

ALEXANDRE COUTINHO ANTONELLI

**Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na
prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos**

São Paulo
2007

ALEXANDRE COUTINHO ANTONELLI

Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em 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 Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1874
FMVZ

Antonelli, Alexandre Coutinho

Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos / Alexandre Coutinho Antonelli. – São Paulo : A. C. Antonelli, 2007.
122 f. : il.

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

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

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

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

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


Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos", protocolo nº437/2004, utilizando 25 ovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of a mineral mix with high levels of molybdenum in the prevention of accumulative copper poisoning in sheep", protocol number 437/2004, utilizing 25 sheep, 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, 22 de fevereiro de 2005


Prof.^a Dr.^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: ANTONELLI, Alexandre Coutinho

Título: Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*À **Daniela**, por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, incentivando o meu crescimento profissional.
Meu eterno amor e respeito por você.*

*Aos meus pais, irmãos, tios e avós,
**Demetrio, Sylvia, †Isabel†, Gustavo, Berenice, Marily,
Walter, Ely e †Maria Emília†** por se dedicarem na minha
formação, ensinando a ter respeito, dedicação e
honestidade, por sempre me incentivarem, estando ao
meu lado durante todos os momentos difíceis de minha
vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani**, pela preocupação paternal com seus orientados. Exemplo de orientação, dedicação, apoio e estímulo ao estudo e pessoal. Agradeço a compreensão, paciência e o auxílio neste período importante de minha vida. Espero contar com a sua eterna amizade.

Ao grande amigo **Raimundo Alves Barrêto Júnior**, pela grande ajuda durante todo o Doutorado, principalmente durante a parte experimental em Pirassununga.

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

À **Clara Satsuki Mori**, técnica de nível superior responsável pelo Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas, pelo convívio diário, ajuda irrestrita e resolução de vários problemas técnicos e pessoais. Agradeço sua ajuda, paciência e espero contar com sua eterna amizade.

Ao Professor Doutor **Pierre Castro Soares** do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela realização das determinações de minerais, sem as quais não seria possível concluir este trabalho.

A minha família de Pós-Graduação: **Alessandra Silva Lima, Antônio Humberto Hamad Minervino, Celso Akio Maruta, Frederico Augusto Mazzoca Lopes Rodrigues, Maria Cláudia Araripe Sucupira, Néria Vânia Marcos dos Santos, Pierre Castro Soares, Raimundo Alves Barrêto Júnior e Sandra Satiko Kitamura** que me receberam com muito carinho e respeito, e passaram todas as suas experiências e conhecimentos que foram úteis para a execução e conclusão deste trabalho; e espero poder retribuir tudo aquilo que fizeram pela minha pessoa. Agradeço o convívio “familiar” diário, os momentos felizes, a ajuda na realização das colheitas e tratamento dos animais, o espírito de equipe e, principalmente, pela amizade.

À **Maria Carolina Sedenho Marcello**, biomédica autônoma, agradeço a atenção, o respeito, paciência, amizade e a ajuda nas análises durante o período experimental.

Ao funcionário do Galpão de Experimentação em Clínica de Ruminantes: **Agnaildo Arcanjo dos Santos**, pela ajuda no trato dos animais, pela paciência e pela amizade, imprescindíveis na realização deste trabalho.

À secretária da pós-graduação, **Adelaide Borges**, pela paciência, agradável convívio, ajuda, compreensão e amizade.

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

A todos amigos da **60ª turma de Medicina Veterinária da USP** que sempre estiveram ao meu lado. Todo meu respeito e agradecimento.

Aos amigos **Ubiraem, Pacheco, “Zico”, Paulo, Maria Cecília, Maria Paula, “Dona Nice”, Rosangela, Vanderlei, Gérson, João, Josane, Ana Paula e Sirley**, pela amizade, ensinamentos, agradável convívio e pelas conversas sempre proveitosas em Pirassununga.

Aos amigos de pós-graduação: **Beth, Eliza, Fernanda, Flávio, Genílson, João Paulo, Lilian, Maiara, Maria Carolina, Marta, Rebeca e “Tio Chico”** pelo agradável convívio, troca de conhecimentos e amizade.

À **Samantha Miyashiro e Marly E. Ferreira de Castro**, pela generosa acolhida, ajuda nas análises bioquímicas e principalmente pela sua amizade.

Aos **funcionários da biblioteca**, pelo profissionalismo, cordial atendimento e amizade.

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

A **Tortuga Companhia Zootécnica Agrária** pelo gentil fornecimento dos materiais necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

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

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

RESUMO

ANTONELLI, A. C. **Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos.** [Evaluation of a molybdenum-rich mineral salt in the prevention of cumulative copper poisoning in sheep]. 2007. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade de um sal mineral rico em molibdênio (Mo) em prevenir a intoxicação cúprica acumulativa (ICA), analisando variáveis clínicas, sangüíneas e os teores de cobre (Cu) e Mo hepático. Foram utilizados 25 ovinos da raça Ile-de-France, aleatoriamente distribuídos em cinco grupos de cinco animais de cada, sendo que o grupo 1 recebia dieta contendo 80% volumoso e 20% concentrado, os grupos 2 e 3 recebiam 50% volumoso e 50% concentrado, e os grupos 4 e 5 recebiam a mesma dieta dos grupos 2 e 3 com a adição diária de 150 mg de sulfato de Cu até o término do experimento (150 d). Os grupos 1, 3 e 5 recebiam sal mineral contendo 300 ppm de Mo. Foram realizadas três biópsias hepáticas para determinação da concentração de Cu, Mo e Zn neste órgão e três ensaios de retenção aparente de Cu e Mo (0 d, 75 d, 150 d). Quinzenalmente, foi realizado exame clínico e coleta de amostras de sangue e urina. Três ovinos do grupo 4 e um do grupo 5 manifestaram ICA. Não existiu diferença entre a frequência de mortalidade entre os grupos ($P = 0,56$). Os teores de Cu hepático nos ovinos com ICA (2450 ppm) foram superiores aos que não intoxicaram (1518 ppm). Quanto maior a ingestão de Mo na dieta menor foi o acúmulo de Cu hepático ao término do experimento ($r = -0,72$). Ovinos com ICA aumentaram a concentração de Zn hepático nas fases finais da intoxicação. A presença de altas atividades de GGT ($>56,5$ U/L) e de AST (>120 U/L) indicaram de maneira efetiva a presença de destacado acúmulo de Cu nos tecidos hepáticos (1000 ppm).

