ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO

**AVALIAÇÃO DE CRESCENTES TEORES DE ZINCO
DIETÉTICO NO METABOLISMO DO COBRE E NA
PREVENÇÃO DE INTOXICAÇÃO CÚPRICA EM OVINOS**

São Paulo
2011

ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO

Avaliação de crescentes teores de zinco dietético no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo
2011

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 033201

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
11/21/14

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1874
FMVZ

Minervino, Antonio Humberto Hamad

Avaliação de crescentes teores de zinco dietético no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos / Antonio Humberto Hamad Minervino. – São Paulo : A. H. Minervino, 2011.
69 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2007.

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

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Intoxicação cúprica. 2. Ovinos. 3. Prevenção. 4. Molibdênio. I. Título.

ERRATA

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

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha		
Catalográfica	69 f.	92 f.
RESUMO	69 f.	92 f.
ABSTRACT	69 f.	92 f.
REFERÊNCIAS	65-69 (páginas)	88-92 (páginas)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de crescentes teores de zinco no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos", protocolado sob o nº1090/2007, utilizando 50 (cinquenta) ovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, 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 increasing doses of zinc on copper metabolism and in the prevention of copper poisoning in sheep", protocol number 1090/2007, utilizing 50 (fifty) sheeps, under the responsibility Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 03 de abril de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MINERVINO, Antonio Humberto Hamad Minervino

Título: Avaliação de crescentes teores de zinco dietético no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 25/02/2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. <u>ENRICO LIPPI ORTOLANI</u>	Instituição: <u>FMVZ - USP</u>
Assinatura: <u>[Assinatura]</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. <u>Fernando José Benesi</u>	Instituição: <u>FMVZ - USP</u>
Assinatura: <u>[Assinatura]</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. <u>Viviani Gomes</u>	Instituição: <u>FMVZ - USP</u>
Assinatura: <u>[Assinatura]</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. <u>Raimundo Alves Barreto Junior</u>	Instituição: <u>UFERSA</u>
Assinatura: <u>[Assinatura]</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. <u>ALEXANDRE COUTINHO ANTONELLI</u>	Instituição: <u>UNIVASP</u>
Assinatura: <u>[Assinatura]</u>	Julgamento: <u>APROVADO</u>

DEDICO

À minha família, meus pais, **Julio** e **Ana Júlia**, meus irmãos, **Julio**, **Eunice** e **Raquel** e minha madrastra **Eliete**, que desde sempre me apoiaram, incentivaram e me aguentaram, sendo essenciais para a conclusão desta Tese.

DEDICO

À minha namorada durante a maior parte do curso de Doutorado, **Larissa Gabriel**, pelo amor, carinho, companheirismo e convivência, tanto no Brasil quanto na Espanha, durante a elaboração esta tese.

"Do, or do not. There is no try. May the force be with you"

- Yoda

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani**, pelo quase sempre agradável convívio, por todos os ensinamentos e conselhos, tanto relacionados aos projetos de pesquisa, quanto a todos os aspectos da vida. Agradeço todas as oportunidades oferecidas, a confiança irrestrita a mim delegada e o apoio nos momentos difíceis,

À minha querida família DNM, que me acompanham ao longo dos anos e que foram fundamentais na elaboração desta tese: **Barrêto, Fred, Carol, Leo** (Ventania), **Clara** e **Alexandre** (Zangado).

Ao meu grande amigo, **Enoch Brandão de Meira Júnior**, *que não está morto, apenas adormecido*, pela ajuda fundamental durante o doutorado.

A minha maravilhosa família, meus avós (**Maria Hermínia, José Hamad e Eunice Minervino**) meus tios (**Jorge, José, Jonas, Kim, João e Cabral** da família Hamad e **José, Balduino e Claro** da família Minervino de Carvalho) tias (**Alda, Angela, Adma, Áurea, Mercedes, Linda, Laudicéia e Solange**), primos e primas (**Xandy, Aldrwin, Gil, Mayra, Mayara Aylhana, Karine, Jessé, Rodrigo, Haffiki, Haquiffi, Haffira, Kamylla, Amir, Anis, Carlinha e Álvaro**), por fazerem parte da minha vida e me apoiarem em todos os momentos.

Aos demais membros da DNM ativos ou não, que de uma forma ou de outra ajudaram durante esta tese: **Bráulio, Rejane, Isadora, Isabella, Herbert, Rodrigo, Bruno e Leonardo** (Barreira).

À **FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP**, pela concessão de bolsa de doutorado e auxílio pesquisa, imprescindíveis ao desenvolvimento desta pesquisa.

A profa. **Marta Lopez-Alonso**, por ter me recebido em seu laboratório de maneira acolhedora e ter me auxiliado na realização de importantes análises desta tese. Agradeço ainda aos professores, funcionários e alunos da Universidade de Santiago de Compostela que tive o prazer de conhecer, **Benedicto, Joaquin, Marta Miranda, Cristina, Marco, Isabel e Lucia**.

Ao prof. **Selwyn A. Headley**, pelo apoio, amizade, e auxílio na realização das análises histopatológicas.

Aos meus amigos da Pós-Graduação: **Alessandra, Celso, Sandra, Fernanda, Viviane, Xexa, Ewaldo, Genílson, Raquel, Bruno, Fábio, Eliza, João Paulo, Lipinski, Laura, Marjore, Maiara, Camila, Barbara e Bruna** pelo agradável convívio, troca de conhecimentos e amizade.

Ao meu amigo, **Milton Ricardo Azedo**, que... não teve nenhum papel significativo nesta tese, mas como ele é o **Tio Chico**, tem que ter um agradecimento só pra ele.

A Profa. **Solange Gennari** pelas oportunidades oferecidas e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. **Fernando José Benesi** por toda sua paciência em atender cada uma das minhas várias solicitações e pelos conselhos e conhecimentos repassados e, agora posso dizer, pela sua amizade.

À secretária da pós-graduação, **Adelaide Borges**, *que como uma mitológica Phoenix, ressurgiu das cinzas para me resgatar*. Agradeço pela paciência, quase sempre agradável convívio, ajuda, compreensão e amizade.

A Profa. Elyzabeth da Cruz Cardoso, por ser minha orientadora desde a iniciação científica e por ter possibilitado meu ingresso na pós-graduação.

Agradeço ao meu primeiro orientador, Dr. **Norton Amador da Costa**, pelos ensinamentos e incentivos que me levaram a seguir esta maravilhosa carreira acadêmica.

Aos funcionários da FMVZ – USP **Luizinho, Rosendo, Francisco e Edson** e em especial ao funcionário do Centro de pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas: **Agnaldo Arcanjo dos Santos**, pela ajuda no trato dos animais, pela paciência e pela amizade, imprescindíveis na realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP: **Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Carlos Eduardo Larsson, Cássio Xavier de Mendonça Junior, Eduardo Harry Birgel Júnior, Fernando José Benesi, Lílian Gregory, Márcia Mery Kogika, Maria Cláudia Araripe Sucupira, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Wanderley Pereira de Araújo† e Wilson Roberto Fernandes** pela convivência e pelos conhecimentos transmitidos.

À **Samantha Miyashiro e Marly E. Ferreira de Castro**, pela generosa acolhida e ajuda nas análises bioquímicas e hematológicas e aos funcionários do VCM: **Cida, Dinha, Cláudia, Dinho, Silvana, Carol e D. Carmem** pelo constante auxílio e agradável convivência.

Aos **funcionários da biblioteca**, em especial a querida **D. Elza**, pelo profissionalismo, cordial atendimento e amizade.

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

Aos meus grandes amigos: **Kalil, Rafael, Felipe, Marçal, Daniel, Gláucio, Calhau, Paulo Guilherme e Cezar**. Tenho sorte de poder contar amigos em mais dedos de uma mão.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

MINERVINO, A. H. H. **Avaliação de crescentes teores de zinco dietético no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos.** [Evaluation of increasing dietary zinc on copper metabolism and in the prevention of cumulative copper poisoning in sheep]. 2011. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Esse trabalho objetivou avaliar o efeito de crescentes quantidades de zinco dietético no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos. Foram utilizados 40 ovinos, machos, mestiços da raça Santa Inês, distribuídos em 5 grupos experimentais de 8 animais cada, submetidos a diferentes tratamentos com cobre (Cu) e zinco (Zn). Os grupos A, B, C e D receberam diariamente 12 mg de Cu por kg de PV sendo que adicionalmente o grupo A recebeu 1 mg de zinco por kg de PV/dia, o grupo B 4 mg de zinco por kg de PV/dia e o grupo C recebeu 8 mg de zinco por kg de PV/dia. O grupo H (controle), recebeu apenas a dieta basal. O experimento teve duração de 14 semanas. Foi realizada biópsia hepática ao início do estudo e sacrifício dos animais ao término do período experimental para coleta de tecidos e fluidos. Foram determinadas as concentrações de cobre e zinco no fígado, bile e sangue total. Semanalmente foram coletadas amostras de sangue para determinações bioquímicas e hematológicas, bem como realizada pesagem dos animais. Nenhum animal do grupo controle (H) e do grupo C (alto zinco) apresentou manifestação clínica, enquanto um animal dos grupos A, B e D, respectivamente, apresentou quadro clínico característico de intoxicação cúprica acumulativa (ICA). Observou-se uma elevação dos valores de cobre no fígado em todos os grupos experimentais entre o início e o final do experimento, contudo a elevação verificada no grupo H foi marcadamente menor, tendo ocorrido em decorrência de maiores níveis de cobre na dieta basal. Verificou-se ao final do experimento que os grupos A, B, C e D apresentaram maiores concentrações de cobre hepático em relação ao grupo H. O grupo C (alto Zn) teve menor concentração de cobre hepático do que o grupo D, que não recebeu zinco. Os grupos suplementados com zinco apresentaram maiores concentrações de metalotioneína (MT) no fígado em relação aos grupos não suplementados (D e H). Os grupos A e C apresentaram maiores valores de Cu ligado à MT em relação aos grupos D e H. Conseqüentemente houve maior proporção de Cu ligado à MT em relação ao Cu total nos grupos A e C em relação

ao grupo D. Não foram verificadas diferenças significativas entre os valores da atividade da γ GT entre os grupos suplementados com cobre, havendo apenas uma clara diferença entre o grupo controle e os demais. Ocorreu uma elevação dos valores da atividade da γ GT em relação ao tempo zero nos grupos A, B C e D a partir da sétima semana. Observou-se uma elevação dos valores da atividade da AST em relação ao tempo zero nos grupos suplementados a partir da oitava semana do experimento. Não foram verificadas alterações nas variáveis bioquímicas e hematológicas nos grupos experimentais no decorrer do experimento, a exceção dos três animais que apresentaram quadro clínico de ICA. A quantidade de cobre utilizado para desafiar os ovinos foi suficiente para gerar um aumento substancial de cobre hepático e provocar em alguns dos animais quadros característicos de intoxicação cúprica. A adição de altos teores de zinco preveniu a morte de animais no decorrer do experimento; promoveu uma redução na quantidade de cobre acumulado no fígado; estimulou a síntese de metalotioneína hepática; incrementou a quantidade de cobre hepático ligado à metalotioneína; assim como o percentual de cobre hepático ligado a metalotioneína. Essas condições favoreceram a prevenção de quadros de intoxicação por cobre em ovinos.

Palavras-chave: Ovinos. Cobre. Zinco. Prevenção. Intoxicação.

ABSTRACT

MINERVINO, A. H. H. Evaluation of increasing dietary zinc on copper metabolism and in the prevention of cumulative copper poisoning in sheep [Avaliação de crescentes teores de zinco dietético no metabolismo do cobre e na prevenção de intoxicação cúprica em ovinos]. 2011. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The objective of this study was to evaluate the effects of increasing quantities of dietary zinc on the metabolism of copper and the prevention of copper toxicosis in sheep. Forty male, mixed breed St. Inês, sheep were divided into 5 experimental groups, each containing 8 animals, and were submitted to different doses of copper (Cu) and zinc (Zn). Animals from Groups A, B, C, and D received 12 mg of Cu per kg of body weight daily (BW). Additionally, those in Group A, B, and C were supplemented with increasing levels of zinc: Group A, 1 mg of Zn/ kg BW; Group B 4 mg of Zn/ kg BW; and Group C 8 mg of Zn/kg BW. Group H animals served as controls and received only the basic diet. The experiment occurred during 14 weeks during which hepatic biopsies were done at the beginning of the study, and tissue fragments were collected at the end of the experiment after the animals were euthanized. The concentrations of Zn, Cu, bile, and whole blood were determined. Weekly blood samples were obtained to evaluate biochemical and hematological parameters during which the weight of each animal was recorded. Animals used as controls (Group H) and those that supplemented with elevated doses of Zn (Group C) did not demonstrate clinical manifestation of intoxication. However, one member from Group A, B, and D demonstrated clinical manifestations that were consistent with accumulative copper toxicosis (ACC). Elevated values of hepatic Cu occurred in all groups between the beginning and the end of the experiment, but this elevation was drastically more reduced in Group H animals due to comparatively reduced Cu levels within the basic diet. At the end of the experiment it was verified that Group A, B, C, and D animals demonstrated more elevated concentrations of hepatic Cu relative to their counterparts from Group H. Members from Group C (elevated Zn) demonstrated reduced concentrations of hepatic copper relative to those from Group D, who did not receive any zinc. Members from groups that received Zn supplement demonstrated more elevated concentrations of hepatic metallothionein (MT) relative to those from

Groups D and H that did not receive any supplementation. Members from Groups A and D demonstrated more reduced values of Cu bound to MT (Cu-MT), relative to those from Groups D and H. Consequently, there was a greater proportion of Cu- MT relative to total Cu in animals from Groups A and C when compared with those from Group D. Significant differences in the values of γ GT activity were not verified between the groups that were supplemented with Cu; there was only a distinct difference between members of the control group and the other groups. There was an elevation in the values of γ GT activity relative to time 0 on Groups A, B, C and D effective from the eight week. An increase in the values of AST activity relative to time 0 was observed in animals from groups that were supplemented, this being effective from the tenth week of the experiment. Alterations to biochemical and hematological variables were not observed during the experiment; occurring only in those three animals that demonstrated clinical manifestations of ACC. The amount of copper used to challenge the sheep was adequate to induce a substantial increase of hepatic copper and produce the characteristic manifestations of copper toxicosis in some animals. The addition of elevated values of Zn prevented the death of animals during the experiment; promoted a reduction in the quantity of copper accumulated within the liver; stimulated the synthesis of metallothionein; incremented the quantity and the percentage of hepatic copper bound to metallothionein. These conditions favor the prevention of copper toxicosis in sheep.

