

**ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO**

**ESTUDO COMPARATIVO DA SUSCEPTIBILIDADE DE BOVINOS E BUFALINOS  
À INTOXICAÇÃO CÚPRICA ACUMULATIVA**

**SÃO PAULO**

**2007**

**ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO**

**ESTUDO COMPARATIVO DA SUSCEPTIBILIDADE DE BOVINOS E BUFALINOS  
À INTOXICAÇÃO CÚPRICA ACUMULATIVA**

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

**Departamento:**

Clínica Médica

**Área de concentração:**

Clínica Veterinária

**Orientador:**

Prof Dr. Enrico Lippi Ortolani

**SÃO PAULO**

**2007**

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1833  
FMVZ

Minervino, Antonio Humberto Hamad  
Estudo comparativo da susceptibilidade de bovinos e bufalinos à  
intoxicação cúprica acumulativa / Antonio Humberto Hamad Minervino. –  
São Paulo: A. H. H. Minervino, 2007.  
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) - 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. Búfalos. 2. Bovinos. 3. Cobre. 4. Intoxicação. 5. Fígado. I. Título.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Assistência Acadêmica**


*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo comparativo da susceptibilidade de bovinos e bubalinos à intoxicação cúprica acumulativa", protocolo nº746/2005, utilizando 20 bovinos, 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 "Comparative study of the susceptibility of cattle and buffalo to accumulative copper poisoning", protocol number 746/2005, utilizing 20 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 25 de outubro de 2005

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>   
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MINERVINO, Antonio Humberto Hamad

Título: Estudo comparativo da susceptibilidade de bovinos e bufalinos à intoxicação  
cúprica acumulativa

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*Dedico esta dissertação:*

*Ao meu pai, **JULIO MINERVINO**, meu principal incentivador e o grande responsável pela realização do curso de mestrado na FMVZ - USP.*

*A minha mãe **ANA JÚLIA** e ao meu irmão **JÚLIO**, por todo apoio, carinho e paciência que sempre tiveram comigo*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **ENRICO LIPPI ORTOLANI** por ter me aceitado como seu orientado, pelos conhecimentos transmitidos, horas de agradável convívio e por ser um exemplo a ser seguido como pesquisador, professor e orientador.

A **FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP**, pela concessão de bolsa de mestrado, imprescindível ao desenvolvimento desta pesquisa.

A minha maravilhosa família, meus tios (**Jorge, Jonas, Kim, João e Cabral**) tias (**Angela, Adma, Áurea, Mercedes, Linda e Laudicéia**), primos e primas (**Xandy, Aldrwin, Gil, Aylhana, Karine, Jessé, Rodrigo, Haffiki, Haquiffi, Haffira, Kamylla, Amir, Anis**), minhas irmãs (**Nice e Raquel**) e minha madrasta (**Eliete**) por fazerem parte da minha vida e me apoiarem em todos os momentos.

A minha querida tia **Alda** e minhas primas **Mayra** e **Mayara**, que me acolheram e foram a minha família em um ano muito muito importante da minha vida.

A minha namorada **Larissa**, pelo amor, companheirismo e paciência nestes quatro anos juntos.

A Profa. **Elyzabeth da Cruz Cardoso**, por ser minha orientadora desde a iniciação e por ter possibilitado a realização do mestrado na FMVZ.

Ao meu grande amigo **Raimundo Alves Barreto Júnior** e ao meu estagiário **Rodrigo Ferreira** pela imensa ajuda na condução deste trabalho, amizade indiscutível e apoio em todas as horas, não sei o que teria feito sem vocês!

Aos amigos **Frederico Mazzoca, Genilson Queiroz e João Paulo Saut** por estarem sempre ao meu lado, seja nas coletas de sangue, nas cirurgias, nos congressos ou nas festas.

A **Clara Satsuki Mori** e **Marly Ferreira de Castro** pela paciência e irrestrita ajuda na realização das análises laboratoriais

A Profa. **Solange Gennari** e ao Prof. **Rodrigo Soares** pelas oportunidades oferecidas e pelo 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.

Ao Prof. **Carlos Eduardo Larsson** pelo constante auxílio, paciência e agradável convívio.

Ao Prof. **Wilsom Roberto Fernandes** por ter cedido as baias para alocação dos animais no início do meu experimento.

Aos Professores da FMVZ **Cássio Xavier de Mendonça Júnior, Alice Maria Melville Della Libera, Liliam Gregory, Eduardo Harry Birguel Júnior, Maria Helena Larson, Wanderley Perreira de Araújo, Silvana Gorniak, Paulo Maiorka, Fernando Ferreira, Ricardo Augusto Dias e Fumio Homma** pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos da “Família Ortolani”, **Alexandre Antonelli, Celso Maruta, Sandra Kitamura, Alessandra Lima, Néria dos Santos, Maria Cláudia e Bruno Caputi**, pela convivência harmoniosa e por me permitirem fazer parte desta maravilhosa equipe. Um agradecimento especial ao **Celso**, pela receptividade nesta cidade e amizade.

Ao funcionário do Galpão de ruminantes **Agnaldo dos Santos**, por toda sua ajuda no trato dos animais, na condução do experimento, nas colheitas e na manutenção do galpão.

A secretária **Adeláide Borges** por toda ajuda durante o mestrado, em especial pelo auxílio na parte burocrática que precede a defesa da dissertação.



A **todos os funcionários** da Biblioteca da FMVZ/USP, em especial a **Dona Helena** e a **Dona Elza**, pelo profissionalismo e atenção com os quais sempre fui atendido.

As Médicas Veterinárias do laboratório clínico do HOVET, **Samantha** e **Maria Luíza**, e aos funcionários do VCM **Dinha, Cida, Patricia, Cláudia, Dinho e Carmem** pelo constante auxílio e agradável convivência.

Aos funcionários do Hospital de Equinos, em especial ao meu amigo **Rosendo, Marquinhos e Márcio** e aos funcionários do Hospital de Ruminantes **Luizinho, Elias e Osmar** pela constante ajuda e pela amizade.

Aos amigos da pós-graduação: **Tio Chico, Raquel, Fernanda, Ewaldo, Fábio, Barbara, João Gabriel, Flávio, Ana Paula, Mariana, Maiara, Alêssandra Nava, Wanessa, Fabiola, Solange, Alessandra Ragozo, Alex Tomaz, Tatiana e Leslie**, pela amizade e convivência harmoniosa.

Aos meus eternos amigos: **Rafael, Kalil, Felipe, Marçal, Daniel e Cezar** que apesar da distância ainda continuam grandes amigos.

Aos meus amigos de São Paulo: **Paulo Gilherme, Dani, Rodriguinho, Ike, Gabriel, André, Barone, Carla, Denis, Dila, Aninha e Paula** pela convivência e amizade nestes dois anos.

Aos funcionários da Fazenda Carafá **Fábio e Elias**, pelo auxílio na aquisição dos animais.

Aos funcionários da ABC do criador **Jorge e Rodolfo** pela solicitude na entrega de medicamentos.

Aos bovinos e búfalos que fizeram parte do experimento e foram essenciais para realização deste trabalho (com exceção do 6 e do 9).

## RESUMO

MINERVINO, A. H. H. **Estudo comparativo da susceptibilidade de bovinos e bufalinos à intoxicação cúprica acumulativa.** [Comparative study of the susceptibility of cattle and buffalo to accumulative copper poisoning]. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O presente trabalho objetivou avaliar comparativamente a susceptibilidade dos bufalinos e bovinos à intoxicação cúprica acumulativa, por meio do fornecimento de quantidades crescentes de cobre, analisando variáveis clínicas, sangüíneas e os teores de cobre hepático. Com tal objetivo, foram utilizados 20 ruminantes, 10 bovinos (mestiços) e 10 búfalos (raça Murrah) jovens, aleatoriamente distribuídos em seis animais de cada espécie nos grupos que receberam cobre (BOV Cu e BUF Cu) e quatro animais nos grupos controle (BOV e BUF). Diariamente, os grupos BOV Cu e BUF Cu receberam por meio de fistula ruminal 2 mg Cu /kg/PV ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) sendo esta dose acrescida de mais 2 mg/kg/PV a cada semana, até o término do experimento (105 dias). Foram realizadas três biópsias hepáticas (Dia 0 - dia 45 - dia 105) em todos os animais para determinação da concentração de Cu e Zn neste órgão. Quinzenalmente, foi realizado exame clínico, pesagem dos animais e coleta de amostras de sangue. Três bovinos e dois búfalos dos grupos BOV Cu e BUF Cu manifestaram quadro laboratorial e/ou clínico sugestivo de intoxicação cúprica acumulativa (ICA), vindo a sucumbir em seguida. Não existiu diferença entre a freqüência de mortalidade entre os bovinos e búfalos ( $P > 0,87$ ). Destaca-se a presença de dois quadros clínicos diferentes, o clássico (um bovino e um búfalo) e um atípico (dois bovinos e um búfalo), caracterizado pelo destacado acúmulo de cobre hepático, hiporexia progressiva seguida de anorexia, desidratação, redução dos movimentos de ruminais, oligúria, acentuada apatia e morte, mas sem apresentar hemoglobinúria. Parte dos bovinos e bufalinos se mostraram resistentes

à ICA a despeito da administração de altas quantidades cobre. Os teores de cobre hepático nos bovinos com ICA foram superiores, em mais de 100%, aos encontrados nos bufalinos (4389 e 2052 ppm respectivamente). Bovinos com ICA aumentaram a concentração de zinco hepático nas fases finais da intoxicação. A presença de altas atividades séricas de gama glutamiltransferase (GGT) ( $> 24,6$  U/L) e de aspartato aminotransferase (AST) ( $> 90$  U/L) para bovinos e GGT ( $> 20$  U/L) para bufalinos indicaram de maneira efetiva a presença de destacado acúmulo de cobre nos tecidos hepáticos (1000 ppm). Com exceção de um búfalo com o quadro atípico nenhum outro animal apresentou quadro de insuficiência renal.

Palavras-chave: Búfalos. Bovinos. Cobre. Intoxicação. Fígado.

## ABSTRACT

MINERVINO, A. H. H. **Comparative study of the susceptibility of cattle and buffalo to accumulative copper poisoning.** [Estudo comparativo da susceptibilidade de bovinos e bufalinos à intoxicação cúprica acumulativa]. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The main aim of this project is to carry out a comparative study of the susceptibility of cattle (crossbreed) and buffalo (Murrah) to accumulative copper poisoning, by infusion of increasing doses of copper, and studying some clinical and blood variables and the liver Cu concentration. Ten cattle and 10 buffalo yearling steers were randomly distributed into two copper supplemented groups (BOV Cu; BUF Cu; n = 6) and two control groups (BOV; BUF; n = 4). The two former groups received initially 2 mg Cu/kg/BW (as  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) daily for a week; every following week, up to the end of the experiment (105<sup>th</sup> day), this initial dose was increased of 2 mg Cu/kg/BW. For three times during the experiment (day zero, 45<sup>th</sup> and 105<sup>th</sup> day) a liver biopsy was carried out to evaluate the degree of copper accumulation in this organ; the body weight and clinical examination was followed every 15 days, as far as blood samples were withdrawn. Three cattle and two buffaloes supplemented with copper presented clinical picture and/or laboratory findings indicative of accumulative copper poisoning (ACP), and died thereafter. There was no difference in the frequency of mortality between cattle and buffalo ( $P > 0.87$ ) Two different clinical pictures were seen, the classical (one cattle and one buffalo) and one atypical (two cattle and one buffalo) characterized by remarkable high levels of liver copper, progressive hyporexia followed by anorexia, dehydration, severe apathy, decreased rumen movements, oliguria and death. Some of animals were resistant to ACP in despite of high accumulative levels of copper. The liver copper concentration was higher in cattle than buffalo (4389 and 2052 ppm, respectively). Cattle with ACP

increased their zinc liver concentration at the final stages of the poisoning. The presence of high serum activity of gamma glutamyltransferase (GGT) (> 24.6 U/L) and aspartate aminotransferase (AST) (>90 U/L) for cattle and GGT (> 20 U/L) for buffalo indicated effectively the high accumulation of copper in liver (> 1000 ppm). No poisoned animals developed renal insufficiency, but one buffalo with atypical picture.

Key words: Buffalo. Cattle. Copper. Poisoning. Liver

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variáveis sanguíneas e teor de cobre hepático dos ruminantes que apresentaram quadro clássico e atípico de ICA - São Paulo - 2006.....	50
Tabela 2 -	Dose de cobre por kg de peso metabólico oferecida aos ruminantes - São Paulo - 2006.....	52
Tabela 3 -	Mediana dos teores de cobre hepático (ppm) em bovinos e búfalos dos grupos suplementados e controles - São Paulo - 2006.....	55
Tabela 4 -	Mediana da concentração hepática de cobre (ppm) na última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006.....	57
Tabela 5 -	Mediana dos teores de zinco hepático (ppm) em bovinos e búfalos de grupos suplementados e controles - São Paulo - 2006.....	58
Tabela 6 -	Mediana da concentração hepática de zinco (ppm) na última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006.....	59
Tabela 7 -	Razão dos teores de Cu:Zn hepático da última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006.....	61
Tabela 8 -	Razão dos teores de Cu:Zn hepático da última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006.....	62
Tabela 9 -	Mediana do cobre sérico dos ruminantes dos grupos tratados com cobre e controle no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	63

Tabela 10 -	Análise comparativa do cobre sérico entre os subgrupos intoxicados e resistentes na ultima quinzena do experimento - São Paulo - 2006.....	65
Tabela 11 -	Mediana da atividade de GGT sérica nos diferentes grupos no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	66
Tabela 12 -	Mediana da atividade de GGT sérica na última quinzena, considerando os subgrupos de ruminantes intoxicados e resistentes - São Paulo - 2006.....	68
Tabela 13 -	Média da atividade da AST no soro de bovinos e búfalos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	72
Tabela 14 -	Mediana da atividade da AST sérica na ultima quinzena considerando os subgupos de ruminantes intoxicados e resistentes - São Paulo - 2006.....	74
Tabela 15 -	Valores médios de uréia no soro dos ruminantes no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	78
Tabela 16 -	Uréia sérica na ultima quinzena considerando os subgrupos de ruminantes intoxicados e resistentes - São Paulo - 2006.....	79
Tabela 17 -	Valores médios de creatinina sérica no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	80
Tabela 18 -	Média da Creatinina sérica dos subgrupos intoxicados e resistentes e dos animais controle na ultima quinzena do experimento - São Paulo - 2006.....	81
Tabela 19 -	Valores médios do volume globular dos ruminantes no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	82
Tabela 20 -	Mediana do volume globular dos ruminantes intoxicados e resistentes na ultima quinze do experimento - São Paulo - 2006.....	83

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Peso vivo médio apenas dos ruminantes intoxicados que apresentaram quadro clínico clássico ou atípico de ICA no decorrer das últimas três quinzenas.....	49
Gráfico 2 -	Ganho de peso acumulado, em relação ao peso inicial, dos ruminantes nos quatro grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	53
Gráfico 3 -	Ganho de peso total nos diferentes grupos, obtido pela diferença entre o peso vivo no início e final, do experimento. Letras diferentes nas seqüências de dados apresentam diferença pelo teste de kruskaal-Wallis ( $P < 0,03$ ) - São Paulo - 2006.....	53
Gráfico 4 -	Ganho de peso total entre o início e o final do experimento considerando-se os subgrupos de animais intoxicados e resistentes. Letras diferentes nas seqüências de dados apresentam diferença pelo teste de kruskaal-Wallis ( $P < 0,001$ ) - São Paulo - 2006.....	54
Gráfico 5 -	Valores de mediana dos teores de cobre hepático (ppm) dos vários grupos experimentais nas três biópsias seqüenciais - São Paulo - 2006.....	56
Gráfico 6 -	Valores de mediana dos teores de zinco hepático (ppm) dos vários grupos experimentais nas três biópsias seqüenciais - São Paulo - 2006.....	58
Gráfico 7 -	Relação entre os teores hepáticos de cobre e zinco na última biópsia do experimento em ruminantes de todos os grupos - São Paulo - 2006.....	60
Gráfico 8 -	Concentrações médias do cobre sérico nos diferentes grupos no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	64
Gráfico 9 -	Variação quinzenal da média da atividade de GGT no decorrer do experimento - São Paulo - 2006.....	67



Gráfico 10 -	Relação e coeficiente de determinação entre o cobre hepático e a GGT em bovinos - São Paulo - 2006.....	69
Gráfico 11 -	Relação e coeficiente de determinação entre o cobre hepático e a GGT em búfalos - São Paulo - 2006.....	69
Gráfico 12 -	Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo de GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em bovinos. Números de 1 a 4 no gráfico representam os quadrantes - São Paulo – 2006.....	70
Gráfico 13 -	Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo de GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em búfalos - São Paulo - 2006.....	71
Gráfico 14 -	Varição média da atividade da AST durante o experimento. * O valor de um animal do grupo BUF Cu na última quinzena teve seu valor excluído para possibilitar uma melhor visualização dos dados - São Paulo - 2006.....	73
Gráfico 15 -	Relação e coeficiente de determinação entre a atividade da AST e o cobre hepático em bovinos - São Paulo - 2006.....	75
Gráfico 16 -	Relação e coeficiente de determinação entre a atividade da AST e o cobre hepático em búfalos - São Paulo - 2006.....	75
Gráfico 17 -	Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em bovinos - São Paulo - 2006.....	76
Gráfico 18 -	Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo de GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em búfalos. * Para uma melhor visualização da linha de corte foi omitido neste gráfico um ponto de dados no valor de 4001 U/L de AST - São Paulo - 2006.....	77

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Composição bromatológica do feno de coast-cross e do concentrado comercial oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental. <sup>1</sup> Análises realizadas no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ - USP. <sup>2</sup> Informações fornecidas pelos fabricantes - São Paulo - 2006.... 37
- Quadro 2 - Composição mineral do feno de coast-cross, do concentrado comercial e da mistura mineral oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental. <sup>1</sup> Análises realizadas no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ - USP. <sup>2</sup> Informações fornecidas pelos fabricantes - São Paulo - 2006..... 38

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
±	mais ou menos
-	menos
®	marca registrada
°C	graus celcius
cm	centímetros
ppm	parte por milhão
g	grama
mg	miligrama
kg	quilograma
PV	peso vivo
PV <sup>0,75</sup>	peso metabólico
R <sup>2</sup>	coeficiente de determinação
L	litro
ml	mililitro
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	sulfato de cobre pentahidratado
μMol	micro mol
mMol	milimol
U	unidade
TTM	tetratiomolibdato de amônia
P.A.	para análise

EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
RPM	rotações por minuto
MS	matéria seca
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
USP	Universidade de São Paulo
AST	aspartato aminotransferase
GGT	gama glutamiltransferase
BUF	búfalos
BOV	bovinos

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	26
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO.....	36
4.2	INSTALAÇÕES.....	39
4.3	DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	39
4.4	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO.....	40
4.4.1	<b>Determinação da concentração de cobre (Cu) e zinco (Zn) no fígado</b> .....	41
4.5	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS.....	42
4.5.1	<b>Determinação do volume globular</b> .....	43

4.5.2	Concentração sérica de cobre (Cu).....	43
4.5.3	Concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST).....	43
4.5.4	Concentração sérica de gama glutamiltransferase (GGT).....	44
4.5.5	Concentração sérica de uréia.....	44
4.5.6	Concentração sérica de creatinina.....	44
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	<b>RESULTADOS</b> .....	47
5.1	INFORMAÇÕES GERAIS.....	47
5.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	47
5.3	DESENVOLVIMENTO PONDERAL.....	52
5.4	TEORES DE COBRE NO FÍGADO. ....	54
5.5	TEORES DE ZINCO NO FÍGADO.....	57
5.6	RELAÇÃO COBRE E ZINCO HEPÁTICO.....	59

5.7	RAZÃO Cu/Zn NO FÍGADO.....	60
5.8	COBRE SÉRICO.....	62
5.9	CONCENTRAÇÃO DE GAMA GLUTAMILTRANSFERASE (GGT) SÉRICA.....	65
5.10	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ASPARTATO AMINOTRANFERASE (AST).....	72
5.11	URÉIA SÉRICA.....	77
5.12	CREATININA SÉRICA.....	79
5.13	VOLUME GLOBULAR.....	81
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	84
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	93
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

A intoxicação por cobre é considerada a segunda principal enfermidade causadora de mortes em ovinos criados no Brasil, provocando grandes prejuízos a essas criações (ORTOLANI, 2003). Embora a frequência dessa intoxicação seja bem menos pronunciada em outras espécies de ruminantes, a intoxicação cúprica em bovinos vem despontando como uma doença emergente, com relatos de casos agudos e acumulativos em diversos países, inclusive no Brasil (MYLREA et al., 1974; STROGDAL, 1978; BLAKLEY et al., 1982; PERRIN et al., 1990; TREMBLAY; BAIRD, 1991; BRADLEY, 1993; TOKARNIA et al., 2000). Bidewell et al. (2000) faz um alerta a comunidade veterinária sobre o aumento do número de casos em bovinos, relatando a ocorrência de 14 surtos em apenas seis meses.