Palavras-chave: Intoxicação cúprica. Ovinos. Prevenção. Molibdênio

ABSTRACT

ANTONELLI, A. C. **Evaluation of a molybdenum-rich mineral salt in the prevention of cumulative copper poisoning in sheep.** [Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos]. 2007. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The aim of this project is to evaluate the capacity of a molybdenum-rich mineral salt in the prevention of cumulative copper poisoning (CCP) in sheep, through clinical and blood exams and hepatic copper and molybdenum concentrations. Twenty five Ile-de-France sheep were randomly distributed into five groups of five animals each, where group 1 received a 80% forrage and 20% concentrate diet, groups 2 and 3 received a 50% forrage and 50% concentrate diet, and groups 4 and 5 received the same diet as groups 2 and 3 with a daily supplementation of 150mg of copper sulphate until the end of the experiment (150 d). Groups 1, 3 and 5 received a mineral salt with 300 ppm of molybdenum. For three times during the experiment (day zero, 45th and 105th day) a liver biopsy was carried out to evaluate the degree of copper accumulation in this organ. Clinical examination was followed every two weeks, as far as blood and urine samples were withdrawn. Three sheep from group 4 and one sheep from group 5 presented clinical picture of CCP. There was no difference in the frequency of mortality between groups 4 and 5 ($P = 0.56$). The liver copper concentration was higher in sheep with CCP (2450 ppm) compared to sheep that not presented CCP (1518 ppm). The higher the ingestion of molybdenum in the diet the lower the liver copper concentration at the end of the experiment ($r = -0.72$). Sheep with CCP had higher liver zinc concentration. The presence of high activity of GGT (> 56.5 U/L) and AST (>120 U/L) indicated effectively the high accumulation of copper in liver (> 1000 ppm).

Key words: Copper poisoning. Ovine. Prevention. Molybdenum.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Composição bromatológica do feno de capim Coast-Cross e do concentrado comercial oferecido aos ovinos, durante o período experimental, São Paulo – 2006 46
- Quadro 2 - Teor de cobre e molibdênio hepáticos e variáveis sanguíneas e funções vitais dos ovinos no dia em ocorreu hemoglobinúria macroscópica, São Paulo – 2006 60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores de mediana do ganho de peso vivo (g/dia) de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	58
Gráfico 2 -	Valores médios do ganho de peso global (kg) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	59
Gráfico 3 -	Valores médios da frequência cardíaca (bat/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	62
Gráfico 4 -	Valores médios da frequência respiratória (mov/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	63
Gráfico 5 -	Valores médios do movimento ruminal (mov/3 min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	65
Gráfico 6 -	Valores médios da temperatura retal (° C) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	66
Gráfico 7 -	Valores médios do total de cobre ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	68
Gráfico 8 -	Valores médios do total de cobre excretado (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	69
Gráfico 9 -	Valores médios do total de cobre retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	70
Gráfico 10 -	Valores médios do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	71
Gráfico 11 -	Valores medianos do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio. São Paulo, 2006	72
Gráfico 12 -	Valores médios do total de molibdênio ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	73

Gráfico 13 - Valores médios do total de molibdênio excretado (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	74
Gráfico 14 - Valores médios do total de molibdênio retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	76
Gráfico 15 - Valores médios do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	77
Gráfico 16 - Valores médios do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio. São Paulo, 2006	78
Gráfico 17 - Valores médios do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	79
Gráfico 18 - Valores médios do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA. São Paulo, 2006	80
Gráfico 19 - Valores médios do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	82
Gráfico 20 - Valores médios do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA. São Paulo, 2006	83
Gráfico 21 - Valores de médios do molibdênio sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	85
Gráfico 22 - Valores médios da concentração de uréia sérica (mmol/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	86
Gráfico 23 - Valores médios da concentração de creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	88
Gráfico 24 - Valores médios da concentração de AST sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	89

Gráfico 25 - Valores médios da concentração de GGT sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	91
Gráfico 26 - Valores médios da concentração de bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	92
Gráfico 27 - Valores médios da atividade de ceruloplasmina (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	94
Gráfico 28 - Valores médios do pH urinário de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	95
Gráfico 29 - Valores médios da densidade urinária de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	97
Gráfico 30 - Influência do acúmulo de cobre hepático sobre a atividade de AST em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	98
Gráfico 31 - Linha de corte indicativa do valor preditivo da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos. São Paulo, 2006.....	99
Gráfico 32 - Influência do acúmulo de cobre hepático sobre a atividade de GGT em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	99
Gráfico 33 - Linha de corte indicativa do valor preditivo da GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos. São Paulo, 2006.....	100
Gráfico 34 - Influência do acúmulo de cobre hepático sobre a atividade de ceruloplasmina em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	101
Gráfico 35 - Influência do acúmulo diário de cobre sobre a reserva de cobre hepático em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	101
Gráfico 36 - Influência do cobre hepático sobre o zinco hepático em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	102
Gráfico 37 - Relação da ingestão de molibdênio sobre a retenção de cobre no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	103
Gráfico 38 - Relação da excreção de molibdênio sobre a retenção de cobre no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	104

Gráfico 39 - Relação da ingestão de molibdênio sobre o cobre hepático no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	104
Gráfico 40 - Relação da excreção de molibdênio sobre o cobre hepático no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	105
Gráfico 41 - Relação da excreção de molibdênio sobre a excreção de cobre no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de mediana, mínimo e máximo do ganho de peso vivo (g/dia) de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	57
Tabela 2 -	Valores médios e desvios-padrão do ganho de peso global (kg) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	58
Tabela 3 -	Valores médios e desvios-padrão da frequência cardíaca (bat/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	61
Tabela 4 -	Valores médios e desvios-padrão da frequência respiratória (mov/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	63
Tabela 5 -	Valores médios e desvios-padrão do movimento ruminal (mov/3 min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	64
Tabela 6 -	Valores médios e desvios-padrão da temperatura retal (° C) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	66
Tabela 7 -	Valores médios e desvios-padrão do total de cobre ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	67
Tabela 8 -	Valores médios e desvios-padrão do total de cobre excretado (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	69
Tabela 9 -	Valores médios e desvios-padrão do total de cobre retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	70
Tabela 10 -	Valores médios e desvios-padrão do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	71
Tabela 11 -	Valores mediano, mínimo e máximo do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio. São Paulo, 2006	72
Tabela 12 -	Valores médios e desvios-padrão do total de molibdênio ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	73

Tabela 13 - Valores médios e desvios-padrão do total de molibdênio excretado (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	74
Tabela 14 - Valores médios e desvios-padrão do total de molibdênio retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	75
Tabela 15 - Valores médios e desvios-padrão do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	77
Tabela 16 - Valores médios e desvios-padrão do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio. São Paulo, 2006	78
Tabela 17 - Valores médios e desvios-padrão do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	79
Tabela 18 - Valores médios e desvios-padrão do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA. São Paulo, 2006	80
Tabela 19 - Valores médios e desvios-padrão do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	81
Tabela 20 - Valores médios e desvios-padrão do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA. São Paulo, 2006	83
Tabela 21 - Valores de médios e desvios-padrão do molibdênio sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	84
Tabela 22 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de uréia sérica (mmol/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	86
Tabela 23 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	87
Tabela 24 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de AST sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	89