Keywords: Sheep. Copper. Zinc. Prevention. Intoxication.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração hepática de cobre em ovinos submetidos a crescentes teores de zinco dietético – São Paulo - 2011	59
Tabela 2 -	Valores medianos da concentração hepática de cobre no final do experimento – São Paulo - 2011	60
Tabela 3 -	Valores medianos do acúmulo hepático de cobre no fígado de ovinos submetidos a crescentes concentrações de zinco dietético – São Paulo - 2011	60
Tabela 4 -	Valores médios da concentração hepática de zinco em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	61
Tabela 5 -	Teores de metalotioneína no fígado de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	62
Tabela 6 -	Valores medianos da concentração de cobre ligado a metalotioneína no fígado ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	63
Tabela 7 -	Valores medianos da porcentagem de cobre ligado a metalotioneína em relação ao cobre hepático total em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	64
Tabela 8 -	Valores médios de cobre no sangue total de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	64
Tabela 9 -	Valores médios de cobre no sangue total de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	65
Tabela 10 -	Ganho de peso médio e desvios-padrão de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	67

Tabela 11 - - Valores médios e desvios-padrão da concentração de cobre na bile de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Desempenho ponderal dos ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	67
Gráfico 2 -	Desempenho ponderal dos ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre e que apresentaram manifestação clínica de intoxicação cúprica – São Paulo - 2011	68
Gráfico 3 -	Atividade sérica da γ GT no decorrer do experimento em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	70
Gráfico 4 -	Linha de corte indicativa do valor preditivo da atividade sérica da γ GT em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	71
Gráfico 5 -	Atividade sérica da AST no decorrer do experimento em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	72
Gráfico 6 -	Linha de corte indicativa do valor preditivo da atividade sérica da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	73
Gráfico 7 -	Correlação entre as concentrações hepáticas de cobre e zinco em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	75
Gráfico 8 -	Correlação entre os teores de metalotioneínas e zinco no fígado de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	76
Gráfico 9 -	Correlação entre os teores de metalotioneínas e cobre no fígado de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	77

Gráfico 10 -	Correlação entre o zinco hepático e a concentração de cobre ligado a MT – São Paulo - 2011	77
Gráfico 11 -	Correlação entre o cobre hepático e a porcentagem do cobre ligado à metalotioneína em relação ao cobre no fígado total de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	78
Gráfico 12 -	Correlação entre a concentração de cobre no fígado e na bile de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011	79
Gráfico 13 -	Correlação entre o cobre na bile e a porcentagem do cobre ligado à metalotioneína em relação ao cobre total no fígado - São Paulo - 2011	79
Gráfico 14 -	Correlação entre a concentração de cobre no fígado e a atividade sérica de γ GT em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo – 2011	80
Gráfico 15 -	Correlação entre a concentração de cobre no fígado e a atividade sérica de AST em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo – 2011	81

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Composição mineral do feno de coast-cross, do concentrado comercial e da mistura mineral oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental – São Paulo – 2011..... 46
- Quadro 2 – Composição bromatológica do feno de capim Coast-Cross e do concentrado comercial oferecido aos ovinos durante o período experimental – São Paulo – 2011.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	aspartato aminotransferase
cm	centímetros
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Grama
γGT	gama glutamiltransferase
kg	quilograma
L	Litro
mg	miligrama
ml	Mililitro
mmol	Milimol
MS	matéria seca
P.A.	para análise
ppm	parte por milhão
PV	peso vivo
r	coeficiente de correlação
r ²	coeficiente de determinação
TTM	tetratiomolibdato de amônia
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
μmol	Micromol

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	Maior
±	mais ou menos
-	menos
+	Mais
° C	graus Celcius
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	sulfato de cobre pentahidratado
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	28
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1	IMPORTANCIA BIOLÓGICA DO COBRE E ZINCO.....	30
2.2	METALOTIONEÍNA.....	31
2.3	METALOTIONEÍNA E O METABOLISMO DE COBRE E ZINCO.....	32
2.4	DISPONIBILIDADE DE COBRE NOS ALIMENTOS.....	33
2.5	INTOXICAÇÃO CÚPRICA.....	33
2.6	SUSCEPTIBILIDADE DOS OVINOS À INTOXICAÇÃO CÚPRICA.....	35
2.7	PATOGENIA DA INTOXICAÇÃO CÚPRICA.....	37
2.8	SINAIS CLÍNICOS.....	38
2.9	DIAGNÓSTICO.....	39
2.10	TRATAMENTO.....	40
3	OBJETIVOS.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	ANIMAIS.....	44

4.2	INSTALAÇÕES.....	44
4.3	DIETA E MANEJO.....	45
4.4	DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	47
4.5	COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO.....	48
4.6	COLETA DE AMOSTRAS DE BILE.....	48
4.7	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	49
4.8	DIGESTÃO ÁCIDA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	49
4.8.1	Digestão das amostras de fígado.....	49
4.8.2	Digestão das amostras de bile.....	50
4.8.3	Digestão das amostras de sangue total.....	51
4.9	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS MINERAIS.....	51
4.10	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS...	52
4.10.1	Estimativa do cobre ligado a metalotioneína (Cu-MT) e da porcentagem de Cu-MT em relação ao cobre hepático total (%Cu-MT: Cu).....	54
4.11	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	54
4.12	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	54

4.12.1	Concentração sérica de proteína total.....	54
4.12.2	Concentração sérica de albumina.....	55
4.12.3	Concentração de Uréia Sérica	55
4.12.4	Concentração de Creatinina Sérica	55
4.12.5	Atividade de Aspartato Aminotransferase Sérica (AST)	55
4.12.6	Atividade de Gama Glutamilttransferase Sérica (γ GT).....	56
4.13	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	56
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5	RESULTADOS.....	58
5.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	58
5.2	TEORES DE MICROELEMENTOS NO FÍGADO.....	58
5.2.1	Teores de cobre no fígado.....	58
5.2.2	Acúmulo hepático de cobre no decorrer do experimento.....	60
5.2.3	Teores de zinco no fígado.....	61
5.3	TEORES DE METALOTIONEÍNAS NO FÍGADO.....	62

5.4	COBRE LIGADO A METALOTIONEÍNA NO FÍGADO.....	62
5.5.	VALORES MEDIANOS DA PORCENTAGEM DE Cu-MT NO FÍGADO EM RELAÇÃO AO COBRE HEPÁTICO TOTAL.....	63
5.6	CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO SANGUE TOTAL.....	64
5.7	CONCENTRAÇÃO DE ZINCO NO SANGUE TOTAL.....	65
5.8	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	66
5.9	GANHO DE PESO.....	66
5.10	CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA BILE.....	68
5.11	ATIVIDADE SÉRICA DA GAMMA-GLUTAMIL TRANSFERASE (γGT).....	69
5.12	ATIVIDADE DA ASPARTATO-AMINO TRANSFERASE SÉRICA.....	71
5.13	CONCENTRAÇÃO DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS SÉRICAS PROTEÍNA TOTAL, ALBUMINA, URÉIA E CREATININA.....	73
5.14	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	74
5.15	CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS.....	74
5.15.1	Correlação entre a concentração de cobre e zinco no fígado.....	74
5.15.2	Correlação entre os teores de metalotioneínas no fígado e a concentração hepática de zinco.....	75
5.15.3	Correlação entre os teores de metalotioneínas no fígado e a concentração hepática de cobre.....	76

5.15.4	Correlação entre o zinco hepático e a concentração de Cu-MT.....	77
5.15.5	Correlação entre o cobre hepático e a porcentagem de cobre ligado a metalotioneína em relação ao cobre total do fígado.....	78
5.15.6	Correlação entre o cobre hepático e o cobre na bile.....	78
5.15.7	Correlação entre a porcentagem de cobre ligado a metalotioneína e o a concentração de cobre na bile.....	79
5.15.8	Correlação entre o cobre hepático e a atividade da γ GT.....	80
5.15.9	Correlação entre o cobre hepático e a atividade da AST.....	80
6	DISCUSSÃO.....	82
7	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

A criação de ovinos vem se expandido nos últimos anos em nosso país, em especial nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Em muitos dos sistemas de criação houve um incremento do nível tecnológico utilizado, com a introdução de novas técnicas de alimentação e manejo visando principalmente à intensificação da ovinocultura com o aumento da produtividade, especialmente voltada para o abate de cordeiros. Esta prática leva ao aparecimento de várias enfermidades, sendo uma delas a intoxicação por cobre (ORTOLANI; MINERVINO, 2010).

O Cobre (Cu), quando ingerido em concentrações elevadas, pode provocar inicialmente um acúmulo progressivo no organismo, sem causar nenhum sintoma de intoxicação, até atingir um limiar máximo, sendo abruptamente liberado na corrente circulatória como cobre livre, o qual irá causar uma reação em cadeia provocando degeneração hepática, intensa hemólise, icterícia e morte por insuficiência renal, sendo esta enfermidade denominada de intoxicação cúprica acumulativa (ICA) (MACHADO, 1998; ORTOLANI, 2003; SOARES, 2004).

A intoxicação por cobre é considerada importante enfermidade causadora de mortes em ovinos no Brasil, provocando grandes prejuízos a essas criações (RIET-CORREA et al., 1989, ORTOLANI, 2003). Na intoxicação cúprica acumulativa o cobre vai gradativamente se depositando no fígado, e quanto maior for este armazenamento mais se pode afirmar que os animais ou a espécie em questão serão susceptíveis a futuramente apresentarem a crise hemolítica de caráter superagudo. Outro fator importante em relação à susceptibilidade é a capacidade do ruminante de excretar cobre pela bile, através de sua ligação com a metalotioneína no fígado, sendo este mecanismo de excreção influenciado pelos teores de zinco (Zn) presentes no órgão (COUSINS, 1985; LOPEZ-ALONZO et al., 2005).

Surtos esporádicos de intoxicação primária por cobre ocorre em muitas circunstâncias, e tanto os casos agudos quanto os acumulativos apresentam uma elevada taxa de mortalidade (RADOSTITS et al., 2000), chegando a atingir 80% dos animais acometidos (ORTOLANI, 2003). A maioria dos casos de intoxicação aguda primária ocorre pela administração acidental de grandes quantidades de sais solúveis de cobre ou pela contaminação com medicamentos ricos em Cu

(ORTOLANI et al., 2004). Contudo, a maioria dos casos de intoxicação cúprica ocorre de forma cumulativa (LEMOS et al., 1997; BARBOSA et al., 1999).

O fígado é o órgão de eleição para a avaliação do acúmulo de cobre no organismo, pois este microelemento se deposita no interior dos hepatócitos em grandes quantidades, até que, quando as células chegam ao seu limite, todo o Cu é liberado na corrente sangüínea, causando assim a crise hemolítica observada na intoxicação acumulativa (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; ORTOLANI, 2003).

Estudos clássicos demonstraram que os ovinos acumulam mais cobre no fígado que os demais ruminantes e que existem diferenças inclusive entre as diversas raças ovinas, sendo que algumas delas são mais predispostas a essa intoxicação (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; HUMANN-ZIEHANK et al., 2001; HAYWOOD et al., 2005). Existe ainda uma grande variação individual em relação à susceptibilidade à ICA tanto para ovinos (MACHADO, 1998), quanto para outras espécies ruminantes (MINERVINO, 2007). Estas variações observadas provam a variabilidade entre a absorção e excreção do Cu e conseqüente variação na susceptibilidade à ICA. Contudo, não se conhece profundamente qual o mecanismo de excreção e absorção de Cu e seus antagonistas que provoca esta diferença de susceptibilidade sendo que está resposta é de fundamental importância no entendimento desta enfermidade.

No estudo de ANTONELLI (2007), animais submetidos à alta concentração de cobre na dieta e recebendo um sal mineral rico em molibdênio apresentaram menor chance de intoxicação cúprica acumulativa, em relação ao grupo controle, onde em cinco meses, apenas um animal recebendo Mo apresentou intoxicação, enquanto que 3 animais do grupo sem Mo foram acometidos por ICA. Este estudo revelou que um sal rico em Mo oferece uma proteção parcial à ICA, contudo, ainda houve um animal intoxicado. Deste modo um sal rico tanto em molibdênio quanto em zinco poderia promover uma maior proteção à intoxicação cúprica.

No único estudo sobre os efeitos do zinco na intoxicação cúprica, BREMNER et al. (1976) avaliaram duas doses de zinco na prevenção de intoxicação cúprica acumulativa, e apesar de terem obtido proteção à esta enfermidade, os autores relatam que o mecanismo pelo qual o zinco exerceu esta proteção não foi estudado. Deste modo, maiores estudos são necessários, incluindo a análise da concentração de metalotioneínas no fígado, para avaliar o efeito do zinco sobre o metabolismo e acúmulo hepático de cobre em ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DO COBRE E ZINCO

Os minerais desempenham basicamente três tipos de funções essenciais no organismo dos animais, participando como componentes estruturais dos tecidos corporais, como eletrólitos na manutenção do equilíbrio ácido-básico, da pressão osmótica, da permeabilidade das membranas celulares e funcionam também como ativadores de processos enzimáticos ou como integrantes da estrutura de metaloenzimas ou vitaminas (TORKANIA et al., 1998).

Entre os minerais, o cobre (Cu) é um microelemento essencial que apresenta diversas funções no organismo animal, participando no centro ativo de mais de 20 metaloenzimas, cofatores e metaloproteínas ligados à destruição dos radicais livres, na síntese dos tecidos conectivos, formação da mielina e dos ossos, pigmentação e formação de pêlos e lã, além de atuar indiretamente na hematopoiese (MCDOWELL 1999; ORTOLANI, 2003).

Assim como o cobre, o zinco é um microelemento essencial, que participa da composição de várias proteínas e está envolvido em todos os aspectos do metabolismo, sendo integrante de mais de 300 enzimas em diferentes espécies de todos os filos (VALLE; AULD, 1990).

O zinco está envolvido na estabilização de membranas estruturais e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica. A ação antioxidante do zinco é baseada na proteção de grupos sulfidrilas contra oxidação e na inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por metais como ferro e cobre, também tem papel importante na organização polimérica de macromoléculas como DNA e RNA, sendo indispensável para atividade de enzimas ligadas a síntese de RNA e DNA como a RNA polimerase. O zinco também participa da composição de metaloenzimas essenciais no metabolismo da vitamina A, desempenha importante papel em fenômenos imunológicos (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; VALLEE; AULD, 1990; BRAY; BETTER; 1990; VALLE; FALCHUK; 1993).

2.2 METALOTIONEÍNA

As metalotioneínas são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular que foram descobertas há mais de cinco décadas (DAVIS; COUSINS, 2000), quando Margoshes e Vallee (1957) identificaram no córtex de rim equino uma proteína responsável pelo acúmulo natural de cádmio, sendo estas os únicos compostos biológicos conhecidos por conter cádmio naturalmente. Desde então muitos estudos vem sendo desenvolvidos no intuito de desvendar a função dessas proteínas nos sistemas biológicos (NORDBERG, 1998).

As metalotioneínas são compostas por uma única cadeia de aminoácidos, sendo que cerca de 30% destes são cisteínas. A abundância de ligantes tiol dos resíduos de cisteínas confere a estas proteínas uma alta afinidade por íons metálicos específicos como: zinco, cobre, cádmio, mercúrio e prata (NORDBERG, 1998; DAVIS; COUSINS, 2000; STILLMAN, 1995).