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).

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 a 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 níveis de zinco (Zn) presentes no órgão (LOPEZ-ALONZO et al., 2005).

Em um estudo retrospectivo em laboratório de investigação toxicológica durante cinco anos, observou-se um elevado número de amostras com suspeita de intoxicação por cobre, sendo este diagnóstico confirmado em boa parte destas, onde o cobre destacou-se como um dos elementos minerais mais importantes envolvidos em casos de intoxicação juntamente com o chumbo (HOOF et al., 1998).

Alerta-se para o fato de que a intoxicação por cobre pode estar ocorrendo em um número muito maior de casos, visto que o diagnóstico confirmativo nem sempre é estabelecido ou que o mesmo seja confundido com outras enfermidades que causem quadros hemolíticos (BIDEWELL; LIVESEY, 2002). Perrin et al., relatam que foi necessário um ano e o descarte de outras enfermidades, como a intoxicação por nitrito e a doença de Johne para que se chegasse ao diagnóstico de ICA, causada por um erro na mistura da ração. Bradley (1993) relata que animais intoxicados por cobre foram primeiramente tratados para uma suspeita de hipocalcemia e indigestão e exames foram realizados para descartar uma possível intoxicação por nitrito, sendo esta enfermidade considerada de difícil diagnóstico (AUZA et al., 1999)

Já em búfalos, apenas um caso relata o acometimento por esta enfermidade, onde bezerros búfalos que recebiam leite em pó reconstituído rico em cobre demonstraram após alguns meses sinais de ICA, seguidos de morte. Como bovinos que recebiam a mesma dieta não foram acometidos por esta enfermidade, os autores sugerem que os bufalinos poderiam ser mais susceptíveis à intoxicação cúprica que os bovinos (ZICARELLI et al., 1981). Cardoso et al. (1997) sugerem que búfalos possuem uma maior absorção de cobre do que bovinos, entretanto este

estudo foi conduzido com níveis baixo ou normais de cobre na dieta, sendo que não existem informações sobre búfalos recebendo altas doses de cobre.

Uma adequada revisão de literatura feita até os presentes dias não encontrou qualquer trabalho que estudasse de forma concreta e comparativa a suscetibilidade dos búfalos apresentarem intoxicação cúprica em relação aos bovinos, faltando ainda um estudo para avaliar a hipótese lançada pelos pesquisadores italianos.

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). Um indicativo desta possível diferença em relação a susceptibilidade à ICA em outras espécies de ruminantes está nas pesquisas que demonstram uma diferença no metabolismo do cobre entre raças bovinas distintas (DU et al., 1996; MULLIS et al., 2003) e entre diferentes categorias animais, onde vacas em lactação e com gestação avançada seriam mais susceptíveis à ICA (STROGDAL, 1978; PERRIN et al., 1990) o que prova a variabilidade entre a absorção e/ou excreção deste elemento mineral e conseqüente variação na susceptibilidade à ICA.

Os mecanismos de absorção e excreção do cobre, bem como os achados clínicos de casos de intoxicação são bastante complexos e exigem uma explanação mais detalhada, a qual será feita na revisão de literatura, no capítulo a seguir.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

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). 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).

O cobre é absorvido em todos os segmentos do trato gastrintestinal, 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 observamos a absorção por difusão simples. A metalotioneína, uma proteína rica em cisteína e com grande afinidade por metais bivalentes, regula a transferência de cobre para a circulação portal. A regulação da síntese de metalotioneína nas células da mucosa intestinal está sob o controle dos cobre 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 armazenado e incorporado a enzimas que desempenham as demais funções

orgânicas. As concentrações de cobre no organismo animal podem ser avaliadas no tecido hepático, soro ou plasma sanguíneo, e urina, e dependem de fatores como idade, estado reprodutivo, enfermidades e a presença de antagonistas, como molibdênio, zinco, cálcio, cádmio e enxofre, na alimentação (LEMOS et al., 1997; MCDOWELL, 1999).

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 e 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 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)

A concentração de cobre necessária para causar intoxicação depende da concentração de molibdênio, enxofre e ferro na dieta, pois esses minerais interagem com o cobre e impedem sua absorção no sistema digestivo (CARDOSO et al., 1997). A forma de administração do cobre também é um fator a ser considerado, uma vez que o sulfato de cobre diluído em água seria mais tóxico que misturado no sal (CARVALHO et al., 2003).

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 de suplementação deste mineral inadequado têm tido um papel de destaque na ocorrência desta enfermidade (GUMMOW et al., 1991; BRADLEY, 1993; SARGISON; SCOTT, 1996)

O oferecimento de cama-de-frango, usada como suplemento alimentar para bovinos e búfalos, traz um potencial risco, pois este resíduo contém elevados teores de cobre, havendo relatos de casos de intoxicação. (BANTON et al., 1987; TOKARNIA et al., 2000; ORTOLANI; BRITO, 2001).

Uma outra possibilidade dietética é o esterco de suínos que tem sido utilizado nas rações de bovídeos, 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). Lopez-Alonzo et al. (2000) demonstraram que bovinos mantidos em pastagens adubadas com esterco suíno tiveram elevados teores de cobre hepático.

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 ingiram água de pedilúvio contendo fluidos a base de sulfato de cobre (RIBEIRO et al., 1995; ORTOLANI et al., 2004). Além disto, foi descrito um caso de intoxicação cúprica em bovinos causada pela ingestão de sal mineral misturado à ração excessivamente rico em cobre (BRADLEY, 1993).

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, no 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 (GUMMOW et al., 1991; SEDKI et al., 2003).

Os ovinos são muito mais suscetíveis à toxidez por cobre do que bovinos, sendo que concentrações de 15 mg de Cu na matéria seca (MS), produzem intoxicação nesses animais. 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 da 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. Devido ao aumento do número de casos de ICA em bovinos, existe um consenso, especialmente nos países europeus, de que a dose de cobre recomendada para bovinos deve ser reduzida para 30 a 50 ppm (Comunicação Pessoal<sup>1</sup>).

---

<sup>1</sup> Informação fornecida por LOPEZ-ALONZO, M., no curso de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da FMVZ - USP, São Paulo, 2006.

Bezerros são mais susceptíveis a intoxicação cúprica do que os adultos, sendo que um potencial risco para os animais lactentes, tanto bovinos quanto bufalinos, é o oferecimento de sucedâneos lácteos ricos em cobre, onde quantidades superiores a 20 ppm podem levar a morte em poucos meses (ZICARELLI et al., 1981; ANSAY et al., 1984; CROUBELS et al., 2001). Bovinos adultos suportam por vários meses concentrações maiores que 900 mg de Cu na MS (UNDERWOOD; SUTLLE, 1999), onde a dose tóxica oscila entre 200 a 400 g de sulfato de cobre ingerido de uma só vez ou mais de 200 mg de Cu/kg de peso vivo (RADOSTITS et al., 2000), contudo vacas leiteiras, com ingestão diária de 22 a 37 mg/kg de cobre na MS por um período maior que dois anos apresentaram intoxicação acumulativa por cobre, com 14% de mortalidade (BRADLEY, 1993).

Dietas altamente concentradas com uma suplementação adicional de 20 a 40 mg de Cu/kg de MS, provocam redução da ingestão de alimentos e do ganho de peso em bovinos em fase de terminação (ENGLE; SPEARS, 2000).

A ingestão freqüente de pequenas quantidades de cobre não produz alterações clínicas evidentes, contudo ocorre a acumulação deste microelemento no fígado e quando o nível hepático máximo é atingido o cobre é liberado na corrente sanguínea e o animal morre de hemólise intravascular aguda. Nos ruminantes acometidos aparecem repentinamente anorexia, sede, hemoglobinúria, palidez e icterícia. A depressão é profunda e o animal morre, em geral dentro de 24 a 48 horas após o início dos sinais (LEMOS et al., 1997; BIDEWELL; LIVESEY, 2002).

Entre os casos de intoxicação por cobre descritos na literatura, uma certa variabilidade de sintomas foi descrita. Bezerros de um a dois meses de idade apresentaram baixa condição corporal, fezes diarréicas e com muco, enoftalmia, desidratação e icterícia (SARGISON; SCOTT, 1996). Strogdale (1978) reportou três

casos de ICA em vacas Jersey que apresentaram apatia, baixa condição corporal e redução da produção de leite, seguido de icterícia pronunciada e hemoglobinúria. Sintomas digestivos como atonia ruminal e timpanismo, bem como alterações nervosas como inquietude, incoordenação e letargia também já foram descritos (BLAKLEY et al., 1982; PERRIN et al., 1990; BRADLEY, 1993). De uma maneira geral, os bovinos apresentam anorexia, baixa condição corporal, desidratação, alterações nas fezes, seguido de icterícia, hemoglobinúria e morte (GUMMOW, 1996; AUZA et al., 1999; BIDEWELL; LIVESEY, 2002).

Em búfalos, o relato mais importante de intoxicação cúprica refere-se a bezerros em lactação recebendo leite reconstituído rico em cobre que apresentaram fraqueza, baixa condição corporal, icterícia e hemoglobinúria (ZICARELLI et al., 1981). Recentemente, foi diagnosticado e confirmado um surto de intoxicação cúprica em uma propriedade de bufalinos da raça Murrah, no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, em que os animais em questão recebiam dos tratadores uma ingestão forçada de um sal mineral muito rico em sulfato de cobre, o qual era diluído em água e ministrado continuamente aos animais por meio de beberagem, denominado popularmente na região de “garrafada”. Após algum tempo de tratamento vários búfalos desenvolveram um quadro típico de intoxicação cúprica, caracterizado por depressão no estado geral, diminuição na produção leiteira, decúbito external, icterícia, hemoglobinúria e morte (Comunicação Pessoal<sup>2</sup>). Segundo alguns criadores dessa região vários búfalos já tinham sucumbido até então com semelhante quadro clínico, indicando que a extensão do problema é bem maior do que se imagina.

---

<sup>2</sup> Informação fornecida por ORTOLANI, E.L. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2005.



Na intoxicação acumulativa a concentração de cobre no fígado apresenta um aumento acentuado, por isso a biópsia hepática é uma técnica diagnóstica satisfatória, uma vez que os valores sanguíneos não se elevam de maneira satisfatória até que ocorra a crise hemolítica, logo antes da morte. Para se obter o diagnóstico definitivo da intoxicação cumulativa por cobre deve-se a realizar a determinação das concentrações de cobre no fígado ou rim, que em ovinos intoxicados apresentam teores superiores a 500 e 80 mg de Cu/kg de matéria seca, respectivamente (RIET-CORREA et al., 1989). Bovinos que apresentem valores de cobre hepáticos superiores a 800 mg/kg de matéria seca são considerados positivos para a intoxicação por cobre (BIDEWELL; LIVESEY, 2002). Sendo assim o fígado é o órgão de eleição para a avaliação do acúmulo de cobre no organismo, pois este microelemento se deposita no interior dos hepatócitos em grandes quantidades, até que, quando as células chegam ao seu limite, todo o Cu é liberado na corrente sanguínea, causando assim a crise hemolítica observada na intoxicação acumulativa (ORTOLANI, 2003).

Em situações de intoxicação acumulativa por cobre, os sintomas clínicos são observados apenas no momento da crise hemolítica, ou poucos dias antes da mesma, sendo que é extremamente difícil o estabelecimento de um diagnóstico precoce para esta enfermidade, 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 as alterações de enzimas hepáticas (MACHADO, 1998)

Outras variáveis, além da concentração de cobre hepático, também têm sido utilizadas para predizer o surgimento eminente de intoxicação cúprica. Um estudo recente e 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 da intoxicação, 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.

Gummow (1996) em estudo experimental com bovinos encontrou resultados inconstantes para a AST e GGT afirmando que a primeira não pode ser usada para o diagnóstico precoce de ICA e que a atividade da GGT se eleva apenas em 43 % dos animais intoxicados. Desta maneira é necessário um estudo para avaliar se as alterações das atividades de certas enzimas hepáticas são eficientes no diagnóstico precoce da intoxicação cúprica em bovinos e bufalinos.

Nos casos de intoxicações por cobre, apesar das elevadas taxas de mortalidade, é possível a adoção de um tratamento específico que, caso seja utilizado com rapidez e eficiência pode promover a recuperação de animais intoxicados por cobre. O antídoto mais recomendado pela literatura é o Tetratiomolibdato de amônia (HUMPHRIES et al., 1986), cuja dosagem mais eficiente para ovinos mostrou ser a de 3,4 mg/kg de PV (MACHADO, 1998;

SOARES, 2004). Contudo existem raras informações sobre a eficácia do tratamento com o Tetratiomolibdato de amônia em casos de intoxicação cúprica em bovinos e bubalinos. Segundo Wells et al. (2001) o sulfato de cálcio administrado em cápsulas gelatinosas, também pode ser usado no tratamento da intoxicação cúprica.

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar comparativamente a susceptibilidade dos bufalinos e bovinos à intoxicação cúprica acumulativa, por meio do fornecimento de quantidades crescentes de cobre, analisando variáveis clínicas, sangüíneas e os teores de cobre hepático.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados 20 animais, sendo dez bovinos mestiços das raças Nelore e Charolês com idade média  $8 \pm 2$  meses ao início do experimento, e peso médio inicial de  $170 \pm 17$  kg, e dez búfalos com idade semelhante e peso médio de  $174 \pm 43$  kg.

Dois meses antes do início do período experimental, todos os animais receberam aplicação de endectocida a base de ivermectina<sup>3</sup> na concentração de 3,15%, na dose de 1 ml para cada 50 kg de peso vivo aplicada por via subcutânea e 10 ml por animal de polivitamínico mineral<sup>4</sup>. Foi realizado ainda banho com carrapaticida a base de amitraz<sup>5</sup> na dosagem recomendada pelo fabricante, aplicação de doses de vacina contra tétano e clostridioses<sup>6</sup>, seguida de reforço após 30 dias da primeira imunização.

Os ruminantes foram submetidos à cirurgia para colocação de cânula ruminal de látex. Após os procedimentos cirúrgicos, os garrotes passaram por um período de adaptação às instalações e ao novo manejo alimentar. Durante tal período e no decorrer do período experimental os animais foram alimentados com uma ração total composta de 75% da matéria seca (MS) de feno de capim Coast-cross e 25 % da MS de ração concentrada comercial com 14% de proteína bruta, a qual foi oferecida

---

<sup>3</sup> Ivomec Gold® – Merial Saúde Animal®

<sup>4</sup> Modificador Orgânico® – Vallée®

<sup>5</sup> Triatox® – Shering-Plough Saúde Animal®

<sup>6</sup> Sintoxan polivalente T® – Merial Saúde Animal®

numa única vez ao dia. A quantidade de matéria seca da ração total ofertada aos animais foi calculada em relação a 2,7 % do peso vivo individual, sendo corrigido no decorrer do ensaio. Os ruminantes tiveram livre acesso à água; e diariamente receberam 35 g de sal mineralizado<sup>7</sup> comercial por dia, adicionado sobre a ração total. Com o intuito de simular o oferecimento de alimentos na forma de “ração total misturada”, cuidado especial era dispensado na mistura do concentrado com o feno. As constituições bromatológicas dos alimentos e da dieta global encontram-se no quadro 1. A composição mineral dos alimentos, da mistura mineral e da dieta global encontram-se no quadro 2.

Foram colocados colares para identificação dos animais numerados de 1 a 20, com quatro cores diferentes, uma para cada grupo experimental. Os animais receberam ainda cabrestos individuais apropriados para facilitação do manejo.

