por cobre e o restante decorrente de intoxicação aguda ou superaguda. De uma forma geral, os animais acometidos são de alto valor zootécnico e, como a letalidade é superior a 80%, as perdas econômicas decorrentes desta intoxicação são bastante expressivas (ORTOLANI, 2002).

Geralmente os animais que sucumbem pela Intoxicação cumulativa por cobre (ICC), o fazem por insuficiência renal (MACHADO, 1998; SOARES, 2004), sendo a geração de radicais livres e portanto o estresse oxidativo uma de suas principais causas. A compreensão do envolvimento do metabolismo oxidativo com a evolução do quadro pode explicar boa parte das lesões encontradas, bem como pode auxiliar na conduta terapêutica, hoje totalmente embasada na exclusiva utilização do TTM (tetratiomolibdato), nos animais comprometidos.

Há necessidade de maiores estudos pesquisando a interação entre a ação de substâncias antioxidantes e o TTM para maximizar o sucesso do tratamento, reduzindo ao máximo os danos renais e o número de vítimas fatais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A intensificação da produção agropecuária impôs grandes mudanças aos hábitos naturais das espécies domesticadas. A casuística de hospitais veterinários mostra que, dentre estas espécies, os ovinos são os mais suscetíveis à intoxicação por cobre (RIBEIRO, 2000; ORTOLANI, 2003). Esta enfermidade causa, além de grande debilidade física e graves lesões renais ao indivíduo, elevadas perdas econômicas em relação ao rebanho. Soares (2004) constatou que a geração de radicais livres neste tipo de afecção pode ser um dos principais fatores envolvidos na patogenia desta enfermidade. Embora esta constatação tenha sido feita, faltam estudos para que se adote um protocolo de tratamento mais efetivo envolvendo substâncias antioxidantes.

2.1 INTOXICAÇÃO CUMULATIVA POR COBRE EM OVINOS

Entre as espécies de animais domésticos os ovinos são os mais predispostos a apresentarem tanto o quadro de deficiência como o de intoxicação pelo cobre (GOONERATNE; HOWELL; KUMARATILAKE, 1981; SANSINANE et al., 1993). O primeiro quadro está ligado a menor capacidade de absorção de cobre presente em certas raças ovinas, e a intoxicação cúprica está relacionada com a menor capacidade de conjugação do cobre com a metalotioneína, diminuindo a excreção deste elemento do organismo o qual se acumula no fígado, especialmente das raças ovinas como Suffolk, Texel e Ile de France, as quais associadas à raça Santa Inês têm se tornado as mais difundidas na região Sudeste.

O cobre é um metal monovalente que tem grande tendência a ficar bivalente, interagindo assim com outras substâncias em reações oxidativas. Num sistema biológico, o cobre deverá estar combinado a uma proteína ou a outros compostos e nunca poderá ficar livre, pois neste estado pode provocar danos oxidativos às

células (ORTOLANI; MACHADO; SUCUPIRA, 2003).

A patogenia da intoxicação cumulativa por cobre em ovinos está bem documentada e se caracteriza por três fases distintas: pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica (HOWELL; PATH; GAWTHORNE, 1987). Durante a fase pré-hemolítica, ocorre o acúmulo de cobre no fígado, localizando-se inicialmente nos hepatócitos periféricos indo em direção às células da veia central e posteriormente em outras áreas do fígado (GOONERATNE; HOWELL; KUMARATILAKE, 1981; ORTOLANI, 2002). Durante este período, o animal tem desempenho normal, com exceção das últimas duas semanas, antes da crise hemolítica, quando o apetite seletivo se instala, com a inicial recusa de concentrados (MACHADO, 1998, ORTOLANI; MACHADO; SUCUPIRA, 2003). Na fase pós-hemolítica, os poucos animais não tratados, que sobrevivem apresentam sinais de recuperação clínica, com duração de duas a três semanas (MACHADO, 1998).

Porém, a fase hemolítica merece maior destaque. O desencadear desta fase ocorre quando os teores de cobre atingem valores máximos dentro dos hepatócitos, promovendo morte celular difusa destes e a liberação maciça de cobre livre e de lisossomos, que causam intensa injúria celular no fígado e em outros locais do organismo. Após penetrar na hemácia o cobre livre oxida a glutatona, substância responsável pela integridade destas células, culminando com a hemólise, cerca de 24 horas após.

Segundo detalhados estudos, a *causa mortis* na intoxicação cúprica cumulativa são as injúrias causadas pelo complexo cobre-hemoglobina-lisosima aos rins, gerando graves degenerações e necrose dos vasos renais, glomérulos e néfrons levando a intensa disfunção renal e grave quadro de uremia, caracterizada por aumento nos teores séricos de creatinina e uréia (MACHADO, 1998; ORTOLANI, 2002; SOARES, 2004).

Além do danoso complexo cobre-hemoglobina-lisosima Soares (2004) constatou que foi gerado, paralelamente no organismo de ovinos intoxicados, altas quantidades de radicais livres, originadas pela combinação do cobre ionizado com os grupos sulfidrilas das hemácias. Este mesmo autor ainda verificou que quanto maior a formação de radicais livres maior foi o grau de insuficiência renal. Outros estudos também mostraram que os eritrócitos apresentam menor capacidade antioxidante durante a ICC (SANSINANEIA et al., 1993). Essa redução está

associada ao aumento da reatividade do ácido tiobarbitúrico (TBA) na lipoperoxidação induzida pelo peróxido de hidrogênio.

2.2 METABOLISMO OXIDATIVO

Durante o processo de respiração celular, bem como o de geração de energia, há envolvimento do metabolismo oxidativo. Este invariavelmente leva à formação de espécies oxigênio reativas (EROs), pertencentes ao grupo dos radicais livres (RL) endógenos. O desbalanço entre a formação de substâncias oxidantes, como os RL e antioxidantes, favorecendo as primeiras, é chamado de 'Estresse Oxidativo' que ocorre principalmente nas situações de estresse, exercício físico intenso e na maior parte das enfermidades (SIES, 1985, 1986, 1991).

2.2.1 Radicais Livres

A todo o momento, no animal, são gerados os radicais livres (RL). O metabolismo aeróbico gera moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para o funcionamento do organismo, porém, através deste mesmo processo são gerados RL de oxigênio com alto potencial deletério junto às estruturas celulares (DAVIS et al., 1982). Desta forma, o oxigênio representa um paradoxo por ser elemento essencial e, ao mesmo tempo, potencialmente destrutivo para a saúde. Estudos revelaram que os radicais livres de oxigênio são gerados até mesmo durante o metabolismo normal de repouso, porém, normalmente não representam ameaça desde que exista um sistema protetor de amplo espectro, capaz de se opor à geração dos RL (HALLINWELL, 1987).

Geralmente os RL são produzidos através de dois processos principais: (1) do sistema de transporte de elétrons localizado na membrana mitocondrial interior e (2)

das ações das células polimorfonucleares ao fagocitarem e destruírem bactérias. Quando o ambiente interno do organismo se torna hostil, como durante infecções ou exposição a raios X ou toxinas ambientais, o metabolismo da mitocôndria aumenta, intensificando o consumo de oxigênio e favorecendo o escape de RL do sistema de transporte de elétrons (WOODS; PLESSINGER; FANTEL, 1998). Desta forma, a produção de RL pode ser considerada uma medida da ineficiência biológica, pois eles são formados por escape dos elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, os quais reduzem o oxigênio molecular a superóxido e peróxido.

Usualmente, 98% do oxigênio é reduzido totalmente a H_2O , reação catalisada pela oxidase citocrômica. Porém, devido à alta dinâmica da oxidação na mitocôndria, esta enzima não consegue reduzir todas as moléculas que adentram no espaço intracelular, permitindo que de 2 a 5% do oxigênio se transforme em RL (JI et al., 1998; SEN, 2000). No entanto, na presença de oxigênio intracelular, também pode ocorrer de forma não desejada, gerando a produção de espécies de oxigênio parcialmente reduzidas.

Diversas reações celulares geram diferentes formas de radicais livres, como o radical de enxofre central ($RS\cdot$), triclорometil (CCl_3) e o óxido nítrico ($NO\cdot$) (WOODS; PLESSINGER; FANTEL, 1998). Os mais importantes, porém, são formados durante a redução do oxigênio molecular à água gerando os seguintes compostos: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($HO\bullet$), além de espécies como o hidroperoxila (HO_2^-) e o oxigênio “singlet” (1O_2) (PACKER, 1984; HALLINWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Estes compostos podem ser produzidos por várias enzimas oxidativas, em diferentes locais da célula: citosol, mitocôndria, lisossomos, peroxissomos e membrana plasmática (PARKE; PARKE, 1995).

O superóxido é gerado após a primeira redução do O_2 . Este radical ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo, tem sido observada lesão biológica secundária nos sistemas geradores de superóxido (PACKER, 1984; HALLINWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Uma vez produzido, o superóxido pode ser inativado espontaneamente ou, mais rapidamente, pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando H_2O_2 .

O peróxido de hidrogênio é potencialmente tóxico para as células e esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes com a presença de ferro. Apesar de não ser necessariamente radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 possui vida média longa o que lhe permite ser capaz de atravessar camadas lipídicas e formar novos radicais livres, pois, na presença do íon ferroso produz o RL hidroxila ($\text{HO}\cdot$). Esta reação é conhecida como reação de Fenton, na qual o peróxido de hidrogênio recebe um elétron do íon ferroso, se desestabiliza e forma o íon hidroxila e o radical hidroxila (FARBER; KYLE; COLEMAM, 1990; HALLINWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992)

O radical hidroxila é considerado o mais instável e, portanto, o mais reativo junto aos sistemas biológicos. Normalmente produzido pela reação de Fenton, pode também ser gerado por outra reação chamada de reação de Haber-Weiss, na qual o peróxido de hidrogênio recebe um elétron do ânion superóxido, na presença de ferro ou do cobre nas suas formas livres.

Reação de Fenton:

Reação de Haber-Weiss:

Assim, se a hidroxila for produzida próxima ao DNA e, se a este radical estiver fixado a um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode alterar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas ($-\text{SH}$) às pontes dissulfeto ($-\text{SS}$); pode ainda iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, processo denominado de lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (FARBER; KYLE; COLEMAM, 1990; HALLINWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992).

Radical hidroperoxila (HO_2^-) representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton de hidrogênio. Existem evidências de que é

mais reativo que o superóxido *in vitro*, mas não tem sido demonstrado seu efeito destrutivo *in vivo* (HALLINWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992).

O oxigênio “singlet” é a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. Ele tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (HALLINWELL; GUTTERIDGE, 1990).

A ação fisiológica dos RL está diretamente relacionada à proteção antimicrobiana intermediada pelos polimorfonucleares (PMNs). As células PMNs normalmente encontradas no sangue circulam em estado inativo, desta forma os PMNs podem cercar e até fagocitar bactérias, mas são incapazes de lesá-las (WINTERBOURN; ASSMAN, 1990). A partir do momento que os PMNs são expostos a bactérias envoltas por imunoglobulinas, imunocomplexos, complemento 5 ou leucotrienos, a enzima NADPH-oxidase é ativada. Esta ativação inicia a produção de RL (MURRAY, 1993) que se prossegue com o processo microbicida desenvolvido pelos PMN. Além disso, os radicais livres aparecem também como subprodutos do metabolismo do ácido araquidônico, durante a síntese de prostaglandinas (PARKE; PARKE, 1995) e podem induzir a expressão de moléculas de adesão pelas células do endotélio vascular, facilitando a agregação de plaquetas e contribuindo, assim, para causar trombose microvascular (FRATICELLI; SERRANO; BOCHNER, 1996).

Quando ocorre oxidação intensa todos os componentes celulares inclusive lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e açúcares são atingidos e a extensão dos danos causados pelo estresse oxidativo variam segundo a natureza e quantidade de ERO, momento e duração de exposição das moléculas, associado a fatores extracelulares tais como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (AGARWAI; SALEH; BEDAIWY, 2003), podendo resultar em morte celular (SHARMA; PASQUALOTTO; NELSON, 1999).

2.2.2 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica consiste na reação dos RL com os lipídios celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) presentes nas membranas celulares

possuem duplas ligações entre alguns dos seus átomos de carbono, as quais são vulneráveis aos "ataques" dos radicais livres, principalmente o $\text{OH}\bullet$ (KURODA et al., 1995). A interação lípide-radical gera peróxidos, os quais também são espécies reativas, iniciando a redução de outro ácido graxo. Esta reação em cadeia pode levar a uma extensa lesão nas membranas celular e de organelas. A peroxidação lipídica ocorre em seis etapas:

1. **Iniciação:** Ataque de um radical ($\text{R}\bullet$) ao AGPI, capaz de substituir um dos dois átomos de hidrogênio do átomo de carbono entre duas ligações duplas (GIROTTI, 1985). Uma grande variedade de radicais, como o radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), radical peroxila ($\text{LOO}\bullet$), radical alcóxila ($\text{LO}\bullet$) ou radical alquila ($\text{L}\bullet$), podem iniciar esta reação (KAPPUS, 1990).
2. **Propagação:** O produto do ataque do radical sobre o AGPI (LH) é um radical pentadienil deslocado ($\text{L}\bullet$), que pode reagir extremamente rápido com oxigênio para formar o radical peroxila ($\text{LOO}\bullet$), que pode então extrair um hidrogênio de um AGPI, gerando outro radical livre ($\text{L}\bullet$) e um peróxido ($\text{LOO}\bullet$).
3. **Iniciação por radical superóxido:** O radical superóxido, ao iniciar a peroxidação lipídica a partir de AGPI's, representa um dos caminhos pelos quais estas espécies reativas de oxigênio podem ser tóxicas para sistemas biológicos. Apesar dos efeitos do radical superóxido estarem geralmente limitados a reações fotossensibilizantes (GIROTTI, 1990), eles podem ser gerados em eosinófilos (KANOFISKY, 1988) ou a partir de reações de ozônio com material biológico (KANOFISKY; SIMA, 1991). Portanto este oxidante pode ter papel mais amplo em sistemas biológicos do que se pensou inicialmente (FOOTE, 1978).
4. **Reinício:** Um dos modos mais comuns de iniciar a peroxidação lipídica é por meio da quebra de peróxidos já presentes no sistema, catalisada por metais. Tanto metais de transição oxidados como reduzidos, tais como ferro ou cobre, podem catalisar a decomposição de peróxidos para formar os radicais alcóxila, alquila ou hidroxila. Estas espécies podem então iniciar o processo peroxidativo, como descrito em no passo 1.
5. **Remoção de produtos:** As reações de reinício podem ser prevenidas pela remoção de hidroperóxido LOOH , o produto dos três primeiros passos da peroxidação lipídica. Vários antioxidantes presentes no organismo realizam essa função.