Atualmente, na medicina humana são conhecidas quatro isoformas de metalotioneínas (metalotioneína 1, metalotioneína 2, metalotioneína 3 e metalotioneína 4), que possuem distribuição distinta no organismo. As isoformas 1 e 2 estão presente em maior abundância no fígado, pâncreas, intestinos e rins, enquanto as isoformas 3 e 4 são encontradas principalmente no cérebro e pele (DAVIS; COUSINS, 2000). As metalotioneínas ocorrem não apenas no reino animal, mas em microorganismos procarióticos e eucarióticos e em plantas superiores (ISART; VASAK, 2002).

A função das metalotioneínas nos organismos vivos ainda não está bem esclarecida, embora existam vários indícios da participação dessas proteínas no controle da concentração de elementos traços livres como o zinco e o cobre, no estoque e armazenamento de alguns metais, ação como agente de detoxificação para metais como cádmio e mercúrio, papel protetor por sequestro de metais e proteção contra condições de stress e também funcionam como metalochaperonas para transportar íons metálicos para outras proteínas. Dessa forma a metalotioneína desempenha papel importante no metabolismo intracelular do cobre e do zinco e na proteção contra danos oxidativos resultantes da exposição excessiva a esses metais (DAVIS; COUSINS, 2000).

Pesquisas propõem que os níveis de metalotioneína podem estar elevados em tecidos que estejam em rápido desenvolvimento, geralmente para fornecer zinco e cobre para o metabolismo de ácidos nucleicos e síntese de proteínas (VALLE, 1979; SZCKUREK et al., 2001).

2.3 METALOTIONEÍNA E O METABOLISMO DE COBRE E ZINCO

A biossíntese de metalotioneína nos tecidos é regulada pela concentração de metais no organismo, sendo considerada uma necessidade biológica para manter concentrações homeostáticas de íons metálicos essenciais e não essenciais por processo de quelação (HOGSTRAND; HAUX; 1991).

A concentração de metalotioneína pode ser rapidamente aumentada em casos de altos níveis de cobre hepático. O cobre acumula-se nos lisossomos dos hepatócitos ligados a metalotioneína, essa ligação é extremamente forte, sendo capaz de deslocar os demais íons ligados a metalotioneína. A maior afinidade do cobre pela metalotioneína funciona como fator de proteção para a célula já que o zinco e o cádmio são menos reativos com relação a formação de radicais livre (VIARENGO et al., 2000).

Os níveis de zinco no fígado são extremamente importantes no controle da síntese e degradação da metalotioneína, de modo que as concentrações de metalotioneína nos hepatócitos são muito baixas na deficiência de Zn e a síntese desta é estimulada pela suplementação com zinco (LEE et al., 1994).

A captação do zinco e do cobre no intestino é regulada homeostaticamente através de dois mecanismos, por transporte ativo e por difusão simples. O primeiro ocorre em condições normais de dieta, enquanto que na presença de grandes quantidades de cobre ocorre a absorção por difusão simples (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

A regulação da síntese de metalotioneína nas células da mucosa intestinal está sob o controle do cobre e do zinco intracelular, quando as concentrações deste elemento atingem picos elevados, a metalotioneína é sintetizada (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; CARVALHO et al., 2003).

Após a sua absorção intestinal, o Cu é carregado por proteínas até o fígado onde é utilizado para o metabolismo normal ou é armazenado pela ligação a metalotioneína ou ainda, por balanço positivo, é excretado na bile (BREMER, 1991). Após a absorção, o zinco é transportado no sangue portal, sendo captado pelo fígado e subsequentemente distribuído para os demais tecidos.

2.4 DISPONIBILIDADE DE COBRE NOS ALIMENTOS

A disponibilidade do cobre nos alimentos depende da sua forma química nos alimentos e da presença ou não de outros elementos antagonistas na dieta. O cobre ligado ao carbonato, nitrato, sulfato, cloreto e óxido apresenta alta disponibilidade, enquanto na forma metálica é pouco disponível. O capim na forma bruta apresenta grande quantidade de cobre na forma metálica e o processamento deste por meio da fenação ou ensilamento promove formação de complexos entre o cobre e proteínas, elevando a disponibilidade desse mineral, diferentemente dos cereais que possuem alta disponibilidade de cobre (ORTOLANI, 2006; SUTTLE, 1986).

A ingestão de molibdênio e enxofre na dieta aumenta a formação de tiomolibdatos no rúmen, compostos estes que possuem poder quelante sobre o cobre. Os tiomolibdatos são formados na fase sólida do rúmen, em áreas com maior concentração de fibras dietéticas, sulfatos e protozoários, sendo mais estáveis no pH alto desse compartimento (SUTTLE, 1991). O enxofre também pode diminuir a disponibilidade do cobre, pela formação de sulfetos os quais se ligam ao cobre no intestino delgado (SUTTLE et al., 1984; ORTOLANI, 1997).

2.5 INTOXICAÇÃO CÚPRICA

O excesso ou a falta de cobre na alimentação animal pode provocar a intoxicação ou a carência, respectivamente (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

A deficiência do supracitado elemento é tida como um severo problema nutricional em áreas tropicais, devido as suas baixas concentrações na dieta animal

e/ou elevadas concentrações de elementos antagonizantes do cobre como o molibdênio (Mo), enxofre (S) assim como o ferro (Fe) nas pastagens (CARDOSO, 1997; MARQUES et al., 2003), enquanto a intoxicação por cobre pode ocorrer sob duas formas: a primária e a secundária.

A intoxicação primária se caracteriza pela ingestão de grande quantidade de sais de cobre de uma só vez, causando uma intoxicação aguda, ou por uma ingestão de pequenas quantidades por um longo período, causando uma intoxicação cumulativa (MYLREA et al., 1974; ORTOLANI et al., 2004). A intoxicação secundária inclui a intoxicação fitógena que se caracteriza pela ingestão normal de cobre, mas com o acúmulo do microelemento no organismo animal, em consequência de baixos teores de molibdênio nas pastagens, e a intoxicação hepatógena que está relacionada com lesões hepáticas causadas por plantas (UNDERWOOD; SUTLLE, 1999; RADOSTITS et al., 2000).

Surtos esporádicos de intoxicação primária por cobre ocorrem em muitas circunstâncias, e tanto os casos agudos quanto os acumulativos apresentam uma elevada taxa de mortalidade, chegando a atingir 80% dos animais acometidos (RADOSTITS et al., 2000). A maioria dos casos de intoxicação aguda primária ocorre pela administração acidental de grandes quantidades de sais solúveis de cobre ou pela contaminação com medicamentos ricos em Cu (MYLREA et al., 1974; ORTOLANI et al., 2004). Contudo, a maioria dos casos de intoxicação cúprica ocorre de forma cumulativa (STROGDAL, 1978; BLAKLEY et al., 1982; PERRIN et al., 1990; TREMBLAY; BAIRD, 1991).

Várias condições dietéticas ou ambientais podem constituir possíveis causas de intoxicação por cobre em ruminantes criados em nosso meio. A contaminação do meio ambiente com cobre e o manejo inadequado de suplementação deste mineral têm tido um papel de destaque na ocorrência desta enfermidade (GUMMOW et al., 1991; BRADLEY, 1993; SARGISON; SCOTT, 1996).

Com a intensificação da ovinocultura nacional, aumentou o uso de rações, geralmente ricas em cobre, onde sistemas de terminação de cordeiro utilizam o concentrado na proporção de 80% da dieta, o que representa uma grande quantidade de ração e conseqüentemente de cobre ingerida. O oferecimento de cama-de-frango, usada como suplemento alimentar para ruminantes traz um potencial risco, pois este resíduo contém elevados teores de cobre, havendo relatos de casos de intoxicação. (ORTOLANI; BRITO, 2001).

Outra possibilidade dietética é o esterco de suínos que tem sido utilizado nas rações de ovinos e bovinos, podendo também representar risco de intoxicação cúprica. Este resíduo também contém altos teores de cobre, visto que o cobre é utilizado em grande quantidade na dieta de suínos pelo fato de ser um promotor de crescimento, sendo eliminado em alta quantidade nas fezes (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). É importante lembrar que também já foram descritos casos de ICA em ruminantes que pastejaram em piquetes intensamente adubados com esterco de suínos (KERR; McGAVIN, 1991).

Uma condição que não pode ser ignorada é a possibilidade de intoxicação por cobre em ruminantes que pastejam em pomares ou outras áreas em que foram utilizadas, como fungicidas ou antimicrobianos, soluções de calda bordalesa, ou animais que ingeriram água de pedilúvio contendo fluidos a base de sulfato de cobre (RIBEIRO et al., 1995; ORTOLANI et al., 2004).

Outro fator relevante na intoxicação por cobre e por outros metais, com maior importância nos últimos anos, refere-se ao acúmulo de metais pesados, dentre estes o cobre, nos tecidos animais, em criações próximas aos grandes centros urbanos, onde a poluição tem atuado com agente contaminador, podendo fazer parte da etiologia da intoxicação cúprica (ELGERWI, et al., 1999; SEDKI, et al., 2003).

2.6 SUSCEPTIBILIDADE DOS OVINOS À INTOXICAÇÃO CÚPRICA

Dentre as espécies domésticas, a ovina é a mais predisposta a desenvolver tanto o quadro carencial como a intoxicação. Os primeiros relatos de intoxicação cúprica em ovinos ocorreram na Inglaterra na década de 20, na década seguinte Broughton e Hardy (1934) apud Todd (1962) descreveram que os ovinos poderiam armazenar quantidades altas de cobre no fígado, sem apresentar sinais clínicos de intoxicação e subitamente manifestar o quadro hemolítico (Mallory 1925 apud Todd 1962).

A predisposição dos ovinos a quadros de intoxicação estão ligados a diferenças marcantes no metabolismo do cobre segundo a raça de ovinos, pois enquanto algumas têm menores capacidades de retenção do cobre em seus estoques orgânicos, outras o acumulam em demasia (UNDERWOOD e SUTTLE,

1999; ORTOLANI, 2003). Estudos comparativos demonstraram que ovinos das raças Suffolk e Texel são mais predispostos a apresentarem intoxicação que o Scottish Blackface, Merino e Welch. Também é reconhecido que ovinos jovens em crescimento são muito mais susceptíveis a desenvolverem quadros de intoxicação por cobre, pois podem absorver o cobre dietético de duas a três vezes mais eficientemente que os adultos (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Considerando o sexo, as fêmeas parecem ser mais propensas a desenvolverem o quadro de intoxicação cúprica, provavelmente, pela ação do estradiol aumentando a retenção de cobre no fígado (ORTOLANI, 1996).

A ligação da metalotioneína ao cobre diminui o risco de intoxicação por cobre. Pesquisas têm demonstrado que fetos de diferentes espécies apresentam altas concentrações de cobre estocado no fígado, porém os riscos de intoxicação são mínimos, já que grande parte do microelemento está ligado a metalotioneína (BREMNER, 1987). Os ovinos parecem produzir menor quantidade de metalotioneína hepática e reduzido percentual de cobre ligado a metalotioneína o que contribui para a maior susceptibilidade à intoxicação (ORTOLANI; MINERVINO, 2010).

Nas últimas décadas, tem se observado aumento da incidência da ICA decorrente principalmente às mudanças de manejo dos ovinocultores, devido ao oferecimento de dietas ricas em cobre, em especial com o uso de sais minerais formulados para bovinos e alimentação do rebanho com grandes quantidades de rações concentrada à base de grãos, as quais apresentam maior disponibilidade do cobre (ORTOLANI, 2003), e menores quantidades de molibdênio e enxofre aumentando a disponibilidade de cobre presente nesses alimentos.

Concentrações de 15 mg de Cu na matéria seca (MS), produzem intoxicação em ovinos. Por causa desta alta sensibilidade o teor deste elemento na dieta recomendado não deve exceder 25 mg/kg, enquanto que a dose recomendada para bovinos, que apresentam maior nível de tolerância, pode chegar a 100 mg/kg (NRC, 1996). Segundo RIET-CORREA et al. (1989), pastagens contendo de 20 mg/kg de Cu na MS provocam quadro de intoxicação acumulativa em ovinos, sem causar o mesmo efeito em bovinos.

2.7 PATOGENIA DA INTOXICAÇÃO CÚPRICA

A patogenia da ICA em ovinos está bem documentada e se caracteriza por três fases distintas: pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

Na primeira delas ocorre acúmulo de cobre hepático sem que exista o surgimento de sinais clínicos evidentes, quando o acúmulo de cobre dentro dos hepatócitos atinge valores superiores a 1.000 mg/kg M.S. pode ocorrer o rompimento de lisossomos provocando necrose intracelular, que pode ser limitada a um pequeno grupo de células nas semanas que antecedem a crise hemolítica ou desencadearem uma "reação em cascata" que provoca a necrose de um número extremamente maior de hepatócitos, nos dois a três dias que antecedem a crise hemolítica (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

Com o rompimento dos hepatócitos ocorre a liberação de cobre, na sua forma livre e altamente reativa, assim como de lisosimas e radicais livres os quais promovem danos inicialmente nos hepatócitos e em seguida, quando da sua distribuição sistêmica, por todo organismo animal em especial eritrócitos e células renais (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

No decorrer de um dia após a entrada de cobre nos eritrócitos, inicia-se um intenso processo hemolítico (SANSINANE et al. 1994). Além destes danos, temporariamente o cobre livre pode, nos eritrócitos não lisados, oxidar a hemoglobina transformando-a em metahemoglobina, a qual é incapaz de carrear oxigênio. Soli; Frosli (1977) encontraram um percentual variável (10 a 20%) de metahemoglobina nos eritrócitos de ovinos intoxicados. A anemia, provocada pela crise hemolítica, associada à metahemoglobinemia, que incapacita temporariamente o transporte de oxigênio para a economia animal, gera um quadro de anoxia anêmica (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; RADOSTITS et al., 2007).

Outros órgãos bastante afetados em seguida a crise hemolítica são os rins. Além dos agentes agressores supracitados destaca-se também a hemoglobina livre, fruto de intensa hemólise, como substância nefrotóxica. Segundo Gooneratne et al. (1986) e Jones et al. (1984) o achado de um complexo cúprico-proteico-lisossomal nos túbulos contornados proximais está sempre acompanhado de degeneração celular e morte de muitas destas células e parece ser mais intenso os danos, quanto

maior for o grau de hemólise. Além destes danos nos túbulos contornados proximais, os supracitados autores também descreveram lesões discretas na lâmina basal glomerular, assim como a presença de proteinúria e cilindros hemoglobínicos. Todas estas descrições levam os autores a afirmarem que ocorre insuficiência renal nos ovinos intoxicados (GOONERATNE et al., 1986; JONES et al., 1984).