Tabela 25 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de GGT sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006	90
Tabela 26 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	92
Tabela 27 - Valores médios e desvios-padrão da atividade de ceruloplasmina (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	93
Tabela 28 - Valores médios e desvios-padrão do pH urinário de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	95
Tabela 29 - Valores médios e desvios-padrão da densidade urinária de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético. São Paulo, 2006.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	aspartato aminotransferase
cm	centímetros
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
GGT	gama glutamiltransferase
kg	quilograma
L	litro
mg	miligrama
ml	mililitro
mmol	milimol
MS	matéria seca
P.A.	para análise
ppm	parte por milhão
PV	peso vivo
r	coeficiente de correlação
R	coeficiente de determinação
TTM	tetratiomolibdato de amônia
U	unidade
USP	Universidade de São Paulo
μmol	micromol

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO COBRE.....	27
2.2	METABOLISMO DO COBRE NO ORGANISMO DOS RUMINANTES ..	27
2.3	INTERFERÊNCIAS NA DISPONIBILIDADE DO COBRE DIETÉTICO ..	28
2.4	INTOXICAÇÃO CÚPRICA EM OVINOS	29
2.4.1	Causas da intoxicação cúprica	30
2.4.1.1	Fatores predisponentes.....	30
2.4.1.2	Fatores determinantes	30
2.4.2	Patogenia	32
2.4.3	Sinais clínicos	35
2.4.4	Patologia clínica	36
2.4.5	Achados necroscópicos	38
2.4.6	Diagnóstico	38
2.4.7	Tratamento e controle	39
3	OBJETIVOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAIS.....	45
4.1.1	Animais	45
4.1.2	Instalações	45
4.1.3	Dieta e Manejo	45
4.2	MÉTODOS.....	46
4.2.1	Delineamento Experimental	46
4.2.2	Indução Experimental de Intoxicação por Cobre	47
4.2.3	Protocolo de Colheita de Materiais Biológicos	48
4.2.4	Protocolo de Exame Clínico	48
4.2.5	Colheita e Processamento das Amostras Sangüíneas	49
4.2.5.1	Concentração de Uréia Sérica	49
4.2.5.2	Concentração de Creatinina Sérica.....	49
4.2.5.3	Atividade de Aspartato Aminotransferase Sérico (AST).....	50
4.2.5.4	Atividade de Gama Glutamiltransferase Sérico (GGT).....	50

4.2.5.5	Atividade de Ceruloplasmina.....	50
4.2.5.6	Concentração de Bilirrubina Sérica Total	50
4.2.5.7	Concentração de Cobre Sérico	51
4.2.5.8	Concentração de Molibdênio Sérico.....	51
4.2.6	Colheita e Processamento das Amostras de Urina	51
4.2.6.1	Mensuração de pH urinário	51
4.2.6.2	Densidade urinária	51
4.2.6.3	Concentração de cobre urinário	52
4.2.6.4	Concentração de molibdênio urinário.....	52
4.2.6.5	Exame do sedimento urinário.....	52
4.2.7	Biópsia hepática	52
4.2.8	Ensaio de retenção aparente de cobre e molibdênio	53
4.2.9	Tratamento	54
4.2.10	Análise Estatística	54
4.2.10.1	Distribuição de Dados	55
4.2.10.2	Cálculo dos valores preditivos.....	55
4.2.10.3	Níveis de Significância	55
5	RESULTADOS	57
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura tem se expandido nesta última década nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, sendo que nestes últimos anos mostra um crescimento contínuo no Estado de São Paulo, representando hoje uma emergente alternativa econômica dentro da pecuária desse Estado. Muitos criadores têm melhorado o sistema de criação introduzindo novas raças e técnicas de alimentação para intensificar a produção de cordeiros para o abate.

A criação de ovinos em sistema intensivo tem incrementado a produtividade dos rebanhos, porém, aumentado a incidência de várias enfermidades nutricionais e metabólicas, como a toxemia da prenhez em fêmeas, urolitíase em machos e a intoxicação cúprica em ambos os sexos (ORTOLANI, 1996).

No Brasil, a freqüência da intoxicação cúprica em ovinos é alta e tem aumentado no decorrer das últimas décadas. Em levantamento feito no Hospital Veterinário da USP constatou-se que a ICA representou 1,5% dos casos atendidos na década de 70, se elevando para os atuais 6% (ORTOLANI, 2003). Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul a partir de 618 necropsias demonstrou-se que a ICA é considerada a 2ª principal causa de morte em rebanhos ovinos com 15,5%, depois das gastroenterites parasitárias (16,5%) (RIBEIRO, 2000). Geralmente, os ovinos acometidos pela ICA são de alto valor econômico, para não dizer também de grande potencial zootécnico, o que torna os prejuízos da intoxicação ainda mais significativos (ORTOLANI, 1996).

O aumento na incidência da ICA no decorrer das últimas décadas está ligada às mudanças de manejo realizadas pelos ovinocultores, os quais têm fornecido a seus rebanhos dietas com altos teores de cobre, em especial com o uso de sais minerais formulados para bovinos, que contém até 5000 ppm deste elemento. Associa-se também o fato, na grande maioria dos casos, dos criadores alimentarem os ovinos com altas quantidades de rações concentradas, a base de grãos como o trigo, milho e soja. Embora a quantidade de cobre presente nestes alimentos não seja tão alta, a sua disponibilidade o é, pois o cobre está ligado às proteínas facilitando a sua absorção pelos ovinos (ORTOLANI, 2003). Além do mais esses concentrados ricos em energia são muito pobres em molibdênio e enxofre,

antagonistas do cobre, aumentando ainda mais a disponibilidade do cobre neles presentes.

Ainda existe o fato de que os criadores nacionais de ovinos de corte introduziram em seus rebanhos reprodutores de raças de alta produtividade, tais como o Texel, Suffolk e Ile-de-France, que são mais predispostos a acumularem o cobre em seus organismos que as demais raças de ovinos menos especializadas (ORTOLANI, 2003).

A letalidade é altíssima sendo superior a 80% nos animais acometidos (ORTOLANI, 1996, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

No Brasil, já foram comunicados vários relatos de surtos de intoxicação cúprica em ovinos, apresentando de forma invariável uma alta letalidade, principalmente pelo fato dos animais acometidos não terem sido tratados com antídotos eficientes específicos (LE MOS et al., 1997; MAIORKA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1984; ORTOLANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 1994; RIET-CORREA et al., 1989).

O aumento na incidência da ICA no decorrer das últimas décadas está ligada às mudanças de manejo realizadas pelos ovinocultores, os quais têm fornecido a seus rebanhos dietas com altos teores de cobre, em especial com o uso de sais minerais formulados para bovinos, que contém até 5000 ppm deste elemento.

Até a década de 70 não havia alternativas viáveis no tratamento da intoxicação cúprica. Até então, recomendava-se a terapia com penicilame, que apresenta certo efeito quelante sobre o cobre livre, porém é uma droga cara, de difícil obtenção e que pode apresentar efeitos colaterais (SOLI; NAFSTAD, 1978; WOUK et al., 1981). Contudo, no início da década de 80, Gooneratne et al. (1981) utilizaram, pela primeira vez, um composto químico chamado tetratiomolibdato (TTM) que demonstrou apresentar uma grande capacidade quelante sobre o cobre livre. Nesse estudo os autores supracitados obtiveram cura em 77% dos casos de intoxicação cúprica em ovinos, induzidos experimentalmente, e tratados com 1,7 mg de TTM/kg p.v.