6. Término: Compostos que reagem com a cadeia de propagação de espécies radicais, como os radicais peroxila ou alcoxila, e resultam na formação de espécies que não são mais capazes de subtrair hidrogênio, são considerados antioxidantes de término de cadeia. Vários compostos, como fenóis, aminas aromáticas e polienos conjugados podem funcionar como antioxidantes de término de cadeia.

Como resultado da peroxidação lipídica, podem ocorrer alterações na semipermeabilidade das membranas celulares, favorecendo a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos das células através das bombas de intercâmbio iônico proporcionando portanto a perda da homeostase intracelular por intenso desequilíbrio iônico, alteração no equilíbrio osmótico e, conseqüentemente, ruptura da membrana levando à morte celular (FARBER; KYLE; COLEMAM, 1990).

Junto às proteínas, os radicais livres atuam sobre os grupos sulfidrilas (SH), provocando ampla inativação de enzimas dos mais variados sistemas, levando à lentidão ou mesmo paralisação de processos metabólicos, o que reduz a capacidade de transdução energética, da síntese e do reparo protéicos. Além da significativa ação dos radicais livres sobre as proteínas cromossômicas dos ácidos nucleicos (DNA) já relatada anteriormente (JI; DULLON, 1990; DIPLOCK, 1997).

Em situações em que há excesso de produção de RL ocorre desequilíbrio na proporção entre RL e antioxidantes no organismo o que pode levar à situação conhecida como estresse oxidativo, em que acontece extensa lesão celular.

2.3 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

No intuito de prevenir a ação peroxidativa deletéria, as células contam com um sistema de rastreamento (SIES, 1993), constituído de antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathiona, vitaminas C, E dentre outros; e enzimas como a glutathiona peroxidase (GSH – Px), glutathiona – S – transferase, superóxido dismutase (SOD), a glutathiona redutase (GSH) ou a G6PD (WRIGHT; COLBY; MILES, 1981; HOLOVSKÁ et al., 1996).

Antioxidantes são compostos que protegem sistemas biológicos contra lesões causadas por processos que podem levar a altos níveis de oxidação (KRINSKI, 1992). Esses compostos são classificados em fatores endógenos, sintetizados no organismo e exógenos, obtidos da dieta (GALIZIA; WAITZBERG, 2001). Este sistema de defesa pode atuar de maneira detoxificadora do agente lesivo antes que ele cause a lesão, ou reparadora da lesão ocorrida (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O organismo sintetiza uma grande variedade de proteínas e enzimas que compõem seu sistema antioxidante. Destaca-se entre essas substâncias, a catalase, a glutathione peroxidase (dependente do selênio), a superóxido dismutase (SOD) (dependente de cobre e zinco), o ácido úrico e proteínas ligantes a metais de transição, como transferrina e ceruloplasmina (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 1996). Os níveis destes antioxidantes são determinados através da sua taxa de síntese, por serem derivados de proteínas, o que dificulta suas alterações. Os antioxidantes exógenos mais comuns são os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides e flavonóides. Como estes antioxidantes estão disponíveis na natureza, seus níveis podem ser manipulados através da suplementação e de modificações dietéticas (GALIZIA; WAITZBERG, 2001).

2.3.1 Antioxidantes Endógenos

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Sies e Stahl (1995) definiram antioxidantes "qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz". Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (SIES, 1993).

2.3.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas que atuam contra a toxicidade do ânion superóxido. As SODs estão presentes em quase todos os organismos aeróbicos, na forma de SOD-cobre-zinco presente principalmente no citosol, enquanto que a SOD-manganês está primariamente na mitocôndria (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Esta enzima tem grande importância no sistema antioxidante, pois é a enzima mais abundante no organismo, sendo a quinta proteína, em quantidade, presente em todos os organismos aeróbicos, além de hidrofílica e solúvel. Independente da forma, todas as enzimas SOD realizam a mesma função de dismutação do radical superóxido (GUEMOURI et al., 1991).

2.3.1.2 Peroxidases

Peroxidases são enzimas que utilizam o peróxido de hidrogênio para oxidar o substrato. De maneira geral as peroxidases são específicas, a mais importante é a glutathione peroxidase, que remove o peróxido de hidrogênio utilizando a glutathione redutase (GR) e transformando-a em glutathione oxidada (GSSG).

A glutathione peroxidase é dependente do selênio para exercer sua atividade. As glutathiones reduzidas transformam-se em glutathiones oxidadas unindo-se pela cadeia de tiol (SH), onde o hidrogênio é perdido formando uma ponte bissulfídica. A glutathione tem sido reconhecida como substrato para as GSH-transferases e GSH-peroxidases, enzimas catalisadoras das reações de detoxificação e antioxidação (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989; VANNUCCHI et al., 1998).

A glutathione peroxidase é responsável pela oxidação do peróxido de hidrogênio e está presente no citosol e também nas mitocôndrias, os mesmos locais da presença da superóxido dismutase. Esta presença conjunta sugere a ação sequencial e primordial do sistema antioxidante ao lidar com os radicais livres de oxigênio superóxido e peróxido de hidrogênio (GALIZIA; WAITZBERG, 2001).

A glutathiona redutase é um peptídeo formado por três aminoácidos justapostos: o ácido glutâmico, a cisteína e a glicina. Contém um grupo tiol livre que lhe permite executar a sua função (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Para que a sua regeneração aconteça, a glutathiona redutase recebe um íon de hidrogênio da riboflavina (NADPH) presente em sua fórmula (KRETZSCHMAR, 1996). Concentrações limitadas de NADPH podem determinar o aumento de glutathiona oxidada (GSSG), tornando os sistemas biológicos mais sensíveis ao dano oxidativo (SHAN; AW; JONES, 1990).

A inativação do agente oxidante em função da depleção da GR, obviamente determina a produção de GSSG. Em situações em que o sistema de óxido-redução encontra-se íntegro, há recuperação da GR, utilizando-se NADPH. Porém, mediante a excessiva geração de radicais livres e/ou na deficiência do sistema antioxidante, ocorrerá desproporcionalidade entre o consumo de GR e a produção de GSSG, fato que caracteriza o estresse oxidativo assim como sua magnitude (FARBER; KYLE; COLEMAM, 1990; JACOB, 1995; KRETZSCHMAR, 1996). Os eritrócitos são ricos em glutathionas, mais de 95% da glutathiona presente no interior dos eritrócitos então na forma reduzida (GSH).

O fígado é o órgão primário na síntese de GR suprimindo 90% do seu valor circulante, o que mantém a homeostase orgânica (JI et al., 1998). A proteção da GR aos tecidos em relação à peroxidação lipídica pode ser direta e/ou indireta. A GR pode ser usada como substrato pela glutathiona peroxidase na eliminação dos hidroperóxidos, pode induzir a redução da forma oxidada da vitamina C, que por sua vez atua na manutenção da vitamina E em sua forma reduzida. Atua ainda através da glutathiona-S-transferase, na detoxificação de aldeídos reativos, como aqueles reativos ao ácido tiobarbitúrico (STRAB) gerados durante a peroxidação lipídica (JONES et al., 1995).

2.3.1.3 Catalase

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio no organismo. Ela o neutraliza convertendo-o em oxigênio

e água. O seu mau funcionamento na presença de SOD permite o intenso acúmulo de peróxido de hidrogênio, que, catalisado pelo ferro ou cobre livre, acaba se transformando em radical hidroxila. Sua intensa capacidade de metabolizar o peróxido de hidrogênio depende do grande acúmulo deste (GUEMOURI et al., 1991).

2.3.2 Antioxidantes Exógenos

A proteção antioxidante pode ser adquirida também pela dieta. As vitaminas A, C e E são compostos que possuem grande ação antioxidante e estão presentes em muitos alimentos.

2.3.2.1 Carotenóides (vitamina A)

Carotenóides são pigmentos vegetais importantes, responsáveis pelas cores brilhantes de várias frutas e vegetais. São pigmentos fotossintéticos, um complexo protéico encontrado em plantas, bactérias fotossintéticas, fungos e algas. Os carotenóides da dieta também funcionam como corantes naturais em organismos que não sintetizam carotenóides e ocorrem na carne de salmão, casca de lagosta e plumagem das aves, como por exemplo, o flamingo (STAHL; SIES, 1996).

A cor e as atividades antioxidantes dos carotenóides são conseqüências de sua estrutura única, um sistema estendido de duplas ligações conjugadas. Carotenóides são tetraterpenos formados pela ligação entre as extremidades de duas cadeias de 20 carbonos (C-20) e, em muitos deles, os grupos terminais só modificados em anéis compostos de cinco ou seis carbonos, gerando compostos monocíclicos e dicíclicos (STAHL; SIES, 1996). São descoloridos quando expostos a radicais como os formados durante a peroxidação lipídica (KLEIN; KING; GROSSMAN, 1985), o que indica que estes pigmentos interceptam radicais livres.

Suas moléculas longas e repletas de duplas ligações fazem deles excelentes substratos para o ataque de radicais que são eliminados no organismo.

Entre os mais de 600 diferentes carotenóides destacam-se o α e β -caroteno, que são largamente usados como fonte de vitamina A ou corantes alimentares (STAHL; SIES, 1996). O β -caroteno (CAR) pode reagir múltiplas vezes com radicais peroxila ($\text{LOO}\bullet$) para formar moléculas estáveis. Acredita-se que uma única molécula de β -caroteno possa reagir com até 1.000 radicais peróxido, antes de ser oxidada e perder suas propriedades antioxidantes (BURTON, 1989).

Carotenóides possuem a propriedade única de dissipar a energia adquirida dos radicais peróxidos na forma de calor, assim, não é necessário um sistema para regenerar estes compostos como ocorre com o α -tocoferol (SIES et al., 1992).

2.3.2.2. Ácido ascórbico (vitamina C)

Outro agente antioxidante de grande importância, e com relativa facilidade de ser encontrado pelos veterinários de campo, é a vitamina C. Além desta vitamina ser importante para síntese de colágeno e outros tecidos conectivos, ela atua como um antioxidante hidrossolúvel. Está presente em vários alimentos, mas principalmente nas frutas cítricas, folhas verdes e tomates. Pode reagir com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), radical peróxido ($\text{ROO}\bullet$) e radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) para formar os radicais semidehidroascorbato (A^-) e dehidroascorbato (A) (THOMPSON; GOLDIN, 1995; DUELL, 1996; KITTS, 1997).

O ácido ascórbico age no plasma eliminando estas espécies reativas antes que elas reajam com membranas e lipoproteínas biológicas. A vitamina C é o mais potente antioxidante solúvel em água, e, portanto, o principal responsável pela prevenção dos efeitos nocivos dos radicais livres no plasma. Para desempenhar esta função, a vitamina C age conjuntamente com outras enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase) e com a vitamina E (SAUBERLICH, 1994; MOSER; BENDICH, 1991). De fato, estudos em animais e em humanos demonstraram que a deficiência de ácido ascórbico, induzida pela dieta, levou a lesão no miocárdio por peroxidação lipídica, sendo que este dano foi prevenido pela administração e

suplemento de ácido ascórbico. O ácido ascórbico também possui habilidade de restabelecer a atividade de antioxidantes solúveis em lípides, como α -tocoferol e β -caroteno (STEINBERG; PARTHSARATHY; CAREW, 1989; JAILAL; GRUNDY, 1991; STADTMAN, 1991).

2.3.2.3 Tocoferóis (vitamina E)

É reconhecido que a vitamina E é essencial para a integridade e ótimo funcionamento dos sistemas reprodutivo, muscular, circulatório, nervoso e imune tanto nos animais quanto nos humanos. Vitamina E é um termo genérico que engloba um grupo de oito substâncias encontradas na natureza, apresentando graus variados de atividade vitamínica. Estes compostos fazem parte de duas séries: os tocoferóis α , β , γ , δ e os tocotrienóis α , β , γ , δ . O α -tocoferol é a forma mais abundante e, química e biologicamente, mais ativa (FREI, 1994). Os tocotrienóis tem ação antioxidante muito mais potente, porém estão presentes no organismo em pequena quantidade (BASU, 1999). Estes compostos são encontrados nos vegetais e grãos e devido à sua relativa abundância nos alimentos, raramente se observa deficiência desta vitamina.

Os mecanismos envolvidos no acúmulo de α -tocoferol, não são bem compreendidos (DUTTA-ROY, 1999), no entanto, estudos recentes indicam que proteínas de transferência de α -tocoferol em nível intracelular e de membrana podem estar envolvidas neste processo (BIAGINI, 2005).

O α -tocoferol é mantido armazenado no fígado, tecido adiposo e músculos. Ajuda a proteger o fígado de substâncias tóxicas, como o tetracloreto de carbono e age como antioxidante inativando radicais livres. Havendo deficiência, pode ocorrer a oxidação de gorduras monoinsaturadas, levando a alterações da estrutura e função da mitocôndria, lisossomos e membranas plasmáticas (ESTERBAUER; DIEBER-ROTHENEDER; STRIEGL, 1991; BACHUR, 2005).

Sua importância está justamente ligada ao fato de ser lipossolúvel e localizar-se na membrana lipídica. Isto lhe permite mover-se entre as camadas da membrana, executando sua principal função, que é interromper a reação em cadeia da

peroxidação lipídica, neutralizando principalmente os radicais lipídicos peroxila para produzir hidroperóxidos lipídicos e radical tocoferoxila (BURTON; INGOLD, 1981; MIKI et al., 1987; ESTERBAUER; DIEBER-ROTHENEDER; STRIEGL, 1991; JAILAI; GRUNDY, 1992; LIEBER, 1993; GUTTERIDGE e HALLINWELL, 1994; HALLIWELL, 1994).

A ação da vitamina E se dá por meio da doação de hidrogênios a radicais peroxila, derivados de ácidos graxos. Cada molécula de tocoferol pode reagir com dois peroxila, o primeiro produto é o radical α -tocferoxila (α -tocferol $\bullet$). O grupo hidroxila do tocoferol fornece um hidrogênio para o radical peroxila, transformando-o em um peróxido lipídico estável, o que impede a propagação da reação em cadeia nas membranas lipídicas (BURTON; INGOLD, 1981; TIIDUS; HOUSTON, 1993). O tocoferoxila migra até a superfície da membrana para ser novamente transformado em tocoferol, pelo ácido ascórbico que fornece o íon hidrogênio (BASU, 1999; OLSZEWER; FLAN; ELLOVIVICH, 1997). O eficiente mecanismo de regeneração do tocoferol é explicado com o conceito de que, assim que o radical tocoferoxila é formado, o α -tocferol é imediatamente regenerado, sugerindo que os níveis plasmáticos e teciduais de vitamina E sejam repostos por um pool mantido na forma não oxidada (LIEBER, 1993). Quando o processo de peroxidação lipídica é muito intenso, o α -tocferol da membrana pode ser totalmente convertido no radical tocoferoxila, perdendo sua ação antioxidante. Entretanto, o radical tocoferoxila é regenerado por substâncias como a vitamina C e a ubiquinona, entre outras, sendo novamente reduzido a α -tocferol (OLSZEWER; FLAN; ELLOVIVICH, 1997).