Vários autores consideram que os principais danos ao organismo, decorrentes de intoxicação cúprica, que levam os ovinos à morte, estão ligados às lesões hepáticas e sanguíneas, não considerando a insuficiência renal como principal quadro mórbido determinante da morte dos animais (CARLSON; GEORGE, 1990; HOWELL; GAWTHORNE, 1987; ISHMAEL et al. 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; SOLI, 1980; VAN SAUN, 1988).

Na fase pós-hemolítica, os poucos animais não tratados, que sobrevivem as intensas injúrias desencadeadas na fase de hemólise, apresentam sinais de recuperação clínica, com duração de duas a três semanas (MACHADO, 1998).

2.8 SINAIS CLÍNICOS

Na fase pré-hemolítica não são observados sinais clínicos evidentes, porém na fase hemolítica os ovinos intoxicados apresentam quadros de anorexia, fraqueza, depressão, sede, taquipnéia, mucosas ictéricas e diarreias (LE MOS et al. 1997; RADOSTITS et al., 2007; SARGISON et al. 1994; SOLI, 1980). Lemos et al. (1997) e Machado (1998) descreveram ainda a presença de hipotonia ruminal, hipertermia e taquicardia.

Além do surgimento do tom amarelado das mucosas, causada pela presença de hiperbilirrubinemia, pode ser verificado mucosas achocolatadas, devida a metahemoglobinemia, e finalmente mucosas anêmicas, provocadas pela drástica redução do número de eritrócitos (ARORA et al. 1977; HUMPHRIES et al. 1988; LEMOS et al. 1997; SOLI, 1980; TODD et al. 1962). Nem todos os autores supracitados descreveram todas estas colorações de mucosas, pois na maioria dos relatos a sobrevida dos animais foi pequena. Também é descrito em casos esporádicos o aparecimento de quadro de poliencefalomalácia, caracterizado por amaurose, dificuldade de locomoção e opistótomo (SARGISON et al., 1994).

Vale ressaltar que Minervino et al., (2009a) descrevem quadro sintomatológico atípico de intoxicação cúprica, em caráter experimental, nas espécies bovina e bufalina, com a presença de apatia, hiporexia seguido de anoxia, intensa perda de peso, desidratação e oligúria, culminando com um quadro de caquexia e morte do animal, onde os mesmos apresentavam altíssimos teores de cobre no fígado.

2.9 DIAGNÓSTICO

É extremamente difícil o estabelecimento de um diagnóstico precoce para a ICA, através apenas das observações clínicas. Sendo assim, diversos autores tentaram estabelecer parâmetros de diagnóstico clínico baseados em análises laboratoriais, sendo que os melhores resultados, na espécie ovina, foram às alterações de enzimas hepáticas (MACHADO, 1998).

Outras variáveis, além da concentração de cobre hepático, também têm sido utilizadas para prever o surgimento eminente de intoxicação cúprica. Um estudo abrangente foi realizado por Ortolani et al. (2003) que acompanharam durante a fase pré-hemolítica a atividade de quatro enzimas (gama glutamiltransferase - GGT; aspartato aminotransferase - AST; fosfatase ácida - FA; e sorbitol desidrogenase - SDH) e os teores de cobre séricos, além da dinâmica do peso vivo e a ingestão de alimentos em ovinos que recebiam quantidades crescentes de uma solução de sulfato de cobre pentahidratado, por via oral, até o surgimento de quadro hemolítico. Os autores concluíram que a variável mais precoce em indicar um acúmulo de cobre era a da atividade da enzima GGT, que aumentou seu teor na corrente sanguínea 28 dias antes do início dos sintomas, seguida de AST no 14º dia. Embora os teores de cobre séricos se elevassem exponencialmente no dia da crise hemolítica, até o dia anterior os mesmos se mantinham constantes no período pré-hemolítico, dentro dos valores de referência; tanto o peso vivo como a ingestão de alimentos tiveram suas diminuições significativas a partir do 7º dia anterior à crise hemolítica.

Os níveis de cobre na corrente sanguínea não é um bom indicador precoce de intoxicação e aumenta seus valores em até 10 vezes nos dois a três dias que antecedem ou que sucedem a hemoglobinúria, diminuindo seus valores durante o

período de recuperação (HOWELL; GAWTHORNE, 1987). Os valores normais de cupremia variam de 9,3 $\mu\text{mol/L}$ a 20 $\mu\text{mol/L}$ (SUTTLE, 1986).

Devido à crise hemolítica associada às lesões hepáticas ocorre um aumento de bilirrubina sérica, em especial da sua fração indireta, no decorrer de uma semana da fase pós-intoxicação (ISHMAEL et al. 1972). Em um único trabalho foi estudada a concentração de hemoglobina livre, que avalia indiretamente o grau de hemólise. (SOLI; FROSLIE, 1977). Detectou-se que no decorrer de 24 horas da crise hemolítica as concentrações de hemoglobina livre se elevaram constantemente.

Alguns estudos mostraram que partir do início da crise hemolítica, ocorre uma marcante redução volume globular, número de hemácias e no teor de hemoglobina sangüínea, atingindo em alguns casos volume globular de 5% (ISHMAEL et al. 1972; BARDEN; ROBERTSON, 1962; SOLI; FROSLIE, 1977).

Segundo Ishmael et al. (1972), ovinos após a crise hemolítica, manifestada na intoxicação cúprica, apresentam um intenso aumento na concentração de uréia sérica, indicativa de insuficiência renal aguda. Contudo, tais autores não determinaram conjuntamente a concentração de creatinina sérica. Gooneratne et al. (1981) verificaram na urinálise hemoglobinúria durante a crise hemolítica, proteinúria e bilirrubinúria.

2.10 TRATAMENTO

Vários fármacos foram utilizados no tratamento da intoxicação cúprica com completo insucesso. Entre eles citam-se os seguintes: azul de metileno, para controle da metahemoglobinemia; ácido ascórbico, para atuar como agente redutor do cobre livre (forma cúprica); glutathione a fim de aumentar a concentração de glutathione dos eritrócitos; 2,3 dimercapto-1-propanol (SAL) e ácido dietileno diamino tetracético cálcico (CaEDTA) para aumentar a excreção de cobre livre pela urina ou fezes (SOLI, 1980).

Posteriormente, verificou-se que a droga L-penicilamine (Cuprime[®]) tinha um efeito quelante sobre o cobre livre e estocado, aumentando a excreção renal de cobre em até 10 vezes; podendo ser utilizado no tratamento. Vários são os inconvenientes do seu uso na terapia da intoxicação cúprica, entre estes citam-se as

seguintes razões: é um medicamento caro; pouco disponível; que aumenta de maneira significativa a excreção urinária de zinco; pode causar dermatopatias, deficiência de piridoxina, e reações imunes que resultam em glomerulonefrite (GOONERATNE; CHRISTENSEN, 1997; SEYMOUR, 1987; SOLI, 1980; WOUK et al. 1981). Estes inconvenientes contra-indicam ou dificultam o uso desse medicamento na terapia da intoxicação cúprica.

Pela primeira vez, Gooneratne et al. (1981) utilizaram com sucesso tetratiomolibdato de amônia, pela via intravenosa, no tratamento de intoxicação cúprica, em ovinos. O uso deste composto foi empregado a partir dos esclarecimentos gerados em estudos realizados, na década de 70, para compreender os mecanismos da indisponibilidade do cobre, quando as dietas eram ricas em molibdênio e enxofre (SUTTLE, 1991). Constatou-se então que no rúmen eram formados vários compostos de molibdato, com diferentes graus de saturação de enxofre, e que o tetratiomolibdato, composto com máxima tiosaturação, possuía um incrível poder quelante sobre o cobre disponível. Verificou-se que quando injetado, o tetratiomolibdato tinha grande capacidade em se ligar com o cobre presente na corrente circulatória e nos estoques.

No trabalho inicial, Gooneratne et al. (1981) administraram três doses de 1,7 mg de tetratiomolibdato (TTM) de amônia por quilograma de peso vivo, em três dias alternados, em ovinos apresentando hemoglobínúria; obtiveram cura em 77% dos casos, comparado com a letalidade de 65% nos ovinos controles (não tratados). Os ovinos medicados manifestaram uma rápida melhora no quadro geral e no decorrer de 77 dias apresentaram um ganho de peso regular. Os autores ainda constataram que o TTM não causava quaisquer lesões hepáticas ou renais, e que a remoção do cobre livre no sangue ou parte do cobre estocado no fígado e nos rins se ligava ao composto sendo em seguida excretado incólume pela bile e eliminado pelas fezes.

Posteriormente, o TTM foi utilizado por Humphries et al. (1986) no tratamento de casos naturais de intoxicação cúprica em cordeiros, na Escócia. Os autores utilizaram o mesmo esquema de terapia e via de aplicação preconizado por Gooneratne et al. (1981) e obtiveram cura em 80% dos casos clínicos.

Aprofundando os conhecimentos sobre o assunto Humphries et al. (1988) realizaram experimento com 20 cordeiros, com 16 semanas de idade no início do ensaio, oferecendo uma dieta rica em cobre (36 ppm de cobre).

No decorrer de 18 meses, oito cordeiros apresentaram intoxicação cúprica, sendo os mesmos divididos em dois grupos, onde o primeiro deles foi tratado com 1,7 mg de TTM/kg P.V., pela via endovenosa e o subsequente com 3,4 mg de TTM/kg P.V., pela via subcutânea. Em ambos os tratamentos a cura foi total, sendo que a remoção de cobre dos estoques hepáticos, seis dias após os tratamentos, foi respectivamente de 40,9% e 38,2% para os ovinos medicados com 1,7 e 3,4 mg de TTM/kg P.V. A conclusão do trabalho foi que ambas as doses e rotas não apresentavam efeitos colaterais, e pela praticidade sugeriu-se o uso da via subcutânea. Embora os resultados de Humphries et al. (1988) tenham sido satisfatórios quanto ao sucesso dos esquemas de terapias utilizados, deve-se ressaltar que pouquíssima ênfase foi dada neste estudo para a determinação de variáveis clínico-laboratoriais que pudessem avaliar mais profundamente o real efeito terapêutico do TTM; além do mais a metodologia experimental não foi uniforme pois foram empregados dentro dos tratamentos doses e vias diferentes, o que torna difícil a comparação dos resultados, soma-se a isto a ausência de um grupo controle intoxicado e sem tratamento.

Segundo Machado (1998), a terapia da intoxicação cúprica pode ser extremamente eficiente se for iniciada precocemente no decorrer do 1º ao 2º dia após o início da hemoglobinúria, e se for utilizado antídoto específico à base de tetratiomolibdato (TTM), na dose de 3,4 mg/kg PV. Este antídoto tem grande capacidade de quelar o cobre livre, como o cobre presente nos estoques, bloqueando assim seus efeitos imediatos. Gooneratne et al. (1986) também identificaram que o TTM se liga ao cobre livre presente no complexo cobre hemoglobina-lisossomo reduzindo ou praticamente inativando o efeito deste composto como agente nefrotóxico, tendo comprovado a redução dos teores de uréia e creatinina sérica após o emprego de TTM.

3 OBJETIVOS

Avaliar a possibilidade que crescentes quantidades de zinco suplementar na dieta possam ter na prevenção da intoxicação cúprica em ovinos.

Comparar o metabolismo do cobre, em especial quanto a sua concentração no estoque hepático, produção de metalotioneína e sua ligação com o cobre retido no fígado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 ovinos, machos, mestiços da raça Santa Inês, pesando em média 30 kg. Os carneiros foram vermifugados três vezes consecutivas com intervalo de 20 dias entre cada aplicação, sendo utilizado a Moxidectina injetável a 1% na dose de 1 mL para 50 kg de peso vivo na primeira e terceira aplicação, e cloridrato de levamisol a 5% via oral na dose de 1 mL para cada 10 kg e peso vivo na segunda vermifugação. Tal protocolo garantiu a completa eliminação dos endoparasitas, comprovada por exame copro-parasitológico posterior à vermifugação. Assim que foram adquiridos os animais receberam aplicação de polivitamínico mineral via subcutânea na dose de 5 mL por cabeça e passaram a ser alimentados com a dieta basal. Após todo o período de adaptação, os animais tiveram um ganho de peso acentuado, tendo iniciado a fase experimental com 41,2 kg de média de peso corporal.

4.2 INSTALAÇÕES

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

4.3 DIETA E MANEJO

Todos os ovinos receberam uma dieta basal composta de 80% da matéria seca (MS) de feno de capim Coast-cross (*Cynodon dactylum* (L.) Pers) e 20% da MS de concentrado comercial farelado. A quantidade total de matéria seca da ração oferecida aos animais foi calculada em 2,7 % do peso vivo individual, sendo corrigido no decorrer do ensaio. Os ruminantes receberam diariamente 12 g de sal mineralizado comercial por dia. Semanalmente os animais foram pesados, sempre antes do oferecimento de alimentos, pela manhã.

Para o oferecimento preciso das doses suplementares de cobre e zinco realizava-se o seguinte procedimento: Pela manhã, antes do oferecimento da dieta, todos os animais eram amarrados próximos aos seus respectivos cochos, com uso dos cabrestos individuais e cordas. Este manejo era realizado de forma que todos os ovinos ingerissem alimentos apenas dos seus respectivos cochos, não podendo alcançar os comedouros de outros animais. As quantidades de cobre e zinco, previamente pesadas e acondicionadas em coletores universais, adicionadas as 12 g de sal mineral eram então oferecidas aos animais, misturadas no concentrado, também previamente pesado. O processo para mistura dos minerais à ração era realizado vigorosamente, utilizando um pote plástico individual, permitindo assim a completa homogeneização.

Os ovinos ficavam presos aos seus respectivos cochos até que ingerissem completamente todo o concentrado e conseqüentemente as doses dos elementos minerais, o que levava de 30 minutos a no máximo 3 horas. Após esse período os animais eram soltos na baia e era oferecido feno, na quantidade calculada, mas consumo de maneira coletiva. Deste modo, foi possível dosar com excelente segurança a quantidade exata de cobre e zinco consumida por cada ovinos, variando apenas o consumo de feno, que apesar da quantidade ser calculada, não se pode garantir que cada ovino ingeriu a quantidade de feno correspondente ao seu peso. Apesar disso, como os teores de cobre e zinco no feno são baixos, e a quantidade de feno ingerida pelos animais foi elevada, esta variação e extremamente insignificante.

A composição mineral dos componentes da dieta pode ser observada no Quadro 1 enquanto que o resultado da análise bromatológica dos componentes da

dieta encontra-se no Quadro 2. Considerando apenas a dieta basal, sem as doses suplementares de cobre e zinco, a ingestão diária de cobre oriunda do sal mineral, independentemente do peso do animal, foi de 7 mg e a de zinco foi de 45,6 mg. Se considerarmos um ovino de 40 kg de peso corpóreo, podemos calcular que a ingestão de cobre oriunda da dieta basal, sem incluir a mistura mineral, foi de 5,8 mg de Cu/dia e a ingestão de zinco calculada equivale a 39 mg. Assim, a dieta basal completa equivalia a uma ingestão diária de 12,8 mg de Cu e 84,6 mg de Zn.