A terapia da intoxicação cúprica pode ser extremamente eficiente se for iniciada precocemente no decorrer do 1º ao 2º dia após o início da hemoglobinúria, e se utilizado o TTM na dose de 3,4 mg/kg PV (MACHADO, 1998). Este antídoto tem grande capacidade de quelar o cobre livre, como o cobre presente nos estoques, bloqueando assim seus efeitos imediatos. Gooneratne et al. (1986) também identificaram que o TTM se liga ao cobre livre presente no complexo cobre

hemoglobina-lisossomo reduzindo ou praticamente inativando o efeito deste composto como agente nefrotóxico.

Mesmo com o sucesso tratamento, este só é eficaz se realizado rapidamente. Assim sendo, as perdas decorrentes da ICA são enormes, pois muitos animais não são tratados a tempo, ou por falha no diagnóstico, ou pela dificuldade em encontrar no mercado o antídoto eficaz, além da queda de produção dos próprios animais que foram intoxicados e se recuperam com o tratamento.

Desta forma, a prevenção é o caminho a ser buscado no combate à intoxicação cúprica. Uma das possibilidades de prevenção seria a diminuição da quantidade de cobre fornecida aos ovinos. Porém nem sempre isto é possível, pois os criadores têm intensificado os sistemas de criação aumentando a quantidade de concentrado energético na dieta dos cordeiros. O uso de antagonistas do cobre também poderia ser empregado, o que diminuiria a disponibilidade deste elemento para os animais (HUMPHRIES et al., 1986).

É fundamental o desenvolvimento de medidas de prevenção que diminuam o risco de surgimento de ICA em ovinos criados em nossas condições. Um recente experimento acompanhou os principais eventos biológicos durante o período pré-hemolítico de ovinos recebendo altos teores de cobre dietético, o qual indicou que o aumento da atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT) é a primeira manifestação que precede 28 dias antes da instalação do período hemolítico, seguida pelo incremento da atividade do aspartato aminotransferase (AST) ao redor do 14º dia; com o avançar do acúmulo de cobre no organismo constatou-se um apetite seletivo no 9º dia (animal deixa de ingerir concentrados) com destacada hiporexia nos últimos dias que precediam a crise hemolítica (ORTOLANI et al., 2003). Tais achados são altamente sugestivos que medidas dietéticas urgentes devam ainda ser empregadas para evitar o surgimento de ICA no rebanho ovino (ORTOLANI et al., 2003).

Existe no mercado nacional um sal mineral específico para ovinos cujos fabricantes apregoam que seu uso previne o surgimento de ICA. Tal sal mineral contém quantidade relativamente diminuta de cobre quelatado (600 ppm), que não se combina com antagonistas supracitados, em especial os tiomolibdatos, além de ter boa disponibilidade para ovinos, mas com menor risco de causar intoxicação. Esse sal ainda contém altíssimos teores de molibdênio (300 ppm), ao qual se atribuí um efeito preventivo contra a ICA. Frente à alta ocorrência de ICA muitos criadores

têm optado pelo emprego de tal sal mineral, porém ainda com resultados incertos e desconhecidos.

Assim sendo, faltam ainda avaliações da real eficácia deste suplemento mineral na prevenção da ICA, principalmente quando este é oferecido conjuntamente com uma dieta rica em concentrados contendo cobre bastante disponível, em condições experimentais controladas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO COBRE

O cobre, assim como o flúor, ferro, zinco, manganês, iodo, cobalto e selênio é um microelemento essencial para a vida dos animais domésticos. O elemento cobre têm grande facilidade de se oxidar, através da perda de um elétron na sua última camada. Esta característica química faz com que esse elemento esteja presente no sítio ativo de 26 metaloenzimas cúpricas, as quais catalisam reações bioquímicas de oxido-redução (ORTOLANI, 2006).

Entre as principais cuproenzimas citam-se: citocromo c oxidase, lisil oxidase, ceramide galactosil transferase, polifeniloxidase. Além de se apresentar em várias enzimas, o cobre está presente em algumas metaloproteínas como a ceruloplasmina, que regula a atividade da transferrina, e a metalotioneína, que entre várias outras funções regula a absorção do zinco e do próprio cobre (ORTOLANI, 2006).

2.2 METABOLISMO DO COBRE NO ORGANISMO DOS RUMINANTES

O cobre ingerido é absorvido primordialmente no intestino delgado, sendo que para tal, o cobre solúvel se liga ainda na luz intestinal a determinados L-aminoácidos, secretados pelos enterócitos, que funcionam como carreadores de cobre para o interior do organismo. A proteína metalotioneína presente no enterócito regula a absorção de cobre da luz intestinal, sendo que quanto maior a quantidade de metalotioneína no enterócito menor a absorção desse microelemento. Em seguida, já no interior do organismo o cobre se liga a albumina, sendo carregado para o fígado, que é o principal órgão-estoque (ORTOLANI, 2006; SANSINANEIA et al.,1993). No fígado, o cobre pode ser direcionado a três destinos distintos: integrar o estoque prolongado no interior dos hepatócitos em especial no núcleo, citosol, lisossomas e demais organelas; permanecer no estoque temporário onde o

elemento se liga a ceruloplasmina; ou ser excretado pela secreção biliar, ligado a metalotioneína hepática, principal via de excreção do cobre do organismo (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

A ceruloplasmina funciona como principal agente carreador do cobre estocado, distribuindo-o para toda economia animal através da via sistêmica.

Nas células-alvo o cobre é liberado e incorporado no sítio das respectivas cuproenzimas. A excreção biliar do cobre depende de sua ligação prévia a metalotioneína produzida no fígado. Quanto maior a ligação do cobre a metalotioneína hepática, maior será a capacidade de excreção biliar de cobre e menor a predisposição de uma determinada espécie à intoxicação cúprica. Fetos de diferentes espécies apresentam altas concentrações de cobre estocado no fígado, porém, praticamente não existe o risco de uma intoxicação nestes neonatos, pois grande parte do microelemento está ligada a metalotioneína (BREMNER, 1987).

Em estudo comparativo entre espécies resistente (suína) e susceptível (ovina) à intoxicação cúprica demonstrou-se que os ovinos produziram menor quantidade de metalotioneína hepática além de apresentar um percentual extremamente menor (5%) de cobre, estocado nos hepatócitos, ligado a metalotioneína (BREMNER, 1987).

2.3 INTERFERÊNCIAS NA DISPONIBILIDADE DO COBRE DIETÉTICO

A disponibilidade do cobre para o ruminante depende principalmente da sua forma química nos alimentos e da presença ou não de outros elementos antagonistas na dieta. Assim, em ordem decrescente de disponibilidade tem-se: o cobre ligado aos seguintes compostos: carbonato, nitrato, sulfato, cloreto e óxido. O cobre metálico é praticamente indisponível. Nos capins, principalmente de período seco, grande parte do cobre se apresenta como cobre metálico; quando da fenação ou ensilamento dos capins, o cobre se complexa com as proteínas, elevando sua disponibilidade. Os cereais não contêm quantidades extremamente altas de cobre; porém, sua disponibilidade é bastante alta nestes alimentos (ORTOLANI, 2006; SUTTLE, 1986).