Outra atuação desta vitamina é através de ações relacionadas e sinérgicas com o selênio e/ou outros antioxidantes, inativando as espécies reativas de oxigênio e de radicais livres que iniciam a oxidação nos fosfolipídeos insaturados e nos grupos sulfidril provenientes de proteínas e de DNA (BROWNLEE; HUTTENER; PANGANAMALA, 1977; CHOW, 1979; SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992). A vitamina E também oferece proteção antioxidante para os componentes celulares de fase aquosa, aumentando a concentração de glutathione reduzida nos eritrócitos e aumentando a atividade da superóxido dismutase (LII et al., 1998). Neste sentido a suplementação com vitamina E também mostrou reduzir a concentração de produtos de oxidação hidrossolúveis em camundongos desafiados com pró-oxidantes dietéticos, como o óleo de peixe e o excesso de ferro.

Alguns compostos de atividade antioxidante são classicamente usados como indicadores, podendo ser enzimáticos _ superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase _ ou não enzimáticos _ glutathione, vitamina C e E, selênio, ergotioneína, flavonóides polifenólicos (CHIHUAILAF; CONTRERAS; WITTEWER, 2002). A atividade dos radicais livres no organismo pode ser avaliada indiretamente através daqueles indicadores uma vez que são produtos de reações oxidativas nas moléculas celulares, como o malondialdeído, interferem na concentrações de substâncias e enzimas com atividade antioxidante, como a glutathione (McGRATH; DOUGLAS; McCLEAN, 1995; GRUNE; SOMMERBURG; SIEMS, 2000).

A GSH produzida no eritrócito é previne a peroxidação de ácidos graxos insaturados na membrana celular, além de identificar íons ferrosos (Fe^{++}) da hemoglobina (SANSINANEA et al., 1996). Mates (2000), relatou que tanto o ânion superóxido, como o peróxido de hidrogênio, têm a capacidade de redução do íon metálico ferro (Fe^{3+}), formando novo íon (Fe^{2+}), como já mencionado anteriormente, o ferro é o principal metal de transição responsável pela transformação do H_2O_2 em OH^- (reação de Fenton). Assim o poder antioxidante do sangue pode ser dimensionado, indiretamente, como a habilidade de redução do ferro. Benzie e Strain, 1996 indicam o método FRAP, o qual mede a habilidade de redução férrica plasmática, como um indicador de estresse oxidativo. Porém este método ainda é pouco difundido na rotina clínica da medicina veterinária (SOARES, 2004).

2.4 TRATAMENTO

O tratamento tido hoje como clássico para a intoxicação cúprica foi o preconizado por Gooneratne em 1981, que utilizou o tetratiomolibdato (TTM), reconhecido quelante de Cu^{+2} , que é excretado de maneira inerte, favorecendo a sobrevivência dos animais.

No recente trabalho de Soares (2004) ovinos intoxicados com cobre foram tratados com TTM e apresentaram taxa sobrevivência de 80%, enquanto que todos os animais do grupo controle sucumbiram. A notória disfunção renal caracterizada

pela recuperação de apenas 50% da taxa de filtração glomerular e de alterações histológicas renais, indicando que existiam lesões residuais tanto nos glomérulos como nos túbulos. Contudo, não se pode concluir nesse trabalho se estas lesões seriam de caráter temporário ou definitivo, necessitando-se maiores estudos para esclarecer a duração desta questão. Esse mesmo trabalho também demonstrou que até nos animais que sucumbiram existia uma tentativa do organismo de produzir substâncias antioxidantes endógenas, como foi o caso do aumento dos teores de ácido úrico plasmático, para tentar diminuir a ação nociva dos radicais livres. Porém, este esforço, no caso dos animais não tratados, foi insuficiente para diminuir os efeitos dos radicais livres no auge (2^a ao 5^o dia) da crise hemolítica, sugerindo que teria efeito benéfico à utilização medicamentosa de potentes antioxidantes naturais na melhora do quadro geral, em especial nos danos oxidativos nos tecidos renais. Tal tratamento também foi sugerido como uma possível alternativa por Ortolani (2003) em revisão sobre o assunto. Porém até o momento, não haviam trabalhos elucidativos que pudessem demonstrar a ação sinérgica do tratamento com TTM associado a antioxidantes tais como a vitamina E e a vitamina C.

Embora a atividade da vitamina C, como antioxidante seja de grande importância, ela pode agir como um potente pró-oxidante na presença de excessivas concentrações de íons Fe^{+3} e Cu^{+2} (CHIHUAILAF et al., 2002). Assim, não seria conveniente o uso da vitamina C em estados de hipercupremia, como ocorre durante a crise hemolítica de ovinos com intoxicação cúprica cumulativa. Porém, de acordo com Machado (1998), caso haja o tratamento com TTM nesta fase ocorrerá uma significativa queda nos teores de cobre livre no decorrer das primeiras 24 horas, sugerindo que neste momento poder-se-ia iniciar, com maior segurança, a medicação com vitamina C.

Portanto, percebe-se que faltam trabalhos que demonstrem, de forma prática, os benefícios, até agora sugeridos e portanto teóricos, da associação de vitaminas antioxidantes, C e E, associadas ao tetratiomolibdato de amônia no tratamento da ICC, na tentativa de reduzir os danos renais e portanto minimizar o tempo de recuperação dos ovinos comprometidos.

3 HIPÓTESE

A causa *mortis* decorrente dos quadros de ICC são creditadas principalmente à lesão renal. A lesão renal ocorre devido à presença de substâncias oxidantes como Cu livre, hemoglobina e lisossimas. Espera-se que o tratamento associado de TTM (quelante de cobre) com vitaminas antioxidantes C e E diminuam os danos causados pelo complexo Cu-hb-lisossima.

4 OBJETIVO

Verificar o potencial benéfico da utilização da vitamina C e/ou da vitamina E associadas ao TTM no tratamento de ovinos acometidos por ICC, através da avaliação física, do metabolismo oxidativo bem como da análise anátomo-patológica do fígado e do rim destes animais após 60 dias da crise hemolítica (hemoglobinúria macroscópica). (dá para melhorar a forma de escrever).

5 RESULTADOS

Todos os ovinos desenvolveram o quadro clínico característico da intoxicação cúprica cumulativa (ICC). Porém, quatro animais apresentaram crise super aguda, sucumbindo rapidamente logo após a crise hemolítica, caracterizada pela hemoglobinúria macroscópica. Por esse motivo não foi possível manter o grupo controle (Grupo 1) e os 26 animais restantes foram distribuídos nos quatro grupos tratados. Devido a esta variação no quadro clínico, culminando com a perda de animais, a coloração sanguinolenta, “vinho do porto”, não foi mais esperada. Assim que os animais ficavam apáticos, inapetentes e com urina na coloração acastanhada, já era realizado teste com a fita “Combur Test®”. No entanto quando os animais estavam fisicamente bem, o tratamento só foi iniciado, quando a urina atingia a coloração clássica dos quadros de ICC, isto é semelhante ao de Vinho do Porto.

Próximo à crise hemolítica os ovinos apresentavam-se progressivamente apáticos, inapetentes e emaciados. Os cochos dos animais eram reabastecidos nas duas refeições, de forma que foi possível perceber quando sobrava alimento. Inicialmente os ovinos deixavam de comer concentrado e aproximadamente 5 dias antes da CH recusavam o feno. Ao mesmo tempo as fezes se tornavam aglomeradas e progressivamente pastosas e acompanhadas de muco. A oligúria ocorreu concomitante com a progressão dos outros sintomas, culminando com a hematúria. Com a evolução do quadro os animais perderam peso, período em que ficavam mais apáticos, evoluindo, em alguns casos, para o decúbito esternal.

5.1 DOSE DE COBRE ACUMULADA

A tabela 1 mostra e a figura 1 ilustra as diferentes quantidades de cobre administradas (g) e o tempo que levou para os animais entrarem em crise hemolítica (CH) considerando os trinta ovinos do nosso estudo.

Tabela 1 – Valores individuais para o aparecimento da crise hemolítica, em dias e valores da dose de cobre total administrada (g) com seus respectivos valores médios e desvios padrão dos ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre - São Paulo - 2008

ANIMAL	DIAS PARA CRISE HEMOLÍTICA	DOSE ADMINISTRADA (g)
1	60	24,89
2	40	12,43
3	60	24,44
4	78	47,48
5	51	19,42
6	52	21,17
7	47	14,67
8	71	39,20
9	39	11,60
10	41	11,88
11	54	19,88
12	61	23,11
13	123	76,58
14	41	11,60
15	60	21,50
16	50	19,28
17	45	15,33
18	68	26,64
19	130	72,14
20	46	14,78
21	58	23,05
22	96	41,62
23	57	23,39
24	58	21,40
25	53	22,51
26	49	19,71
27	57	22,36
28	57	22,62
29	55	17,64
30	77	40,74
MÉDIA	61,13	26,10
DESVIO PADRÃO	21,28	15,90

A figura 1 mostra a relação entre os dias para a ocorrência da CH e a quantidade total administrada de cobre (g) no referente período (Figura 2). A dose média para o desencadeamento da CH foi de 26,10 g no período médio de 61,1 dias.

Figura 1 – Relação entre o tempo (dias) e a quantidade de cobre (g) administrada para o desencadeamento da Crise Hemolítica (CH), utilizando os 30 animais deste experimento - São Paulo - 2008

Comparando a dose total de cobre administrada (g) para os animais de cada tratamento, observamos que não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,63$), o que reflete a homogeneidade dos animais utilizados no presente estudo.

5.2 AVALIAÇÃO FÍSICA

A avaliação física era feita diariamente através da observação dos animais. Durante os momentos experimentais foram aferidos frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e movimentos ruminais. Nestes momentos também as mucosas e o estado de hidratação foram avaliados.

O peso vivo dos ovinos foi acompanhado semanalmente desde a chegada destes até o final do experimento.

Frequência Cardíaca (FC)

A tabela 2 mostra que, nos momentos experimentais, não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,050$) para esta variável. Houve tendência para os animais do grupo TTM apresentarem menores valores de FC em relação ao grupo TTM+VE nos momentos M6 ($P=0,083$), e M7 ($P=0,060$) e menores que o grupo TTM+VC em M9. Também existiu tendência dos ovinos do grupo TTM+VE apresentarem valores menores de FC que os do grupo TTM+VEC em M2 (Tabela 2)

O grupo TTM+VC apresentou tendência de menores valores que o grupo TTM+VE no momento M7. Os valores das medianas da FC durante os momentos experimentais são também representados na Figura 2.

Tabela 2 – Valores de mediana e limites superior e inferior da frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM + VC	TTM + VE	TTM + VCE
M 0	6 7 (6 5 - 6 8)	6 8 (6 3 - 7 7)	6 4 (6 8 - 9 7)	7 5 (6 8 - 8 2)
M 1	1 1 6 (6 6 - 1 6 4)	1 1 2 (6 1 - 1 2 9)	9 8 (5 6 - 1 4 5)	1 1 2 (8 6 - 1 6 8)
M 2	1 1 3 (6 4 - 1 3 4)	9 3 (6 4 - 1 3 3)	8 7 (6 3 - 1 3 2)	1 4 0 (8 1 - 1 7 0)
M 3	1 2 6 (5 0 - 1 6 0)	9 4 (7 4 - 1 4 2)	9 1 (7 8 - 1 2 1)	1 1 9 (7 6 - 1 5 8)
M 4	1 3 6 (7 0 - 1 5 4)	1 0 1 (7 7 - 1 3 8)	1 1 1 (6 4 - 1 2 4)	1 1 3 (6 2 - 1 4 0)
M 5	7 1 (7 0 - 1 4 5)	9 6 (8 2 - 1 2 5)	1 0 1 (6 9 - 1 4 4)	8 7 (6 8 - 1 5 1)
M 6	7 0 (6 1 - 1 2 8)	1 0 4 (7 6 - 1 5 0)	1 1 9 (1 0 8 - 1 3 5)	1 0 5 (5 3 - 1 2 2)
M 7	6 8 (5 9 - 9 4)	7 2 (6 5 - 9 6)	7 9 (7 4 - 1 3 9)	8 4 (5 2 - 1 4 4)
M 8	6 3 (6 2 - 9 8)	7 2 (6 6 - 7 5)	6 8 (6 6 - 7 8)	6 6 (4 1 - 1 2 3)
M 9	6 2 (5 4 - 7 2)	8 4 (6 6 - 9 2)	6 8 (7 2 - 6 5)	6 1 (5 9 - 8 6)
M 1 0	6 8 (6 4 - 1 6 5)	6 0 (5 0 - 8 7)	7 3 (6 4 - 7 6)	7 0 (6 2 - 1 0 0)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os tratamentos.

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 2 - Valores de mediana para frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Frequência Respiratória (FR)

Em relação à frequência respiratória (FR) no momento M1 o grupo TTM+VEC apresentou maiores valores de FR que o Grupo TTM+VC ($P=0,046$). No M2 a FR do grupo TTM+VEC foi maior que a do o grupo TTM+VC ($P= 0,022$). No momento M4 o grupo TTM teve maior valor de FR que os grupos TTM+VC e TTM+VE ($P=0,023$ para ambos). No M6 a FR do grupo TTM+VC foi menor que do grupo TTM+VEC ($P=0,045$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de mediana e limites superior e inferior da frequência respiratória (FR), em movimentos por minuto (mpm), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	T T M	T T M + V C	T T M + V E	T T M + V C E
M 0	2 1 (1 9 - 2 4)	2 1 (1 8 - 2 6)	2 1 (1 6 - 2 8)	2 2 (1 8 - 2 7)
M 1	2 1 ^{A B} (1 4 - 2 1)	1 5 ^B (1 1 - 2 3)	1 7 ^{A B} (1 2 - 2 5)	2 2 ^A (1 8 - 3 4)
M 2	2 0 ^{A B} (1 4 - 2 4)	1 5 ^B (1 0 - 2 0)	1 6 ^{A B} (1 2 - 2 3)	2 1 ^A (1 6 - 2 5)
M 3	2 0 (1 5 - 2 6)	1 7 (1 3 - 3 0)	1 6 (1 2 - 2 0)	1 9 (1 2 - 2 9)
M 4	2 0 ^A (1 8 - 1 4 3)	1 4 ^B (1 1 - 2 1)	1 5 ^B (9 - 2 4)	2 0 ^{A B} (7 - 9 2)
M 5	2 0 (1 3 - 2 5)	1 6 (1 0 - 1 6)	1 8 (1 4 - 2 4)	1 4 (1 1 - 1 9)
M 6	1 8 ^{A B} (1 3 - 1 4)	1 4 ^B (1 0 - 2 0)	1 5 ^{A B} (1 2 - 2 7)	1 8 ^A (1 5 - 2 2)
M 7	1 8 (1 4 - 2 0)	1 8 (1 2 - 2 0)	1 5 (8 - 2 0)	1 7 (1 3 - 2 4)
M 8	1 9 (1 6 - 2 3)	1 2 (1 - 2 2)	1 8 (1 7 - 2 0)	1 3 (1 2 - 1 7)
M 9	1 6 (1 4 - 2 0)	1 7 (1 3 - 1 9)	1 6 (1 2 - 1 8)	2 0 (1 5 - 2 6)
M 1 0	2 0 (1 9 - 2 7)	1 6 (1 2 - 1 8)	2 0 (1 2 - 2 0)	1 8 (1 5 - 3 6)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os tratamentos.