COMPOSIÇÃO	FENO	CONCENTRADO	MISTURA MINERAL
Cálcio (%)	3,5	2,8	12,0
Fósforo (%)	3,2	0,4	8,7
Magnésio (%)	2,9	-	-
Sódio (%)	-	-	147,0
Enxofre (%)	2,3	1,2	1,8
Cobre (mg/kg)	4,2	10,0	590,0
Molibdênio	-	-	300,0
Zinco (mg/kg)	30,0	60,0	3.800,0
Ferro (mg/kg)	89,0	90,0	1.800,0
Cobalto (mg/kg)	-	1,4	40,0
Iodo (mg/kg)	-	0,8	80,0
Flúor (máx.) (mg/kg)	-	-	880,0
Manganês (mg/kg)	81,0	46,0	1.300,0
Selênio (mg/kg)	-	-	15,0

Quadro 1 - Composição mineral do feno de coast-cross, do concentrado comercial e da mistura mineral oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental – São Paulo – 2011. Fonte: Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ – USP e Tortuga Cia Zootécnica Agrária.

COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA	FENO	CONCENTRADO
% MS (matéria seca)	86,8	87,0
% FB (fibra bruta)	32,4	16,0
% PB (proteína bruta)	7,8	14,0
% EE (extrato etéreo)	1,8	2,0
% MM (matéria mineral)	6,3	16,0
% ENN (extrato não nitrogenado)	51,7	52,0

Quadro 2 – Composição bromatológica do feno de capim Coast-Cross e do concentrado comercial oferecido aos ovinos durante o período experimental – São Paulo – 2011. Fonte: Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

4.4 DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O experimento foi inteiramente ao acaso, onde os ovinos foram distribuídos em cinco grupos compostos de oito animais cada, que variaram conforme as concentrações de cobre e zinco suplementadas diariamente:

Grupo A – 12 mg de Cu por kg de PV / 1 mg de zinco por kg de PV

Grupo B – 12 mg de Cu por kg de PV / 4 mg de zinco por kg de PV

Grupo C – 12 mg de Cu por kg de PV / 8 mg de zinco por kg de PV

Grupo D – 12 mg de Cu por kg de PV (controle positivo)

Grupo H – Sem receber suplementação adicional (controle negativo)

Os ovinos que apresentaram hemoglobinúria macroscópica foram imediatamente sacrificados de maneira humanitária. Após 98 dias (14 semanas), ao término do experimento, todos os animais foram sacrificados onde foram realizadas coletas de tecidos e fluidos.

4.5 COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO

No início do experimento, ainda durante o período de adaptação, todos os animais foram submetidos a cirurgia de biópsia hepática. Tal cirurgia foi realizada adaptada de metodologia descrita em detalhes no trabalho de Minervino et al. (2009b). Após a retirada de fragmento hepático, o mesmo foi subfracionado em três alíquotas. Uma foi acondicionada em tubo plástico tipo KMA e congelada a 20 °C negativos, a segunda alíquota foi imediatamente acondicionada em criotubos e ultracongelada por imersão em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenada em freezer à temperatura de 80° C negativos. Uma terceira alíquota foi fixada em solução de formalina a 10%, em tubos plásticos que permitissem sempre um volume de solução dez vezes superior ao volume da amostra. Ao final do experimento, durante o abate dos animais, o mesmo procedimento foi adotado com a obtenção das mesmas alíquotas. Os animais que apresentaram manifestação clínica de intoxicação cúprica e foram sacrificados antes do final do experimento tiveram amostras hepáticas coletadas no momento da eutanásia e estas foram consideradas como as amostras do tempo final.

4.6 COLETA DE AMOSTRAS DE BILE

Amostras de bile foram coletadas no início do experimento, durante a cirurgia de biópsia hepática, utilizando seringa de 3 mL e agulha 24G descartáveis (Becton, Dickinson and Company©). Era realizada punção da vesícula biliar com aspiração da bile até o esvaziamento completo da vesícula. Após a retirada da agulha era realizado um ponto simples utilizando fio tipo catgut cromado 3-0 (Paramed® suturas) no exato local, para evitar posterior vazamento de bile na cavidade abdominal. Um alíquota de aproximadamente 3 mL era acondicionada em tubos tipo KMA e congelada a 20° C negativos. Durante o abate era realizado procedimento similar, no entanto sem a necessidade de sutura da vesícula. Os animais que apresentaram manifestação clínica de intoxicação cúprica e foram sacrificados antes

do final do experimento tiveram amostras de bile coletadas no momento da eutanásia e estas foram consideradas como as amostras do tempo final.

4.7 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE

Foram realizadas coletas de sangue semanalmente em todos os animais até o final do experimento. As amostras sangüíneas foram obtidas por flebopunção jugular externa. Em cada coleta eram obtidas amostras de sangue coletadas em três tubos diferentes., utilizando-se frascos vacutainer® contendo ou não anticoagulante (EDTA e Heparina). As amostras de sangue total coletadas com anticoagulante EDTA foram utilizadas para análises hematológicas e as obtidas com uso de heparina foram utilizadas para separar uma alíquota de sangue total, a qual foi congelada a 20° C negativos. Os tubos sem anticoagulante foram usados para obtenção do soro para realização de determinações bioquímicas.

4.8 DIGESTÃO ÁCIDA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para determinação das concentrações dos elementos minerais, as amostras orgânicas precisam ser digeridas até que se obtenha uma solução que mantenha os minerais da amostra inicial e que seja totalmente líquida, sem a presença de partículas que podem entupir os capilares do espectrômetro e assim impedir a leitura.

4.8.1 Digestão das amostras de fígado

Para digestão das amostras de fígado, optou-se pela realização de digestão nítrico-perclórica em sistema aberto. Após o descongelamento em temperatura ambiente de cada amostra orgânica, a mesma foi subdividida, quando necessário,

em pequenos pedaços, sendo estes acondicionados em vidros de relógio, devidamente identificados e levados a estufa a 102°C por 24 horas. Após a secagem, esperavam-se as amostras esfriarem e então eram pesadas entre 0,2 e 0,4 g de amostra seca, usando balança de alta precisão. Esta sub-alíquota, era transferida para tubos de vidro de 150 x 21 mm, onde foram adicionados 5 mL de uma solução de ácidos nítrico e perclórico, na proporção de 4:1, ambos os ácidos P.A..

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

Após a digestão é adicionado em cada tubo 20 mL de uma solução de ácido clorídrico a 0,1 N. A solução então é homogeneizada vigorosamente e depois acondicionada em dois tubos tipo falcon® de 15 mL de capacidade, sendo colocado 10 mL de solução em cada tubo, tendo-se então duas alíquotas iguais da mesma amostras para leitura, analisando-se uma e a outra ficando de contra-prova.

4.8.2 Digestão das amostras de bile

Para as amostras biológicas em estado líquido, como a bile, o processo de digestão foi semelhante ao utilizado no item 4.8.1, excluindo-se apenas a fase de secagem. Assim as amostras, após descongelamento, foram pesadas diretamente nos tubos de digestão, sendo pesada sempre uma alíquota de 1 mL de amostra, que resultava em um peso fresco de pouco mais de um grama, sendo considerado então

o peso da amostras para determinação das concentrações de elementos minerais na matéria fresca.

4.8.3 Digestão das amostras de sangue total

Para as amostras de sangue total, coletadas com uso de anticoagulante heparina, o processo de digestão foi semelhante ao utilizado no item 4.8.1, excluindo-se a fase de secagem. Assim as amostras, após descongelamento, foram pesadas diretamente nos tubos de digestão, sendo pesada sempre uma alíquota de 1 mL de amostra, sendo considerado então o peso da amostras para determinação das concentrações de elementos minerais na matéria fresca. Após a digestão é adicionado em cada tubo 10 mL de uma solução de ácido clorídrico a 0,1 N. A solução então é homogeneizada vigorosamente e depois acondicionada em tubos tipo falcon® de 15 mL de capacidade para posterior determinação dos elementos minerais.

4.9 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS MINERAIS

Amostras hepáticas, de bile e de sangue total foram utilizadas para determinação das concentrações de cobre e zinco através de espectrometria óptica por emissão de plasma. A cada 20 amostras era inserido um controle de qualidade interno do laboratório. A porcentagem de recuperação de cobre no padrão interno variou nos diferentes tecidos entre 96 a 99% enquanto que a de zinco ficou entre 95 e 98%.

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS

Os níveis de metalotioneína no fígado foram determinados utilizando-se o método da saturação de cádmio (Scheuhammer e Cherian, 1986).

O método da saturação de cádmio para a determinação de metalotioneínas em tecidos foi desenvolvido a fim de melhorar a precisão analítica para determinar a concentração de metalotioneínas em tecidos onde uma elevada percentagem de cobre (ou outros metais com grande afinidade para estas metalotioneínas) pode estar presente.

A estimativa da metalotioneína pelo método da saturação de cádmio é baseada na alta afinidade dos íons de cádmio (Cd^{+2}) para ligar a estas metaloproteínas juntamente com a alta estabilidade térmica destas proteínas em comparação com outros ligantes citosólicos. A adição de um excesso de Cd^{+2} à amostra dá lugar a um deslocamento de outros metais presentes nas metalotioneínas assim como aumenta a saturação destas pelo metal. A adição de hemoglobina na amostra elimina o Cd^{+2} de outras ligações distintas das metalotioneínas. Em seguida realiza-se tratamento térmico, com o fim de precipitar a hemoglobina ligada ao Cd^{+2} . A repetição da adição de hemoglobina conclui o processo de remoção do excesso de Cd^{+2} e outros ligantes de cádmio e, conseqüentemente, o sobrenadante resultante contém apenas Cd^{+2} ligado à metalotioneína. A concentração de metalotioneínas é calculada tendo-se em conta a concentração de cádmio no sobrenadante e o número de posições ocupadas pelo metal em cada molécula de metalotioneína.

Para a determinação da concentração de metalotioneínas foram utilizadas amostras de 0,5 gramas de tecido hepático fresco, homogeneizadas em 4 volumes de sacarose 0,25 M (pH 8,4 e 4 °C). As amostras foram centrifugadas a 20.000xg por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi então retirado.

Este processo envolveu:

- Alíquotas de 0,5 ml de cada citosol ajustada para um volume de 2,4 ml com 0,5 M de glicina (pH 8,5).
- Adição de 1 ml de solução de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (20 mg / Cd / ml de tampão glicina) e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos.
- Adição de 0,2 ml de solução de 2% de hemoglobina em tampão.

- Aquecimento em banho Maria (cerca de 100°C por 1 minuto).
- Centrifugação a 1000xg por 5 minutos em temperatura ambiente.
- Adição de solução de hemoglobina e novo tratamento térmico duas vezes.
- Com uma pipeta Pasteur foi realizada a transferência do sobrenadante para um tubo de ensaio centrifugado a 20.000xg por 10 minutos.
- Mensuração da concentração de cádmio no sobrenadante por espectrometria óptica por emissão de plasma.

A concentração de cádmio no sobrenadante final foi proporcional à quantidade de metalotioneína presente na amostra. Scheuhammer e Cherian (1991) demonstraram que em condições de ensaio 1 mol de metalotioneína tem uma capacidade de carrear 17 moles de cádmio, indicando que a 1 mg Cd representa 3,55 g de metalotioneínas.

A concentração de metalotioneína da solução foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Metalotioneínas (mg / g de tecido)} = \frac{(CCd) \times 3.55 \times Vf \times FDM}{Vm}$$

Onde CCd = concentração de cádmio na amostra, Vf = volume final do processo, FDM = factor de diluição da amostra, sob o peso da amostra e o volume de homogeneização, Vm = volume de amostra utilizada.

Em cada lote de dez amostras havia um branco a fim de detectar uma eventual contaminação e controlar a consistência da análise de todo o experimento. Durante a leitura das concentrações de cádmio, a cada 20 amostras era feita a leitura de um padrão interno do laboratório para controle de qualidade. A porcentagem média de recuperação de cádmio durante as determinações das metalotioneínas foi de 96,7%.

4.10.1 Estimativa do cobre ligado a metalotioneína (Cu-MT) e da porcentagem de Cu-MT em relação ao cobre hepático total (%Cu-MT: Cu).

De acordo com os estudos de Lopez-Alonso et al. (2005), que observaram uma altíssima correlação entre a concentração de MT e o Cu-MT, foi possível estabelecermos as concentrações de Cu-MT através da seguinte regressão: $[y = 1,63 + 0,071x]$, onde y é a concentração de Cu-MT em ppm e x é a concentração de MT no fígado em ppm.

A partir desse resultado, foi possível calcular qual a porcentagem de Cu-MT em relação ao cobre hepático total, por meio de regra de três simples.

4.11 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

As amostras de fígado acondicionadas em solução de formalina foram processadas rotineiramente para realização de análise histopatológica, utilizando coloração de Hematoxilina-Eosina para leitura das lâminas.

4.12 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.12.1 Concentração sérica de proteína total

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto e processada no analisador bioquímico automático Labmax 240, marca Labtest®.

4.12.2 Concentração sérica de albumina

A concentração sérica de albumina foi determinada pelo método do verde bromocresol e processada no analisador bioquímico automático Labmax 240, marca Labtest®.

4.12.3 Concentração de Uréia Sérica

A determinação de uréia sérica foi realizada baseada em atividade cinética descrita por Talke; Schubert (1965) utilizando kit comercial Labtest®, processada no analisador bioquímico automático Labmax 240, marca Labtest®.

4.12.4 Concentração de Creatinina Sérica

A creatinina sérica foi determinada pelo método cinético descrito por Lutsgarten; Wenk (1972), utilizando o kit comercial Labtest®. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático Labmax 240, marca Labtest®.

4.12.5 Atividade de Aspartato Aminotransferase Sérica (AST)

A atividade de AST foi determinada através de método cinético, utilizando kit comercial ByoSystems®. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático Labmax 240, marca Labtest®. Os resultados foram expressos a 30°C conforme recomendação de Kaneko et al. (1997).

4.12.6 Atividade de Gama Glutamyltransferase Sérica (γ GT)

A atividade de GGT foi determinada através de método cinético, utilizando kit comercial ByoSystems®. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático Labmax 240, marca Labtest®. Os resultados foram expressos a 30°C conforme recomendação de Kaneko et al. (1997).

4.13 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

Para a realização das análises hematológicas foi utilizado um contador automático de células (ABC® - Animal Blood Counter) da marca ABX®, padronizado para ovinos. Amostras do sangue total foram coletadas com anticoagulante EDTA, mantidas em refrigeração (4° C) imediatamente após a coleta até o momento da análise, que foi realizada, no máximo, após quatro horas. As variáveis consideradas foram: Contagem de eritrócitos, contagem de total de leucócitos, concentração de hemoglobina e volume globular.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram testados quanto sua distribuição, utilizando - se para tal o teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises intra-grupo foram realizados pelo teste T pareado enquanto que a comparações entre os grupos foi realizada por meio de ANOVA e teste de Tukey para dados com distribuição normal e teste de Mann-Whitney para dados de distribuição não normal.

O cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia do teste e dos melhores valores preditivos positivo e negativo, baseado na frequência de achados de resultados verdadeiros ou falsos e negativos ou positivos, foi realizado com vistas a determinar a melhor linha de corte ("cut-off line") para suspeição de acúmulo

determinado de cobre hepático de acordo com a atividade enzimática, segundo recomendações de Smith (1991), de acordo com as fórmulas; Sensibilidade = $a / (a + c)$; Especificidade = $d / (b + d)$; Acurácia = $(a + d) / (a + b + c + d)$; Valor Preditivo Positivo = $a / (a + b)$; e Valor Preditivo Negativo = $d / (c + d)$. Onde: a = verdadeiro positivo; b = falso positivo; c = falso negativo; d = verdadeiro negativo.

Foram consideradas significativas as diferenças cujo valor de “P” apresentou valores iguais ou inferiores a 0,05. O coeficiente de correlação foi avaliado através de teste F (LITTLE; HILLS, 1978), ficando estabelecido que existiu uma correlação de alta intensidade entre as variáveis quando $r > 0,60$; média intensidade quando $0,30 < r < 0,60$; e de baixa intensidade quando $r < 0,30$, sendo o nível de significância obtido para todas correlações foi igual ou inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No decorrer do experimento nenhum animal do grupo controle negativo (H) e do grupo C (alto zinco) apresentou qualquer manifestação clínica indicativa de um quadro de intoxicação cúprica. Entretanto, um animal dos grupos A (baixo Zn), B (Médio Zn) e D (Apenas Cu alto), respectivamente, apresentaram quadro clínico característico de intoxicação cúprica acumulativa, manifestado progressivamente de uma a duas semanas antes do quadro hiperagudo hiporexia e perda de peso (em média 22 %), e posteriormente no quadro emergente hemoglobinúria macroscópica, intensa apatia, mucosas amareladas, aumento de frequência cardíaca e temperatura retal, redução da frequência respiratória e movimento ruminal, anorexia e oligúria.

Os animais intoxicados manifestaram o quadro na 8ª (grupo A), 10ª (Grupo B) e 14ª (Grupo D) semanas do experimento. Em todos os casos a intoxicação foi fatal e os aspectos macroscópicos constatados na necropsia (emagrecimento, serosas amareladas, fígado de coloração laranja-amarelada, rins enegrecidos, presença de urina denotando hemoglobinúria. A comparação da frequência de mortalidade nos diferentes grupos experimentais pelo teste exato de Fisher não apresentou diferença significativa ($P=0,12$).

5.2 TEORES DE MICROELEMENTOS NO FÍGADO

5.2.1 Teores de cobre no fígado

A tabela 1 apresenta os valores médios da concentração de cobre no início e no final do experimento nos diferentes grupos avaliados. Observou-se uma elevação dos valores de cobre no fígado em todos os grupos experimentais, tanto nos submetidos a elevadas doses de cobre dietético quanto no grupo controle. Contudo

a elevação do grupo controle foi marcadamente menor, tendo ocorrido apenas em decorrência de maiores níveis de cobre na dieta basal, oferecida durante os 98 dias de experimento, incluindo o suplemento mineral com adequadas concentrações de cobre.

Tabela 1 - Concentração hepática de cobre em ovinos submetidos a crescentes teores de zinco dietético – São Paulo - 2011

Grupo	Cu hepático – Início do experimento (ppm)		Cu hepático – final do experimento (ppm)		P
	Média	DP	Média	DP	
A – Baixo Zn	158 ^{Ab}	± 46	2129 ^{Aa}	± 945	< 0,001
B – Médio Zn	191 ^{Ab}	± 99	2083 ^{Aa}	± 822	< 0,001
C – Alto Zn	207 ^{Ab}	± 88	1639 ^{Aa}	± 587	< 0,001
D – Apenas Cu	196 ^{Ab}	± 84	2724 ^{Aa}	± 1819*	0,005
H – Controle	174 ^{Ab}	± 98	279 ^{Ba}	± 83	0,009
P	0,8		0,001		< 0,001

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T pareado ($P < 0,05$). Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). * Um animal (que apresentou sintomas de intoxicação) teve um valor de Cu hepático de 6640 ppm.

Devido ao elevado desvio padrão das amostras, optou-se por realizar uma análise não paramétrica dos dados no tempo final. A tabela 2 apresenta os valores em mediana das concentrações hepáticas de cobre no final do experimento.

Tabela 2 - Valores medianos da concentração hepática de cobre no final do experimento – São Paulo - 2011

Grupos	Cobre hepático (ppm)
A – Baixo Zn	2203 ^{AB}
B – Médio Zn	2281 ^{AB}
C – Alto Zn	1619 ^B
D – Apenas Cu	2470 ^A
H – Controle	297 ^C

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Witney ($P < 0,05$).

Verificou-se na avaliação do momento final do experimento que os grupos A, B, C e D apresentaram maiores concentrações de cobre hepático que o grupo controle e que o grupo que recebeu altas quantidades de zinco dietético teve menor concentração de cobre hepático do que o grupo D, que não recebeu zinco.

5.2.2 Acúmulo hepático de cobre no decorrer do experimento.

Para uma análise do acúmulo hepático total de cobre durante o decorrer do experimento subtraiu-se os valores do tempo final aos valores do tempo inicial. A tabela 3 apresenta a análise não paramétrica do acúmulo de cobre no fígado.

Tabela 3 - Valores medianos do acúmulo hepático de cobre no fígado de ovinos submetidos a crescentes concentrações de zinco dietético – São Paulo - 2011

Grupos	Acúmulo de Cobre hepático (ppm)
A – Baixo Zn	2009 ^{AB}
B – Médio Zn	2078 ^{AB}
C – Alto Zn	1433 ^A
D – Apenas Cu	2278 ^B
H – Controle	188 ^C

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Witney ($P < 0,05$).

Verificou-se que o grupo controle apresentou menor acúmulo hepático que todos os demais e que o grupo C que recebeu altas doses de zinco dietético teve menor acúmulo hepático de cobre do que o grupo que não recebeu zinco.

5.2.3 Teores de zinco no fígado

A tabela 4 apresenta os valores médios da concentração hepática de zinco em ovinos dos diferentes grupos nos momentos inicial e final do experimento. Observa-se que não houve diferença nos momentos iniciais em todos os grupos. No final do experimento os grupos A, B, C e D apresentaram valores médios de zinco superiores ao grupo controle. Apesar de não ter recebido suplementação adicional de zinco, o grupo D apresentou concentração média deste microelemento igual aos grupos que foram suplementados.

Tabela 4 - Valores médios da concentração hepática de zinco em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupo	Zn hepático – Início do experimento (ppm)		Zn hepático – Final do experimento (ppm)	
	Média	DP	Média	DP
A – Baixo Zn	148 ^a	26	205 ^{Ab}	60
B – Médio Zn	127 ^a	29	197 ^{Ab}	45
C – Alto Zn	149 ^a	29	208 ^{Ab}	75
D – Apenas Cu	131 ^a	34	198 ^{Ab}	42
H - Controle	156 ^a	49	110 ^{Ba}	14
P	0,407		0,002	

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T pareado ($P < 0,05$). Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo de Mann-Witney ($P < 0,05$).

Verificou-se ainda que os grupos A, B, C e D apresentaram uma elevação da concentração hepática de zinco entre o início e o final do experimento.

5.3 TEORES DE METALOTIONEÍNAS NO FÍGADO

A tabela 5 apresenta os valores médios da concentração de metalotioneínas no tecido hepático no final do experimento. Verificou-se que os grupos suplementados com zinco apresentaram maiores concentrações desta metaloenzima no fígado em relação aos grupo não suplementados com este microelemento (D e H).

Tabela 5 - Teores de metalotioneína no fígado de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupo	Concentração hepática de MT (ppm)	
	Média	DP
A – Baixo Zn	416 ^A	227
B – Médio Zn	300 ^A	200
C – Alto Zn	390 ^A	257
D – Apenas Cu	180 ^B	64
H - Controle	212 ^B	80
P	0,049	

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.4 COBRE LIGADO A METALOTIONEÍNA NO FÍGADO

A tabela 6 apresenta os valores medianos de cobre ligado a metalotioneína (Cu-MT) no fígado dos animais nos diferentes grupos.

Tabela 6 - Valores medianos da concentração de cobre ligado a metalotioneína no fígado ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupo	Cu-MT no fígado
A – Baixo Zn	24,3 ^A
B – Médio Zn	20,6 ^{AB}
C – Alto Zn	21,9 ^A
D – Apenas Cu	15,5 ^B
H - Controle	15,8 ^B
P	0,01

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo de Mann-Witney ($P < 0,05$).

Verificou-se que os grupos A e C apresentaram superiores valores de CU-MT em relação aos grupos que não receberam suplementação adicional de zinco (D e H).

5.5. VALORES MEDIANOS DA PORCENTAGEM DE Cu-MT NO FÍGADO EM RELAÇÃO AO COBRE HEPÁTICO TOTAL.

A tabela 7 apresenta a porcentagem de cobre ligado a metalotioneína em relação ao cobre hepático total (%Cu-MT:CU). Verifica-se que o grupo controle apresenta as maiores proporções em relação aos demais grupos em decorrência de menores valores de cobre hepático total, o que aumenta significativamente a proporção de Cu-MT. Considerando os demais grupos, observa-se uma significativa maior proporção de cobre ligado à metalotioneína em relação ao cobre total no fígado nos grupos A e C, sendo superiores ao grupo D que não recebeu suplementação adicional de zinco.

Tabela 7 - Valores medianos da porcentagem de cobre ligado a metalotioneína em relação ao cobre hepático total em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupo	% Cu-MT:Cu
A – Baixo Zn	3,4 ^{BC}
B – Médio Zn	2,5 ^{BC}
C – Alto Zn	4,2 ^B
D – Apenas Cu	2,3 ^C
H - Controle	17,5 ^A
P	0,001

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo de Mann-Witney ($P < 0,05$).

5.6 CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO SANGUE TOTAL

A tabela 8 apresenta os resultados da concentração de cobre no sangue total em três momentos distintos do experimento, no início (semana 0), no meio (semana 7) e ao término do estudo (semana 14).

Tabela 8 - Valores médios de cobre no sangue total de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupos	Cu (ppm) T 0		Cu (ppm) T 7*		Cu (ppm) T 14	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
A – Baixo Zn	0,61 ^b	0,17	1,06 ^{aA}	0,15	0,98 ^{aA}	0,23
B – Médio Zn	0,60 ^b	0,08	0,99 ^{aA}	0,17	0,98 ^{aA}	0,17
C – Alto Zn	0,59 ^b	0,08	1,05 ^{aA}	0,16	0,95 ^{aA}	0,20
D – Apenas Cu	0,54 ^b	0,15	1,01 ^{aA}	0,19	1,07 ^{aA}	0,38
H – Controle	0,48 ^a	0,07	0,60 ^{aB}	0,12	0,59 ^{aB}	0,12

*Os animais intoxicados foram retirados desta análise (A3, B6 e D3). Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T pareado ($P < 0,05$). Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para uma melhor análises dos dados os resultados de cobre no sangue total dos animais intoxicados foram retirados desta análise pois apresentavam elevado valor, em virtude da liberação de grandes quantidades de cobre do fígado para o sangue durante a crise hemolítica. Os valores médios de cobre no sangue total do animais intoxicados, considerando a ultima coleta antes de apresentarem hemoglobinúria foi de 3,8 ppm.

5. 7 CONCENTRAÇÃO DE ZINCO NO SANGUE TOTAL

A tabela 9 apresenta os resultados da concentração de zinco no sangue total em três momentos distintos do experimento, no início (semana 0), no meio (semana 7) e ao término do estudo (semana 14). Verificou-se um aumento das concentrações de Zn no sangue a partir da 7 semana, que se manteve estável até o final do experimento. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em nenhum dos momentos de coleta

Tabela 9 - Valores médios de cobre no sangue total de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupos	Cu (ppm) T 0		Cu (ppm) T 7*		Cu (ppm) T 14	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
A – Baixo Zn	1,3 ^b	0,27	2,7 ^a	0,37	2,5 ^a	0,44
B – Médio Zn	1,5 ^b	0,21	3,2 ^a	0,22	2,7 ^a	0,39
C – Alto Zn	1,1 ^b	0,15	2,6 ^a	0,39	2,4 ^a	0,51
D – Apenas Cu	1,3 ^b	0,20	2,9 ^a	0,61	2,5 ^a	0,41
H – Controle	1,2 ^b	0,31	2,9 ^a	0,49	2,6 ^a	0,72

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T pareado ($P < 0,05$).

5.8 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

As alterações histológicas observadas eram predominantes hepáticas; enquanto as alterações renais e intestinais eram inconsistentes com àquelas associadas à intoxicação por cobre. Além disso, as alterações variam com o grau de severidade entre os grupos de animais avaliados.

As alterações hepáticas eram caracterizadas por discreto apoptose hepatocelular, discreta a moderada áreas de regeneração nodular e proliferação moderada a severa de tecido conjuntivo nas regiões portais. Adicionalmente, havia proliferação discreta a moderada das células epiteliais dos ductos biliares e discreta a moderada vacuolização hepatocelular. Nesses animais avaliados, a estase biliar (canalicular e ductal) varia entre discreta a moderada, enquanto o padrão de necrose era portal ou paraportal ou centrolobular, com a intensidade variando entre discreta e moderada.

Dois animais apresentaram severas alterações renais sugestivas de nefrose tubular tóxica, sendo caracterizada por dilatação dos túbulos renais, fibrose intersticial, regeneração e necrose tubular e o acúmulo intenso de cilindros granulosos e hialinos nos luz tubulares.

As alterações intestinais eram achatamento e fusão das vilosidades intestinais, dilatação e necrose das criptas intestinais, depleção do tecido linfóide e necrose da mucosa intestinal.

5.9 GANHO DE PESO

A tabela 10 apresenta os valores médios do ganho de peso dos ovinos entre o início e o final do experimento. Não foram verificadas diferenças entre os grupos experimentais.

Tabela 10 - Ganho de peso médio e desvios-padrão de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupo	Ganho de peso (kg)	
	Média	DP
A – Baixo Zn	2,9	1,4
B – Médio Zn	4,7	3,0
C – Alto Zn	4,3	1,9
D – Apenas Cu	3,6	3,7
H - Controle	4,5	1,4
P	0,649	

O gráfico 1 apresenta o desempenho ponderal dos ovinos no decorrer do experimento, com a exclusão dos animais intoxicados, enquanto que o gráfico 2 apresenta os resultados do peso corpóreo apenas dos três animais intoxicados no decorrer do experimento.