Desde a década de 50 sabe-se que tanto o molibdênio como o enxofre interferem com a disponibilidade do cobre, em ruminantes. Estudos mais recentes, porém, mostraram que o molibdênio e o enxofre formam complexos no rúmem, que podem tornar o cobre altamente indisponível para o animal.

Numa ampla revisão sobre o assunto Suttle (1991) demonstrou quimicamente a formação dos chamados tiomolibdatos no conteúdo ruminal. Inicialmente, uma molécula de sulfeto combina-se com uma de molibdato formando o monotiomolibdato, quando duas, três ou quatro moléculas de sulfeto se combinam com uma de molibdato existe a formação, respectivamente do di, tri e tetratiomolibdato. Quanto maior a saturação da molécula de molibdato pelo enxofre maior será o poder quelante do composto sobre o cobre, tornando-o menos disponível. O poder de quelação é tão grande no caso do tetra e em menor grau do tritiomolibdato que mesmo o complexo passando por um pH extremamente ácido, como ocorre no abomaso, não se deioniza, tornando o cobre inicialmente solúvel em insolúvel.

Quanto maior for a ingestão de molibdênio e do enxofre na dieta maior será a chance de se formar no rúmem os tiomolibdatos. Estes compostos são formados na fase sólida do rúmem e são mais estáveis num alto pH deste conteúdo, e quanto maior for a concentração de fibra dietética, de sulfato e de protozoários no conteúdo ruminal (SUTTLE, 1991).

O enxofre *per se* pode interferir com a disponibilidade do cobre na dieta. Estudos feitos por Suttle et al. (1984) sugeriram que o enxofre se reduz em sulfeto no rúmem ligando-se ao ferro, e no abomaso este complexo se desfaz, e o sulfeto liga-se, então, ao cobre, sendo que esta forte ligação com o cobre passa incólume pelos intestinos. Posteriormente, Ortolani (1997) verificou que esta reação ocorre, porém, não no abomaso e sim no duodeno.

2.4 INTOXICAÇÃO CÚPRICA EM OVINOS

A primeira descrição de intoxicação cúprica em ovinos ocorreu na Inglaterra por Mallory em 1925 apud Todd (1962). Posteriormente na década de 30, Broughton; Hardy (1934) apud Todd (1962), foram os primeiros a descrever que os

ovinos podem receber quantidades altas de cobre na dieta e armazená-lo no fígado, sem demonstrar por longos períodos sinais clínicos da doença, e subitamente poderiam manifestar o quadro hemolítico superagudo.

2.4.1 Causas da intoxicação cúprica

2.4.1.1 Fatores predisponentes

Vários são os fatores predisponentes relacionados à intoxicação cúprica em ovinos. Entre eles ressalta-se o fator racial dos ovinos. Estudos comparativos demonstraram que ovinos das raças Suffolk e Texel são mais predispostos a apresentarem intoxicação que o Scottish Blackface, Merino e Welch. As raças susceptíveis apresentam, provavelmente uma maior capacidade de absorver o cobre dietético e posteriormente retê-lo no órgão estoque. Ovinos jovens podem apresentar um risco de intoxicação até quatro vezes maior que os adultos devido a sua maior capacidade de absorção de cobre. As fêmeas parecem ser mais propensas a desenvolverem o quadro de intoxicação cúprica, provavelmente, pela ação do estradiol aumentando a retenção de cobre no fígado (ORTOLANI, 1996).

2.4.1.2 Fatores determinantes

A intoxicação cúprica é proveniente da ingestão de alimentos, água e demais substâncias que contenham altas quantidades de cobre, como contaminantes ou presentes naturalmente em suas composições; ainda a intoxicação pode ser advinda do uso de medicamentos ricos em cobre (RADOSTITS et al., 2007). Basicamente, os fatores determinantes de intoxicação podem ser divididos nas seguintes causas: por envenenamento, iatrogênico e dietético.

Nas causas por envenenamento citam-se: a ingestão de água armazenada em recipientes de cobre ou que circule por tubos de cobre; água de piscinas tratadas

com algicidas; água de pedilúvio para tratamento de casco com sulfato de cobre; efluentes contaminados com substâncias moluscocidas; ingestão de pastagens que permeiam pomares de uva, maçã etc tratados com produtos fungicidas; pastagens contaminadas com fiações de cobre etc, (RADOSTITS et al., 2007).

Nas causas iatrogênicas citam-se: uso de sulfato de cobre com finalidades anti-helmínticas ou para desenvolvimento de velo; tratamento de carências generalizadas de cobre com produtos injetáveis a base de edetato de cobre ou glicinato de cobre (RADOSTITS et al., 2007).

Vários são as causas dietéticas determinantes de intoxicação cúprica. A principal delas é a ingestão prolongada de rações comerciais a base de grãos (milho, cevada, arroz, sorgo etc) ricos em energia e que contém quantidades de cobre dentro dos requerimentos ou ligeiramente acima destes (8 - 15 ppm), mas com alta disponibilidade do cobre para os ruminantes (SUTTLE, 1986). Estes grãos geralmente apresentam baixas concentrações de molibdênio e teores normais de enxofre, o que predispõe o acúmulo de cobre hepático (ORTOLANI, 1996).

Outras fontes dietéticas ricas em cobre, muito comuns em nosso meio, são os sais minerais geralmente formulados para bovinos, espécie esta mais resistente a intoxicação cúprica. Além dos sais minerais fornecerem quantidades luxuriantes de cobre (de 1300 a 7500 ppm) os mesmos contêm, invariavelmente cobre fornecido na forma de sulfato, bastante disponível para ovinos (ORTOLANI, 1996).

Certos tipos de alimentos tais como cama de frango e esterco de suínos apresentam altas quantidades de cobre (70 a 350 ppm) e vários surtos de intoxicação cúprica já foram descritos após a ingestão prolongada destes subprodutos.

A intoxicação cúprica pode ser dividida em duas formas, de acordo com o quadro evolutivo. No caso de ingestão abrupta de grandes quantidades de cobre, dentro de um curto período de tempo, desencadeia-se o quadro agudo. Quando o acúmulo de cobre hepático é progressivo e se dá num espaço superior a um ou mais meses ou anos, até o desencadeamento do quadro hemolítico, denomina-se de intoxicação cúprica acumulativa.

Na primeira forma, a aguda, a quantidade de cobre ingerido de uma só vez, acima de 500 mg, já pode desencadear o surgimento da intoxicação (ORTOLANI, 1996). Contudo é mais freqüente nesta forma, a ingestão de quantidades superiores a um grama de cobre (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

A intoxicação "crônica" é a sinonímia mais utilizada para denominar a intoxicação acumulativa. Segundo OLGIVIE (1954), a primeira denominação é usada incorretamente, pois, tanto na forma aguda como na forma "crônica" os sinais clínicos, indicativos de crise hemolítica, desenvolvem-se de forma súbita e superaguda.