Observou-se tendência para os valores do grupo TTM+VEC serem maiores que os valores do grupo TTM+VE (Figura 3).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH

Figura 3 - Valores de mediana para frequência respiratória (FR) em movimentos por minuto (mpm) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Temperatura Retal

Quanto à temperatura retal houve diferença apenas no momento M9 em que o valor do grupo TTM+VEC foi maior que o grupo TTM ($P=0,043$) (Tabela 4). Em M5 houve tendência dos valores de TTM+VC serem maiores que do grupo TTM+VE ($P=0,078$); também em M9 observou-se tendências para os valores do grupo TTM serem menores que os valores do grupo TTM+VEC ($P=0,081$) e os valores do grupo TTM+VE serem menores que do grupo TTM+VEC ($P=0,081$) (Figura 4).

Tabela 4 – Valores de mediana e limites superior e inferior da temperatura corporal (°C), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM + VC	TTM + VE	TTM + VCE
M 0	39,3 (37,6 - 39,6)	38,7 (38,5 - 39,0)	38,9 (38,7 - 39,7)	38,8 (38,6 - 40,0)
M 1	38,4 (37,4 - 39,3)	38,9 (38,3 - 39,9)	39,0 (37,8 - 39,9)	39,2 (37,4 - 40,4)
M 2	38,9 (37,4 - 39,9)	38,9 (37,4 - 40,2)	40,0 (37,1 - 39,8)	38,9 (37,4 - 40,1)
M 3	38,6 (37,1 - 39,8)	38,6 (38,0 - 39,2)	39,0 (37,6 - 39,4)	38,5 (36,5 - 39,1)
M 4	39,0 (37,8 - 39,6)	38,5 (37,8 - 39,1)	38,3 (38,1 - 39,2)	38,7 (38,2 - 39,4)
M 5	38,8 (37,9 - 39,1)	38,6 (37,7 - 39,4)	38,3 (37,6 - 38,5)	38,9 (38,0 - 39,2)
M 6	38,6 (38,0 - 39,5)	38,5 (38,3 - 39,0)	38,4 (37,7 - 38,6)	38,7 (38,3 - 39,0)
M 7	38,7 (37,1 - 38,9)	38,4 (37,1 - 39,0)	38,3 (36,7 - 38,7)	37,9 (37,3 - 38,7)
M 8	38,5 (37,8 - 39,9)	38,6 (38,3 - 38,9)	37,8 (36,5 - 38,5)	39,0 (38,0 - 39,2)
M 9	38,0 ^B (37,0 - 38,1)	38,1 ^{A B} (37,8 - 38,8)	37,8 ^{A B} (36,3 - 39,8)	39,0 ^A (38,1 - 39,2)
M 10	37,8 (37,7 - 38,7)	38,4 (38,1 - 38,8)	38,7 (38,4 - 38,8)	39,3 (39,2 - 39,6)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre grupos.

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH

Figura 4 - Valores de mediana para temperatura corporal (°C), de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Movimentos Ruminais (MR)

Na avaliação da movimentação ruminal em três minutos houve diferença no momento M4 entre os grupos de forma que o grupo TTM foi maior que os outros ($P=0,045$ para TTM+VC; $P=0,045$ para TTM+VE e $P=0,037$ para TTM+VEC) (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de mediana e limites superior e inferior de movimentos ruminais (MR) em três minutos, de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	T T M	T T M + V C	T T M + V E	T T M + V C E
M 0	3 (2 - 3)	2 (2 - 3)	2 (2 - 3)	3 (1 - 4)
M 1	2 (2 - 3)	1 (0 - 3)	2 (0 - 3)	3 (0 - 4)
M 2	3 (1 - 3)	2 (1 - 3)	2 (1 - 6)	2 (0 - 3)
M 3	3 (1 - 3)	2 (0 - 3)	2 (1 - 3)	2 (0 - 3)
M 4	3^A (2 - 3)	2^B (0 - 3)	2^B (0 - 3)	2^B (0 - 2)
M 5	3 (0 - 3)	1 (0 - 3)	2 (0 - 2)	2 (0 - 3)
M 6	3 (0 - 3)	2 (1 - 3)	2 (0 - 3)	1 (0 - 3)
M 7	3 (0 - 4)	3 (2 - 3)	2 (0 - 4)	2 (0 - 3)
M 8	3 (2 - 3)	3 (2 - 3)	3 (2 - 4)	3 (2 - 3)
M 9	4 (3 - 4)	3 (1 - 3)	3 (3 - 5)	3 (3 - 5)
M 10	2 (0 - 4)	3 (2 - 4)	2 (1 - 2)	3 (3 - 3)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre.

Numericamente, até o momento 6, todos os valores de MR em três minutos estiveram dentro da normalidade para a espécie. Porém as características destes movimentos se alteravam da mesma forma para todos os animais, os ciclos eram incompletos e com baixa tonicidade. Observou-se ainda tendência dos valores do grupo TTM serem maiores que os valores do grupo TTM+VC em M3 ($P=0,068$) (Figura 5).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 5 - Valores de mediana de movimentos ruminais (MR) em três minutos, de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Mucosas

As mucosas dos ovinos, estudados neste experimento, seguiram o mesmo perfil na evolução de coloração durante os momentos, não havendo diferença entre os animais que receberam diferentes tratamentos. A coloração no momento basal (M0) era rósea (normocorada) e, durante dois a quatro dias da crise hemolítica ela se tornava esbranquiçada, levemente achocolatada, passando para coloração esbranquiçada-amarelada e por fim pálida. Deve-se ressaltar que as mucosas, pós-crise hemolítica, estavam sempre hipocoradas. Apenas dois animais (um do grupo TTM+VC e outro do grupo TTM+VE), 10 dias pós-crise ainda apresentavam mucosas ictéricas, o restante possuía mucosas róseas.

Pesos

O peso vivo dos animais (kg) está ilustrado no quadro 1, durante o período de 42 dias antes da crise hemolítica, durante a fase de intoxicação, até 60 dias após a mesma. Todos os animais, independentemente do tratamento, seguiram o mesmo padrão, ocorrendo aumento discreto e gradual na fase de intoxicação e notada queda após a CH, seguida de novo aumento como ilustra a figura 6.

Quadro 1 – Valores de mediana de peso vivo (kg) nas fases de pré e pós-intoxicação de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

D i a s	T T M	T T M + V C	T T M + V E	T T M + V C E
-42	26,3	25,1	21,1	24,7
-35	26,2	25,9	27,5	25,0
-28	26,2	26,1	28,1	24,9
-21	26,7	26,3	28,6	25,5
-14	27,0	26,2	28,7	25,3
-7	27,3	26,5	28,4	25,3
0	26,8	25,3	27,4	25,0
7	23,0	22,8	25,4	23,1
14	21,9	20,9	24,9	18,9
21	23,6	22,1	27,6	18,6
28	24,5	23,4	28,0	18,9
35	25,6	24,3	27,3	20,6
42	26,5	25,3	27,6	22,0
49	27,9	25,5	29,6	21,9
56	27,7	26,0	29,9	21,6
60	29,1	27,0	29,2	21,4

Nota: o momento da Crise hemolítica (CH) está representado pelo algalismo zero (0).

Nota: o momento da Crise hemolítica (CH) está representado pelo algarismo zero (0).

Figura 6 – Valores de mediana para evolução do peso vivo durante as fases pré e pós de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado ambas as vitaminas (TTM+VCE) – São Paulo - 2008

5.3 VARIÁVEIS SANGUÍNEAS

Concentração sérica de Cobre

As concentrações séricas de cobre foram maiores nos animais que receberam TTM em relação aos animais que receberam TTM+VCE nos momentos M2 ($P=0,023$); M3 ($P=0,012$); M4 ($P=0,020$) e M5 ($P=0,022$). No momento M3 as concentrações séricas de cobre também foram menores para os animais tratados com a associação de TTM+VCE em relação aos ovinos tratados apenas com TTM+VE ($P=0,037$). (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de mediana e limites superior e inferior do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM + VC	TTM + VE	TTM + VCE
M 0	10,39	9,77	9,23	8,19
	(7,26 - 13,42)	(8,40 - 11,50)	(8,18 - 10,65)	(4,98 - 11,33)
M 1	24,58	48,91	41,28	19,36
	(23,65 - 30,74)	(14,17 - 80,65)	(14,33 - 62,93)	(8,81 - 24,50)
M 2	69,09^A	69,61^{AB}	67,30^{AB}	41,60^B
	(49,24 - 72,78)	(35,91 - 78,43)	(41,65 - 95,26)	(16,89 - 64,88)
M 3	63,02^A	55,55^{AB}	71,10^A	43,06^B
	(57,59 - 83,12)	(15,02 - 131,50)	(21,42 - 90,63)	(20,95 - 53,02)
M 4	61,99^A	53,78^{AB}	60,04^{AB}	45,24^B
	(51,94 - 99,35)	(44,25 - 93,23)	(40,79 - 85,25)	(35,20 - 49,04)
M 5	62,61^A	53,22^{AB}	61,16^{AB}	49,04^B
	(49,65 - 107,72)	(38,27 - 171,65)	(42,05 - 74,24)	(43,65 - 50,38)
M 6	47,04	43,77	51,60	38,15
	(40,70 - 57,17)	(35,91 - 66,61)	(34,33 - 62,81)	(32,81 - 51,32)
M 7	30,64	29,29	35,50	28,13
	(23,92 - 47,35)	(25,43 - 38,43)	(23,04 - 46,86)	(22,03 - 37,84)
M 8	28,37	25,51	26,06	25,94
	(23,64 - 30,32)	(19,76 - 26,46)	(18,78 - 34,13)	(14,87 - 28,94)
M 9	19,73	16,38	21,02	20,09
	(15,61 - 36,38)	(12,76 - 59,06)	(14,67 - 21,76)	(9,17 - 23,58)
M 10	13,20	12,75	16,68	14,35
	(12,06 - 14,80)	(10,39 - 20,31)	(11,65 - 17,23)	(13,91 - 14,91)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os grupos.

No momento M1 os valores do grupo TTM+VEC tendeu a ser menor que os valores dos grupos TTM ($P=0,060$) e TTM+VC ($P=0,093$); em M2 houve tendência dos valores do grupo TTM+VE serem maiores que os valores do grupo TTM+VEC ($P=0,066$); nos momentos M3, M4 e houveram tendências semelhantes para os valores do grupo TTM+VC serem maiores que os valores do grupo TTM+VEC ($P=0,095$ e $P=0,070$ respectivamente); já no momento M5 os valores do grupo TTM+VE que tendenciaram a ser maiores que os valores do grupo TTM+VEC ($P=0,083$) (Figura 7).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 7 - Valores de mediana para cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Hematócrito

A avaliação dos valores de hematócrito (Ht) revelou diferenças em dois momentos. No momento M4 o valor do Ht grupo TTM foi maior que do grupo TTM+VE (P=0,07) e no M6 o volume globular médio dos animais do grupo TTM foi maior que o grupo TTM+VE (P=0,036) (Tabela10).

Tabela 7 – Valores de mediana e limites superior e inferior do hematócrito (%) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	T T M	T T M + V C	T T M + V E	T T M + V C E
M 0	3 4 (2 5 - 3 7)	3 7 (3 4 - 4 3)	3 6 (2 7 - 3 8)	2 9 (2 5 - 4 0)
M 1	3 0 (1 4 - 3 5)	2 8 (1 7 - 3 3)	2 8 (1 5 - 3 0)	2 6 (1 7 - 2 9)
M 2	2 2 (1 2 - 3 2)	2 2 (1 7 - 1 5)	2 2 (1 1 - 2 7)	1 8 (1 0 - 2 7)
M 3	1 9 (1 2 - 2 9)	2 0 (1 0 - 2 6)	2 2 (1 3 - 2 5)	1 3 (8 - 1 9)
M 4	2 2 ^A (1 4 - 2 9)	1 8 ^{A B} (1 0 - 2 2)	1 9 ^{A B} (1 2 - 2 2)	1 1 ^B (1 0 - 1 7)
M 5	2 0 (1 6 - 2 8)	1 8 (1 1 - 2 1)	1 6 (1 2 - 2 0)	1 6 (1 4 - 1 9)
M 6	2 1 ^A (1 8 - 2 5)	1 7 ^{A B} (1 4 - 3 0)	1 8 ^B (1 0 - 2 1)	1 8 ^{A B} (1 4 - 2 7)
M 7	2 2 (1 9 - 2 8)	2 2 (2 0 - 2 7)	2 2 (1 0 - 2 8)	2 5 (2 3 - 2 7)
M 8	3 0 (2 6 - 3 2)	2 7 (2 5 - 2 9)	2 6 (2 2 - 2 8)	2 5 (2 1 - 3 1)
M 9	3 4 (2 7 - 3 9)	2 9 (2 7 - 3 0)	2 9 (2 8 - 3 0)	3 1 (3 0 - 3 1)
M 1 0	3 6 (3 5 - 3 7)	3 5 (2 5 - 3 7)	3 3 (3 2 - 3 6)	3 5 (3 3 - 3 8)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os grupos.

Ocorreram ainda tendências nos momentos M3 para os valores do grupo TTM serem maiores que do grupo TTM+VEC (P= 0,088); no momento M4 para os valores de TTM+VEC serem menores que os valores de TTM+VE (P=0,068) e também em M5 para o grupo TTM apresentar valores maiores que os do grupo TTM+VE (P=0,068) (Figura 11).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 8 - Valores de mediana para hematócrito (%) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Concentração sérica de Uréia

A análise entre os grupos de tratamento revelou diferença apenas no momento M3 em que o grupo TTM+VEC apresentou maiores concentrações séricas de uréia que o grupo TTM ($P=0,035$) (Tabela 7).