<b>Composição</b>	<b>Feno<sup>1</sup></b>	<b>Ração Peletizada<sup>2</sup></b>
% MS (matéria seca)	87,2	87,0
% FB (fibra bruta)	31,2	16,0
% PB (proteína bruta)	7,1	14,0
% EE (estrato etéreo)	1,8	2,0
% MM (matéria mineral)	6,4	16,0
% ENN (extrato não nitrogenado)	53,6	52,0

Quadro 1 – Composição bromatológica do feno de coast-cross e do concentrado comercial oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental. <sup>1</sup> Análises realizadas no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ - USP. <sup>2</sup> Informações fornecidas pelos fabricantes - São Paulo - 2006

<sup>7</sup> Fosbovi 20® – Tortuga Cia Zootécnica Agrária®

<b>Composição</b>	<b>Feno<sup>1</sup></b>	<b>Ração Peletizada<sup>2</sup></b>	<b>Mistura Mineral<sup>2</sup></b>
Cálcio (%)	3,5	2,8	12,0
Fósforo (%)	3,2	0,4	8,8
Magnésio (%)	2,9	-	-
Sódio (%)	-	-	126,0
Enxofre (%)	2,3	1,2	1,2
Cobre (mg/kg)	4,2	10,0	1.530,0
Molibdênio	-	-	-
Zinco (mg/kg)	30,0	60,0	3.630,0
Ferro (mg/kg)	89,0	90,0	1.800,0
Cobalto (mg/kg)	-	1,4	55,0
Iodo (mg/kg)	-	0,8	75,0
Flúor (máx.) (mg/kg)	-	-	880,0
Manganês (mg/kg)	81,0	46,0	1.300,0
Selênio (mg/kg)	-	-	15,0

Quadro 2 - Composição mineral do feno de coast-cross, do concentrado comercial e da mistura mineral oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental. <sup>1</sup> Análises realizadas no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ - USP. <sup>2</sup> Informações fornecidas pelos fabricantes - São Paulo - 2006

## 4.2 INSTALAÇÕES

Os animais foram mantidos em baias individuais em sistema de “tie-stall” , nas dependências do “Galpão de Experimentação Clínica de Ruminantes” do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da Universidade de São Paulo - USP, Campus de São Paulo.

As pesagens dos animais foram feitas na chegada, no início do período experimental e semanalmente durante todo o decorrer do trabalho, sempre antes do oferecimento de ração total pela manhã, utilizando balança Filizola®, modelo 3106100, com capacidade de 1.500 kg e sensibilidade de 200 g.

## 4.3 DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O experimento foi inteiramente ao acaso, onde os búfalos e os bovinos, isoladamente, foram sorteados em dois grupos compostos de quatro animais no grupo controle e seis do grupo suplementado com solução de sulfato de cobre (Cu).

O modelo proposto para estudar o acúmulo de cobre no organismo foi adaptado ao descrito por Machado (1998) para ovinos, onde os animais do grupo Cu receberam diariamente solução de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) diretamente no rumem, através de injeção diretamente na cânula ruminal. A dose inicial utilizada foi de 2 mg/kg/PV, sendo esta acrescida de mais 2 mg/kg/PV a cada semana, até o aparecimento de quadro de intoxicação, ou até o final do



experimento, após 7 quinzenas. Nos casos de intoxicação cúprica, identificada por meio da observação de hemoglobinúria macroscópica, em qualquer um dos animais a administração de sulfato de cobre foi imediatamente interrompida, com subsequente tratamento com 3,4 mg/kg de peso vivo de tetratimolibdato de amônia (TTM), segundo preconizam Ortolani (2003) e Soares (2004) .

#### 4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO

Foram realizadas três séries de biópsias hepáticas em todos os animais experimentais, objetivando determinar o acúmulo deste microelemento no organismo animal. A 1ª coleta foi realizada no início do experimento, antes do oferecimento da primeira dose de cobre, a 2ª coleta após 45 dias de experimento, e a 3ª coleta no final do experimento, após 105 dias (7 quinzenas). Nos animais que sucumbiram, a despeito do tratamento, foram coletadas amostras de fígado do lobo cranial, imediatamente após a morte.

A biópsia foi realizada por laparotomia, adaptada da técnica descrita por Silva et al. (1996) em ovinos. Inicialmente os animais foram tranqüilizados com cloridrato de xilazina a 2%<sup>8</sup>, na dose de 0,5 ml para cada 150 kg de peso vivo; foi realizada a tricotomia do flanco direito e assepsia do local com álcool iodado na concentração de 5%. A anestesia local nas camadas dérmicas e musculares foi realizada utilizando-se cerca de 40 ml de Lidocaina a 1% associada a Epinefrina<sup>9</sup> por animal.

---

<sup>8</sup> Virbaxyl® - Virbac®

<sup>9</sup> Anestésico L® – Pearson Saúde Animal®

A laparotomia foi realizada um centímetro caudal a 13ª costela incisando-se pele, musculatura e peritônio. Após a exposição do fígado foi efetuado pinçamento no bordo do lobo caudal deste órgão, utilizando-se uma pinça de Doyen. O fragmento pinçado foi removido com tesoura curva, e a pinça permaneceu no órgão por alguns minutos efetuando a hemostasia. Foi realizada sutura interna com categute 1-0, ponto simples contínuo, aproximando peritônio e musculatura, seguida de fechamento da pele com fio de náilon 0,7 em pontos contínuos padrão de sutura Wolf. As amostras de fígado foram acondicionadas em coletores universais estéreis e congeladas a 20°C negativos para posterior análise.

Após a cirurgia foi feita aplicação de antibiótico e antiinflamatório<sup>10</sup> em formulação de longa ação, na dose de 1 ml para cada 10 kg de peso vivo, por via intramuscular, com repetição da mesma dosagem após 72 horas, ficando os animais sob efeito do medicamento por seis dias. Nas duas semanas posteriores a cirurgia, foi realizado curativo com spray cicatrizante comercial<sup>11</sup> o que permitiu uma cicatrização rápida e impediu a ocorrência de mífases.

#### **4.4.1 Determinação da concentração de cobre e zinco no fígado**

As amostras hepáticas foram secas em estufa a 103 °C por 24 horas. Foi pesada uma amostra de aproximadamente 0,3 g de fígado seco mais 5 ml de ácido nítrico P.A. (Merck®) em tubos de vidro de 250 por 20 milímetros, os quais foram colocados em uma bloco digestor a 100° C até a completa digestão do tecido e

---

<sup>10</sup> Reverin LA® - Intervet®

<sup>11</sup> Topline spray® – Merial Saúde Animal®

evaporação parcial do ácido. Em seguida foi adicionado ao tubo 2 ml de ácido perclórico P.A. e mais 5 ml de ácido nítrico P.A., elevando-se a temperatura do bloco digestor para 200° C até a evaporação completa dos ácidos. Os tubos foram lavados com 10 ml de ácido clorídrico na concentração de 0,1 Normal, sendo esta solução final acondicionada em tubos tipo Falcon. A concentração de cobre foi determinada na solução final, tendo como base o peso seco das amostras de fígado, através de espectrofotometria de absorção atômica, segundo Ortolani (1997).

#### 4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS

Foram realizadas coletas de sangue quinzenalmente em todos os animais até o final do período experimental, totalizando 8 coletas por animal, uma no início (quinzena zero – antes dos animais receberem a 1ª dose de cobre) e mais 7 quinzenas de experimento.

As amostras de sangue foram obtidas por meio de venipuntura da jugular externa, utilizando-se tubos de coleta à vácuo. Para as determinações séricas de cobre, aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT), uréia e creatinina, o sangue foi coletado em tubos vacutainer® sem anticoagulante e, aproximadamente após três horas da coleta, foram centrifugados por dez minutos a 3.000 rpm para a obtenção do soro, que foi transferido para tubos plásticos, tipo KMA, e armazenado em freezer à 20 °C negativos, até que fossem realizadas as análises laboratoriais. As alíquotas de soro dos animais foram descongeladas em temperatura ambiente uma única vez para serem analisadas.

#### **4.5.1 Determinação do volume globular**

Para a determinação do volume globular foi utilizado um contador automático de células (ABC® - Animal Blood Counter) da marca ABX®, padronizado para bovinos. Amostras do sangue total dos animais foram coletadas em tubos vacutainers® contendo anticoagulante EDTA, os quais foram mantidos em refrigeração (4° C) imediatamente após a coleta até o momento da análise, que foi realizada, no máximo, após quatro horas.

#### **4.5.2 Concentração sérica de cobre (Cu)**

A concentração de cobre no soro foi determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS® e utilizando-se o kit comercial da marca RANDOX®.

#### **4.5.3 Concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST)**

A concentração sérica da AST determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS®, utilizando-se kit comercial BIOSYSTEMS®, seguindo a técnica enzimática descrita por Gella et al. (1985). Os resultados das atividades das enzimas foram determinados em 30 °C, segundo recomendação de Kaneko et al. (1997).

#### **4.5.4 Concentração sérica de gama glutamiltransferase (GGT)**

A concentração sérica da GGT determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS®, utilizando-se kit comercial BIOSYSTEMS®. Os resultados das atividades das enzimas foram determinados em 30 °C, segundo recomendação de Kaneko et al. (1997).

#### **4.5.5 Concentração sérica de uréia**

A concentração sérica de uréia foi determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS®, utilizando-se kit comercial BAYER®, segundo técnica descrita por Talke e Schubert (1965).

#### **4.5.6 Concentração sérica de creatinina**

A concentração de creatinina foi determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS®, utilizando-se o kit comercial SIGMA®, de acordo com a técnica cinética descrita por Lutsgarten e Wenk (1972).

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência de mortalidade pela suplementação de cobre entre espécies foi analisada pelo teste exato de Fisher (MASSAD et al., 2004). Todos os dados foram testados quanto sua distribuição, utilizando-se para tal o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que tiverem distribuição normal foram submetidos inicialmente à análise de variância (teste F) e no caso de significância foram comparados pelo teste de Tukey.

Os dados com distribuição não-paramétrica foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e expressos por mediana. Algumas variáveis que apresentaram distribuição paramétrica, mas tiveram elevado desvio-padrão em algumas de suas subparcelas, em especial nas últimas quinzenas nos grupos suplementados com cobre, comprometendo assim a comparação entre tratamentos, foram analisadas pelo método de Kruskal-Wallis. Análises de regressão e seus respectivos coeficientes de determinação, foram utilizados para a verificação da relação de pares variáveis. A significância obtida na regressão linear foi avaliada por meio de teste F (SAMPAIO, 2002). Foi adotado neste trabalho um grau de significância mínimo de 5%. A maioria das análises estatísticas foi processada com o auxílio de software estatístico (MINITAB, 2000).

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 =  $b / b + d$ ; Acurácia =  $a + d / a + b + c + d$ ; Teste Positivo de um Valor Preditivo =  $a / a + b$ ; e Teste Negativo de um Valor Negativo =  $d / c + d$ . Onde:  $a$  = verdadeiro positivo;  $b$  = falso positivo;  $c$  = verdadeiro negativo;  $d$  = falso negativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 INFORMAÇÕES GERAIS

Nenhum bovino ou bufalino dos grupos controles apresentaram qualquer alteração clínica durante o experimento. Contudo, nos grupos suplementados com cobre três bovinos e dois búfalos manifestaram, no decorrer das últimas duas quinzenas, quadro laboratorial e/ou clínico sugestivo de ICA, vindo a sucumbir. Não existiu diferença entre a frequência de mortalidade entre os bovinos e búfalos ( $P > 0,87$ ).

### 5.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dois animais, um bovino e um búfalo, apresentaram quadro clínico considerado clássico, com presença de hemoglobinúria, apatia, andar cambaleante, diminuição dos movimentos ruminais, desidratação intensa, mucosas aparentes amareladas (no búfalo a pele também se apresentava desta cor), fezes pastosas e oligúria. Esse conjunto de sintomas foi mais exuberante no búfalo que no bovino. A perda de peso foi provavelmente decorrente de 10 dias de hiporexia progressiva e de um dois (bovino) e três (búfalo) dias de anorexia, resultando numa redução de peso vivo de 12 % e 9,4 % no bovino e búfalo, respectivamente. O estado corporal



dos animais atingiu no final do quadro um escore de 2 (2/5). Esses animais sucumbiram no decorrer do segundo dia de hemoglobinúria, após serem medicados, no dia anterior, com uma dose de tetratiomolibdato (3,4 mg/kg P.V.).

Na necropsia, constatou-se coloração amarelada nas serosas, fígado com coloração amarelada, friável e com os bordos arredondados; rins de coloração enegrecida tanto na região cortical como medular; baço ligeiramente aumentado de tamanho; aparelho respiratório contendo grande quantidade de líquido espumoso desde a traquéia até os bronquíolos; a mucosa abomasal encontrava-se bastante congesta e apresentava pequenas ulcerações com cerca de 1 cm de diâmetro.

Nos exames laboratoriais, constataram-se destacadas alterações da última coleta em relação às obtidas na penúltima ou antepenúltima semana, caracterizada por diminuição do valor de volume globular e aumento das atividades de GGT e AST e da concentração de uréia e cobre séricos, mas não de creatinina. Os teores de cobre hepático, considerando as particularidades das espécies, se elevaram da primeira para a biópsia derradeira 30 e 6 vezes no bovino e búfalo, respectivamente.

Diferentemente do que se deveria esperar, parte dos animais (dois bovinos e um búfalo) que sucumbiram manifestaram um quadro atípico, até o momento não descrito na literatura. Nos três casos existiu uma redução no apetite nos animais no decorrer das últimas três semanas de vida, ou seja, ocorreu uma hiporexia progressiva por cerca de 18 dias seguida de anorexia por dois a cinco dias. Esta redução de apetite resultou em uma perda no supracitado período de 22 %, 19 % e 15 % do peso vivo nos bovinos e búfalo, respectivamente. No gráfico 1 evidencia-se o desenvolvimento ponderal dos ruminantes com quadro clássico de ICA e atípico, ressaltando a perda de peso mais precoce e pronunciada no grupo atípico.

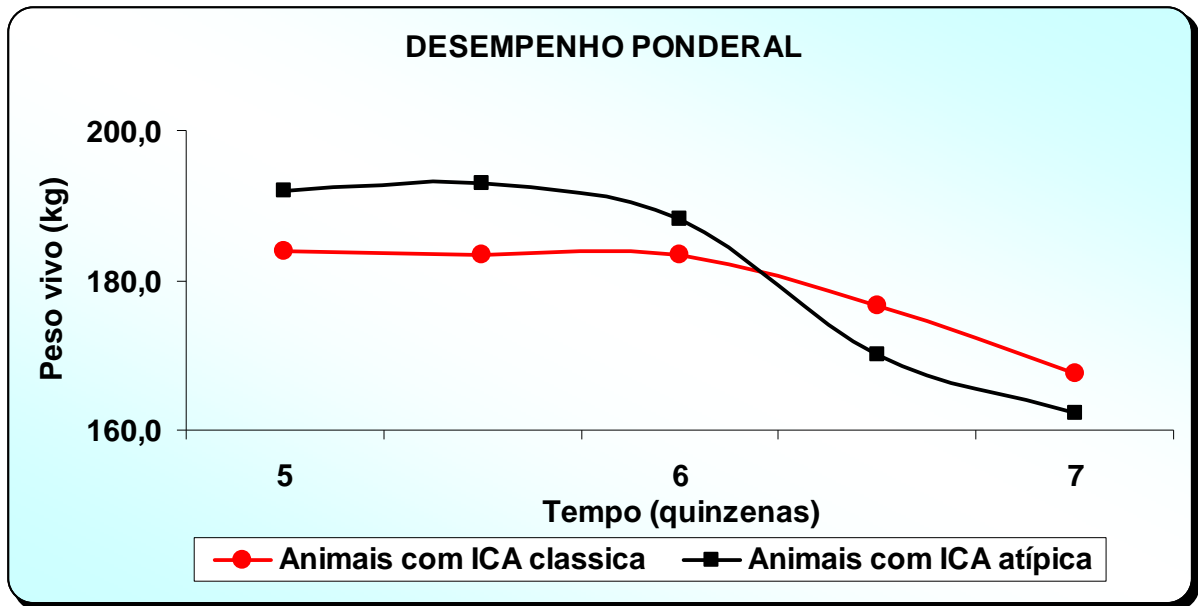


Gráfico 1 - Peso vivo médio apenas dos ruminantes intoxicados que apresentaram quadro clínico clássico ou atípico de ICA no decorrer das últimas três quinzenas - São Paulo - 2006

A condição corporal desses animais com quadro atípico atingiu o escore 1 (1/5) nos três casos. Nesse período os animais se tornaram muito desidratados, diminuíram acentuadamente o movimento de rúmen, desenvolveram oligúria e demonstraram uma marcante e crescente apatia. Eles não apresentaram, diferentes do quadro clássico, hemoglobinúria, mucosas amareladas, andar cambaleante e excreção de fezes pastosas.

À necropsia, detectaram-se nos animais uma marcante caquexia, presença de conteúdo altamente ressecado no interior do rúmen, abomaso, omaso e em menor grau nos intestinos. O fígado se encontrava com os bordos ligeiramente arredondados e os rins de coloração e aspecto normais. A urina se mostrava concentrada e de coloração amarela escura. Não foram encontradas micro úlceras abomasais como as vistas no quadro clássico. Nos resultados do último exame laboratorial em relação aos encontrados na 3ª semana precedente pode-se

constatar uma queda no volume globular dos bovinos e uma elevação no búfalo, um aumento na atividade das enzimas GGT e AST assim como nas concentrações séricas de uréia e cobre sangüíneo. Em relação à creatinina sérica verificou-se a presença de incremento na concentração nos três animais, porém enquanto que nesses bovinos (133 e 148  $\mu\text{Mol/L}$ ) os teores ainda apresentavam valores dentro da normalidade no búfalo este se elevou de maneira marcante (288  $\mu\text{Mol/L}$ ).

Semelhante aos animais com quadro clássico, também foram encontrados nos que apresentaram quadro atípico altas concentrações de cobre hepático (4389 e 4901 ppm nos bovinos e 2051 ppm nos búfalos). A tabela 1 apresenta os valores individuais das variáveis analisadas dos ruminantes que apresentaram quadro de ICA.

Tabela 1 - Variáveis sangüíneas e teor de cobre hepático dos ruminantes que apresentaram quadro clássico e atípico de ICA - São Paulo - 2006

Variáveis	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 5	Búfalo 7	Búfalo 9
Quadro clínico	Atípico	Atípico	Clássico	Clássico	Atípico
Cobre hepático (ppm)	4901	4389	3987	2053	2051
Cobre sérico ( $\mu\text{Mol/L}$ )	24,9	19,1	92,5	48,3	20,5
GGT sérica (U/L)	35	39	27	84	23
AST sérica (U/L)	348	116	162	4001	190
Uréia (mMol/L)	16	24	12	10	22
Creatinina ( $\mu\text{Mol/L}$ )	133	148	158	169	288
Volume globular	23	17	22	28	40

O fato de encontrar elevadíssimos teores de cobre no fígado de animais que apresentaram tanto o quadro clássico como o atípico, bem acima dos outros

ruminantes suplementados com o cobre e que não manifestaram sintomas, levou a agrupar os primeiros animais num único conjunto denominado de intoxicados (ICA) e os demais como assintomáticos num segundo conjunto cognominados de resistentes (R).