A quantidade sugerida de cobre para provocar a intoxicação cúprica acumulativa é bastante variável e dependente das condições predisponentes, já descritas, assim como das quantidades dietéticas de outros elementos interferentes na disponibilidade do cobre, em especial o enxofre e o molibdênio. Estudos têm demonstrado que ovinos jovens que recebem dietas pobres em molibdênio e enxofre e quantidades não muito grandes de cobre (12 a 20 ppm), podem no decorrer de meses ou mesmo de um ou mais anos acumular excessivamente cobre hepático, a ponto de apresentar uma intoxicação (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; HUMPHRIES et al., 1986; SOLI, 1980).

Além destes fatores citados acima é de fundamental importância a variabilidade individual. MacPherson; Hemingway (1969) induziram intoxicação cúprica em cordeiros de mesma raça, sexo, idade e lote de criação e obtiveram o surgimento do quadro hemolítico no animal mais susceptível no 184^o dia de experimento (dose acumulada de cobre oferecida de 11,50 g) e no mais resistente com 740 dias (dose acumulada de cobre oferecida de 46,25 g). Woollams et al. (1983) ofereceram dietas com diferentes quantidades de cobre para ovinos e constataram existir uma relação linear significativa com a retenção hepática do microelemento.

2.4.2 Patogenia

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

Na primeira delas ocorre acúmulo de cobre hepático sem que exista o surgimento de sinais clínicos evidentes. Inicialmente, o cobre vai acumulando-se nos hepatócitos periféricos à veia central e na zona pericanalicular. Contudo, com o

progredir do acúmulo de cobre outros hepatócitos, mais periféricos a estas áreas citadas, também aumentam suas concentrações de cobre, porém, com quantidades não tão altas.

De acordo com o que ocorre o aumento da concentração cúprica nos hepatócitos a distribuição deste microelemento dentro das células se modifica. Em condições normais, grande quantidade do cobre está situada dentro do núcleo e em menor quantidade no citosol, mitocôndria e lisossomo. Contudo, com o evoluir do acúmulo, o cobre passa a ser estocado nos lisossomos, os quais aumentam em número e tamanho dentro dos hepatócitos.

Quando o acúmulo de cobre dentro destes hepatócitos atinge valores superiores a 1.000 mg/kg M.S. pode ocorrer o rompimento de lisossomos provocando necrose intracelular, que pode ser limitada a um pequeno grupo de células nas semanas que antecedem a crise hemolítica ou desencadearem uma "reação em cascata" que provoca a necrose de um número extremamente maior de hepatócitos, nos dois a três dias que antecedem a crise hemolítica (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

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

O cobre livre adentra o eritrócito se combinando com radicais sulfidrilas da membrana celular, gerando a formação de radicais livres; diminuindo a quantidade de glutathione, responsável pela manutenção da integridade da membrana. No decorrer de um dia após a entrada de cobre nos eritrócitos, inicia-se um intenso processo hemolítico (SANSINANEA et al. 1994).

Além destes danos, temporariamente o cobre livre pode, nos eritrócitos não lisados, oxidar a hemoglobina transformando-a em metahemoglobina, a qual é incapaz de carrear oxigênio. Soli; Froslic (1977) encontraram um percentual variável (10 a 20%) de metahemoglobina nos eritrócitos de ovinos intoxicados. A anemia, provocada pela crise hemolítica, associada a metahemoglobinemia, que incapacita temporariamente o transporte de oxigênio para a economia animal, gera um quadro de anoxia anêmica (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; RADOSTITS et al., 2007).

Entretanto, na decorrência deste grave quadro ainda não foi investigado até o momento a evolução do equilíbrio ácido-básico, assim como as concentrações de gases sanguíneos em ovinos intoxicados, necessitando uma perfeita avaliação de tais variáveis.

O cobre livre associado a presença de lisosimas e radicais livres também causam danos em outros órgãos da economia animal, além dos já citados. Gooneratne; Howell (1980) descreveram que no decorrer de dois a três dias posteriores ao início da crise hemolítica existe uma lise limitada de células da musculatura estriada.

Outros órgãos bastante afetados em seguida a crise hemolítica são os rins. Além dos agentes agressores supracitados destaca-se também a hemoglobina livre, fruto de intensa hemólise, como substância nefrotóxica. Segundo Gooneratne et al. (1986) e Jones et al. (1984) o achado de um complexo cúprico-proteico-lisossomal nos túbulos contornados proximais está sempre acompanhado de degeneração celular e morte de muitas destas células e parece ser mais intenso os danos, quanto maior for o grau de hemólise. Além destes danos nos túbulos contornados proximais, os supracitados autores também descreveram lesões discretas na lâmina basal glomerular, assim como a presença de proteinúria e cilindros hemoglobinicos. Todas estas descrições levam os autores a afirmarem que ocorre insuficiência renal nos ovinos intoxicados (GOONERATNE et al., 1986; JONES et al., 1984). Entretanto, pelo fato destes estudos terem sido realizados especificamente para avaliar as lesões renais independente do quadro geral, os autores não concluem da real importância da insuficiência renal dentro do contexto desta enfermidade, necessitando maiores estudos a respeito.

Em ovinos intoxicados que apresentem uma sobrevivência maior que cinco dias, pode ocorrer, como um evento terminal, vacuolização da substância branca do sistema nervoso central (SOLI, 1980).

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

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

2.4.3 Sinais clínicos

Durante grande parte da fase pré-hemolítica os ovinos não apresentam quaisquer sinais clínicos. Na semana que antecede a crise hemolítica Van Saun (1988) descreveu a presença de menor ganho de peso em cordeiros.

No dia da ocorrência de hemoglobinúria os seguintes sinais clínicos tornam-se evidentes nos ovinos intoxicados: anorexia, depressão, fraqueza, sede, taquipnéia, mucosas ictéricas e principalmente na forma aguda a presença de diarreia (LEMOS et al. 1997; RADOSTITS et al., 2007; SARGISON et al. 1994; SOLI, 1980). Com exceção de Lemos et al. (1997) e Machado (1998), nenhum outro autor citou a presença de hipotonia ruminal, hipertermia e taquicardia.

Em relação a coloração das mucosas, cita-se que além do surgimento de tom amarelado, causada pela presença de hiperbilirrubinemia, pode ser verificado mucosas achocolatadas, devida a metahemoglobinemia, e finalmente mucosas anêmicas, provocadas pela drástica redução do número de eritrócitos (ARORA et al. 1977; HUMPHRIES et al. 1988; LEMOS et al. 1997; SOLI, 1980; TODD et al. 1962). Nem todos os autores supracitados descreveram todas estas colorações de mucosas, pois na maioria dos relatos a sobrevivência dos animais foi pequena.