Tabela 8 – Valores de mediana e limites superior e inferior da uréia sérica (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM + VC	TTM + VE	TTM + VCE
M 0	5,25 (3,95 - 9,34)	4,99 (3,40 - 7,76)	5,63 (3,39 - 7,32)	4,74 (4,16 - 6,43)
M 1	8,27 (6,66 - 19,44)	8,69 (5,73 - 12,16)	8,15 (6,84 - 13,91)	8,00 (7,61 - 16,44)
M 2	7,11 (3,68 - 24,46)	11,21 (7,42 - 15,93)	15,94 (7,67 - 22,08)	13,39 (7,03 - 20,36)
M 3	11,58^B (4,39 - 18,09)	8,20^{AB} (6,27 - 25,02)	18,65^{AB} (5,72 - 43,94)	20,52^A (5,41 - 31,08)
M 4	10,07 (6,53 - 64,87)	12,00 (5,69 - 53,35)	32,57 (7,22 - 56,09)	22,49 (9,56 - 42,60)
M 5	12,15 (8,61 - 47,00)	14,68 (4,92 - 70,97)	34,05 (5,56 - 94,10)	29,89 (9,14 - 61,83)
M 6	16,04 (5,97 - 72,58)	14,94 (4,31 - 103,52)	46,58 (6,49 - 101,54)	46,84 (6,35 - 64,87)
M 7	9,42 (6,78 - 215,40)	9,84 (8,30 - 44,55)	10,58 (6,72 - 154,87)	37,83 (5,36 - 67,37)
M 8	6,98 (6,44 - 7,78)	6,54 (6,09 - 11,09)	8,78 (4,89 - 8,78)	19,15 (13,94 - 29,07)
M 9	6,10 (5,30 - 7,40)	6,45 (5,19 - 12,64)	5,03 (4,92 - 8,50)	13,21 (8,90 - 23,30)
M 10	7,41 (5,24 - 9,68)	6,16 (1,58 - 8,14)	5,31 (4,91 - 7,88)	9,33 (7,76 - 10,85)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre.

A figura 8 ilustra as tendências dos grupos TTM+VE e TTM+VEC serem maiores que os outros dois grupos em M6 e do grupo TTM+VEC ter valores maiores que os outros tratamentos em M7, porém não houve diferença entre eles ($P>0,0050$) (Tabela 7 e Figura 8). A figura 8 ilustra a tendência dos valores do grupo TTM serem menores que os valores do grupo TTM+VE no momento M2 ($P=0,093$), o grupo TTM também tendeu a possuir menores valores que o grupo TTM+VEC nos momentos M7 e M8 ($P=0,076$ e $P=0,052$ respectivamente). Em M8 houve tendência ainda dos valores do grupo TTM+VEC serem maiores que os valores dos grupos TTM+VC e TTM+VE ($P=0,052$ e $P=0,081$). Finalmente em M9 ocorreram tendências para os valores do grupo TTM+VEC serem maiores que os valores do grupo TTM e TTM+VE ($P=0,052$ e $P=0,081$).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 9 - Valores de mediana para uréia sérica (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Concentração sérica de creatinina

Ocorreram diferenças entre os tratamentos em três momentos. No momentos M1 os grupos TTM+VE e TTM+VEC apresentaram maiores valores de creatinina sérica que o grupo TTM+VC ($P=0,045$ e $P=0,038$, respectivamente). No momento M3 as concentrações séricas de creatinina foram maiores para os animais do TTM+VEC para os animais pertencentes ao grupo TTM ($P=0,028$). No momento M7 os valores encontrados para os animais do grupo TTM+VEC foram maiores que para os do grupo TTM+VC ($P=0,037$) (Tabela 8).

Tabela 9 – Valores de mediana e limites superior e inferior da creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM+VC	TTM+VE	TTM+VCE
M 0	112,27 (107,85 - 130,83)	107,67 (95,47 - 114,04)	107,41 (105,20 - 116,69)	123,76 (106,96 - 140,56)
M 1	128,18^{AB} (84,86 - 198,02)	102,99^B (91,94 - 149,40)	128,62^A (112,27 - 176,80)	136,14^A (120,22 - 176,80)
M 2	143,00 (96,36 - 170,61)	133,93 (96,36 - 158,24)	172,38 (109,62 - 270,50)	148,51 (126,41 - 193,60)
M 3	143,00^B (94,59 - 216,58)	126,41^{AB} (91,05 - 248,4)	232,49^{AB} (112,27 - 552,50)	224,54^A (144,09 - 495,04)
M 4	154,70 (103,43 - 432,28)	139,67 (91,94 - 583,44)	403,10 (115,80 - 875,16)	321,78 (125,53 - 583,44)
M 5	153,82 (124,64 - 760,24)	144,53 (86,63 - 716,04)	503,88 (110,50 - 1087,30)	321,78 (159,12 - 689,52)
M 6	151,16 (110,50 - 200,67)	208,62 (89,28 - 954,72)	573,72 (99,89 - 1122,70)	517,14 (143,21 - 636,48)
M 7	132,60^{AB} (109,62 - 319,12)	127,30^B (93,70 - 160,89)	131,72^{AB} (117,57 - 1463,00)	433,16^A (129,06 - 592,28)
M 8	118,46 (93,70 - 120,22)	96,36 (91,05 - 107,85)	107,85 (99,01 - 116,69)	175,03 (92,82 - 274,92)
M 9	116,25 (93,70 - 123,76)	106,08 (93,70 - 138,79)	110,50 (99,01 - 112,27)	136,14 (129,95 - 159,12)
M 10	125,09 (115,80 - 134,37)	108,73 (95,47 - 115,80)	108,73 (103,43 - 112,27)	156,47 (118,46 - 158,24)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os grupos

A figura 9 ilustra as tendências dos valores para os grupos TTM, TTM+VC, TTM+VE e TTM+VEC. Em M2 a tendência foi para o grupo TTM+VE ser maior que os valores do grupo TTM+VC ($P=0,066$). No momento M7 os valores do grupo TTM+VEC tendeu a ser maior que os valores do grupo TTM ($P=0,095$). No momento M9 a tendência foi para o grupo TTM+VEC possuir maiores valores que os grupos TTM e TTM+VE ($P=0,052$ e $P=0,081$ respectivamente). Nos 60 dias após a CH (M10) os valores do grupo TTM+VEC tenderam a ser maiores que os valores dos grupos TTM+VC e TTM+VE ($P=0,052$ e $P=0,081$ respectivamente).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 10 - Valores de mediana para creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Concentração sérica de malondialdeído

A tabela 9 e a figura 10 mostram os valores das medianas para a concentração sérica de malondialdeído (MDA). Apenas no M5 o grupo TTM+VE apresentou maior concentração de MDA em relação aos animais do grupo TTM+VEC ($P=0,0081$).

Tabela 10 – Valores de mediana e limites superior e inferior do malondialdeído sérico ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM + VC	TTM + VE	TTM + VCE
M 0	0,18 (0,02 - 0,58)	0,44 (0,25 - 0,75)	0,40 (0,23 - 0,56)	0,50 (0,23 - 0,75)
M 1	0,50 (0,2 - 1,45)	1,16 (0,18 - 1,38)	1,06 (0,80 - 1,74)	0,80 (0,54 - 1,04)
M 2	1,02 (0,62 - 1,43)	1,01 (0,69 - 1,44)	1,15 (0,77 - 1,97)	0,80 (0,48 - 1,33)
M 3	1,03 (0,27 - 1,27)	0,97 (0,47 - 1,96)	1,37 (0,38 - 3,25)	0,87 (0,26 - 1,68)
M 4	1,02 (0,72 - 1,45)	1,31 (0,31 - 2,27)	1,90 (0,87 - 2,88)	1,14 (0,52 - 1,71)
M 5	0,39 ^{AB} (0,03 - 2,37)	0,44 ^{AB} (1,14 - 3,07)	1,87 ^A (1,42 - 2,87)	0,68 ^B (0,55 - 1,37)
M 6	0,88 (0,35 - 1,30)	1,42 (0,72 - 3,16)	2,29 (0,19 - 3,12)	1,25 (0,48 - 1,44)
M 7	0,95 (0,38 - 2,89)	0,74 (0,53 - 1,26)	1,20 (1,09 - 5,41)	1,16 (0,37 - 2,63)
M 8	0,52 (0,12 - 1,06)	0,84 (0,32 - 1,16)	0,58 (0,56 - 2,46)	0,66 (0,57 - 0,84)
M 9	0,63 (0,06 - 0,64)	0,64 (0,30 - 1,21)	0,71 (0,63 - 2,24)	0,50 (0,22 - 1,07)
M 10	0,67 (0,12 - 3,68)	0,57 (0,51 - 0,79)	0,50 (0,31 - 1,71)	0,57 (0,08 - 1,33)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre.

A figura 10 ilustra as medianas dos valores de malondialdeído nos diferentes tratamentos. No momento M1 notou-se tendência para os valores do grupo TTM+VE serem maiores que os valores do grupo TTM ($P=0,060$). Em M4 o grupo TTM+VEC tendeu a possuir menores valores que o grupo TTM+VE ($P=0,083$). No momento M6 os valores do grupo TTM+VE tenderam a ser maiores que os valores do grupo TTM e TTM+VEC ($P=0,083$ em ambos). Já em M7 os valores do grupo TTM+VE apresentaram tendência para serem maiores que do grupo TTM+VC ($P=0,060$).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 11 - Valores de mediana para malondialdeído sérico ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH)

A tabela 11 mostram os valores das medianas das concentrações sanguíneas de Glutathiona Reduzida (GSH). Ocorreu diferença no M2 quando o grupo TTM apresentou maiores concentrações de GSH que os grupos TTM+VC ($P=0,008$), TTM+VE ($P=0,008$) e TTM+VEC ($P=0,035$). No momento M7 as concentrações de GSH do grupo TTM+VC foram maiores que do grupo TTM+VE ($P=0,022$).

Tabela 11 – Valores de mediana e limites superior e inferior da atividade da glutathione reduzida (mg/dL) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM + VC	TTM + VE	TTM + VCE
M 0	26,39 (22,13 - 46,40)	21,35 (9,07 - 46,00)	22,60 (22,13 - 46,33)	26,39 (18,70 - 31,73)
M 1	22,67 (10,87 - 27,32)	15,15 (7,30 - 21,73)	16,42 (11,33 - 19,50)	11,90 (6,84 - 24,25)
M 2	19,88^A (19,55 - 25,67)	15,95^B (7,98 - 18,06)	14,19^B (9,25 - 17,00)	12,71^B (8,00 - 22,93)
M 3	23,68 (7,21 - 29,71)	15,16 (9,85 - 20,76)	14,66 (11,89 - 21,59)	14,14 (7,48 - 18,70)
M 4	19,21 (17,97 - 31,82)	14,26 (12,14 - 21,28)	12,35 (10,80 - 23,27)	18,00 (10,91 - 21,79)
M 5	16,55 (13,52 - 29,78)	18,82 (12,73 - 23,54)	17,65 (15,00 - 27,14)	14,32 (13,00 - 27,00)
M 6	19,79 (14,47 - 22,97)	17,38 (9,64 - 19,21)	19,79 (11,22 - 40,60)	16,39 (8,68 - 34,47)
M 7	21,82^{AB} (18,21 - 32,53)	22,50^A (21,61 - 24,43)	19,63^B (13,57 - 21,76)	22,68^{AB} (18,28 - 41,60)
M 8	28,37 (23,74 - 32,06)	26,11 (20,41 - 27,88)	19,63 (19,06 - 26,91)	20,72 (17,41 - 23,79)
M 9	28,13 (24,86 - 42,34)	26,87 (18,79 - 37,01)	36,50 (28,44 - 42,50)	31,02 (29,10 - 33,00)
M 10	59,97 (40,50 - 79,44)	33,07 (16,43 - 64,72)	37,57 (36,45 - 44,76)	24,63 (11,39 - 37,86)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os grupos.

A análise mostrou ainda tendência da atividade de glutathione ser maior no grupo TTM que no grupo TTM+VEC em M1 ($P=0,074$) e que no grupo TTM+VC em M6 ($P=0,055$). Já em M7 notou-se tendência do grupo TTM+VC apresentar maior atividade desta enzima que o grupo TTM ($P=0,050$), assim como o grupo TTM+VEC teve tendência a ser maior em relação ao grupo TTM+VE ($P=0,0945$) (Figura 12).

M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 12 - Valores de mediana para da atividade da glutatona reduzida (mg/dL) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Ácido Úrico

A concentração sérica de ácido úrico variou com o mesmo padrão para os momentos M1, M2 e M3, quando as concentrações deste metabólito foram maiores para o grupo TTM+VE que para o grupo TTM ($P=0,036$; $P=0,036$ e $P=0,023$, respectivamente).

A análise revelou ainda as seguintes tendências: em M2 a concentração do grupo TTM mostrou tendência de ser menor que o Grupo TTM+VEC ($P= 0,055$) e do grupo TTM+VE ser maior que do grupo TTM+VEC. No momento M3 o grupo TTM apresentar menor concentração que o grupo TTM+VEC ($P= 0,074$). Em M4 o grupo TTM+VEC tendenciou a ter menores valores que os grupos TTM+VC e TTM+VE ($P= 0,055$ para ambos). Em M5 foi o grupo TTM+VC que tendeu a possuir maior concentração que os grupos TTM e TTM+VEC ($P= 0,083$ e $P= 0,055$).

respectivamente). No momento M6 houve tendência para o grupo TTM+VE ter maior concentração que o grupo TTM+VEC ($P=0,083$). Em M7 o grupo TTM+VEC teve menores valores que os grupos TTM+VC e TTM+VE ($P= 0,060$ e $P= 0,095$ respectivamente). Em M8 o grupo TTM+VC tendeu a ter maior concentração que o grupo TTM+VE ($P= 0,052$). Trinta dias após a CH (M9) o grupo TTM tendeu a ter menores concentrações que o grupo TTM+VC. Finalmente, 60 dias após a CH (M10) o grupo TTM+VEC apresentou tendência a ter menor concentração que os grupos TTM+VC e TTM+VE ($P= 0,052$ e $P= 0,081$ respectivamente) (Tabela 12 e Figura 13).