Gráfico 1 – Desempenho ponderal dos ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Gráfico 2 - Desempenho ponderal dos ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre e que apresentaram manifestação clínica de intoxicação cúprica – São Paulo - 2011

Não foram observadas variações significativas no peso corpóreo dos ovinos entre os grupos experimentais no decorrer do experimento, com uma tendência constante de ganho de peso em todos os animais. Verificou-se uma drástica redução do peso corpóreo dos ovinos que apresentam sinais clínicos de intoxicação cúprica, com um início de redução de peso de até três semanas antes de apresentarem hemoglobinúria macroscópica.

5.10 CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA BILE

A tabela 11 apresenta a concentração de cobre na bile no final do experimento. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais e foi constatada uma grande variação nos resultados com elevados desvios-padrão.

Tabela 11 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de cobre na bile de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Grupo	Cobre na bile (ppm)	
	Média	DP
A – Baixo Zn	2,5	1,6
B – Médio Zn	2,5	1,7
C – Alto Zn	2,1	1,2
D – Apenas Cu	2,0	1,0
H - Controle	1,2	2,3
P	0,563	

5.11 ATIVIDADE SÉRICA DA GAMMA-GLUTAMIL TRANSFERASE (γ GT)

O gráfico 3 apresenta os valores médios da atividade da γ GT sérica no decorrer do experimento. Verificou-se que o grupo controle não apresentou alterações significativas na atividade desta enzima no decorrer do experimento. Já os demais grupos suplementados com cobre apresentaram uma elevação gradual nos valores médios da atividade desta enzima conforme a evolução do experimento, com o grupo D apresentando os maiores valores nas ultimas duas semanas.

Não foram verificadas diferenças significativas entre os valores da atividade da γ GT entre os grupos suplementados com cobre, havendo apenas uma clara diferença entre os grupos A, B, C e D em relação ao grupo H.

Gráfico 3 - Atividade sérica da γ GT no decorrer do experimento em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Considerando-se o valor de 1.000 ppm como um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA e a linha de corte estabelecida por Antonelli (2007) de 56,5 U/L de atividade de γ GT sérica para ovinos, obtivemos os seguintes resultados: sensibilidade de 100% , especificidade de 98%, acurácia de 99%, valor preditivo positivo de 97% e valor preditivo negativo de 100%. O gráfico 4 ilustra o comportamento atividade da γ GT e as linhas de corte utilizadas.

Gráfico 4 – Linha de corte indicativa do valor preditivo da atividade sérica da γ GT em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

5.12 ATIVIDADE DA ASPARTATO-AMINO TRANSFERASE SÉRICA.

O gráfico 5 apresenta os valores médios da atividade a AST sérica no decorrer do experimento. Observa-se comportamento similar ao da γ GT, com uma elevação gradual nos valores médios da atividade desta enzima conforme a evolução do experimento, com o grupo D apresentando os maiores valores nas duas últimas semanas.

Não foram verificadas diferenças significativas entre os valores da atividade da AST entre os grupos suplementados com cobre, havendo apenas uma clara diferença entre os grupos A, B, C e D em relação ao grupo H. Ocorreu uma elevação dos valores da atividade da AST em relação ao tempo zero nos grupos A, B, C e D a partir da décima semana do experimento.

Gráfico 5 - Atividade sérica da AST no decorrer do experimento em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

Considerando-se o valor de 1.000 ppm como um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA e a linha de corte considerada por Antonelli (2007) de 120 U/L de atividade da AST sérica como indicativa de lesão hepática por acúmulo de cobre, obtiveram-se os seguintes resultados: Sensibilidade de 100%, especificidade de 94%, acurácia de 96%, valor preditivo positivo de 91% e valor preditivo negativo de 100%. O gráfico 6 ilustra o comportamento da atividade da AST e as linhas de corte utilizadas.

Gráfico 6 – Linha de corte indicativa do valor preditivo da atividade sérica da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

5.13 CONCENTRAÇÃO DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS SÉRICAS PROTEÍNA TOTAL, ALBUMINA, URÉIA E CREATININA

Não foram verificadas alterações no comportamento destas variáveis no decorrer de todo o período experimental, sendo que as mesmas apresentaram limitada importância neste estudo.

Considerando apenas os animais intoxicados (A3, B6 e D3), notou-se uma elevações das concentrações de creatinina (média de 14,5 mg/dL) e de uréia (média de 749,1 mg/dL) na ultima coleta antes da morte do animal.

5.14 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Não foram encontradas alterações nas variáveis do hemograma (volume globular, contagem de células vermelhas, contagem de células brancas e teores de hemoglobina) no decorrer do experimento em nenhum dos grupos experimentais. Não foram verificadas alterações significativas entre os grupos em nenhuma das 14 semanas do estudo, bem como não houve variação na avaliação estatística intra-grupo, em função dos momentos de coleta.

Considerando-se apenas os animais intoxicados verificou-se uma redução drástica da contagem de células vermelhas (média de $4,5 \times 10^6$ / mL) e dos teores de hemoglobina (média de 7,1 g/dL).

5.15 CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS

5.15.1 Correlação entre a concentração de cobre e zinco no fígado.

O gráfico 7 apresenta a correlação entre as concentrações hepáticas de cobre e de zinco em todos os momentos de coleta de dados do experimento.

Gráfico 7 - Correlação entre as concentrações hepáticas de cobre e zinco em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

5.15.2 Correlação entre os teores de metalotioneínas no fígado e a concentração hepática de zinco.

O gráfico 8 apresenta a correlação entre os teores de metalotioneínas no fígado e a concentração hepática de zinco.

Gráfico 8 - Correlação entre os teores de metalotioneínas e zinco no fígado de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

5.15.3 Correlação entre os teores de metalotioneínas no fígado e a concentração hepática de cobre.

O gráfico 9 apresenta a correlação dos teores de metalotioneína no fígado e os teores de cobre neste órgão. Não foi verificada uma significativa correlação entre estas duas variáveis analisadas.

5.15.4 Correlação entre o zinco hepático e a concentração de Cu-MT.

O gráfico 10 apresenta a correlação entre o Zn e o Cu-MT no fígado.

5.15.5 Correlação entre o cobre hepático e a porcentagem de cobre ligado a metalotioneína em relação ao cobre total do fígado.

O gráfico 11 apresenta a correlação entre o cobre hepático e a porcentagem de cobre ligado a metalotioneína em relação ao cobre total do fígado.

Gráfico 11 - Correlação entre o cobre hepático e a porcentagem do cobre ligado à metalotioneína em relação ao cobre no fígado total de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

5.15.6 Correlação entre o cobre hepático e o cobre na bile.

O gráfico 12 apresenta a correlação entre as concentrações de cobre no fígado e na bile.

Gráfico 12 - Correlação entre a concentração de cobre no fígado e na bile de ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo - 2011

5.15.7 Correlação entre a porcentagem de cobre ligado a metalotioneína e o a concentração de cobre na bile.

O gráfico 13 apresenta a correlação entre a porcentagem de cobre ligado a metalotioneína e o a concentração de cobre na bile.

Gráfico 13 - Correlação entre o cobre na bile e a porcentagem do cobre ligado à metalotioneína em relação ao cobre total no fígado - São Paulo - 2011

5.15.8 Correlação entre o cobre hepático e a atividade da γGT

O gráfico 14 apresenta a correlação entre a atividade sérica da γGT e a concentração hepática de cobre.

Gráfico 14 - Correlação entre a concentração de cobre no fígado e a atividade sérica de γGT em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo – 2011

5.15.9 Correlação entre o cobre hepático e a atividade da AST

O gráfico 15 apresenta a correlação entre a atividade sérica da AST e a concentração hepática de cobre.

Gráfico 15 - Correlação entre a concentração de cobre no fígado e a atividade sérica de AST em ovinos que receberam crescentes teores de zinco dietético e dieta rica em cobre – São Paulo – 2011

6 DISCUSSÃO

O presente experimento conseguiu avaliar e de certa forma comprovar a hipótese levantada da proteção “metafilática” do zinco contra a intoxicação cúprica acumulativa em ovinos submetidos às altas doses de cobre. Constatou que em três dos quatro grupos submetidos ao representativo desafio ocorreram casos individuais de intoxicação por cobre, mas não no grupo que maiores quantidades de zinco. Verificou que a suplementação com o zinco, em especial em altas doses, gerou uma menor retenção hepática de cobre, incremento na síntese de metalotioneína e um aumento percentual na complexação desta molécula com o cobre hepático. Tais tópicos serão devidamente avaliados nessa discussão.

A sintomatologia clínica manifestada pelos três ovinos que sucumbiram intoxicados por cobre se enquadra perfeitamente naquela descrita na literatura especializada. Deve-se chamar atenção para a perda de peso (Gráfico 2) e hiporexia exibidos nas duas semanas anteriores ao quadro superagudo da intoxicação cúprica nos animais intoxicados. Tais sintomas foram descritos em detalhes por Ortolani et al. (2003). No presente trabalho a perda de peso foi bem mais pronunciada atingindo uma média de 22 % em duas semanas, bem maior que a descrita no supracitado trabalho.

Outras manifestações clínicas constatadas na fase superaguda do quadro, assim como os achados macroscópicos verificados na necropsia desses ovinos também se coadunam com as descrições clássicas (HOWELL, GAWTHORNE, 1986; MACHADO, 1997, ANTONELLI, 2007 RADOSTITS ET AL., 2007, ORTOLANI; MINERVINO, 2010).

O peso vivo de todos os animais foi analisado no decorrer do experimento (Gráfico 1) e não foram constatadas diferenças significativas entre eles. De alguma forma esses resultados sofreram interferência do manejo empregado no experimento destacando-se o estresse provocado pela amarração individual dos animais diariamente, durante o decorrer do experimento. Contudo, nos cordeiros intoxicados ficou claro que nas semanas que antecederam o quadro fatal existiu uma nítida perda de peso (Gráfico 2).

Como era de se esperar os teores de cobre hepático se acumularam sobremaneira nos animais que foram desafiados com altas doses de cobre (Tabela

1) no decorrer do experimento ($P < 0,001$). O mesmo fato existiu em relação ao grupo controle negativo ($P = 0,009$) (H), no entanto com magnitude inferior, atingindo uma média de 279 ppm, estando ainda dentro dos valores de referência que é de 405 ppm (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

É de se destacar a diferença (30,7%) entre os teores de cobre hepático nos animais que foram suplementados com altas doses de zinco (grupo C) em relação ao grupo não suplementado (D) ($P = 0,04$) e uma diferença tendencial ($P = 0,06$ e $P = 0,08$) em relação aos grupos que receberam menores teores de zinco ($A = 23,2\%$ e $B = 26,3\%$). Provavelmente como reflexo desses maiores teores de cobre hepático ocorreu a morte de um ovino em cada um dos três grupos desafiados, fato este que foi prevenido no grupo C devido às doses altas de zinco.

A suplementação com zinco nos grupos A, B e C no decorrer do experimento aumentaram ($P = 0,002$) o teor de zinco hepático ao término do experimento em relação ao momento inicial (Tabela 4). Porém, a maior quantidade de zinco oferecido ao grupo C não proporcionou que o mesmo acumulasse mais esse microelemento no fígado que os outros dois grupos suplementados com quantidades inferiores de zinco. Idênticos resultados foram obtidos por Bremner et al. (1976) que chegou a suplementar ovinos com até 420 mg/kg MS, garantindo a ingestão diária de 420 mg de Zn, enquanto em média animais do grupo C recebiam cerca de 400 mg diários de Zn. Possivelmente, os animais do grupo C foram capazes de excretar adequadamente os teores de zinco excedentes, previamente absorvidos. É digno de nota que o excesso de cobre dietético antagoniza a absorção intestinal de zinco nas fezes, aumentando sua excreção nas fezes (BREMNER, 1993).

Mesmo sem o grupo D ter tido suplementação adicional de zinco as concentrações hepáticas deste microelemento também aumentaram ao término do experimento em relação ao momento inicial (Tabela 4). Embora a patogenia do processo não seja conhecida o mesmo resultado também foi obtido em diferentes espécies de ruminantes, bovinos e búfalos (Minervino et al., 2009a) e ovinos (Antonelli, 2007) desafiados com grandes e prolongadas quantidades de cobre. Esses autores supracitados lançaram uma hipótese que essa poderia ser uma reação de alarme com o intuito de se protegerem, pois o zinco é o principal indutor da quantidade de metalotioneína, proteína esta que se complexa ao cobre livre em excesso no fígado excretando-o do organismo via bile (BREMNER, 1993; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; LOPÉZ-ALONSO et al. 2005).

Este trabalho teve como novidade a determinação pela primeira vez na ciência veterinária nacional das concentrações de metalotioneína hepática, fruto de treinamento sanduíche no laboratório da Professora Marta López-Alonso na Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, na Espanha. Na tabela 5 constatou-se que os ovinos do grupo C e A sintetizaram mais metalotioneína no fígado que os grupos D e H que não receberam zinco adicional. Adicionalmente, foi constatado que a concentração de metalotioneína hepática foi diretamente influenciada pelos crescentes teores de zinco hepático ($R^2 = 0,52$) (Gráfico 8). Esse resultado era esperado, pois é devidamente reconhecido que o zinco estocado serve de estímulo para a síntese de metalotioneína neste órgão (BREMNER, 1993; LOPÉZ-ALONSO et al. 2005).

Constatou-se neste presente trabalho que não existiu uma relação significativa ($R^2 = 0,09$) entre os teores de metalotioneína no fígado e a concentração hepática de cobre (Gráfico 9). Idênticos resultados foram obtidos por Saylor et al. (1980) em ovinos e por por López-Alonso et al. (2005) em bovinos, embora Underwood; Suttle (1999) tenham sugerido que o cobre e o cádmio poderiam estimular a síntese de metalotioneína hepática. A interpretação simples desse resultado pode induzir uma idéia incorreta sobre a ausência do poder protetor da metalotioneína na prevenção da intoxicação por cobre em ovinos.

Contudo, quando foi estimada a quantidade de cobre hepático ligado a metalotioneína (Cu-MT) constatou-se que esta foi maior nos grupos C e A em relação às obtidas nos grupos D e H, indicando que nos grupos que receberam Zn em diferentes quantidades, este mineral promoveu uma maior ligação do Cu hepático com a MT, fator este indicativo de proteção contra a intoxicação cúprica. Com relação ao grupo B, apesar de ter valores de Cu-MT numericamente superiores ao grupo D, em decorrência do alto desvio padrão dos dados, não foi verificada diferença estatística.

Analizando mais detalhadamente o real papel da metalotioneína na desintoxicação do cobre, por meio do percentual de cobre ligado a esta molécula (Tabela 7) em relação à concentração total de cobre hepático, verificou-se que os animais do grupo controle (H) apresentaram o maior percentual de cobre ligado a metalotioneína (%Cu-MT) em relação a todos os outros grupos desafiados.

Porém, aqueles que receberam alto zinco (grupo C) tiveram um maior percentual de cobre complexado à metalotioneína que o grupo D ($P = 0,01$).