Também é descrito em casos esporádicos o aparecimento de quadro de poliencefalomalácia, caracterizado por amaurose, dificuldade de locomoção e opistótomos (SARGISON et al., 1994).

No caso dos ovinos conseguirem sobreviver a fase crítica da intoxicação, os mesmos apresentarão uma gradual melhora no estado geral e na condição clínica (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

2.4.4 Patologia clínica

A concentração de cobre hepático é conclusiva no diagnóstico de intoxicação cúprica, principalmente nos casos fatais. Usualmente, os teores de cobre hepático variam de 60 a 300 mg/kg M.S. Ovinos intoxicados podem conter teores de cobre hepático de 1400 a 5000 mg/kg M.S.; esta concentração pode ser usada como parâmetro para monitorar o acúmulo de cobre hepático em ovinos de rebanhos sujeitos a risco de intoxicação.

Entre os indicadores precoces da intoxicação cúprica, merecem destaque as atividades das enzimas hepáticas, já que o fígado é o primeiro e único órgão a manifestar lesões de pequena monta, com algumas semanas de antecedência ao aparecimento de hemoglobinúria (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; SUTTLE, 1995).

Vários foram os estudos a respeito da atividade das enzimas hepáticas. Entre eles destaca-se o de MacPherson; Hemingway (1969) que acompanharam as atividades de AST (aspartato aminotransferase) e GGT (gama glutamiltransferase) em sete ovinos durante a fase pré-hemolítica. Os autores concluíram que a atividade de AST apresentou melhor desempenho como indicador precoce de intoxicação, que a de GGT, pois ocorreu um aumento significativo de AST em 71,5% dos casos, quatro a cinco semanas prévios ao aparecimento de hemoglobinúria, e em 14% dos casos o surgimento já na 6ª semana ou apenas na 2ª semana.

Em outro estudo Schee et al. (1983) compararam a relação entre cobre hepático e atividade de cinco enzimas hepáticas (SDH – sorbitol desidrogenase, GGT – gama glutamiltransferase, LDH – lactato desidrogenase, AST - aspartato aminotransferase e FA - fosfatase ácida) em ovinos submetidos a dietas riquíssimas em cobre, porém, sem apresentarem intoxicação cúprica. Os autores concluíram que melhor se relacionavam com altos teores de cobre hepático a AST e SDH, e em menor grau a GGT; a LDH só se correlacionou com a concentração de cobre hepático, quando esta foi superior a 1.500 ppm. Howell; Gawthorne (1987) determinaram a atividade de FA, contida dentro dos lisossomos e concluíram que a mesma se eleva no 5º dia prévio à hemoglobinúria. Suttle (1995) indica que, entre as enzimas hepáticas, a atividade da GLDH (glutamato desidrogenase) se eleva com maior precocidade, seguida de AST e GGT. Contudo, o autor faz uma ressalva

quanto ao uso de AST, pelo fato de apresentar falsas atividades elevadas, derivadas de lesões musculares ou de outros tecidos que não hepáticos.

Comparando a eficiência de AST e GGT na fase pré-hemolítica Lemos et al. (1997) indicam que a GGT elevou sua atividade mais precocemente que a AST, no decorrer da 1^a a 3^a semana da fase pré-hemolítica. Entretanto, o trabalho de Lemos et al. (1997) não especifica claramente a periodicidade da determinação da atividade de AST e GGT no período pré-hemolítico do experimento; assim como não apresenta o seqüencial de dados obtidos, o que torna mais difícil a compreensão dos resultados.

As atividades de todas as enzimas hepáticas citadas previamente se elevam nas primeiras duas semanas da fase pós-intoxicação, apresentando em seguida, retorno aos valores de normalidade (HOWELL; GAWTHORNE, 1987).

A cupremia não é um bom indicador precoce de intoxicação e aumenta seus valores em até 10 vezes nos dois a três dias que antecedem ou que sucedem a hemoglobinúria, diminuindo seus valores durante o período de recuperação (HOWELL; GAWTHORNE, 1987). Os valores normais de cupremia variam de 9,3 $\mu\text{mol/L}$ a 20 $\mu\text{mol/L}$ (SUTTLE, 1986).

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

Alguns estudos foram realizados sobre a evolução do eritrograma de ovinos com intoxicação cúprica, principalmente a partir do início da crise hemolítica (BARDEN; ROBERTSON, 1962; ISHMAEL et al. 1972; SOLI; FROSLIE, 1977). É citada uma marcante redução no número de eritrócitos assim como no hematócrito e no teor de hemoglobina sangüínea, atingindo em alguns casos hematócrito de 5% (ISHMAEL et al. 1972).

Surpreendentemente, tais autores supracitados não apresentaram nos seus resultados os índices hematimétricos, respectivos, assim como não monitoraram a eritorregeneração, através da contagem de reticulócitos.

Segundo Ishmael et al. (1972), ovinos após a crise hemolítica, manifestada na intoxicação cúprica, apresentam um intenso aumento na concentração de uréia sérica, indicativa de insuficiência renal aguda.

Contudo, tais autores não determinaram, conjuntamente a concentração de creatinina sérica. Gooneratne et al. (1981) verificaram as seguintes alterações na urinálise: hemoglobinúria durante a crise hemolítica, proteinúria e bilirrubinúria.

2.4.5 Achados necroscópicos

É comum a morte em ovinos acometidos por intoxicação cúprica e não tratados; sendo a letal idade variável de 75 a 100% (RADOSTITS et al., 2007).

Na maioria dos casos as mucosas, carcaça e principais serosas apresentam coloração amarelada. O sangue se apresenta enegrecido e aquoso. O fígado está aumentado de volume, friável e de coloração alaranjada, com a vesícula biliar dilatada e com conteúdo espesso e grumoso; os rins se encontram com sua cápsula e parênquima enegrecidos e edemaciados, característico desta intoxicação; o baço apresenta-se aumentado de volume e friável e em alguns casos observa-se gastroenterite (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; RADOSTITS et al., 2007).

2.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico da intoxicação cúprica é feito pelo histórico, sinais clínicos, patologia clínica e achados necroscópicos. Na anamnese detecta-se o uso de rações, suplementos ou aplicação de medicamentos ricos em cobre. A presença de hemoglobinúria associada a mucosas achocolatadas e/ou ictéricas são sugestivas do quadro. Na patologia clínica destaca-se a determinação de elevadas: cupremia, atividades de enzimas hepáticas, hiperbilirrubinemia, altas concentrações de uréia sérica e hemoglobina livre assim como baixo hematócrito. Altas concentrações de cobre hepático e renal são conclusivas. Os achados necroscópicos mais importantes são a icterícia generalizada, rins com cápsula e parênquima enegrecidos e fígado

friável e de coloração alaranjada (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; ORTOLANI, 1996; RADOSTITS et al., 2007).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com a leptospirose e hemoglobinúria bacilar Tanto no primeiro como no segundo caso o quadro clínico é acompanhado de síndrome febril; na hemoglobinúria bacilar se encontram no fígado características áreas de infarto anêmico. Nas duas enfermidades podem ser isolados os agentes causais (ORTOLANI, 1996).