Tabela 12 – Valores de mediana e limites superior e inferior da concentração de ácido úrico sérico (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM +VC	TTM +VE	TTM +VCE
M 0	0,03 (0,02 - 0,23)	0,11 (0,09 - 0,18)	0,09 (0,09 - 0,22)	0,02 (0,02 - 0,11)
M 1	0,38^B (0,12 - 1,05)	0,71^{AB} (0,33 - 2,37)	1,04^A (0,47 - 8,85)	0,27^{AB} (0,15 - 2,28)
M 2	0,24^B (0,05 - 1,36)	1,23^{AB} (0,35 - 5,92)	2,08^A (0,52 - 7,93)	0,67^{AB} (0,13 - 2,01)
M 3	0,15^B (0,06 - 0,46)	0,62^{AB} (0,30 - 5,13)	1,18^A (0,29 - 5,0)	0,50^{AB} (0,06 - 1,22)
M 4	0,07 (0,05 - 0,38)	0,79 (0,33 - 3,36)	1,13 (0,32 - 2,93)	0,28 (0,04 - 1,13)
M 5	0,07 (0,04 - 1,32)	0,75 (0,27 - 3,36)	0,68 (0,27 - 3,06)	0,27 (0,04 - 0,77)
M 6	0,05 (0,03 - 0,77)	0,29 (0,20 - 1,00)	0,60 (0,30 - 1,86)	0,13 (0,03 - 0,70)
M 7	0,05 (0,02 - 0,62)	0,32 (0,15 - 0,36)	0,29 (0,22 - 0,43)	0,06 (0,03 - 0,32)
M 8	0,03 (0,02 - 0,32)	0,30 (0,28 - 0,32)	0,26 (0,09 - 0,28)	0,30 (0,04 - 1,02)
M 9	0,04 (0,03 - 0,30)	0,36 (0,15 - 0,83)	0,20 (0,14 - 0,21)	0,22 (0,03 - 0,42)
M 10	0,00 (0,00 - 0,01)	0,27 (0,21 - 0,36)	0,23 (0,19 - 0,26)	0,03 (0,03 - 0,16)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os grupos.

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH

Figura 13 – Valores de mediana para da concentração de ácido úrico sérico (mmol/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)

A análise revelou diferenças em dois momentos. No momento M2 maiores valores foram encontrados no grupo TTM+VEC em relação ao grupo TTM+VE ($P=0.042$). Em M3 os valores do grupo TTM+VEC foram maiores que os valores do grupo TTM ($P=0.035$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Valores de mediana e limites superior e inferior da habilidade de redução férrica plasmática ($\times 10^3 \mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

	TTM	TTM + VC	TTM + VE	TTM + VCE
M 0	0,29 (0,16 - 0,33)	0,19 (0,16 - 0,24)	0,23 (0,16 - 0,33)	0,28 (0,16 - 0,40)
M 1	0,18 (0,44 - 0,93)	0,70 (0,39 - 6,23)	3,30 (0,42 - 8,44)	2,25 (1,02 - 9,92)
M 2	1,13 ^{AB} (0,36 - 7,63)	0,67 ^{AB} (0,39 - 9,55)	3,66 ^B (0,66 - 13,53)	7,10 ^A (0,65 - 21,01)
M 3	0,91 ^B (0,44 - 2,99)	0,72 ^{AB} (0,46 - 14,54)	1,37 ^{AB} (0,41 - 7,78)	11,57 ^A (0,51 - 14,87)
M 4	0,51 (0,37 - 0,80)	0,63 (0,49 - 9,24)	2,47 (0,36 - 8,21)	1,13 (0,35 - 11,07)
M 5	0,56 (0,47 - 0,69)	0,70 (0,42 - 8,20)	2,28 (0,28 - 7,00)	2,81 (0,49 - 10,27)
M 6	0,58 (0,43 - 3,06)	0,45 (0,36 - 5,45)	3,46 (0,21 - 8,02)	0,55 (0,39 - 1,36)
M 7	0,37 (0,25 - 0,70)	0,35 (0,25 - 0,58)	0,32 (0,18 - 0,92)	0,55 (0,32 - 0,90)
M 8	0,30 (0,23 - 0,35)	0,21 (0,20 - 0,22)	0,32 (0,25 - 0,40)	0,51 (0,33 - 0,69)
M 9	0,21 (0,20 - 0,26)	0,26 (0,21 - 0,31)	0,16 (0,14 - 0,21)	0,43 (0,24 - 0,57)
M 10	0,21 (0,13 - 0,28)	0,16 (0,14 - 0,43)	0,17 (0,11 - 0,23)	0,24 (0,21 - 0,29)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras nas linhas indicam diferenças entre os grupos.

O correram também tendências, como em M3 onde os valores de TTM+VEC tenderam a serem maiores que os valores de TTM+VE ($P = 0.074$). Em M4 o grupo TTM+VE teve tendência a apresentar maiores valores que o grupo TTM ($P = 0.074$). No momento M8 as tendências foram para o grupo TTM possuir maiores valores que o grupo TTM+VC ($P = 0.052$) e também para o grupo TTM+VC ter menores valores que os grupos TTM+VE e TTM+VEC ($P = 0.081$ e $P = 0.052$ respectivamente). Finalmente, 30 dias após a CH o grupo TTM+VE tendeu a apresentar valores maiores que o grupo TTM+VC e menores que o grupo TTM+VEC ($P = 0.052$ para ambos) (Figura14).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 14 – Valores de mediana para da habilidade de redução férrica plasmática ($\times 10^3$ $\mu\text{mol/L}$) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

5.4 VARIÁVEL URINÁRIA

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

A análise urinária da NAG revelou maiores teores no grupo TTM+VEC em relação ao grupo TTM+VE no M2 ($P=0,027$). No M7 os maiores teores ocorreram no grupo TTM+VE em relação ao grupo TTM+VEC ($P=0,037$) (Tabela).

Tabela 14 – Valores de mediana e limites superior e inferior da atividade urinária de N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (U/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo – 2008

	TTM	TTM+VC	TTM+VE	TTM+VCE
M 0	1,70 (0,57 - 1,93)	1,38 (0,48 - 2,28)	1,07 (0,48 - 1,74)	1,59 (0,36 - 2,04)
M 1	3,79 (2,28 - 6,48)	2,88 (2,27 - 99,72)	3,74 (1,29 - 49,75)	8,03 (1,37 - 17,16)
M 2	3,24^{AB} (1,87 - 7,48)	5,23^{AB} (1,47 - 51,93)	3,71^B (0,83 - 10,84)	9,63^A (4,30 - 34,38)
M 3	24,41 (2,25 - 58,18)	17,75 (0,87 - 53,53)	8,58 (1,09 - 25,32)	20,79 (3,07 - 427,74)
M 4	10,16 (2,48 - 153,80)	4,26 (2,13 - 16,24)	3,66 (2,50 - 27,86)	4,71 (2,82 - 21,22)
M 5	26,71 (1,87 - 121,83)	2,92 (1,64 - 18,75)	6,41 (3,13 - 39,99)	4,22 (2,79 - 11,94)
M 6	12,69 (0,98 - 29,51)	1,82 (0,68 - 25,94)	2,13 (1,83 - 26,06)	2,47 (1,69 - 5,54)
M 7	1,53^{AB} (1,08 - 3,34)	2,73^{AB} (1,57 - 8,98)	5,06^A (1,93 - 25,74)	1,87^B (1,23 - 2,39)
M 8	1,72 (1,29 - 2,52)	1,52 (1,58 - 2,33)	1,59 (0,82 - 4,23)	0,99 (0,98 - 2,36)
M 9	2,70 (1,83 - 2,73)	1,55 (0,68 - 2,04)	2,03 (0,87 - 2,61)	1,42 (0,61 - 2,11)
M 10	2,84 (0,98 - 55,67)	2,52 (1,73 - 3,47)	2,59 (1,24 - 3,94)	1,74 (1,05 - 2,86)

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os grupos.

Houve tendência no momento M7 para o grupo TTM+VE apresentar maiores atividades que o grupo TTM ($P=0,095$). Também ocorreu tendência em M9 para o grupo TTM ter maiores valores que os grupos TTM+VC e TTM+VEC ($P=0,061$ para ambos) (Figura 15).

Nota: M0: momento basal; M1: dia da crise hemolítica (CH); M2: um dia pós CH; M3: dois dias pós CH; M4: três dias pós CH; M5: quatro dias pós CH; M6: cinco dias pós CH; M7: 10 dias pós CH; M8: 15 dias pós CH; M9: 30 dias pós CH; M10: 60 dias pós CH.

Figura 15 – Valores de mediana para da atividade urinária de N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (U/L) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratiomolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

5.5 RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

A Figura 16 mostra a relação entre a frequência cardíaca (bpm) e o hematócrito (%) dos ovinos utilizados neste estudo. Foi observada correlação média ($r = 0,52$) entre as variáveis estudadas.

Figura 16 – Relação entre a frequência cardíaca (bpm) e o hematócrito (%) de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas as vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

5.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Na avaliação histológica dos animais que participaram do experimento 89% apresentou infiltrado inflamatório nos rins e 35% apresentou glomerulonefrite e 50% apresentou pigmentos nos rins. O principal achado no fígado foi o infiltrado inflamatório, presente em 75% dos ovinos. A avaliação dos grupos de tratamento está representada no quadro 2.

Quadro 2 – Ocorrência de lesões hepáticas e renais (%) distribuídas segundo o grupo de tratamento de ovinos da raça Santa Inês intoxicados por cobre e tratados somente com tetratimolibdato de amônio (TTM), ou este associado à vitamina C (TTM+VC), ou associado à vitamina E (TTM+VE) ou ainda associado a ambas vitaminas (TTM+VCE) - São Paulo - 2008

		TTM	TTM+VC	TTM+VE	TTM+VEC
Fígado	Infiltrado	60%	83%	66%	42%
	Inflamatório				
	Infiltrado	80%	83%	100%	85%
	Inflamatório				
Rins	Glomérulonefrite	20%	66%	83%	14%
	Pigmentos	20%	16%	50%	42%

A presença de pigmentos foi observada principalmente nos animais que não chegaram ao momento 10 deste experimento e, os animais que morreram de forma extremamente aguda, apresentaram congestão generalizada e edema pulmonar. Foi observado ainda que, em relação ao pulmão 35% dos animais apresentaram edema, 50% congestão e 39% infiltrado inflamatório. No baço, 35%, apresentaram congestão e hemossiderose. Alguns animais, que vieram a óbito neste quadro agudo (animais desconsiderados neste estudo), apresentaram úlcera de abomaso (46%).

Figura 17 – Fígado de ovino. A – depósitos de cobre rodamina 10 x. B – depósitos de cobre rodamina 40 x. C – depósitos de sais de ferro 40 x. D – hemorragia H&E 10 x. E e F – Infiltrado inflamatório com presença de macrófagos espumosos 40 x.

Figura 18 – Rim de ovino. A – Depósitos de cobre, rodamina 10x. B – Depósitos de cobre, rodamina 40x. C – Depósito de sais de ferro, Pearls 10x. D – Glomérulonefrite em estágio avançado, H&E 10x. E – Hemorragia, H&E 10x. F – hemorragia e necrose tubular e glomerulonefrite, H&E 10x.

6 DISCUSSÃO

As elevadas concentrações de cobre presente no sangue no momento da CH e no fígado dos animais necropsiados, bem como a sintomatologia clínica apresentada pelos animais, não deixa dúvida sobre o desenvolvimento do quadro de intoxicação cúprica cumulativa, como proposto. Porém, no presente estudo o modelo utilizado por Machado (1998) teve que ser modificado, pois inicialmente seis ovinos desenvolveram sintomas muito agudos, o que inviabilizou tanto a instituição de um dos tratamentos bem como da observação da sua evolução clínica, já que sucumbiram de forma quase que fulminante. Pode-se sugerir que isto tenha ocorrido devido a uma possível maior resistência dos ovinos da raça Santa Inês à ICC em relação aos animais utilizados por Machado (1998) e/ou então devido à menor idade dos animais utilizado neste experimento, já que Soares (2004) embora tenha trabalhado com ovinos da raça Santa Inês, utilizou indução conforme feito por Machado (1998), com animais mais pesados do que os utilizados no presente estudo. Apesar de Soares (2004) ter trabalhado com o mesmo modelo de indução utilizado por Machado (1998), obteve, em média, 29,4 g de cobre para o surgimento da crise hemolítica ocorrer em 66 dias muito próximo do obtido neste experimento com média de 26,1g de cobre em 61 dias para o desencadeamento do quadro. No atual estudo, iniciava-se a administração de 3 mg de cobre por kg de peso vivo por animal por dia e, se os animais não entrassem em hemoglobinúria macroscópica acrescentava-se mais 3 mg.kg⁻¹ de PV, corrigido semanalmente por este último, até atingir no máximo 21 mg.kg⁻¹ de PV. Quantidade esta que era fixada até o aparecimento do quadro hemolítico.

Apesar dos animais terem sido distribuídos aleatoriamente nos grupos de tratamento, notou-se que as concentrações séricas de cobre foram maiores nos animais que receberam TTM em relação aos animais que receberam TTM+VCE nos momentos M2, M3, M4 e M5. Porém no M3 as concentrações séricas de cobre foram menores para os animais tratados com a associação de TTM+VCE em também em relação aos animais do grupo TTM+VE. Estes resultados sugerem que

a associação do TTM com VCE teve alguma ação benéfica em relação ao tratamento com utilização exclusiva do quelante de cobre (TTM), ou mesmo da utilização deste último com as vitaminas isoladamente. Esta resposta, aparentemente sinérgica da associação das vitaminas C e E, pode estar relacionadas com a ação antioxidante de ambas, pois a vitamina E tem ação protetora na membrana celular, coibindo a peroxidação lipídica e conseqüente lesão celular (HATCKOCK, 1997), deve ser ressaltado que a administração da vitamina E já foi associada à redução na lesão renal, através da melhora na função glomerular em ratos submetidos a tratamento com adriamicina, um quimioterápico (WASHIO et al., 1994).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em pequenas concentrações, podem inibir ou ao menos reduzir as taxas de oxidação (MAXWELL, 1995; SIES, 1993). Sies (1993) classifica o sistema antioxidante em enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo, e não enzimático, composto por substâncias como os flavanóide, licopeno, bilirrubina, ácido úrico, zinco, selênio e as vitaminas A, E e C.

Em levantamento sobre os efeitos benéficos das vitaminas antioxidantes na terapia e quimioterapia oncológica, Santos; Cruz (2001) relataram a ação dos antioxidantes em três linhas de defesa orgânica contra as espécies reativas de oxigênio, onde a primeira delas é a prevenção, caracterizada pela proteção contra a formação de substâncias agressoras; a segunda linha é a interceptação, onde os antioxidantes precisam interceptar os radicais livres (RL) que, uma vez formados, iniciam suas atividades destrutivas; a terceira e última linha é a do reparo, que ocorre quando as duas primeiras etapas não foram efetivas e há contínua formação dos produtos de destruição dos RL.

A vitamina C (VC) é hidrossolúvel e, como antioxidante, atua diretamente no oxigênio simples (singlet), radical hidroxila e radical superóxido, além de ser importante no processo de regeneração da vitamina E. A VC mantém as enzimas tiols em seus estados reduzidos e portanto economiza a glutathione peroxidase, importante antioxidante intracelular e cofator enzimático (CARR; FREI, 1999).