Observou-se que uma maior quantidade de zinco hepático promoveu maior proporção de cobre ligado a metalotioneína no fígado ($R^2 = 0,46$) (Gráfico 10), fato este indicativo da proteção contra o acúmulo hepático de cobre influenciada diretamente pelo zinco (BREMNER, 1976).

Até o presente trabalho, todos os estudos realizados com ovinos e bovinos submetidos a grande risco de apresentarem intoxicação cúprica apenas em um deles, Bremner et al. (1976), foi avaliado o papel que altas doses de zinco poderiam ter na prevenção deste quadro, comprovando tal hipótese. Porém, esses autores não elucidaram claramente os mecanismos envolvidos nessa proteção, por não determinarem as concentrações hepáticas de metalotioneína. Os resultados do presente trabalho confirmam a hipótese sugerida por Bremner et al. (1976) que o zinco aumenta a produção de metalotioneína hepática proporcionando maior proteção contra o acúmulo de cobre.

Ficou patente ainda que quanto maior o teor de cobre hepático menor foi o percentual da metalotioneína ligado ao cobre ($R^2 = 0,66$) (Gráfico 11). Tal condição reflete a predisposição que os ruminantes têm, em especial os ovinos, de acumularem cobre hepático, devido a menor produção de metalotioneína no fígado, por exemplo que os suínos, ratos e cães, que leva a uma baixa capacidade de complexação e posterior eliminação do cobre hepático pela bile (HENRY et al., 1994). Os presentes resultados são compatíveis com os descritos na literatura a respeito.

Ovinos submetidos a dietas normais de cobre sintetizam menor quantidade de metalotioneína, porém como o acúmulo de cobre hepático é pequeno um maior percentual deste encontrasse ligado a metalotioneína (SAYLOR et al. 1980; BREMNER, 1987; LOPÉZ-ALONSO et al. 2005). Entretanto nos ovinos desafiados com cobre existiu uma drástica redução nessa porcentagem de cobre ligado à metalotioneína, semelhante ao que foi descrito trabalhos realizados com ovinos por Saylor et al. (1980) e Bremner, (1987). Lopez-Alonso et al. (2005) relatam que quase 50% do Cu hepático encontra-se ligado a MT em bovinos com dietas normais de cobre e que a proporção de Cu ligado à MT apresenta resultados bastante variáveis. Analisando os valores do grupo controle observa-se um valor médio de 21%, com animais que chegaram a ter 44% do Cu hepático ligado a MT.

Os teores de cobre na bile não foram diferentes entre os animais desafiados com cobre, porém todos excretaram mais nesse fluido que os ovinos do grupo

controle (H) ($P = 0,03$) (Tabela 11). É de se esperar que tal resultado ocorresse, pois os ovinos desafiados com cobre para diminuir os estoques de cobre hepático procuram excretar mais este microelemento pela bile (LOPÉZ-ALONSO et al., 2005).

Existiu uma alta correlação entre os teores de cobre hepático e os de cobre na bile ($R^2 = 0,74$), porém ausência de correlação entre os teores de zinco e metalotioneína hepáticos e de cobre na bile ($R^2 = 0,2$ e $R^2 = 0,05$, respectivamente). Esperava-se que quanto maiores fossem as concentrações de zinco e de metalotioneína no fígado maiores seriam as excreções de cobre na bile. Possivelmente, o presente resultado obtido poderia ser diferente caso fosse corrigido os teores de cobre na bile pela quantidade total de bile presente na vesícula no momento da necropsia dos animais. Contudo, isto não foi feito e deve ser levado em consideração quando da realização de outro protocolo experimental semelhante.

A suplementação com Zn, mesmo na dose mais elevada, não ocasionou nenhuma alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados, sendo considerada segura para alimentação animal. Não foram verificadas neste estudo as alterações hematológicas descritas por Bremner et al. (1976), que cita a ocorrência de discreta anemia em ovinos suplementados com 420 mg de zinco, em especial após 24 semanas de estudo.

As atividades da γ GT e AST foram de valia para subsidiar o diagnóstico precoce de ruminantes que acumularam quantidades significativas de cobre no fígado (mais de 1000 ppm) (Gráficos 4 e 5). No presente trabalho a linha de corte indicativa de risco de quadro de ICA em ovinos a partir dos valores de γ GT e AST, expressos a 30° C, é de 56,5 e 120 U/L, respectivamente. Tanto a AST (Gráfico 15) como a γ GT (Gráfico 14) apresentaram coeficientes de determinação altos. As atividades das duas enzimas foram altamente específicas e apresentaram sensibilidade de 100 %, com altíssima acurácia.

Em relação aos animais que apresentaram quadro clínico de intoxicação cúprica acumulativa, observou-se que ocorreram alterações significativas na função renal, com elevação da uréia e creatinina e alterações hematológicas decorrentes da intensa hemólise, tais como uma drástica redução na contagem de células vermelhas. Tais resultados foram similares aos descritos em ovinos e bovídeos com quadro de intoxicação cúprica (MACHADO, 1998; MINERVINO et al., 2009a)

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu que fossem feitas as seguintes conclusões

Quanto ao modelo experimental:

A quantidade de cobre utilizado para desafiar os ovinos foi suficiente para gerar um aumento substancial de cobre hepático e provocar em alguns deles quadros característicos de intoxicação cúprica.

Quanto ao efeito suplementar dietético com altas quantidades de zinco no metabolismo do cobre de ovinos desafiados:

Essa adição preveniu a morte de animais no decorrer do experimento; promoveu uma redução na quantidade de cobre acumulado no fígado; não elevou comparativamente aos outros grupos os teores de zinco hepático; estimulou a síntese de metalotioneína hepática; incrementou a quantidade de cobre hepático ligado à metalotioneína; assim como o percentual de cobre hepático ligado a metalotioneína. Essas condições favoreceram a prevenção de quadros de intoxicação por cobre em ovinos.

REFERÊNCIAS

- ANTONELLI, A. C. **Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos**. 2007. 122 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária. - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BARBOSA, J.D.; PFEIFER BARBOSA, I.B.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; MORAES, S.S.; FIGUEIRA, M.L.C. Intoxicação Crônica por Cobre em Ovinos no Estado do Pará. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 1999, Campo Grande. **Anais...** p.52.,
- BIDEWELL, C.; LIVESEY, C. Copper poisoning: an emerging disease in dairy cattle. **State Veterinary Journal**, v. 12, n. 2, p.16-19, 2002.
- BLAKLEY, B. R.; BEREZOWSKI, J. A.; SCHIEFER, H. B.; ARMSTRONG, K. R. Chronic copper toxicity in a dairy cow. **Canadian Veterinary Journal**, v. 23, p. 190-192, 1982.
- BRADLEY, C. H. Copper poisoning in a dairy herd fed a mineral supplement. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p.287-292, 1993.
- BREMNER, I.; YOUNG, B.W.; MILLS, C.F. Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 36, p. 551-561, 1976
- BREMNER, I.; Metallothionein in copper deficiency and copper toxicity. In: Anke, M.; MEISSNER, D.; MILLS, C.F.; **Proceedings of the eighth International symposium on trace elements in man and animals**. Verlag Media Touristik, Gersdorf, p.507-515, 1993
- CARDOSO, E. C. **Nutrição Mineral em bovinos e bubalinos nos campos do Marajó, Estado do Pará: Ca, P, Cu, Co, Mn, Fe e Zn**. 1997. 138 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Pará, Belém, 1997.
- CARDOSO, E. C.; MCDOWELL, L. R.; VALE, W. G.; VEIGA, J. B.; SIMÃO NETO, M.; WILKINSON, N. S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B. Copper and molybdenum status of cattle and buffaloes in Marajó Island, Brazil. **International Journal of Animal Science**, v. 12, p. 57-60, 1997.
- CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; MCDOWELL, L. R. **Nutrição de bovinos a pasto**. Belo Horizonte: PapelForm, 2003. 438 p.
- COUSINS, R. J. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc with special reference to metallothionein and caeruloplasmin. **Physiological Reviews**, v. 65, p. 238-309, 1985.
- ELGERWI, A.; BIRES, J.; LEVKUT, M. Industrial copper intoxication in sheep: clinical and pathological findings. **Acta Veterinaria**, v. 68, n. 3, p.197-202, 1999.

- GOONERATNE, S.R. ; HOWELL, J.MCC.; GAWTHORNE, J.M. 1981. Intravenous administration of thiomolybdate for the treatment and prevention of chronic copper poisoning in sheep. **British Journal of Nutrition**. V.46, p. 457-468.
- GOONERATNE, S.R.; HOWELL, J. M.; AUGHEY, E. An ultrastructural study of the kidney of normal, copper poisoned and thiomolybdate-treated sheep, **Journal of Comparative Pathology**, Volume 96, p. 593-612. 1986
- GUMMOW, B.; BOTHA, C. J.; BASSON, A. T.; BASTIANELLO, S. S. Copper toxicity in ruminants: air pollution as a possible cause. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 1, p. 33-39, 1991.
- HAYWOOD, S.; SIMPSON, D. M.; RODD, G.; BEYNON, R. J. The greater susceptibility of North Ronaldsay sheep compared with Cambridge sheep to copper-induced oxidative stress, mitochondrial damage and hepatic stellate cell activation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p.114-127, 2005.
- HENRY, R. B.; LIU, J.; CHOUDHURI, S.; KLAASSEN, C.D. Species variation in hepatic metallothionein. **Toxicology Letters** v.74, p. 23–33. 1994
- HOOFF, B.; BOERMANS, H. J.; BAIRD, J. D. Retrospective study of toxic metal analyses request at a veterinary diagnostic toxicology laboratory in Ontario (1990-1995). **Canadian Veterinary Journal**, v. 39, p. 39-43, 1998.
- HOWELL, J. M.; GAWTHORNE, J. M. **Copper in animals and man**. Boca Ranton: CRC Press, 1987, 142 p.
- HUMANN-ZIEHANK, E.; COENEN, M.; GANTER, M.; BICKHARDT, K. Long-term observation of subclinical chronic copper poisoning in two sheep breeds. **Journal of Veterinary Medicine: Series A**, v. 48, p. 429-439, 2001.
- HUMPHRIES, W.R., MILLS, C.F., GREIG, A., *et al*. Use of ammonium tetrathiomolybdate in the treatment of copper poisoning in sheep. **Veterinary Record**, v.119, p.596 – 598, 1986.
- KERR, L. A.; MCGAVIN, D. Chronic copper poisoning in sheep grazing pastures fertilized with swine manure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 1, p.99-101, 1997.
- LEMONS, R.A.M; 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.
- LÓPEZ-ALONSO, M; PRIETO, F.; MIRANDA, M.; CASTILLO, C.; HERNANDÉZ, J.; BENEDITO, J.L. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 262-267, 2005.
- MACHADO, C.H. **Uso do tetratiomolibdato no tratamento de intoxicação cúprica experimental em ovinos: avaliações clínica e toxicológica**. 1998. 138 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MAIORKA, P. C.; MASSOCO, C. O.; DE ALMEIDA, S. D.; GORNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Copper toxicosis in sheep: a case report. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 40, n. 2, p. 99-100, 1998.

MARQUES A. P.; RIET-CORREA, F.; SOARES, M. P.; ORTOLANI, E. L.; GIULIODORI, M. J. Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 21-32, 2003.

MCDOWELL, L. R. **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. 3.ed. Gainesville: Universidade da Flórida, 1999, 292 p.

MINERVINO, A.H.H. **Estudo comparativo da susceptibilidade de bovinos e bufalinos à intoxicação cúprica acumulativa**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MINITAB. **The student edition of MINITAB statistical software adapted for education**: 13.0 release; user's manual. New York: Wesley, 2000. 624 p.

MINITAB. **The student edition of MINITAB statistical software adapted for education**: 13.0 release; user's manual. New York: Wesley, 2000. 624 p.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle: Minerals**. 7. ed. rev. Washington: National Academic Press, 1996. 577 p.

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. **Efeitos da suplementação dietética de molibdênio e enxofre sobre a infestação de Haemonchus contortus (Rudolphi, 1803), em ovinos. Estudo de alguns aspectos do metabolismo de cobre, sódio e da resposta celular do hospedeiro**. 1997. 94 f. Tese (Livre-docência em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

ORTOLANI, E. L. ; BRITO, L. A. B. Enfermidades causadas pelo uso inadequado de cama-de-frango na alimentação de ruminantes. **Revista CFMV**, Brasília, v. 22, p. 41-48, 2001.

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

ORTOLANI, E.L. Intoxicação cúprica acumulativa em ovinos. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 5., 2003. **Anais...** Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003. p. 113-114.

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

ORTOLANI, E. L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. P. 750-761.

PAYNTER, D. I. The diagnosis of copper insufficiency. In: HOWELL, J. M.; GAWTHORNE, J. M. **Copper in animals and man**. v. I. CRC Press, 1987. P. 101-119.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. **Veterinary medicine**. 9. ed. London: Baillière Tindal, 2000. 542 p.

RIBEIRO, L. A. O.; PIRES NETO, J. A. S. Não mate seu carneiro com cobre. **Corriedale**, v. 16, n. 43, p. 24, 1994.

RIBEIRO, L. A. O.; PIRES NETO, J. A. S.; RODRIGUES, N. C.; FALLAVENA, L. C. B. Intoxicação crônica por cobre em ovinos mantidos em pomar de macieiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 15, n. 1, p.15-17, 1995.

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

RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J. A.; GUESTA, S.; SHILD, A. L.; MENDEZ, M. C. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, n. 3/4, p. 51-54, 1989.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

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

SAYLOR, W. W.; MORROW, F. D.; LEACH, R. M. Copper and zinc binding proteins in sheep liver and intestine: effects of dietary levels of the metals. *Journal of Nutrition*. v.110, p. 448-459, 1980.

SCHEE, W. V. D.; SCHOTMAN, A. J. H.; BERG, V. D. R. Levels of enzyme activities in blood serum as indicators of high copper status in sheep flocks. **Zentralblatt für Veterinär Medizin - Reihe A**, v. 30, n. 9, p. 664-673, 1983.

SCHEUHAMMER, A. M. ; CHERIAN, M. G. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 82,417.-25. 1986

SEDKI, A.; LEKOUCH, N.; GAMON, S.; PINEAU, A. Toxic and essential trace metals in muscle, liver and kidney of bovines from a polluted area of Morocco. **Science of the Total Environment**, v. 317, n. 1/3, p. 201-205, 2003.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350 p.

SNEDCOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1967. 593 p.

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

SØLI NE, FRØSLIE A, AASETH J. The mobilization of copper in sheep by chelating agents. **Acta veterinaria Scandinavica**. 1978; 19(3): 422-9.

SUTTLE, N. F. Problems in the diagnosis and anticipation of trace elements deficiencies in grazing livestock. **Veterinary Record**, v. 119, n. 11. p. 519-522, 1986.

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

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

WOUK, A.F.P.F.; FAN, L.C.R.; PIPPI, N.L. Efeitos adversos da D-penicilamina (cuprime) em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.4, n.3, p.31-3, 1981.