A fragmentação desses dois conjuntos em quatro subgrupos considerando a espécie (Bov ICA; Buf ICA; Bov R e Buf R) passou a ser válida e considerada quando foi realizada a análise dos teores de cobre na última biópsia (3<sup>a</sup>), pois existiu uma diferença significativa destacada ( $P < 0,0001$ ) entre os grupos intoxicados e resistentes dentro de cada espécie (Tabela 3). Assim sendo, os resultados a seguir exibem não apenas as comparações das variáveis entre os quatro grupos originais (Bov Cu; Buf Cu; Bov, Buf) no decorrer do experimento, mas também dos seis novos grupos (Bov ICA;Buf ICA; Bov R e Buf R; Bov; Buf) na última quinzena.

Devido ao pequeno número de repetições em alguns dos grupos intoxicados (BUF ICA = 2; BOV ICA = 3; BOV R = 3) optou-se pela utilização de métodos estatísticos não-paramétricos (Kruskal-Wallis), com apresentação dos dados em mediana.

Para uma melhor análise dos dados, nos animais que apresentaram quadro de ICA e morreram, as amostras de sangue coletadas na semana derradeira e as amostras de fígado coletadas na necrópsia foram consideradas como a última coleta (7<sup>a</sup> quinzena e 3<sup>a</sup> biópsia, respectivamente).

A tabela 2 apresenta a dose total de cobre por kg de peso metabólico oferecida aos ruminantes, até o momento do quadro severo de ICA nos animais deste grupo e até o final do experimento nos animais resistentes.

Tabela 2 - Dose de cobre por kg de peso metabólico oferecida aos ruminantes - São Paulo - 2006

Grupos	Gramas de cobre / kg de peso metabólico		
	N	Média	DP
BOV ICA	3	5,5	0,42
BUF ICA	2	4,1	0,07
BOV R	3	6,1	0,21
BUF R	4	6,0	0,15

### 5.3 DESENVOLVIMENTO PONDERAL

No gráfico 2 está exposto o ganho de peso acumulado dos animais dos diversos grupos no decorrer do experimento, onde se nota nitidamente que os bovinos e búfalos suplementados na última quinzena uma diminuição no peso corporal.

No gráfico 3 foi computado todo o balanço de ganho de peso dos quatro subgrupos. Devido a uma grande variação individual dos resultados apenas o grupo BUF teve ganho de peso global superior ao BOV ICA ( $P < 0,03$ ).

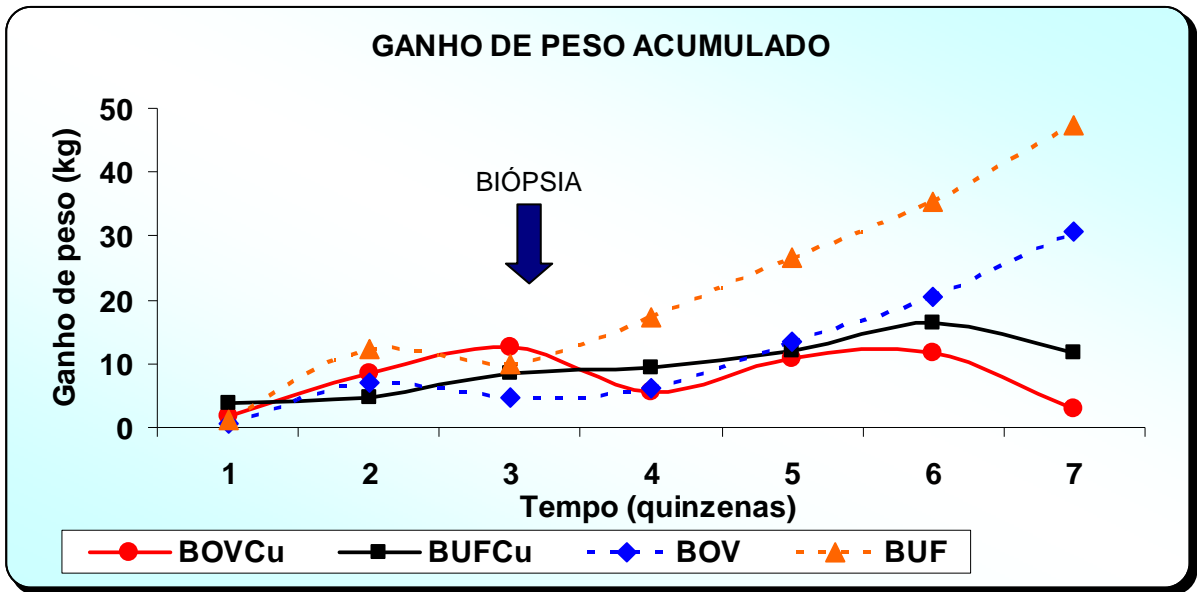


Gráfico 2 - Ganho de peso acumulado, em relação ao peso inicial, dos ruminantes nos quatro grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

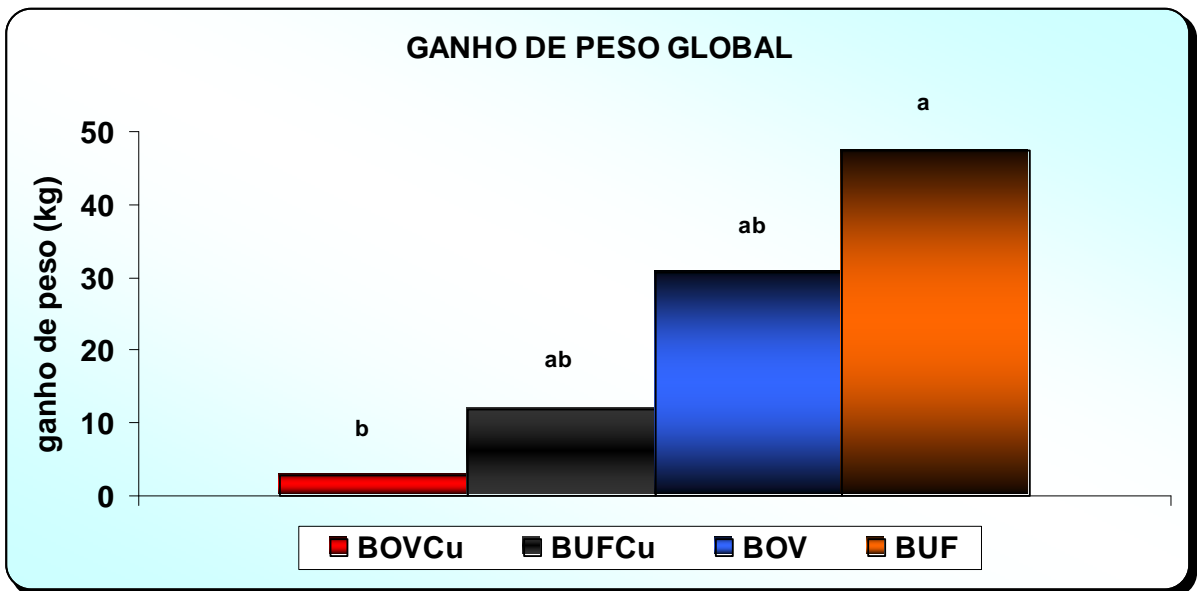


Gráfico 3 - Ganho de peso total nos diferentes grupos, obtido pela diferença entre o peso vivo no início e final, do experimento. Letras diferentes nas seqüências de dados apresentam diferença pelo teste de kruskal-Wallis ( $P < 0,03$ ) - São Paulo - 2006

No gráfico 4 foram fracionados os dois subgrupos suplementados com cobre de acordo com a resistência ou não à intoxicação cúprica. Com esta consideração a avaliação estatística evidenciou nitidamente agora uma diferença entre os grupos com ICA e os resistentes e controles ( $P < 0,001$ ).

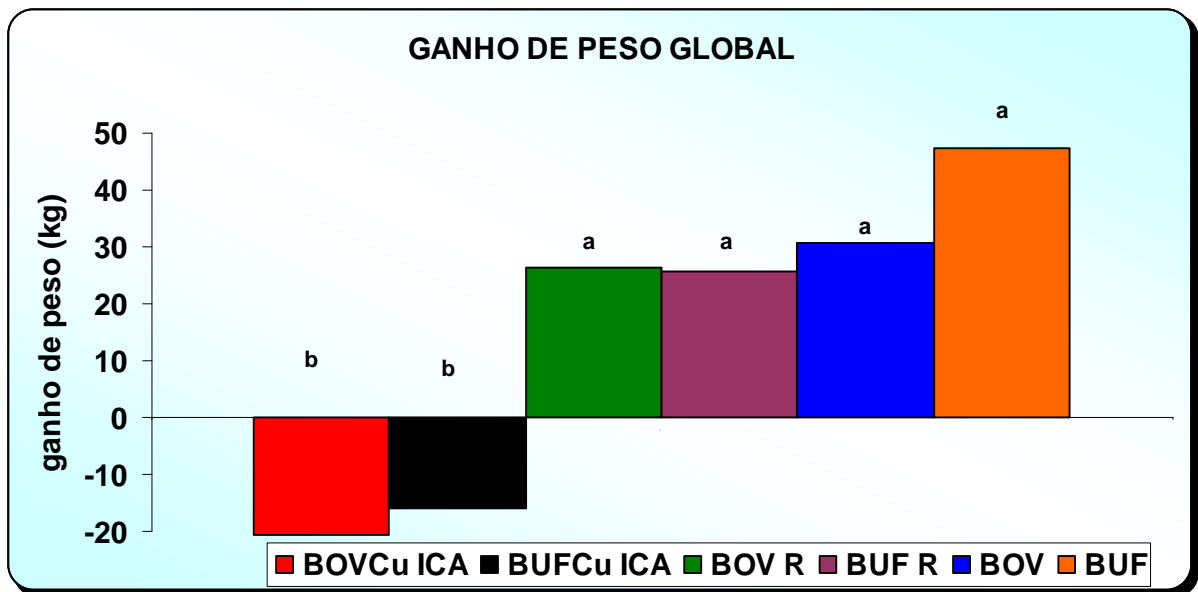


Gráfico 4 - Ganho de peso total entre o início e o final do experimento considerando-se os subgrupos de animais intoxicados e resistentes. Letras diferentes nas seqüências de dados apresentam diferença pelo teste de kruskal-Wallis ( $P < 0,001$ ) - São Paulo - 2006

#### 5.4 TEORES DE COBRE NO FÍGADO.

A tabela 3 apresenta os valores médios da concentração hepática de cobre dos grupos experimentais nas três biópsias realizadas durante o experimento. Destaca-se nesta tabela o aumento progressivo nos teores de cobre nos dois grupos

suplementados com cobre, enquanto que não existiu diferença dentro dos grupos controles. Ainda deve-se citar que os ruminantes suplementados com cobre apresentaram maiores teores de cobre que os respectivos grupos controle.

Tabela 3 - Mediana dos teores de cobre hepático (ppm) em bovinos e búfalos dos grupos suplementados e controles - São Paulo - 2006

Quinzenas	Cobre Hepático (ppm)			P
	Mediana			
	1ª Biópsia	2ª Biópsia	3ª Biópsia	
	Dia 0	Dia 45	Dia 105	
BOV Cu	168 <sup>cB</sup>	524 <sup>bA</sup>	2620 <sup>aA</sup>	0,001
BUF Cu	374 <sup>aA</sup>	649 <sup>bA</sup>	1698 <sup>cA</sup>	0,001
BOV	92 <sup>B</sup>	102 <sup>B</sup>	92 <sup>B</sup>	0,874
BUF	197 <sup>B</sup>	170 <sup>B</sup>	175 <sup>B</sup>	0,396
P	0,007	0,002	0,003	-

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,001$ ).

O gráfico 5 ilustra os teores de cobre hepático (ppm) nos vários grupos experimentais, explicitados na tabela 1, no decorrer do experimento.



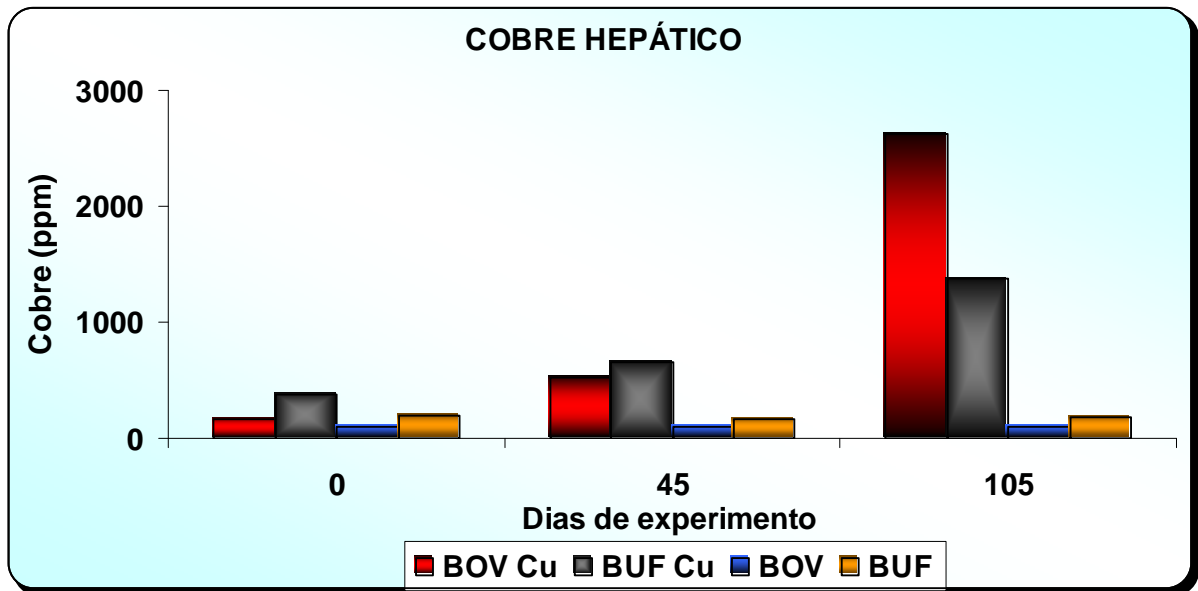


Gráfico 5 - Valores de mediana dos teores de cobre hepático (ppm) dos vários grupos experimentais nas três biópsias seqüenciais - São Paulo - 2006

A tabela 4 apresenta a análise comparativa da concentração de cobre hepático, apenas na última biópsia, entre os animais que apresentaram sintomas de ICA, os animais resistentes e os grupos controle de ambas as espécies. Os bovinos intoxicados por cobre apresentaram maior teor deste microelemento no fígado que os outros três subgrupos suplementados, os quais foram superiores aos grupos controles. Os búfalos ICA foram superiores aos resistentes ( $P < 0,001$ ).

Tabela 4 - Mediana da concentração hepática de cobre (ppm) na última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006

Grupos	Cobre hepático (ppm) - 3º biópsia - Dia 105	
	N	Mediana
BOV Cu ICA	3	4389 <sup>a</sup>
BOV Cu R	3	1140 <sup>bc</sup>
BUF Cu ICA	2	2052 <sup>b</sup>
BUF Cu R	4	1322 <sup>c</sup>
BOV	4	93 <sup>d</sup>
BUF	4	175 <sup>d</sup>

Letras minúsculas diversas na coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,0001$ ).

## 5.5 TEORES DE ZINCO NO FÍGADO

A tabela 5 apresenta os teores de zinco hepático no decorrer do experimento nos quatro grupos originais. Deve-se ressaltar nesta tabela o aumento nos teores de zinco na última biópsia no grupo búfalo em relação às duas primeiras amostragens; na 3ª biópsia foram encontradas maiores concentrações no grupo Bov Cu em relação aos demais grupos .

Tabela 5 - Mediana dos teores de zinco hepático (ppm) em bovinos e búfalos de grupos suplementados e controles - São Paulo - 2006

Quinzenas	Mediana do teores de Zinco hepático (ppm)			P
	1ª Biópsia	2ª Biópsia	3ª Biópsia	
	Dia 0	Dia 45	Dia 105	
BOV Cu	120 <sup>A</sup>	122 <sup>A</sup>	219 <sup>A</sup>	0,121
BUF Cu	87 <sup>bB</sup>	89 <sup>bB</sup>	133 <sup>aA</sup>	0,003
BOV	136 <sup>aA</sup>	117 <sup>aA</sup>	90 <sup>aB</sup>	0,012
BUF	73 <sup>C</sup>	76 <sup>B</sup>	77 <sup>C</sup>	0,437
P	0,002	0,002	0,002	

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa.

O gráfico 6 ilustra os teores hepáticos de zinco no decorrer do experimento.

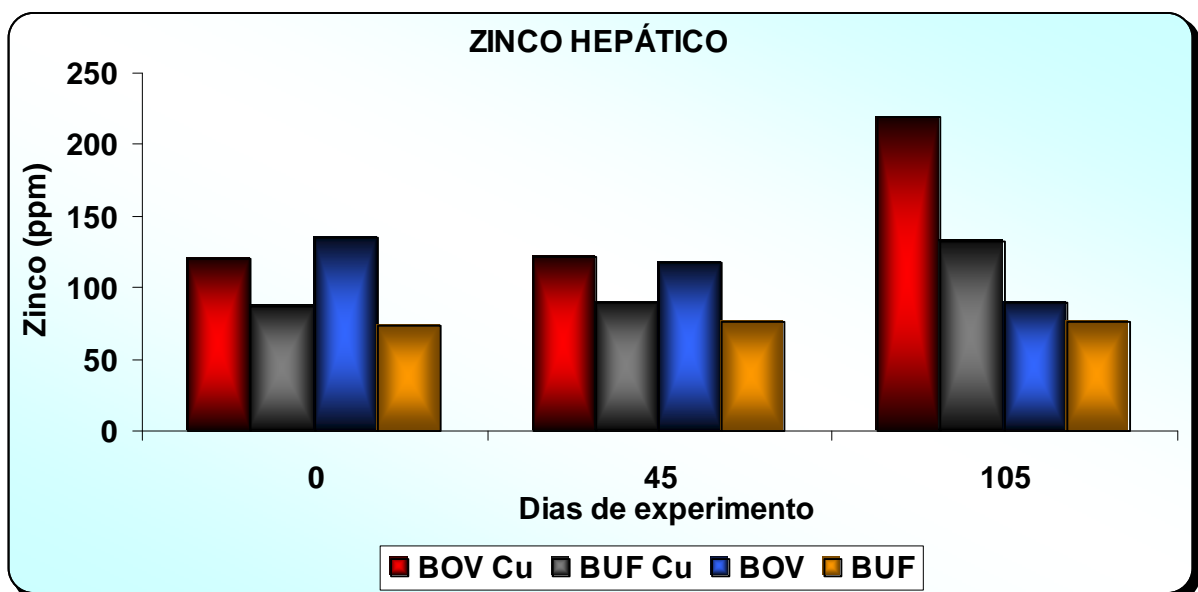


Gráfico 6 - Valores de mediana dos teores de zinco hepático (ppm) dos vários grupos experimentais nas três biópsias sequenciais - São Paulo - 2006

A tabela 6 apresenta os teores de zinco hepático considerando os grupos de animais intoxicados e resistentes e seus respectivos controles. Deve-se ressaltar nesta tabela os maiores teores de cobre no grupo Bov ICA que nos demais grupos suplementados, os quais foram superiores aos grupamentos controles ( $P < 0,05$ ).