A evolução do quadro clínico concorda com a descrita por Machado (1998) e Soares (2004), principalmente após a CH. Ressalta-se que inicialmente os ovinos deixavam de comer concentrado e aproximadamente cinco dias antes da CH diminuía progressivamente a ingestão de feno. A redução do apetite associada à administração diária de cobre pode ser a causa das inflamações na mucosa dos abomasos observadas em algumas necropsias. Em relação aos exames físicos, não houve diferenças na frequência cardíacas, temperatura retal e coloração das mucosas entre os tratamentos. Embora não tenha havido diferença entre os tratamentos, no período da CH (crise hemolítica), portanto de M1 – M6 a FC ficou alterada, acima dos valores de referência, 70–90 bpm (RADOSTITS, 2002). Essa maior FC durante a fase hemolítica é justificada devido à importante redução do número dos eritrócitos circulantes, aqui estudada através do valor do hematócrito (Ht) que, embora não seja a melhor variável para representar o número de eritrócitos, pode ser indicador deste, verificado pela correlação de intensidade média ($r = 0,52$) (Figura 16). Considerando os valores normais do Ht para esta espécie entre 27% e 45% (KANEKO, 1997), neste estudo o valor do Ht foi menor durante a fase hemolítica e nesta, para os animais tratados com as vitaminas, embora os animais tratados com TTM também tenham apresentados menores valores de Ht nesta fase. Tanto este aumento na FC como a diminuição nos valores de Ht podem ser explicados devido ao intenso processo hemolítico. Machado (1998) observou que ocorrem perdas da ordem de 50 a 75% do número de eritrócitos na fase hemolítica que acarretam no quadro de anemia severa, também observado por Soares (2004) e Antonelli (2007). Desta situação alterada e para manter a homeostase, o organismo se vale de mecanismos compensatórios, promovendo maior resistência vascular periférica, mantendo um efetivo volume circulatório na micro circulação para manter o débito cardíaco e, aumentando concomitantemente a frequência cardíaca, para que a micro circulação consiga enviar sangue suficiente para os órgãos (DUKES, 1996).

Quanto à frequência respiratória (FR), embora os valores tenham ficado dentro do limites da normalidade, 10 a 20 mrm (RADOSTITS, 2002), houve diferença entre os tratamentos durante a fase hemolítica (M1-M6), quando, geralmente os animais pertencentes aos grupos TTM e TTM+VCE apresentaram maiores valores de FR que os animais do grupo TTM+VC. Durante esta fase só não

houve diferença entre os tratamentos no M5, isto é, quatro dias após o surgimento da hemoglobinúria macroscópica. Alves (2008); Machado (1998); Lemos et al. (1997) observaram bradpnéia. Embora teoricamente, devido à anemia, se esperasse que nestes casos os animais apresentassem taquipnéia, Alves (2008) atribui este menor perfil respiratório devido a uma leve alcalose metabólica nos animais do seu estudo. Aqui não foram aferidos os parâmetros hemogasométricos para que pudéssemos discorrer sobre esta resposta respiratória.

Embora os movimentos ruminais, aparentemente não tivessem diferença entre os tratamentos, foi clinicamente bastante importante o quadro de atonia ruminal, presente na maior parte dos animais na fase hemolítica do presente estudo, independentemente do tratamento recebido. Foi notável que, embora ocorresse a presença de movimentos ruminais, estes eram de menor magnitude e incompletos nesta fase.

Ao analisarmos a temperatura retal dos animais, embora não se tenha encontrado variações neste perfil, observa-se na figura 4, que a fase hemolítica levou a pequeno aumento da temperatura, chegando a valores considerados fora da normalidade, 39,0°C a 40,0°C segundo Radostits, 2002, para os animais do grupo TTM+VE. Soares (2004) e Machado (1998) observaram tendência à hipertermia na crise hemolítica, discorrendo a possibilidade desta ser, em parte, a responsável pelo quadro de anorexia e de menor motilidade ruminal, bem como pelo quadro de uremia. Neste sentido, no presente estudo, talvez pela menor magnitude da hipertermia, nem todos os animais apresentaram o quadro de atonia ruminal. O aumento da temperatura retal de intensidade moderada em ovinos com ICC pode ocorrer devido à presença de debris celulares oriundos da hemólise intravascular, que atuam como pirógenos estimulando o centro termorregulador (RADOSTITS, 2002).

Embora sem diferença entre os tratamentos, com a evolução do quadro os animais perderam peso, período em que ficaram mais apáticos, evoluindo, em alguns casos, para o decúbito esternal. Este comprometimento ficou mais evidente, pois ao mesmo tempo em que os animais ficavam inapetentes eles também cresciam, assim a emaciação foi mais marcante do que a demonstrada numericamente no quadro 1. Observando-se a figura 6 fica claro o leve ganho inicial

de peso seguido pela estagnação deste ganho na última semana pré CH. A perda do peso se acentuou até quatorze dias após a CH, próximo ao M8, quando os animais novamente começaram a adquirir peso indicando a recuperação do organismo frente ao estresse sofrido na intoxicação. É interessante ressaltar que, nas primeiras semanas do início da administração do cobre, os animais apresentavam ganho de peso compatível com o período fisiológico, além de apresentarem pelagem brilhante e escore de condição corporal entre 3,0 e 3,5.

Segundo os estudos de Machado (1998) a *causa mortis* na intoxicação cúprica cumulativa são as injúrias causadas pelo complexo cobre-hemoglobina-lisosima aos rins, gerando graves degenerações e necrose dos vasos renais, glomérulos e néfrons levando a uma intensa disfunção renal e um grave quadro de uremia, caracterizada por aumento nos teores séricos de creatinina e uréia (ORTOLANI, 2002; SOARES, 2004). Como os autores acima citados, no presente estudo foi observado que a oligúria ocorreu concomitante com a progressão dos outros sintomas, culminando com a hematúria no dia da CH.

A atividade urinária de N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), é mensurada na urina como marcador não invasivo de lesão e doença renal (PRICE, 1992). Soares 2004 encontrou valores muito elevados de NAG durante o período de crise hemolítica, sendo que o pico ocorreu 48h após a CH. O presente estudo obteve valores elevados de NAG em relação ao M0 e o pico seguiu os moldes daquele autor, sendo em 48h também. Porém, em relação aos dados de Soares (2004) os valores aqui foram muito mais baixos em todos os momentos e, embora sem diferenças, o grupo tratado apenas com TTM demonstrou os maiores valores em relação aos grupos tratados também com as vitaminas. Neste estudo a atividade da NAG foi mais intensa dois dias após a CH no grupo TTM+VEC em relação ao grupo TTM+VE, o que não era esperado, já dez dias após a CH (M7) a situação se inverte e neste momento pode-se interpretar que os animais do grupo TTM+VE apresentaram maior dificuldade em restabelecer a sua função renal. Contudo, em M8, ou seja cinco dias após o M7, já não havia mais diferenças entre os grupos. Observou-se que as maiores atividades do NAG ocorreram entre dois e cinco dias após a CH e que, embora sem diferenças estatísticas, o grupo TTM aparentemente apresentava os maiores valores neste mesmo período.

Quanto à uréia, a análise entre os grupos de tratamento revelou diferença apenas no momento M3 em que o grupo TTM+VEC apresentou maiores concentrações séricas de uréia que o grupo TTM, diferença novamente remetida à variação individual acentuada no grupo TTM+VEC. De acordo com os parâmetros dados por KANEKO (1997) os valores normais de uréia sérica para ovinos variam entre 3 e 10 mmol/L, assim 24 horas após a CH os valores estavam aumentados para todos os grupos, exceto para o grupo TTM. Nos momentos seguintes esta situação se agravou até M7, quando os animais começam a demonstrar redução deste valor, desta vez com exceção do grupo TTM+VEC que manteve altos níveis até 30 dias após a CH. Para a creatinina, considerou-se parâmetros de normalidade aqueles dados por Kaneko (1997): de 70 a 105 μ mol/L. Houve diferença em M1 em que o grupo TTM+VEC foi maior que o grupo TTM+VE. Em M3 ocorreu diferença entre os grupos TTM+VEC e TTM, sendo o primeiro maior. Porém observando-se os números nota-se que os grupos TTM+VE e TTM+VEC, neste momento já tratados com vitamina E, tenderam a apresentar maiores valores que os grupos TTM e TTM+VC que no M3 haviam recebido somente o TTM, apontando para um possível efeito negativo da vitamina E sobre a creatinina sérica. Após dez dias da CH, o grupo TTM+VEC apresentou concentrações maiores que os outros grupos e diferente de TTM+VC. Apesar de já no momento basal os níveis de creatinina estarem elevados, observou-se grande aumento da concentração a partir de M2 até M7, quando notou-se redução dos valores, semelhante ao ocorrido com a uréia. Mais uma vez o grupo TTM+VEC manteve níveis mais altos, a exemplo da uréia, indicando que a associação das vitaminas não foi benéfica para o restabelecimento da função renal.

Segundo Moser; Bendich (1991) e Sauberlich (1994) a vitamina C é o mais potente antioxidante hidrossolúvel e age em conjunto com outras enzimas, como a vitamina E. Ela atua ainda restabelecendo atividade da vitamina E (STEINBERG; PARTHSARATHY; CAREW, 1989; STADTMAN, 1991; JAILAL; GRUNDY, 1991). aumentando ainda mais o poder protetor. Estes estudos sugerem que na presente pesquisa, estas vitaminas diminuíram a atividade oxidativa do cobre e ainda reduziu a sua concentração sérica. Sendo a associação TTM e VCE a mais eficiente nesta redução. Na realidade foi observado que a utilização das vitaminas, principalmente a associação do TTM com as duas vitaminas, reduziu a concentração

sérica do cobre e, o que aparentemente indicava menor atividade oxidativa deste elemento.

Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Embora esta diminuição da concentração sérica de cobre nos induza a pensar que a utilização da associação das vitaminas C e E foram benéficas, isto não foi observado quando os marcadores do estresse oxidativo foram analisados. A determinação, do malondialdeído (MDA), substância reativa ao ácido tiobarbitúrico e utilizada como marcadora da lipoperoxidação, sinalizou que apenas no M5 o grupo TTM+VE apresentou maior concentração desta substância em relação aos animais do grupo TTM+VEC, esta diferença 48 horas após a injeção de VC pode ser indicativa do benefício desta vitamina ser utilizada em associação com a VE. Com exceção do M4, onde o grupo TTM+VCE apresentou tendência a maiores concentrações de MDA que o grupo TTM+VE, nos momentos M6 e M7 houve tendência para maiores concentrações de MDA para os animais pertencentes ao grupo TTM+VE em relação aos animais dos grupos TTM-TTM+VCE e TTM+VC, respectivamente, o que pode ser relacionado à possível toxicidade da Vitamina E descrita por Brugelius-Flohé (1999), que seria controlada pela associação com a vitamina C. Estes resultados sugerem que a vitamina E pode ter efeito pró-oxidante, agindo antagonicamente ao esperado

A glutathione tem sido utilizada como marcador de estresse oxidativo por sua ação na catalisação de reações de detoxificadores e antioxidantes (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989; VANNUCCHI et al., 1998), além de induzir a redução da forma oxidada da vitamina C, que por sua vez atua na manutenção da vitamina E em sua forma reduzida (JONES, et al., 1995). No presente estudo, em M2 o grupo TTM apresentou maiores concentrações de GSH que os grupos TTM+VC, TTM+VE e TTM+VEC esta diferença não era esperada em relação ao grupo TTM+VC, uma vez que apenas os grupos TTM+VE e TTM+VEC já haviam recebido vitamina E. No momento M7 as concentrações de GSH do grupo TTM+VC foram maiores que do grupo TTM+VE ($P=0,022$) sugerindo que a vitamina C foi mais eficiente na redução do tempo do estresse oxidativo no prazo de 10 dias, ou então mais uma vez atentando para o possível efeito pró-oxidante da VE, quando utilizada em doses elevadas. Estes resultados sugerem que a utilização isolada do TTM em relação à

associação do TTM com as vitaminas, principalmente quando se utilizou a vitamina E, foi menos eficiente na redução do estresse oxidativo.

O ácido úrico é um antioxidante não enzimático endógeno sua presença em concentrações elevadas indica a intensificação do metabolismo oxidativo no organismo, age também formando complexos como cobre e prevenindo a oxidação de substâncias antioxidantes, como a vitamina C (CHIHUAILAF; CONTRERAS; WITTWER, 2002). Foi observado o mesmo padrão de alterações para o ácido úrico nos momentos M1, M2 e M3 mostra que se por um lado esta diferença no momento da CH não era esperada, por outro a vitamina E, único fármaco além do TTM administrado até então, não foi eficaz na redução do estresse oxidativo. No momento seguinte, três dias após a CH, os resultados se somam uma vez que já havia a ação da vitamina C e os grupos TTM+VC e TTM+VE apresentaram os maiores valores e sem diferenças entre si nem em relação ao grupo TTM+VEC, indicando que o grupo sem associação de vitaminas desenvolveu metabolismo oxidativo menos intenso.

A HRFP remete à capacidade antioxidante sanguínea do animal (BENZIE; STRAIN, 1996). Os maiores valores deste índice foram encontrados dois dias após a CH indicando reação compensatória do organismo do animal frente ao estresse oxidativo causado pela intoxicação. A maior capacidade foi encontrada no grupo TTM+VEC no dia seguinte a CH e dois dias após a mesma (M3), indicando maior mobilização antioxidante do organismo no grupo tratado com as duas vitaminas. O aumento destes teores no período de CH concorda com os achados de Soares (2004), que demonstrou o mesmo fenômeno em ovinos intoxicados por cobre.

Dos animais considerados neste estudo, isto é apenas os que escaparam da crise aguda, até o momento quatro (M4), isto é, três dias após a crise hemolítica, nenhum morreu. Neste momento, apenas o grupo TTM+VCE possuía 83% dos seus animais, permanecendo assim até o momento sete (M7), dez dias após a crise hemolítica. Neste tempo, somente o grupo TTM estava com 100% de seus animais vivos, os demais possuíam 83% do grupo. No momento oito e nove (M8 e M9), isto é, 15 e 30 dias após a crise hemolítica, os grupos TTM, TTM+VC, TTM+VE e TTM+VCE possuíam respectivamente 80; 67; 50; e 50% de seus animais. No momento 10 (M10), isto é 60 dias pós-crise hemolítica, haviam 40; 67; 50 e 50% dos animais nos grupos TTM, TTM+VC, TTM+VE e TTM+VCE, respectivamente.

Embora, aparentemente, os animais que passaram de 30 dias da crise hemolítica estivessem fisicamente bem, pôde-se perceber que apresentavam problemas tanto renais como hepáticos, pois alguns ainda morreram neste íterim.

As figuras dos exames anátomo-patológico ilustram lesões hepáticas e renais bem como o acúmulo de ferro e cobre nestes órgãos.

A principal afecção encontrada no fígado, de ocorrência na maioria dos animais independente do tratamento, foi o infiltrado inflamatório. Esta lesão constituída por células mononucleares, na maioria linfócitos, indicando a possível instalação ou ainda a não completa solução do processo inflamatório decorrente da crise hemolítica.