Tabela 6 - Mediana da concentração hepática de zinco (ppm) na última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006

Grupos	Zinco hepático (ppm) - 3ª biópsia - Dia 105	
	N	Mediana
BOV Cu ICA	3	574 <sup>A</sup>
BOV Cu R	3	131 <sup>B</sup>
BUF Cu ICA	2	126 <sup>B</sup>
BUF Cu R	4	144 <sup>B</sup>
BOV	4	90 <sup>C</sup>
BUF	4	77 <sup>D</sup>

Letras maiúsculas diversas na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

## 5.6 RELAÇÃO COBRE E ZINCO HEPÁTICO

O gráfico 7 ilustra a relação entre os teores hepáticos de cobre e de zinco na última biópsia realizada ao término do experimento em ruminantes de todos os grupos. Deve-se ressaltar o alto valor do coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,81$ ) indicando a alta influência do cobre sobre a concentração de zinco neste órgão.

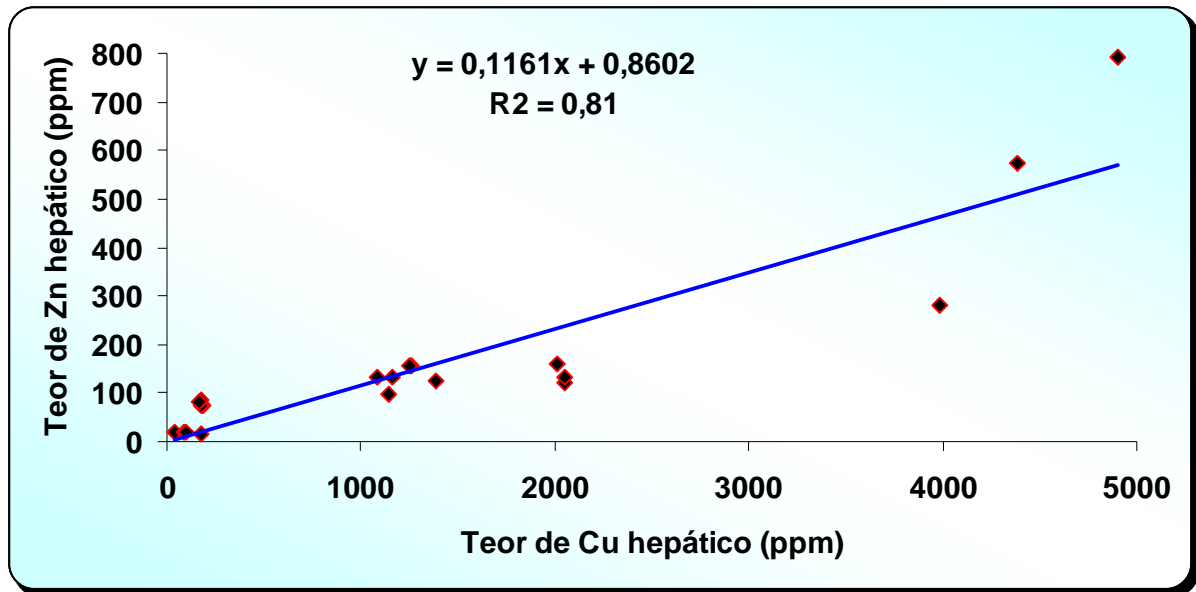


Gráfico 7 - Relação entre os teores hepáticos de cobre e zinco na última biópsia do experimento em ruminantes de todos os grupos - São Paulo - 2006

### 5.7 RAZÃO Cu/Zn NO FÍGADO

A tabela 7 apresenta os resultados da relação Cu:Zn no decorrer do experimento. Deve-se destacar nesta tabela 5 o aumento da razão cobre/zinco na última biópsia em relação às duas amostragens anteriores dentro dos grupos suplementados com cobre ( $P < 0,001$ ). Na 3ª biópsia a razão foi superior no grupo Buf Cu, seguido do Bov. Cu, o qual foi superior aos dois grupos controles ( $P < 0,001$ ).

Tabela 7 - Razão dos teores de Cu:Zn hepático da última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006

Quinzenas	Razão Cobre / Zinco hepático			P
	média ± DP			
	1ª Biópsia Dia 0	2ª Biópsia Dia 45	3ª Biópsia Dia 105	
BOV Cu	1,7 ± 0,7 <sup>bBC</sup>	4,1 ± 1,0 <sup>bB</sup>	9,3 ± 3,0 <sup>aA</sup>	0,001
BUF Cu	4,3 ± 0,6 <sup>bA</sup>	7,7 ± 2,5 <sup>bA</sup>	12,2 ± 3,6 <sup>aA</sup>	0,001
BOV	0,7 ± 0,4 <sup>C</sup>	1,0 ± 0,5 <sup>C</sup>	1,1 ± 0,6 <sup>B</sup>	0,589
BUF	2,7 ± 0,5 <sup>B</sup>	2,3 ± 0,3 <sup>BC</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>B</sup>	0,246
P	0,001	0,001	0,001	-

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ( $p < 0,001$ ).

Na tabela 8 encontram-se os valores de media da razão cobre/zinco hepático de animais com ICA, resistentes e os grupos controles. A razão foi superior no grupo Buf ICA que nos demais grupos suplementados com Cu, os quais foram maiores que os grupos controles ( $P < 0,0001$ ).

Tabela 8 - Razão dos teores de Cu:Zn hepático da última biópsia nos subgrupos intoxicados e resistentes e nos animais controles das duas diferentes espécies animais - São Paulo - 2006

Grupos	Razão Cobre / Zinco hepático		
	3ª biópsia – Dia 105		
	N	Média	±DP
BOV Cu ICA	3	9,3 <sup>B</sup>	4,3
BOV Cu R	3	9,2 <sup>B</sup>	1,9
BUF Cu ICA	2	16,3 <sup>A</sup>	1,2
BUF Cu R	4	10,1 <sup>B</sup>	2,1
BOV	4	1,1 <sup>C</sup>	0,6
BUF	4	2,3 <sup>C</sup>	0,2

Letras maiúsculas diversas na coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,01$ ).

## 5.8 COBRE SÉRICO

A tabela 9 apresenta os valores do cobre sérico no decorrer do experimento. Deve-se ressaltar que nas últimas duas semanas os bovinos suplementados foram superiores aos grupos controles. A partir da 4ª quinzena os teores de cobre passaram a serem maiores que os momentos anteriores dentro do grupo Bov Cu.

Tabela 9 - Mediana do cobre sérico dos ruminantes dos grupos tratados com cobre e controle no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

Quinzenas	Mediana do Cobre sérico ( $\mu\text{Mol/L}$ )				P
	BOV Cu	BUF Cu	BOV	BUF	
0	11,0 <sup>B</sup>	10,8	8,9	11,9	0,608
1	8,4 <sup>B</sup>	11,4	9,4	14,3	0,700
2	9,9 <sup>B</sup>	11,1	6,0	10,2	0,058
3	9,5 <sup>B</sup>	10,5	10,3	11,9	0,074
4	16,6 <sup>A</sup>	18,1	10,5	13,0	0,208
5	14,6 <sup>A</sup>	17,2	8,4	10,8	0,090
6	14,2 <sup>aA</sup>	13,4 <sup>ab</sup>	7,8 <sup>c</sup>	10,1 <sup>bc</sup>	0,009
7	17,6 <sup>aA</sup>	12,8 <sup>ab</sup>	10,9 <sup>b</sup>	11,4 <sup>b</sup>	0,041
P	0,001	0,105	0,140	0,106	-

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Percebe-se uma elevação nos teores séricos de cobre dos bovinos suplementados com este mineral a partir da 4<sup>o</sup> quinzena do experimento. Houve diferença significativa entre desde o início do experimento até a 3<sup>o</sup> quinzena e a última quinzena, com uma elevação de 3 vezes dos valores iniciais.

O gráfico 8 apresenta a concentração média de cobre no soro dos grupos tratados com cobre no decorrer do experimento.



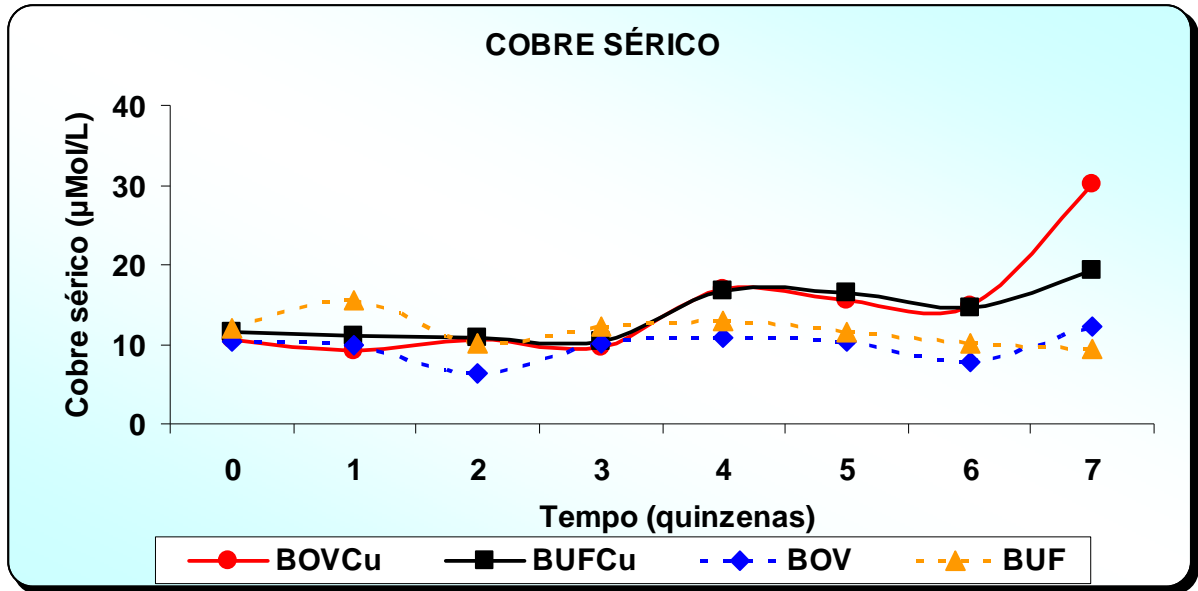


Gráfico 8 - Concentrações médias do cobre sérico nos diferentes grupos no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

A tabela 10 contém os valores do cobre sérico na última quinzena nos subgrupos de animais intoxicados, resistentes e controles. Destaca-se nesta tabela a diferença observada entre os ruminantes que apresentaram quadro de ICA em relação aos grupos resistentes e controle, e a similaridade dos resultados entre estes últimos grupos ( $P < 0,033$ ).

Tabela 10 - Análise comparativa do cobre sérico entre os subgrupos intoxicados e resistentes na última quinzena do experimento - São Paulo - 2006

Grupos	Cobre sérico - 7 <sup>a</sup> quinzena	
	N	Mediana
BOV Cu ICA	3	24,86 <sup>A</sup>
BOV Cu R	3	15,04 <sup>B</sup>
BUF Cu ICA	2	34,41 <sup>A</sup>
BUF Cu R	4	11,67 <sup>B</sup>
BOV	4	12,20 <sup>B</sup>
BUF	4	10,61 <sup>B</sup>

Letras Maiúsculas diversas na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,033$ ).

## 5.9 CONCENTRAÇÃO DE GAMA GLUTAMILTRANSFERASE (GGT) SÉRICA

A tabela 11 apresenta a análise comparativa da GGT sérica entre os grupos experimentais e a variação intragrupo nas subseqüentes quinzenas do experimento.

Tabela 11 - Mediana da atividade de GGT sérica nos diferentes grupos no decorrer do experimento - São Paulo – 2006

Quinzenas	Mediana GGT sérica (U/L)				P
	BOV Cu	BUF Cu	BOV	BUF	
0	10 <sup>C</sup>	13 <sup>B</sup>	10	8	0,118
1	10 <sup>C</sup>	16 <sup>B</sup>	9	13	0,132
2	13 <sup>C</sup>	15 <sup>B</sup>	12	12	0,190
3	13 <sup>C</sup>	16 <sup>B</sup>	13	1	0,598
4	16 <sup>BC</sup>	18 <sup>B</sup>	15	12	0,225
5	20 <sup>B</sup>	21 <sup>B</sup>	11	11	0,073
6	27 <sup>a AB</sup>	28 <sup>a AB</sup>	12 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	0,050
7	37 <sup>a A</sup>	26 <sup>a A</sup>	11 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>	0,003
P	0,001	0,006	0,382	0,399	-

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,01$ ).

Nas últimas duas quinzenas as atividades de GGT foram maiores nos grupos de bovinos e búfalos suplementados com cobre. Dentro do grupo BOV Cu existiu incremento efetivo na atividade da GGT, em relação ao momento basal, já na 5ª quinzena a qual teve valores menores que na 7ª quinzena. Nos búfalos a GGT teve atividades superiores apenas na última quinzena. Os grupos controle não apresentaram diferença nem entre as diferentes quinzenas no decorrer do experimento nem entre a espécie animal.

O gráfico 9 apresenta a concentração média de GGT no soro dos bovinos e búfalos dos grupos suplementados com cobre e controle.

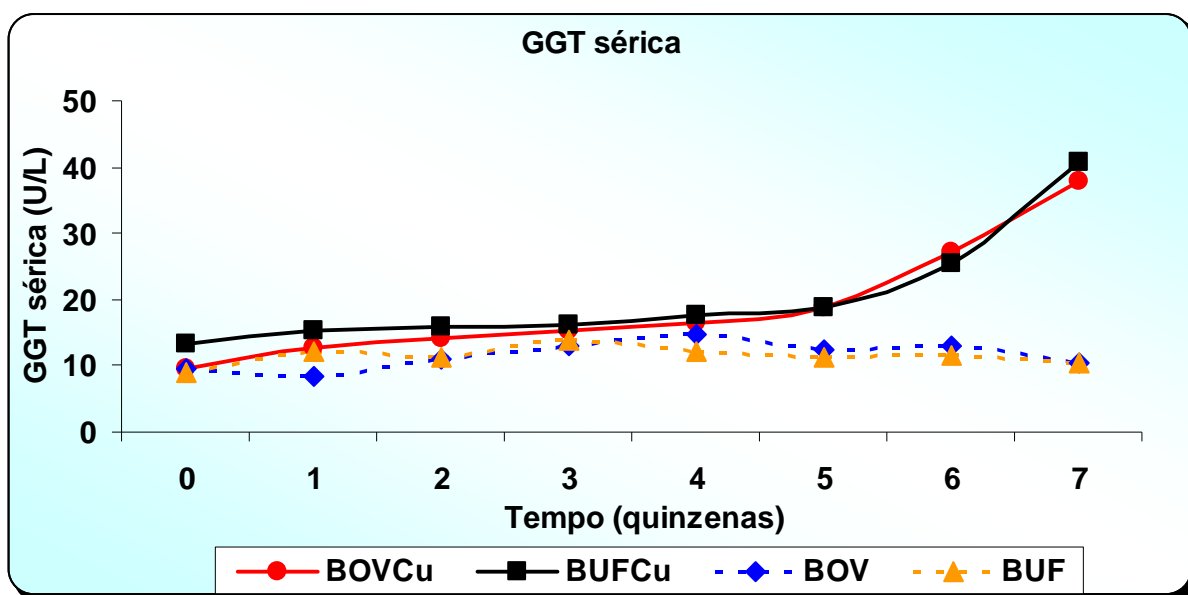


Gráfico 9 - Variação quinzenal da média da atividade de GGT no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

Na tabela 12 encontram-se os resultados da ultima quinzena do experimento avaliando-se os grupos de acordo com a presença ou não de quadro de ICA. Fica patente na avaliação da tabela que todos os animais suplementados com cobre apresentaram aumento expressivo na atividade da enzima GGT em relação ao controle.

Tabela 12 - Mediana da atividade de GGT sérica na última quinzena, considerando os subgrupos de ruminantes intoxicados e resistentes - São Paulo - 2006

Grupos	GGT sérica - 7 <sup>o</sup> quinzena	
	N	Mediana
BOV Cu ICA	3	35 <sup>A</sup>
BOV Cu R	3	47 <sup>A</sup>
BUF Cu ICA	2	54 <sup>A</sup>
BUF Cu R	4	26 <sup>A</sup>
BOV	4	12 <sup>B</sup>
BUF	4	12 <sup>B</sup>

Letras Maiúsculas diversas na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Observa-se que não houve diferença entre os grupos intoxicados e resistentes, contudo os valores de ambos os grupos foram superiores aos dos grupos controle, o que indica um certo nível de lesão hepática relacionada ao excesso de cobre na dieta e sua acumulação no fígado.

Na análise dos coeficientes de determinação da relação entre teor de cobre hepático e GGT apurou-se que este foi menor ( $R^2 = 0,33$ ) quando as amostras de bovinos e búfalos foram agrupadas (não mostrado), assim optou-se por realizar tal coeficiente separadamente em cada espécie.

Em bovinos, a melhor equação de regressão teve uma equação com expressão potencial, com o coeficiente de determinação de 0,5838 (Gráfico 10).

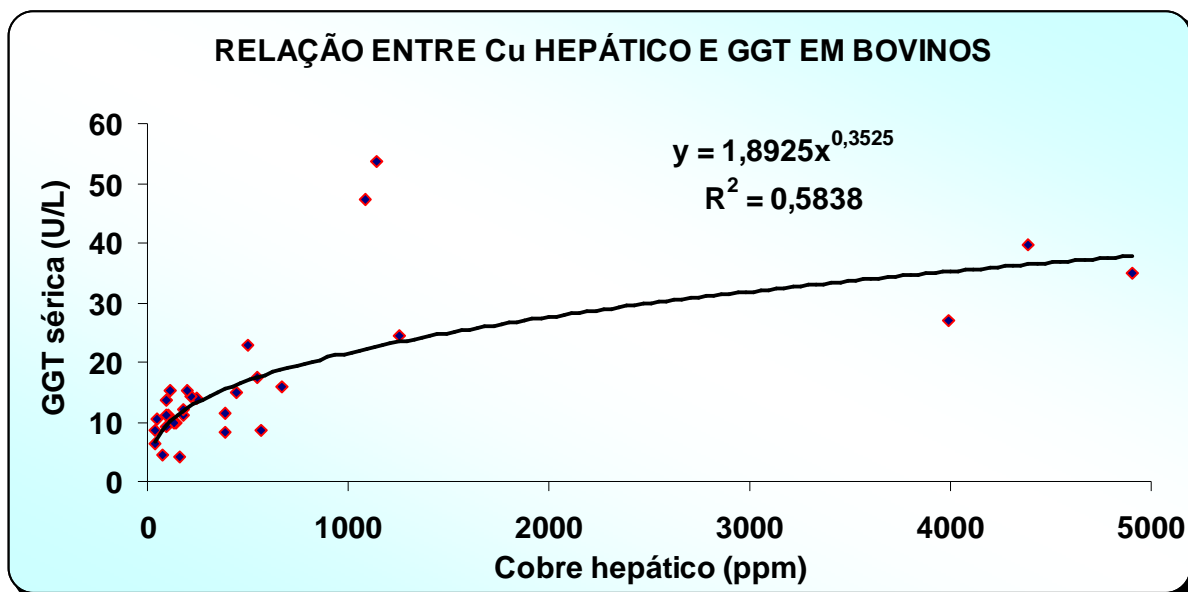


Gráfico 10 - Relação e coeficiente de determinação entre o cobre hepático e a GGT em bovinos - São Paulo - 2006

Já em búfalos a melhor equação de regressão obtida teve expressão exponencial, com o coeficiente de determinação igual a 0,5707 (Gráfico 11).

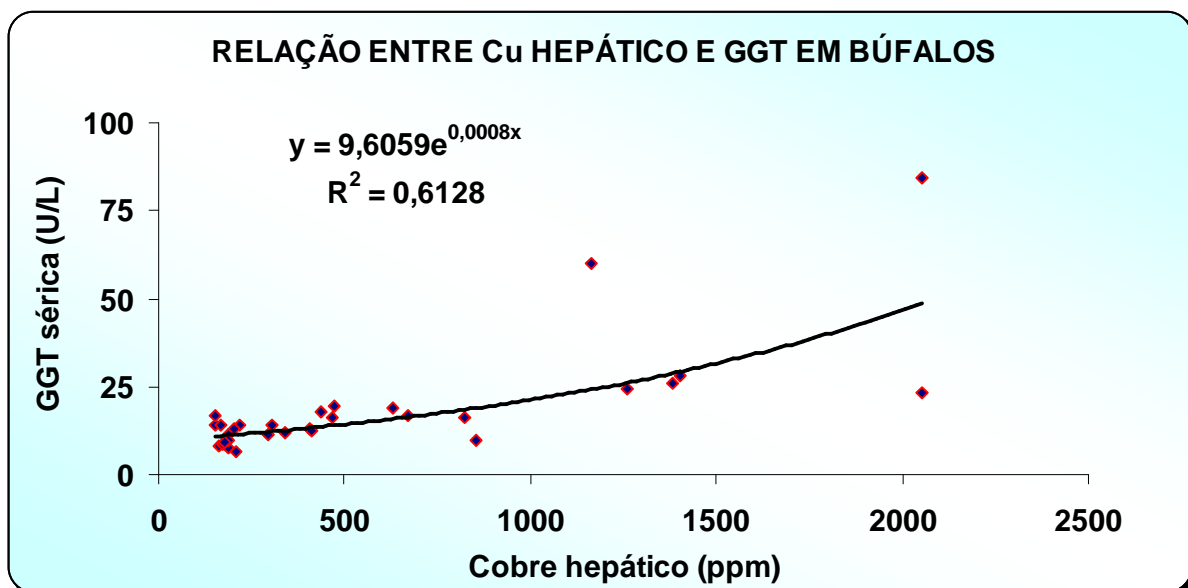


Gráfico 11 - Relação e coeficiente de determinação entre o cobre hepático e a GGT em búfalos - São Paulo - 2006

Considerando-se o valor de 1.000 ppm, tanto para bovinos como búfalos, como um acúmulo de cobre hepático indicativo de desencadeamento de ICA buscou-se a melhor linha de corte das atividades de GGT em ambas as espécies, para poder indicada como diagnóstica. Para tal foram utilizados os valores preditivos tanto positivo (probabilidade de risco de doença num animal com teste positivo) como negativo (probabilidade de um animal não ter risco de doença quando o teste é negativo).

Em bovinos esses valores preditivos positivos e negativos foram máximos (100 %) quando a atividade de GGT foi 24,6 U/L (gráfico 12). Como não foram encontrados nenhum dos pontos no quadrante 1 (resultados falso positivos) e nem no 4 (falsos negativos) obteve-se uma sensibilidade, especificidade e acurácia de 100 %.

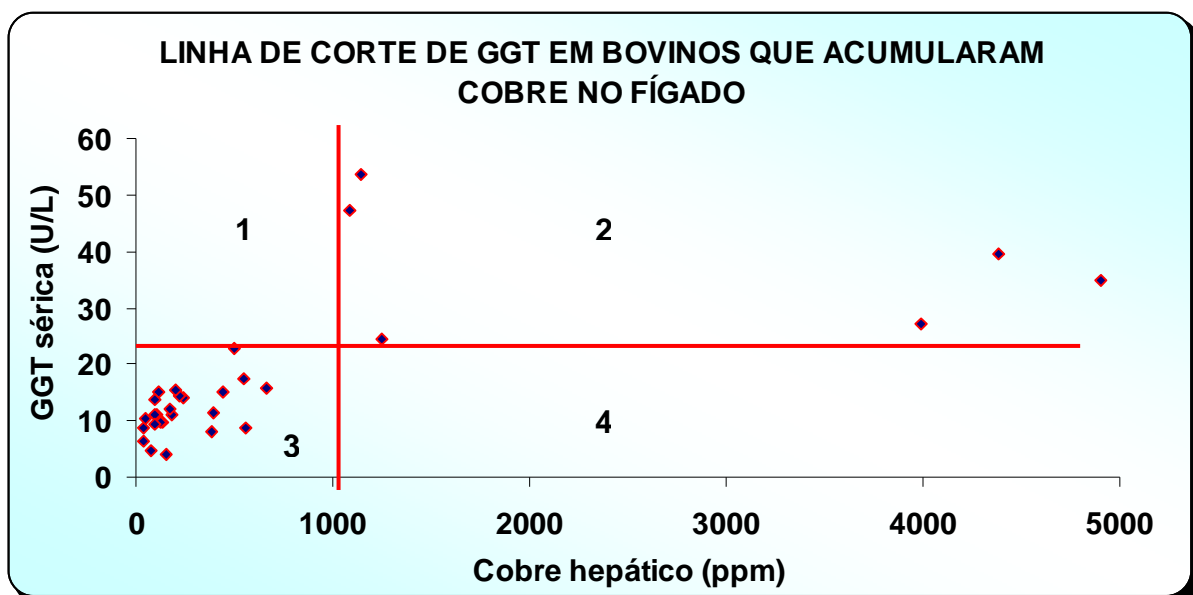


Gráfico 12 - Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo de GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em bovinos. Números de 1 a 4 no gráfico representam os quadrantes - São Paulo - 2006

No caso dos búfalos apurou-se melhor a linha de corte na atividade de GGT em 20 U/L. Semelhante aos bovinos, não foram encontrados resultados nos quadrante 1 e 4, obtendo-se assim valores preditivos positivos e negativos máximos (100 %), assim como sensibilidade, especificidade e acurácia também máximas (Gráfico 13).

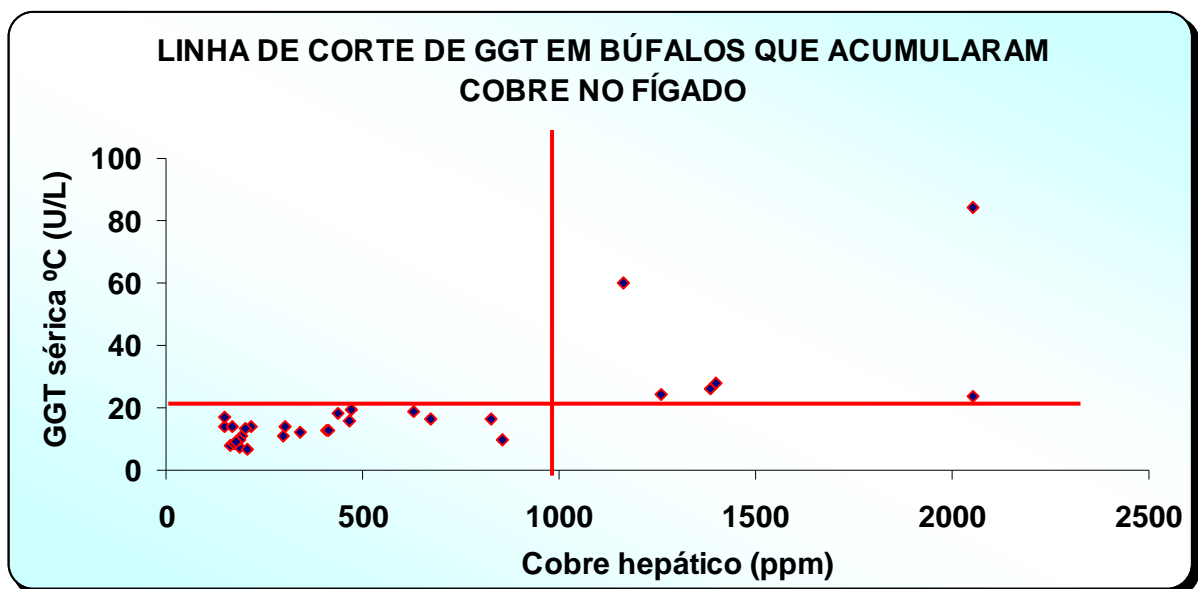


Gráfico 13 - Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo de GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em búfalos - São Paulo - 2006



### 5.10 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

A tabela 13 apresenta os resultados da AST dos quatro grupos no decorrer do experimento. O grupo Bov CU apresentou na 7<sup>a</sup> quinzena aumento na atividade de AST; na maioria das quinzenas os grupos de búfalos apresentaram valores superiores de AST que os bovinos.

Tabela 13 – Média da atividade da AST no soro de bovinos e búfalos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

Quinzenas	Média da atividade de AST sérica (U/L)				P
	BOV Cu	BUF Cu	BOV	BUF	
0	40 ± 8,8 <sup>c B</sup>	118 ± 28,4 <sup>b</sup>	61 ± 9,2 <sup>c A</sup>	187 ± 33,9 <sup>a B</sup>	0,000
1	45 ± 3,7 <sup>c B</sup>	136 ± 40,5 <sup>b</sup>	76 ± 12,1 <sup>c A</sup>	210 ± 25,6 <sup>a A</sup>	0,000
2	51 ± 6,7 <sup>c B</sup>	149 ± 19,4 <sup>a</sup>	86 ± 20,7 <sup>b A</sup>	153 ± 15,6 <sup>a B</sup>	0,000
3	52 ± 7,0 <sup>c B</sup>	140 ± 12,4 <sup>a</sup>	60 ± 8,4 <sup>c A</sup>	125 ± 19,9 <sup>b C</sup>	0,000
4	57 ± 17,5 <sup>b B</sup>	136 ± 33,2 <sup>a</sup>	46 ± 9,9 <sup>b B</sup>	118 ± 13,2 <sup>a C</sup>	0,000
5	89 ± 64,7 <sup>AB</sup>	125 ± 24,7	76 ± 20,6 <sup>A</sup>	118 ± 19 <sup>C</sup>	0,215
6	76 ± 31,1 <sup>b B</sup>	144 ± 40,2 <sup>a</sup>	78 ± 16,2 <sup>b A</sup>	146 ± 10,1 <sup>a B</sup>	0,001
7	162 ± 95,0 <sup>A</sup>	815 ± 1563	90 ± 10,2 <sup>A</sup>	149 ± 28,4 <sup>B</sup>	0,490
P	0,000	0,362	0,003	0,000	-

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P < 0,01).

O gráfico 14 apresenta os valores médios de AST durante o experimento.

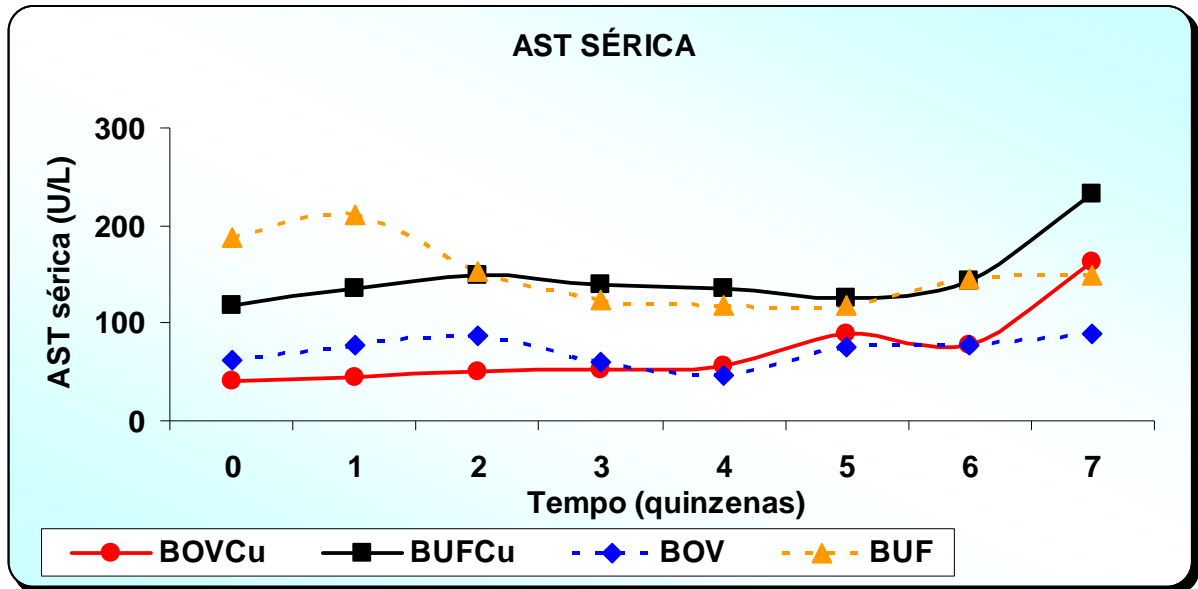


Gráfico 14 - Variação média da atividade da AST durante o experimento. \* O valor de um animal do grupo BUF Cu na ultima quinzena teve seu valor excluído para possibilitar uma melhor visualização dos dados - São Paulo - 2006

A tabela 14 apresenta a análise comparativa da AST dos animais intoxicados e resistentes e controles na ultima quinzena. Os bovinos controles apresentaram menores valores de mediana que os com ICA e os búfalos controle ( $P < 0,02$ ). Embora o valor de mediana do grupo Buf ICA tenha sido muito mais alta que os demais grupos devido a enorme discrepância dos dois dados impossibilitou de demonstrar diferença significativa, mesmo se utilizando um teste não-paramétrico.

Tabela 14 - Mediana da atividade da AST sérica na ultima quinzena considerando os subgrupos de ruminantes intoxicados e resistentes - São Paulo - 2006

Grupos	AST sérica – 7ª quinzena (U/L)	
	N	Mediana
BOV Cu ICA	3	161,7 <sup>A</sup>
BOV Cu R	3	102,3 <sup>AB</sup>
BUF Cu ICA	2	2096 <sup>AB</sup>
BUF Cu R	4	129,9 <sup>AB</sup>
BOV	4	88,85 <sup>B</sup>
BUF	4	140,60 <sup>A</sup>

Letras diversas na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

De forma até mais marcante do que aconteceu no caso da GGT, o coeficiente de determinação entre os teores hepáticos e a atividade da AST foi inexpressivo ( $R^2 = 0,32$ ) quando foram analisados os dados de bovinos e búfalos juntos. Porém, quando os dados de bovinos foram analisados em separado obteve-se um coeficiente de determinação alto e uma regressão com equação de primeiro grau (Gráfico 15). No caso dos búfalos o coeficiente de determinação foi bem mais baixo que o obtido com bovinos e a equação de regressão foi linear (Gráfico 16).