Nos rins também o infiltrado inflamatório foi caracterizado pela presença de células mononucleares, também com predomínio linfocitário, em região tubular, tanto proximal como distal e distribuída em focos, esta foi a principal lesão renal e ocorreu na maioria dos animais, independente do tratamento. A glomerulonefrite, definida pela presença de células inflamatórias mononucleares, em sua maioria linfócitos, em região de tufo glomerular, ocorreu em maior proporção nos grupos TTM+VC e TTM+VE, sugerindo que a associação das duas vitaminas não é benéfica, uma vez que apresentou o mesmo resultado que o grupo sem vitamina. Os pigmentos, presentes em região glomerular e tubular proximal, foram identificados com colorações especiais e específicas, neste caso utilizou-se a Rodamina e Pearls. Esta avaliação evidenciou maior ocorrência de pigmentos nos grupos TTM+VE e TTM+VEC.

Segundo a coloração de Pearls, nos rins as lesões estavam concentradas em regiões glomerular e tubular proximal. Já no fígado não houve padrão para o depósito de ferro, com presença difusa por todo o parênquima.

Na coloração Rodamina a distribuição das lesões foi semelhante àquela da coloração de Pearls, diferindo apenas pelo grau de lesão no fígado ser maior que no rim.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo nos permitiu concluir que:

- Embora tenham ocorrido diferenças pontuais entre os tratamentos utilizados, não se observou benefício da associação das vitaminas antioxidantes, especialmente da vitamina E, na dosagem aqui utilizada, na recuperação de ovinos da raça Santa Inês acometidos pela Intoxicação Cumulativa por Cobre e tratados com tetratiomolibdato de amônio.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.

ALVES, K.H.G. **Parâmetros clínicos, hemogasométricos e metabolismo oxidativo em ovinos intoxicados com cobre e tratados ou não com tetratiomolibdato**. 2008, 111 f. (Dissertação de Mestrado, em ciência veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

ANTONELLI, A.C. **Avaliação do uso de sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica em ovinos**. 2007.122f. (Tese Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2007.

BACHUR, J.A. **Radicais livres, glutathione e alfatocoferol no fígado e na musculatura esquelética após esforço físico agudo em ratos sedentários**. 2005, 82f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

BARBOSA, J. A. Especialista recomenda investimento em ovinos
<http://www.ovinosecia.com.br>. 2003.

BARROS, E. E. L. Considerações sobre a produção de caprinos e ovinos no Brasil.
<http://www.cico.rj.gov.br/PESQUISA/Artig/artigo/Emanoel>, 2001.

BASU, T. K. Potential role of antioxidant vitamin. In: BASU, T. K.; TEMPLE, N. J.; GARG, M. L., Ed. **Antioxidants in human health**. Oxon: CAB International 1999. p. 15-26.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 61, n. 5, p. 882-888, 1963.

BIAGINI, A. P. **Efeito da vitamina E no músculo esquelético submetido ao exercício físico e sua relação com o estresse oxidativo** 2005. 99f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

BROWNLEE, N. R.; HUTTNER, J. J.; PANGANAMALA, R. V. Role of vitamin E and glutathione induced oxidant stress: methemoglobin, lipid peroxidation and hemolysis. **Journal of Lipid Research**, v. 18, p. 635, 1977.

BUROTN, G. W. Antioxidant action of carotenoids. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 109-111, 1989.

BURTON, G.W.; INGOLD, K. U. Autoxidation of biological molecules. In: The oxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 6742-6777, 1981.

CARR, A.C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1086-1107, 1999.

CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITTEWER, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinaria México**. v. 33, n. 3, p. 265-283, 2002.

CHOW, C.K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 1066-1070, 1979.

DAVIS, K. J. A.; QUNTANILHA, A.; BROOKS, G. A.; PARKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.

DIPLOCK, A. T. Will the "good fairies" please prove to us that vitamin e lessens human degenerative disease? **Free radical research**, v. 27, n. 5, p. 511-532, 1997.

DUELL, P. B. Prevention of atherosclerosis with dietary and antioxidants: fact or fiction. **The Journal of Nutrition**, v. 126, supplement 4, p. 1067S-1071S, 1996.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **DUKES: Fisiologia dos animais domésticos**, 11 ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 224-241.

DUTTA-ROY, A. K. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of α -tocoferol: role of tocoferol-binding proteins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9/10, p. 967-971, 1999.

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

ESTERBAUER, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; STRIEGL, G. Role of vitamin E preventing the oxidation of low-density lipoproteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, supplement 1, p.312S-321S, 1991.

FARBER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMAM, J. B. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation**, v. 62, n. 6, p. 670-679, 1990.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FOOTE, C. S. Mechanism of photo-oxidation. In: RANBY, B.; RABEK, J.F (Ed). **Singlet oxygen reactions with organic compounds & polymers**. Chichester: John Wiley & Sons 1978. p.135-146.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L.; BERTI, G. Use of 3,5-dicloro-hydroxybenzenesulfonicacid /4-aminophenazone chromogenic system in direct enzyme assay of uric acid in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v. 26, n.2, p. 227-231, 1980.

FRATICELLI, A.; SERRANO, C. V.; BOCHNER, B. S. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1310, p. 251 1996.

FREI, B. Reactive oxygen species and auto oxidant vitamins: mechanisms of action. **The American Journal of Medicine**, v. 97 supplement 3A, p. 3A-5S, 3A-13S, 1994.

GALIZIA, M. S. WAITZBERG, D. L. Mecanismo de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 16, p. 79-89, 2001.

GIROTTI, A. W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. **Journal of photochemistry and photobiology**, v. 51, n. 4, p. 497-509, 1990.

GOONERATNE, S. R.; HOWELL, J. M.; KUMARATILAKE, J. S. Kidney function in copper toxicity in sheep. In: International symposium on trace element metabolism in man and animals. **Australian Academy of Science**, v. 46, p. 461-464. 1981.

GRUNE, T.; SOMMERBURG, O.; SIEMS, W.G. Oxidative stress in anemia. **Clinical Nephrology**, v. 53, supplement 1, p. S18-S22, 2000.

GUÉMOURI, L.; ARTUR, Y.; HERBETH, B.; JEANDEL, C.; CUNY, G.; SIEST, G.;
Biological viability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in
blood. **Clinical chemistry**, v. 37, n.11, p. 1932-1937, 1991.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: elixirs of life or media hype.
In: GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed) **Antioxidants in Nutrition, health and disease**.
Oxford, Oxford University press, 1994. p. 1-16.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB
Journal**, v. 1 n. 5, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C. Lipid peroxidation: A radical chain reaction,
In Halliwell B, Gutteridge JMC (Ed) **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford,
England, Clarendon Press, 1989, pp 188-276.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metals
ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85,
1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants
and human disease: where we now? **The Journal of Laboratory and Clinical
Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL B. Free radical, antioxidants and human disease: curiosity, cause or
consequence. **The lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. **Pathology
and Biology**, v. 44, p. 6-13, 1996.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and
significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57 p. 715-725, 1993.

HATCKOCK, J. N. Vitamins and minerals: efficacy and safety. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 427-437, 1997.

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

HOWELL, J. M.; PATH, F. R. C.; GAWTHORNE, J. M. **Cooper in animals and man**. Flórida CRC Press, 1987. v. 2, 125 p.

IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**, 2005. IBGE, 2005.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v. 15 n. 5 p. 755-756, 1995.

JAILAL, I.; GRUNDY, S. M. Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on oxidative modification of low-density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 899-906, 1992.

JAILAL, I.; GRUNDY, S. M. Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 597-601, 1991.

JI, L. L.; DILLON, D.; WU, E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. 918-923, 1990.

JI, L. L., LEEWENBURGH, C.; LEICHTWEIS, S.; GORE, M., FIEBIG, R.; HOLLANDER, J.; BEJMA, J. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences and antioxidant systems. **Annals of The New York Academy of Science**, v. 20, n. 854, p.102-117, 1998.

JOHNSON, B; HEATH, R; BOWMAN, B; PHILLIPS, R; RICH, L; VOSS, J. Serum chemistry changes in horses during anesthesia: a pilot study investigating the possible causes of postanesthetic myositis in horses. **Journal of Equine medicine and Surgery** v. 2, p. 109-123, 1978.

JONES, D.P., VALERIAN, E. K., STEVEN, D. A., DONALD, J. R., STANLEY, T. O. Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Toxicological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 1995.

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

KANOFISKY, J. R. Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 28, p. 14171-14175, 1988.

KANOFISKY, J.R.; SIMA, P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9039-9042, 1991.

KAPPUS, H. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: **Oxidative Stress**, ed. SIES, H, **Academic Press**, London, 1985, p.273-310.

KITTS, D. D. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 198-203, 1997.

KLEIN, B. P.; KING, D.; GROSSMAN, S. Cooxidation reactions of lipoxygenase of plant systems. **Advances in free radical biology and medicine**, v. 1, p. 309-343, 1985.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 48, n. 5, p. 439-446, 1996.

KRINSKI, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 200, p. 248-254, 1992.

KURODA, M.; KAMINISHI, T.; UCHIDA, K.; MIYAZAWA, K.; TOMOIKE, H.; DOI, K. Ca^{+} increase and pHdecrease induced by hypochlorous acid in single quiescent myocytes isolated from rat ventricles. **Japan Physiology**, v. 45, p. 619-630, 1995.

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

LIEBER, D. C.; The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. **Critical reviews in toxicology**. v. 23, p. 147-169, 1993.

LII, C. K.; KO, Y. J.; CHIANG, M. T.; SUNG, W. C.; CHEN, H. W. Effect of dietary vitamin E on antioxidant status and antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats. **Nutr Cancer**, v. 32, p. 95-100, 1998.

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

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

MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, p. 345-361, 1995.

McGRATH, L. T.; DOUGLAS, A. F.; McCLEAN, E. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, n. 2, p. 179-188, 1995.

MORAIS, O. O melhoramento genético dos ovinos no Brasil: situação atual e perspectivas para o futuro. 2001. Disponível em: <http://www.ovinocultura.com.br>. Acessado em outubro de 2008.

MOSER, U.; BENDICH, A. Vitamin C. In: MACHLIN, L.J. **Handbook of Vitamins**, 2 Ed. New York: Marcel Dekker, 1991, p.195.

MIKI, M.; TAMAI, H.; MINO, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E. Free radical chain oxidation of rat red cells by molecular oxygen and its inhibition by tocoferol. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 258, p. 373-380, 1987.

MURRAY, R. K. Red and white blood cells. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, ODWELL VW, (Ed) **Harper's biochemistry**. 23: ed. Norwalk: Appleton and Lange, 1993, p. 688-703.

OLSZEWER, E.; FLAN, S.; ELLOVIVICH, S. Radicais livres em medicina, In: **Radicais livres em cardiologia: isquemia e reperfusão** 2. ed. São Paulo: Tecnopress, 1997. p.11-37.

ORTOLANI, E. L. Intoxicações metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica. In: SILVA SOBRINHO, A. G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. I. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de ovinos**. Jaboticabal: Funep, 1996. p. 241-246.

ORTOLANI, E.L. Intoxicação cúprica acumulativa em ovinos. In: Congresso Latinoamericano de Buiatria, 11, 2003. Salvador, Associação Baiana de Buiatria, 2003, p. 113-114.

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

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

PACKER, L. Vitamin E, physical exercise and tissue damage in animals. **Medical biology**, v. 62, n. 2, p. 105-109, 1984.

PARKE, A.; PARKE, D. V. The pathogenesis of inflammatory disease: surgical shock and multiple system organs failure. **Inflammopharmacology**, v. 3, p. 149-168, 1995.

PRICE, R. G. The role of NAG (N-acetyl-b-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. **Clinical Nephrology**, n. 38, Supplement 1, p. S14-S19, 1992.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. HINCHCLIFF, K. W. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 3-29;1647.

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

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino em medicina veterinária e zootecnia, 1998. 221 p.

SANSINANE, A. S.; CERONE, S. I.; ELPERDING, A.; AUZA, N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from chronically copper poisoned sheep. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 114, n. 3, p. 197-200, 1996.

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

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308. 2001.

SAUBERLICH, H. E. Ascorbic Acid. In: OLSON, R. E. **Nutrition reviews, present knowledge in nutrition**. Washington: Nutrition Foundation, p.132, 1990.

SEN, C. K. Antioxidant and regulation of cellular signaling: introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 3, p. 368-370, 2000.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47 p. 61-71, 1990.

SHARMA, R. K.; PASQUALOTTO, F. F.; NELSON, D. R. *et al.* The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2801-2807, 1999.

SIEMS, W.G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clinical Nephrology**, v. 53, p. 9-17, 2000.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In **Oxidative Stress**, ed. SIES, H. pp. 1-8, Academic Press, London, 1985.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie**, International Edition in English v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. In **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**, ed. SIES, H ed., Academic Press, London 1991. p.15-22.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant functions of vitamin: vitamins E e C, beta-carotene and other carotenoids. **Annals of The New York Academy of Science**, v. 669, p. 7-20, 1992.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SOARES, P.C. **Efeito da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos.** São Paulo, 2003, 117f. tese (Doutorado em Clínica Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

STADTMAN, E. R. Prooxidant activity of ascorbic acid. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1125S-1127S, 1991.

STAHL, W.; SIES, H. Lycopene: a biologically important corotenoid for humans? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, n. 1, p. 1-9, 1996.

STEINBERG, D.; PARTHSARATHY, S.; CAREW, T. E. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 915-924, 1989.

TALK, H.; SCHUBERT, G. E. Enzymatische harnstoffbestimmung in blut und serum in optischen test nach warburb. **Klinische Wochenschrift**, v. 43, p. 174, 1965.

THOMPSON, K. H.; GOLDIN, D. V. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. **Nutrition Research**, v. 15, p. 1377-1410, 1995.

TIIDUS, P. M.; HOUSTON, M. E. Vitamin E status does not affect the responses to exercise training and acute exercise in female rats. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 834-840, 1993.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JR., A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p.31-44, 1998.

VASCONCELOS, V. R.; VIEIRA, L. S. A evolução da caprino-ovinocultura brasileira. 2005. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br>. Acessado em outubro de 2008.

WASHIO, M.; NASISHI, F.; OKUDA, S.; ONOYAMA, K.; FUJISHIMA, M. Alpha tocopherol improves foal glomeruloclerosis in rats with adriamycin induced progressive renal failure. **Nephron Physiology**, v. 68, p. 347-352, 1994.

WINTERBOURN, C. C.; ASSMAN, W. B. Neutrophil oxidants: production and reactions. In: DAS, D. K.; ESSMAN, W. B. (Ed). **Oxygen radicals: systemic events and disease processes**. New York: Karger; 1990. p. 31-70.

WOODS JR, J. R.; PLESSINGER, M. A.; FANTEL, A. An introduction to reactive oxygen species and their possible roles in substance abuse. **Obstetrics Gynecology Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 219-236, 1998.

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