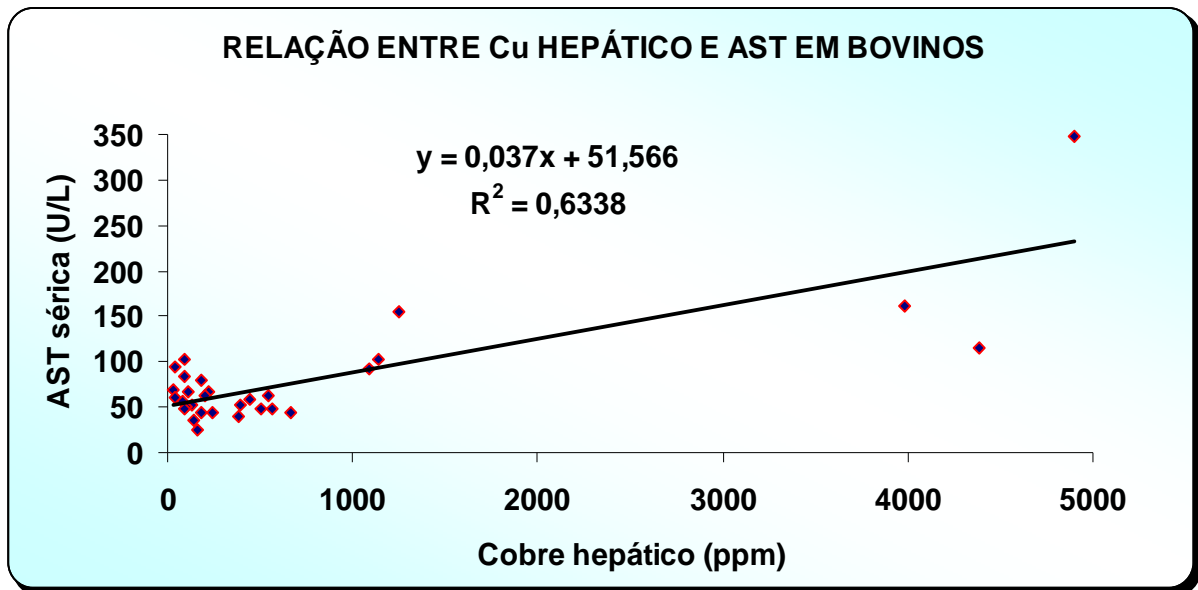


Gráfico 15 - Relação e coeficiente de determinação entre a atividade da AST e o cobre hepático em bovinos - São Paulo - 2006

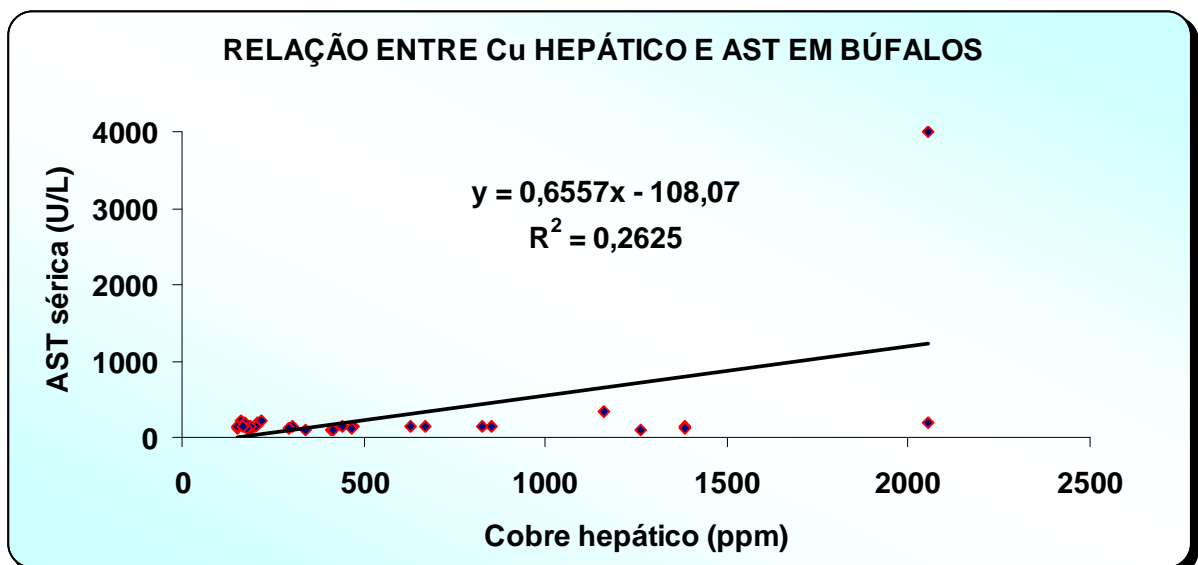


Gráfico 16 - Relação e coeficiente de determinação entre a atividade da AST e o cobre hepático em búfalos - São Paulo - 2006

Utilizando-se a mesma linha de corte no concernente ao cobre hepático (1000 ppm) apurou-se que a melhor linha de corte para o AST foi de 90 U/L (Gráfico 17). Com essas delimitações obteve-se um valor preditivo positivo de 75 % e valor preditivo negativo de 100 %, uma sensibilidade de 100% , especificidade de 91,7 % e acurácia de 93,3 %.

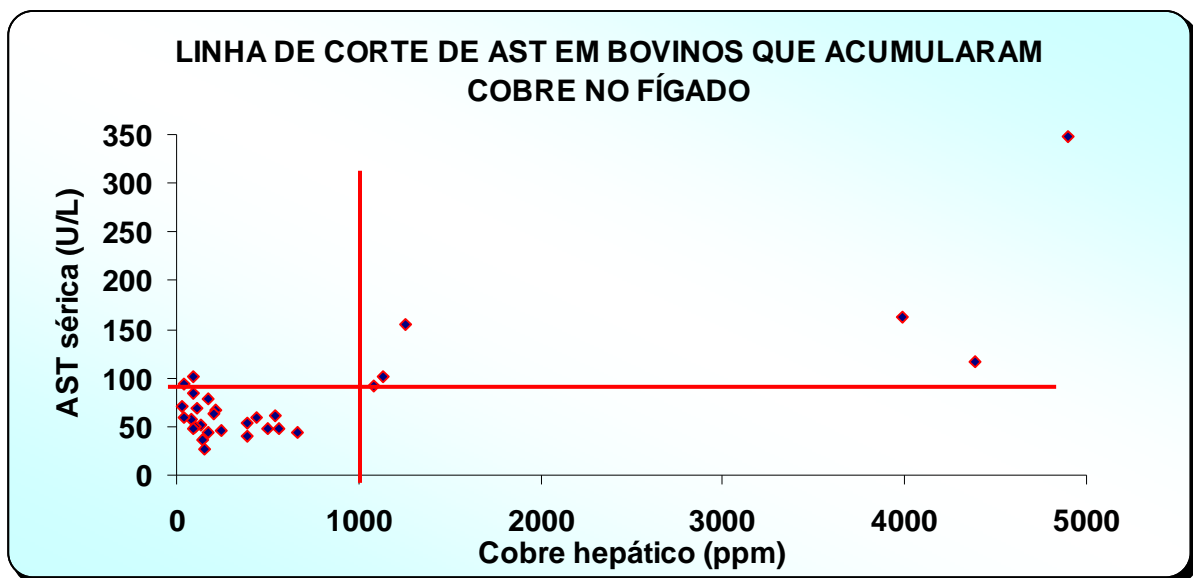


Gráfico 17 - Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em bovinos - São Paulo - 2006

No caso dos búfalos a melhor linha de corte para atividade de AST foi de 180 U/L. Com este valor avaliou-se o valor preditivo positivo de 46 % e valor preditivo negativo de 86 %, uma sensibilidade de 50 % e especificidade de 83 % e acurácia de 76,7 % (Gráfico 18).

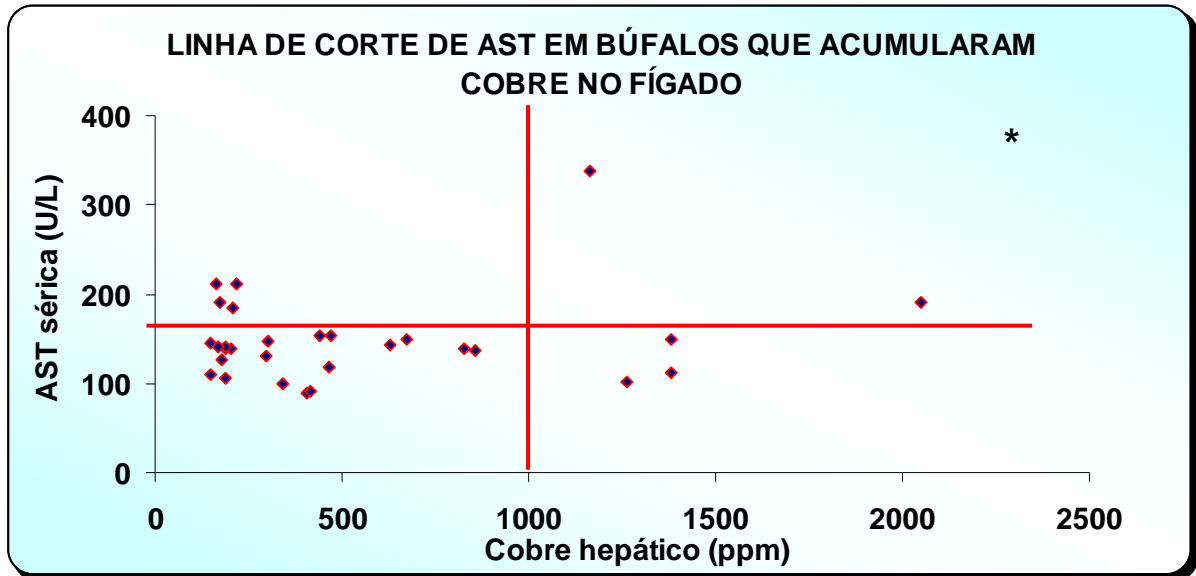


Gráfico 18 - Linha de corte (“cut-off line”) indicativa do valor preditivo de GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em búfalos. \* Para uma melhor visualização da linha de corte foi omitido neste gráfico um ponto de dados no valor de 4001 U/L de AST - São Paulo - 2006

### 5.11 URÉIA SÉRICA

Na tabela 15 estão expostos os valores de média da uréia sérica em ruminantes suplementados ou não com cobre. Deve-se destacar os aumentos de concentração no grupo Bov Cu na última quinzena.

Tabela 15 - Valores médios de uréia no soro dos ruminantes no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

Quinzenas	Uréia sérica (mMol/L)				P
	Média ± DP				
	BOV Cu	BUF Cu	BOV	BUF	
0	4,7 ± 1,0 <sup>a AB</sup>	6,1 ± 2,0 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,4 <sup>b C</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>b B</sup>	0,001
1	4,2 ± 1,1 <sup>a B</sup>	5,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>b C</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>b B</sup>	0,001
2	4,4 ± 0,7 <sup>ab B</sup>	6,9 ± 2,2 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,6 <sup>c BC</sup>	2,3 ± 0,5 <sup>bc AB</sup>	0,001
3	4,3 ± 1,8 <sup>b B</sup>	6,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,4 <sup>c C</sup>	1,2 ± 0,3 <sup>c B</sup>	0,001
4	4,7 ± 0,7 <sup>b AB</sup>	7,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,8 <sup>c C</sup>	2,9 ± 2,3 <sup>bc AB</sup>	0,001
5	4,4 ± 0,3 <sup>b B</sup>	7,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	4,5 ± 1,1 <sup>b A</sup>	3,4 ± 2,8 <sup>b AB</sup>	0,003
6	5,7 ± 1,4 <sup>ab AB</sup>	6,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,4 <sup>c B</sup>	4,4 ± 0,8 <sup>bc A</sup>	0,001
7	10,2 ± 8,1 <sup>A</sup>	8,8 ± 6,9	4,7 ± 0,2 <sup>A</sup>	5,2 ± 0,5 <sup>A</sup>	0,423
P	0,250	0,640	0,001	0,001	

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P < 0,05).

Na tabela 16 estão apresentados os resultados de uréia sérica entre os grupos de ruminantes com ICA, resistentes e controles. Fica patente que os bovinos e búfalos com ICA tiveram maiores concentrações de uréia que os demais grupos (P < 0,032).

Tabela 16 - Uréia sérica na ultima quinzena considerando os subgrupos de ruminantes intoxicados e resistentes - São Paulo - 2006

Grupos	Uréia sérica (mMol/L) - 7ª quinzena	
	N	Mediana
BOV Cu ICA	3	13,2 <sup>A</sup>
BOV Cu R	3	2,5 <sup>B</sup>
BUF Cu ICA	2	16,2 <sup>A</sup>
BUF Cu R	4	5,3 <sup>B</sup>
BOV	4	4,7 <sup>B</sup>
BUF	4	5,0 <sup>B</sup>

Letras maiúscula diversas na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

## 5.12 CREATININA SÉRICA

Na tabela 17 apresenta-se a tabela de creatinina dos quatro grupos de ruminantes suplementados ou não com cobre .



Tabela 17 - Valores médios de creatinina sérica no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

Quinzenas					
Média da Creatinina sérica ( $\mu\text{Mol/L}$ )					
	BOV Cu	BUF Cu	BOV	BUF	P
0	121 $\pm$ 18,9 <sup>ab</sup>	153 $\pm$ 29,1 <sup>a</sup>	109 $\pm$ 8,6 <sup>b</sup>	148 $\pm$ 11,6 <sup>abB</sup>	0,011
1	133 $\pm$ 9,6 <sup>ab</sup>	156 $\pm$ 38,7 <sup>ab</sup>	116 $\pm$ 13,0 <sup>b</sup>	173 $\pm$ 5,5 <sup>aA</sup>	0,011
2	131 $\pm$ 8,8 <sup>bc</sup>	175 $\pm$ 19,2 <sup>a</sup>	122 $\pm$ 9,8 <sup>c</sup>	154 $\pm$ 9,2 <sup>bB</sup>	0,001
3	136 $\pm$ 19,1 <sup>ab</sup>	182 $\pm$ 49,4 <sup>a</sup>	107 $\pm$ 10,9 <sup>b</sup>	142 $\pm$ 4,6 <sup>abBC</sup>	0,010
4	126 $\pm$ 20,1	149 $\pm$ 34,5	123 $\pm$ 8,7	151 $\pm$ 11,7 <sup>B</sup>	0,159
5	122 $\pm$ 14,1 <sup>b</sup>	155 $\pm$ 14,8 <sup>a</sup>	106 $\pm$ 8,8 <sup>b</sup>	149 $\pm$ 8,8 <sup>aB</sup>	0,000
6	119 $\pm$ 16,6 <sup>ab</sup>	148 $\pm$ 30,9 <sup>a</sup>	109 $\pm$ 9,8 <sup>b</sup>	125 $\pm$ 3,5 <sup>abC</sup>	0,037
7	137 $\pm$ 16,8	177 $\pm$ 55,6	125 $\pm$ 10,2	136 $\pm$ 5,2 <sup>BC</sup>	0,090
P	0,344	0,550	0,064	0,000	-

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,001$ ).

A tabela 18 apresenta a média da creatinina sérica nos ruminantes intoxicado e resistentes à ICA na ultima quinzena do experimento.

Tabela 18 - Média da Creatinina sérica dos subgrupos intoxicados e resistentes e dos animais controle na última quinzena do experimento - São Paulo - 2006

Grupos	Creatinina sérica - 7ª quinzena - Dia 105		
	N	Média	± DP
BOV Cu ICA	3	147 <sup>B</sup>	12,4
BOV Cu R	3	126 <sup>B</sup>	15,6
BUF Cu ICA	2	228 <sup>A</sup>	84,4
BUF Cu R	4	151 <sup>B</sup>	10,9
BOV	4	126 <sup>B</sup>	10,2
BUF	4	136 <sup>B</sup>	5,2

Letras maiúsculas diversas na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,005$ ).

### 5.13 VOLUME GLOBULAR

Na tabela 19 estão expressos os resultados de volume globular nos quatro grupos originais.

Tabela 19 - Valores médios do volume globular dos ruminantes no decorrer do experimento - São Paulo - 2006

Quinzenas	Volume globular médio				P
	BOV Cu	BUF Cu	BOV	BUF	
0	31 ± 2,9 <sup>a</sup>	35 ± 4,9 <sup>a</sup>	22 ± 4,6 <sup>b</sup>	35 ± 2,7 <sup>aA</sup>	0,001
1	30 ± 2,1 <sup>bc</sup>	33 ± 3,9 <sup>ab</sup>	25 ± 3,7 <sup>c</sup>	35 ± 1,2 <sup>aA</sup>	0,000
2	29 ± 1,6 <sup>ab</sup>	34 ± 4,7 <sup>a</sup>	25 ± 2,8 <sup>b</sup>	31 ± 1,9 <sup>aB</sup>	0,002
3	31 ± 3,9 <sup>a</sup>	30 ± 4,9 <sup>ab</sup>	23 ± 2,8 <sup>b</sup>	30 ± 1,4 <sup>abB</sup>	0,018
4	30 ± 4,6 <sup>ab</sup>	32 ± 4,5 <sup>a</sup>	24 ± 2,7 <sup>b</sup>	31 ± 1,0 <sup>abB</sup>	0,044
5	28 ± 4,4 <sup>a</sup>	30 ± 3,2 <sup>a</sup>	22 ± 1,4 <sup>b</sup>	30 ± 1,1 <sup>aB</sup>	0,008
6	30 ± 3,7 <sup>a</sup>	32 ± 1,9 <sup>a</sup>	25 ± 1,6 <sup>b</sup>	31 ± 1,5 <sup>aB</sup>	0,004
7	26 ± 6,9	32 ± 4,1	26 ± 1,4	32 ± 1,1 <sup>B</sup>	0,054
P	0,327	0,226	0,506	0,000	

Letras minúsculas diversas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,005$ ).

Na tabela 20 estão expressos os resultados de volume globular nos ruminantes com ICA, resistentes e controles. O grupo Bov ICA apresentou-se inferior a todos os demais grupos ( $P < 0,032$ ).

Tabela 20 - Mediana do volume globular dos ruminantes intoxicados e resistentes na ultima quinze do experimento - São Paulo - 2006

Grupos	Volume globular – 7 <sup>a</sup> quinzena	
	N	Mediana
BOV Cu ICA	3	22 <sup>C</sup>
BOV Cu R	3	28 <sup>AB</sup>
BUF Cu ICA	2	34 <sup>A</sup>
BUF Cu R	4	32 <sup>AB</sup>
BOV	4	26 <sup>B</sup>
BUF	4	32 <sup>A</sup>

Letras minúsculas diversas na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O modelo experimental empregado para intoxicação cúprica em ovinos, baseado num aumento gradativo de infusão de cobre a partir de uma dose fixa, segundo Machado (1988) e Soares (2004) se mostrou razoavelmente eficiente para induzir quadro de ICA em bovinos e búfalos. Enquanto que no trabalho dos supracitados autores todos os ovinos desenvolveram o quadro clássico no prazo de 97 dias, em 105 dias metade dos bovinos e um terço dos búfalos de certa forma manifestaram sintomas sugestivos da enfermidade. Deve-se lembrar inicialmente que os ovinos são classicamente conhecidos como a espécie mais susceptível à ICA, em especial, pelo fato dos ovinos terem uma menor capacidade do cobre estocado no fígado se ligar à metalotioneína, possibilitando a partir daí a sua excreção pela bile (HOWEEL; GAWTHORNE 1987; LÓPEZ-ALONSO et al., 2005) .

Essa maior susceptibilidade pode ser quantificada pela quantidade de gramas de cobre / kg de peso metabólico ( $PV^{0,75}$ ) utilizada para provocar morte por ICA nas espécies de ruminantes. Enquanto que em ovinos, Soares (2004) utilizou em média 1,5 g cobre / kg  $PV^{0,75}$ , na presente dissertação necessitou-se, em média, 5,5 mg e 4,1 mg de cobre para bovinos e búfalos para provocar ICA (Tabela 2), respectivamente, ou seja, 3,67 e 2,73 vezes a mais que os ovinos para causar o mesmo efeito.

Constituiu-se uma surpresa o surgimento de um quadro sintomatológico atípico, que não o clássico, tanto em bovinos como em búfalos. A ausência de sintomas clássicos como a hemoglobinúria e mucosas amareladas precedendo a morte gerou inicialmente perplexidade quanto ao diagnóstico. Pensava-se que

pudesse ser um quadro hemorrágico abomasal ou intestinal, mas na necropsia isto não foi constatado. Posteriormente, detectaram-se altas quantidades de cobre no fígado dos mesmos, semelhante á determinada no quadro clássico de ICA e superior ao constatado em ruminantes resistentes, passando-se a admitir um efeito prejudicial direto do excesso de cobre desencadeando o quadro atípico. Corroborou para o diagnóstico os achados nos exames laboratoriais, pois dois dos bovinos (2 e 3) tiveram uma diminuição significativa, da 6<sup>a</sup> para a 7<sup>a</sup> quinzena, no volume globular (33% e 30% para 23 % e 22 %, respectivamente) (Tabela 20) e elevação nos teores de cobre sérico, em relação aos animais resistentes (Tabela 10). Ou seja, além do cobre sérico atingir um novo patamar de concentração, os animais manifestaram provavelmente, quadros hemolíticos causados pelo excesso de cobre livre na corrente, mas sem denotar uma crise hemolítica de grandes proporções como no quadro clássico.

Um ponto de diferenciação que ocorreu no quadro atípico em relação ao clássico foi o tempo mais prolongado com que os animais permaneceram com hiporexia (18 dias X 10 dias), levando a uma perda de peso e uma diminuição na condição corporal mais acentuada no quadro atípico (Gráfico 1). Esta menor ingestão de alimentos no grupo de quadro atípico deve ter promovido um grande déficit energético nos animais, o qual se evidenciou pelos maiores teores de uréia no soro (Tabela 1). Segundo Maruta (2005) o jejum ou anorexia estimulam a proteólise aumentando temporariamente de maneira significativa os teores de uréia no soro.

Em relação ao peso vivo deve ser ressaltada a grande capacidade dos animais resistentes continuarem a apresentar ganho de peso em comparação com os que desenvolveram ICA, quando estes a partir das últimas duas a três quinzenas tiveram franca perda de peso vivo (Gráfico 3).

Uma hipótese para causar esta hiporexia poderia ser a liberação de hormônios gastrintestinais (colecistoquinina e gastrina) inibidores do apetite oriundos da irritação destas mucosas pelo cobre livre administrado para causar ICA. Porém, esta situação parece não ter acontecido visto que esses animais não tinham congestão desses tecidos, diferentemente dos que tiveram o quadro clássico. Caso a administração da solução de cobre fosse pela via oral a mesma poderia induzir a formação de goteira esofágica fazendo com o cobre ionizado irritasse diretamente a mucosa. Mas, neste experimento tomou-se cuidado desse fato não ocorrer devido à infusão de cobre ser realizada diretamente pela cânula ruminal. A forma com que o excesso de cobre interferiu com o apetite dos animais com quadro atípico ainda precisa ser melhor estudada e compreendida.

É digno de nota que numa descrição de surto de ICA em vacas leiteiras Bradley (1993) apenas cita que uma das seis fêmeas acometidas apresentou anorexia, conteúdo ruminal ressecado, ausência de hemoglobinúria, mucosas amareladas e de coloração enegrecida nos rins, mas altos teores de cobre no fígado e rins. Mesmo assim, o autor atribuiu a morte pela ICA.

Segundo os presentes resultados, os búfalos não foram mais predispostos à ICA que os bovinos, como sugeriram Zicarelli et al. (1981), visto que não existiu diferença significativa na frequência de morte nos animais dessas espécies. Porém a presente comparação trouxe à luz vários fatos peculiares no concernente ao metabolismo de cobre nos bufalinos, em especial quando estes foram submetidos ao recebimento de altos teores deste microelemento. O primeiro deles foi que os búfalos intoxicados apresentaram menores quantidades de cobre no fígado que os bovinos (Tabela 4). Esse resultado ressalta para um aspecto do metabolismo de cobre. Segundo Howell; Gawthorne (1987) e Ortolani (2003) o fígado funciona como

um reservatório para o excesso de cobre, porém quando os teores no órgão atingem um determinado limite que ultrapassa a “comporta” poderá ocorrer extravasamento de cobre para a corrente circulatória desencadeando o quadro de ICA. Esse limite no fígado de búfalos foi demonstrado ser menor que em bovinos, ao redor de duas vezes menos. Mas como a quantidade de cobre administrado em bufalinos foi semelhante à dos bovinos (Tabela 2) isto indica que o cobre aparentemente foi menos retido no fígado, ou proveniente de uma menor disponibilidade ou por uma maior excreção de cobre do órgão-estoque.

No presente trabalho não foi avaliada a quantidade de metalotioneína sintetizada pelo fígado dos ruminantes suplementados com cobre. De acordo com López-Alonzo et al. (2005) a síntese de metalotioneína no fígado está diretamente associada ( $R^2 = 0,687$ ) aos teores de zinco neste órgão. Os mesmos autores ainda verificaram que quanto menor for a razão cobre/zinco no fígado maior será a capacidade do cobre presente no órgão se ligar com a metalotioneína, facilitando a excreção biliar desse microelemento e aumentando assim a proteção contra ICA. Interessantemente, búfalos com ICA apresentaram (Tabela 6) menores teores de zinco hepático que os bovinos intoxicados, assim como maior razão cobre/zinco hepático (Tabela 8). Desta forma, pode-se inferir que o menor teor hepático de cobre nos búfalos seja oriundo de uma menor disponibilidade dietética, mas ainda necessita ser provado.

Bovinos com ICA tiveram significativamente as maiores concentrações de zinco no fígado (Tabela 6), aumentando essa concentração da 2ª para a 3ª biópsia (Tabela 5). Este fenômeno pode ser interpretado como uma reação de alarme dos bovinos para se protegerem contra o excesso de cobre nos hepatócitos, por meio de maior produção de metalotioneína no órgão e aumento na ligação de cobre com



metalotioneína. O zinco além de ser estocado no fígado também o é em outros órgãos como na medula óssea, pâncreas, baço etc., assim é possível na eminência de ICA que o zinco tenha migrado desses órgãos para o fígado. Contudo, mesmo com um provável aumento na produção de metalotioneínas a quantidade de cobre acumulada no fígado dos bovinos foi bastante superior desencadeando um quadro fatal.

Merecem também reflexão os mecanismos desencadeados pelos ruminantes resistentes à ICA. Segundo dados da última biópsia (Tabela 4) os bovinos e búfalos resistentes acumularam no fígado 3,85 e 1,55 vezes menos cobre que os animais que sucumbiram de ICA. Embora o menor acúmulo de cobre fosse explícito nos resistentes, não houve elevação nos os teores hepáticos de zinco (Tabela 6), o que poderia promover maior resistência, por estímulo de produção de metalotioneínas nesse órgão. Um outro mecanismo de proteção contra o acúmulo exagerado de cobre no organismo seria por diminuição na sua disponibilidade, por meio de menor absorção intestinal (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

Segundo Cousins (1985) a absorção intestinal do cobre, semelhante ao ferro, é regida pelo conceito de saturabilidade. Assim, quando o cobre é absorvido e adentra o enterócito, se liga a uma molécula de metalotioneína, a qual captura este metal a fim de diminuir a sua absorção. Quanto maior a produção de metalotioneína intestinal, que é produzida de maneira independente da similar tioneína hepática, menor será a disponibilidade do cobre na dieta. Rações ricas em zinco e cádmio estimulam potencialmente a produção de metalotioneína pelos enterócitos diminuindo a absorção de cobre dietético. Como provavelmente os animais resistentes não aumentaram a produção hepática de metalotioneína é possível que

tenha ocorrido nestes uma menor absorção de cobre, quiçá pela maior produção intestinal de metalotioneínas.

As atividades de GGT 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 10, 11, 12 e 13). Embora o número de amostras tenha sido pequeno os resultados foram consistentes e apontaram que a atividade de GGT é muito mais indicativa do status de excesso de cobre que o AST. A primeira enzima incrementou sua atividade mais precocemente (5<sup>a</sup> quinzena) nos bovinos suplementados com cobre que nos búfalos em igual situação (7<sup>a</sup> quinzena) (Tabela 11). No AST isso aconteceu mais morosamente em ambas às espécies (7<sup>a</sup> quinzena) e apenas nos ruminantes com ICA e não nos resistentes (Tabelas 13 e 14).

Ortolani et al. (2003) estudando as mesmas enzimas em ovinos com ICA denotaram também que a enzima GGT aumentava sua atividade de forma mais precoce e consistente que a AST. Os autores justificaram este fenômeno baseado em vários fatores, em especial, que durante a acumulação anormal de cobre no fígado há a ocorrência de pequenos focos de necrose no sistema excretor biliar, resultando numa proliferação de células epiteliais biliares as quais passam a secretar continuamente GGT. Por outro lado, para ocorrer o extravasamento de AST em quantidade significativa para a corrente circulatória há necessidade de lesões mais extensas em células hepáticas e geralmente quando isto acontece é sinal indicativo de crise hemolítica eminente.

Um outro detalhe importante no concernente à avaliação do AST é a sua atividade basal bastante superior na espécie bufalina, em relação aos bovinos (Tabela 13 e Gráfico 14). Tirando-se por média os animais do grupo controle

verificou-se que os bufalinos têm cerca de 2,4 vezes maior atividade que os bovinos. Em um estudo com búfalos da raça Murrah, Yang et al. (1998) encontraram valores similares aos constatados no grupo controle do presente trabalho, ratificando os resultados obtidos.

Isso denota a real importância de se levar em consideração à espécie quando da interpretação diagnóstica a partir de dados de AST. Este trabalho mostrou que a linha corte de AST para bufalinos (180 U/L) foi exatamente o dobro do indicado para bovinos (90 U/L)

Tanto a AST (Gráfico 15) como a GGT (Gráfico 10) apresentaram coeficientes de determinação altos e praticamente idênticos como preditores de altas concentrações de cobre hepático nos bovinos. Porém, em búfalos o AST não foi uma boa variável de predição dos teores hepáticos, visto que existiu um baixo coeficiente de determinação nessa espécie ( $R^2 = 0,26$ ) pela existência de vários animais falso positivos e falso negativos.

Coincidentemente, todos os três dados falsos negativos eram oriundos de búfalos resistentes, indicando que a quantidade de cobre no fígado destes animais não era suficiente para causar lesões significativas que redundassem em extravasamento de AST para a corrente sangüínea. Por outro lado, os quatro dados falso positivos eram provenientes de animais do grupo controle, que por sinal apresentavam uma grande dispersão dos valores (100 a 235 U/L), diminuindo a confiabilidade deste teste.

A análise da distribuição dos dados obtidos com as atividades de GGT e AST considerando as linhas de corte indicou em ambas espécies que a primeira enzima apresentou maiores potencialidades diagnósticas indicativas de acúmulo de cobre hepático que o AST. Tal fato pode ser comprovado pela maximização dos vários

índices estudados (sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivos e negativos) com o GGT em ambas as espécies (Gráficos 12 e 13). Porém, pela presença de falsos positivos (em bovinos e búfalos) e falsos negativos (em búfalos) a AST apresentou índices com valores mais inferiores (Gráficos 17 e 18).

Diferentemente dos achados de Gummow (1996), no presente estudo a GGT mostrou-se como uma possível ferramenta diagnóstica para o acúmulo hepático de cobre tanto em bovinos quanto em búfalos. Quanto a AST, apesar da menor acurácia e dos valores preditivos quando comparada a GGT, a primeira enzima apresentou relativa eficiência no diagnóstico de acúmulo hepático de cobre em bovinos, tendo um elevado coeficiente de determinação, diferentemente do que foi relatado pelo supracitado autor.

Os dados de creatinina sérica indicam que nenhum dos animais, com exceção de um búfalo que morreu com manifestação atípica de ICA (animal 9; Tabela 1), apresentaram altos teores desta variável indicando que não ocorreu marcante insuficiência renal. Interessantemente, Bradley (1993) também não encontrou dentre seis vacas que morreram de ICA aumento nas concentrações de creatinina. Nos trabalhos de Machado (1998) e Soares (2004) ficou patente que praticamente todos os ovinos acometidos por ICA desenvolveram nos primeiros dias após a crise hemolítica grave insuficiência renal, diferentemente do que foi aqui constatado.

O motivo deste achado é desconhecido, mas especula-se que diferentemente do ovino em que o quadro hemolítico é muito mais devastador, ocorra nos bovinos e búfalos um grau de insuficiência renal bem menos pronunciado não alterando substancialmente a função renal e não gerando uma elevação nos teores de creatinina. Ovinos como ICA recuperados após o tratamento com tetratiomolibdato

continuaram mantendo alterações no funcionamento renal as quais não foram refletidas pelos teores de creatinina e uréia séricos, visto que estas variáveis só se elevam quando mais de 50 % da capacidade de filtração renal for acometida (SOARES, 2004).

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- Não existiu diferença na susceptibilidade de bovinos e búfalos à ICA
- Ocorreram dois quadros sintomatológicos distintos de ICA, o clássico e um outro atípico caracterizado por longo período de hiporexia, destacado emagrecimento, intensa apatia e ausência de hemoglobinúria.
- Parte dos bovinos e bufalinos se mostrou resistente à ICA a despeito da administração de altas quantidades cobre.
- Os teores de cobre hepático nos bovinos com ICA foram superiores, em mais de 100%, aos encontrados nos bufalinos.
- Bovinos com ICA aumentaram a concentração de zinco hepático nas fases finais da intoxicação.
- As altas atividades de GGT e de AST para bovinos e GGT para bufalinos podem indicar o acúmulo de cobre nos tecidos hepáticos destas espécies.
- Quase todos animais acometidos com ICA não apresentaram graves quadros de insuficiência renal, não alterando assim os teores de creatinina sérica.

## REFERÊNCIAS

- ANSAY, M.; DAMME, C. V.; BLODEN, S.; DELPECHIN, B.; NOIRFALISE, A.; BURET, J.; DUREZ, J.; DANVOYE, R. Chronic intoxication in calves with milk containing copper sulphate. **Annales de Medecine Veterinaire**, v. 128, n. 2, p.135-147, 1984.
- AUZA, N. J.; OLSON, W. G. MURPHY, M. J.; LINN, J. G. Diagnosis and treatment of copper toxicosis in ruminants. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 11, p. 1624-1628, 1999.
- BANTON, M. I.; NICHOLSON, S. S.; JOWETT, P. L.; BRANTLEY, M. B.; BOUDREAUX, C. L. Copper toxicosis in cattle fed chicken litter, **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 7, p. 827-828, 1987.
- BIDEWELL, C.; DAVID, G. P.; LIVESEY, C. Copper toxicity and cattle. **Veterinary Record**, v. 147, p. 399-400, 2000.
- 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.
- 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 p. 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.

CROUBELS, S.; BAERT, K.; TORCK, T.; DEPREZ, P.; BACKER, P. Chronic copper intoxication in veal calves. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 70, n. 2, p.142-146, 2001.

DU, Z.; HEMKEN, R. W.; HARMON, R. J. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulfate or copper proteinate. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1873-1880, 1996.

ENGLE, T. E.; SPEARS J. W. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 9, p. 2446–2451, 2000.

GELLA, F. J.; OLIVEIRA, T.; CRUZ PASTOS, M.; ARENAS, J.; MORENO, O. R.; DURBAN, R.; GOMEZ, J. A. A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. **Clinical Chemistry Acta**, v. 157, n. 1, p. 241-247, 1985.

GUMMOW, B. Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 277-288, 1996.

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.

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.; ROBERTS, L.; INGLIS, D.; HALLIDAY, G. J. Use of ammonium tetrathiomolybdate in the treatment of copper poisoning in sheep. **The Veterinary Record**, v. 119, n. 24, p. 596-598, 1986.

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

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, 1997, p.457-463.

LÓPEZ-ALONSO, M.; BENEDITO, J. L.; MIRANDA, M; CASTILLO, C.; HERNÁNDEZ, J.; SHORE, R. F. The effect of pig farming on copper and zinc accumulation in cattle in Galicia (North-Western Spain) **The Veterinary Journal**, v. 160, n. 3, p. 259-266, 2000.

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.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

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

MARUTA, C. A. **Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos às condições de alimentação normal, jejum e realimentação**. 2005. 92 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

MASSAD, E.; MENEZES, R. X.; SILVEIRA, P. S. P.; ORTEGA, N. R. S. **Métodos quantitativos em medicina**. Barueri: Manole, 2004. 561 p.

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.

MINITAB – The student edition of MINITAB Statistical software adapted for education. Release 13.0. **User's Manual**. New York: Addison-Wesley, 2000. CD-ROM.

MULLIS, L. A.; SPEARS, J. W.; MCCRAW, R. L. Estimated copper requirements of Angus and Simmental heifers. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 865-873, 2003.

MYLREA, P. J.; BYRNE, D. T. Na outbreak of acute copper poisoning in caves. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 4, p. 169-172, 1974.

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

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

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

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

ORTOLANI, E. L. ; 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.

PERRIN, D. J.; SCHIEFER, H. B.; BLAKLEY, B. R. Chronic copper toxicity in a dairy herd. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 629-632, 1990.

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.; 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.

RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J. A.; GIESTA, 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. The diagnosis and treatment of chronic copper poisoning in 4- to 12-week-old single-suckled calves. **Agri-Practice**, v. 17, n. 3/4, p. 36-40, 1996.

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.

SILVA, L. C.; FERREIRA, M. A.; GOMES, H. M.; FUTEMA, F.; ORTOLANI, E. L. Biópsia hepática em ovinos por via laparoscópica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIA VETERINÁRIA, 2., 1996, Ribeirão Preto. **Anais...** p. 108-109.

SMITH, R. D. **Veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. 236 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 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

STOGDALE, L. Chronic copper poisoning in dairy cows. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 4, p. 169-172, 1974.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. Enzymatische harnstoffbestimmung in blut und serum in optischen test nach warbur. **Klinische Wochenschrift**, v. 43, n. 1, p. 174, 1965.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.; MORAES, S. S. Outbreak of copper poisoning in cattle fed poultry litter. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 92-95, 2000.

TREMBLAY, R. R.; BAIRD, J. D. Chronic copper poisoning in two Holstein cows. **Cornell Veterinary Medicine**, v. 81, n. 2, p. 205-213, 1991.

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

WELLS, N. H.; HALLFORD, D. M.; HERNANDEZ, J. A.; BOLLINGER, J. L.; PETERSEN, M. K.; MCELYEA, U. Use of calcium sulfate to alleviate signs of copper toxicosis in ewe lambs. **Bovine Practitioner**, v. 35, n. 1, p. 70-72, 2001.

YANG, Q.; MAO, W. H.; FERRE, I.; BAYÓN, J. E.; MAO, X. Z.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Plasma aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activities in water buffaloes with experimental subclinical fasciolosis. **Veterinary Parasitology**, v. 78, p. 129-136, 1998.

ZICARELLI, L.; MACRI, A.; VITTORIA, A.; PADULA, P.; COSTANTINI, S.; RANIA, V.; GIORDANO, R. Intossicazione da rame in vitelli bufalini. **Rivista di Zootecnia e Veterinaria**, v. 9, n. 4, p.246-251, 1981.