2.4.7 Tratamento e controle

Até o início da década de 60 todas as tentativas de tratamento da intoxicação cúprica ficaram restritas ao uso de medicamentos pela via oral.

Esta terapia baseava-se no prévio conhecimento que tanto o molibdênio como o enxofre atuavam no tubo gastroentérico diminuindo a disponibilidade de cobre para o ruminante. Assim era recomendado o uso diário de 1 g de sulfato de sódio anidro e 100g de molibdato de amônia (RADOSTITS et al., 2007; SOLI, 1980).

Pierson; Aanes (1958) submeteram ovelhas ao recebimento de altas quantidades de cobre associadas ou não a sais de sulfato e molibdênio pela via oral, parte das ovelhas intoxicadas foram tratadas diariamente com os citados sais. Os autores concluíram que o uso de molibdato e sulfato atuaram eficazmente tanto na prevenção como na terapia da intoxicação.

Posteriormente, Todd et al. (1962) repetiram o experimento e concluíram que o uso de antagonistas de cobre funcionou bem como preventivo, porém promoveu cura em apenas 33% dos animais tratados. Tal tratamento pela via oral é aconselhável principalmente no caso de intoxicação aguda pelo cobre, quando grande quantidade deste microelemento pode estar disponível no tubo gastroentérico (ORTOLANI, 1996).

Vários tipos de medicamentos foram utilizados no tratamento da intoxicação cúprica com completo insucesso. Entre eles citam-se os seguintes: azul de metileno, para controle da metahemoglobinemia; ácido ascórbico, para atuar como agente redutor do cobre livre (forma cúprica); glutathione a fim de aumentar a concentração de glutathione dos eritrócitos; 2,3 dimercapto-1-propanol (SAL) e ácido dietileno

diamino tetracético cálcico (CaEDTA) para aumentar a excreção de cobre livre pela urina ou fezes (SOLI, 1980).

Posteriormente, verificou-se que a droga L-penicilamine (Cuprime®) tinha um efeito quelante sobre o cobre livre e estocado, aumentando a excreção renal de cobre em até 10 vezes; podendo ser utilizado no tratamento. Vários são os inconvenientes do seu uso na terapia da intoxicação cúprica, entre estes citam-se as seguintes razões: é um medicamento caro; pouco disponível; que aumenta de maneira significativa a excreção urinária de zinco; pode causar dermatopias, deficiência de piridoxina, e reações imunes que resultam em glomerulonefrite (GOONERATNE; CHRISTENSEN, 1997; SEYMOUR, 1987; SOLI, 1980; WOUK et al. 1981). Estes inconvenientes contra-indicam ou dificultam o uso desse medicamento na terapia da intoxicação cúprica.

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

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

Posteriormente, o TTM foi utilizado por Humphries et al. (1986) no tratamento de casos naturais de intoxicação cúprica em cordeiros, na Escócia. Os autores

utilizaram o mesmo esquema de terapia e via de aplicação preconizado por Gooneratne et al. (1981) e obtiveram cura em 80% dos casos clínicos.

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

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

Num outro trabalho, Kumaratilake; Howell (1989) trataram ovinos com intoxicação cúprica, utilizando 1,7 mg de TTM/kg p.v., porém, empregando três doses, a intervalos de 24 horas cada; obtiveram a cura de cerca de 75 % dos ovinos tratados. Este menor intervalo do uso de TTM, em relação ao protocolo original, motivou Botha et al. (1995) a realizarem um estudo da farmacocinética do TTM em ovinos, com alto estoque hepático de cobre. Concluiu-se que a meia vida do medicamento é de 7,0 horas e que 3,13% do farmaco permanecia no organismo por 33,5 horas, sugerindo que o uso do TTM no tratamento poderia ser otimizado, caso ele fosse empregado em períodos inferiores a 48 horas, como proposto inicialmente por Gooneratne et al. (1981) e repetido por Humphries et al. (1986, 1988).

Finalmente, Dincer et al. (1993) descreveram em ovinos intoxicados pelo cobre e em seguida tratados com 3,4 mg de TTM/kg P.V., casos de encefalopatias e graves alterações degenerativas no epitélio seminífero; nas fêmeas, cistos

foliculares e numerosos folículos atrésicos. Também foram observadas alterações em neonatos de fêmeas tratadas com TTM durante o período de gestação. A hipótese levantada pelos autores é de que o complexo TTM-cobre formado no organismo poderia atravessar a barreira hemato-encefálica e a placenta e poder-se-ia ter a liberação de TTM e cobre dentro do sistema nervoso central do ovino adulto e do feto, causando o problema. Os autores, também não descartam a hipótese de uma possível encefalopatia por insuficiência hepática.

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

O controle desta intoxicação deve ser realizado, principalmente quando são utilizados ovinos de raças susceptíveis e em animais estabulados, que recebam concentrados por longos períodos. Nestes casos, recomenda-se que as concentrações de cobre dietético não ultrapassem 10 ppm; que a relação forragem/concentrado não diminua de 60:40 e que suplementos minerais não contenham mais que 800 ppm de cobre (ORTOLANI, 1996). Como a diminuição da quantidade de cobre fornecida aos ovinos nem sempre é possível, o uso de antagonistas do cobre poderia ser empregado, diminuindo a disponibilidade deste elemento para os animais (HUMPHRIES et al., 1983).

Desde a década de 50 sabe-se que o molibdênio assim como o enxofre interfere na disponibilidade do cobre para ruminantes. Estudos mais recentes esclareceram que o molibdênio e o enxofre formam substâncias no rúmen dos animais tornando o cobre altamente indisponível para o organismo, sendo amplamente discutido por Suttle (1991) a formação dos chamados tiomolibdatos no rúmen. É demonstrada a seguir a seqüência química de formação de tiomolibdatos no interior da fase sólida do rúmen esquematizada por Ortolani (2006):

	S-2	S-2	S-2	S-2
	+	+	+	+
MoO₄-2	MoO₃S-2	MoO₂S₂-2	MoOS₃-2	MoS₄-2
molibdato	monotio-	ditio-	tritio-	tetratio-
	molibdato	molibdato	molibdato	molibdato

Concluiu-se, desta forma que quanto maior a saturação da molécula de molibdato por enxofre, maior será o poder quelante do composto final sobre o cobre, tornando-o indisponível. Assim quanto maior a ingestão de molibdênio e enxofre pelo animal, maior será a chance de formação dos tiomolibdatos no rúmen, tornando o cobre da dieta menos disponível para os animais. Estes compostos estão mais presentes quanto maior a concentração de fibra dietética, de sulfato e de protozoários no conteúdo ruminal (ORTOLANI, 2006; SUTTLE, 1991). Embora o enxofre seja importante para a formação dos tiomolibdatos, a presença do molibdênio é mais limitante para a síntese ruminal destes compostos, pois este último elemento se encontra na dieta em pequenas quantidades, na ordem de ppm, enquanto que o enxofre está em maior concentração, na ordem de gramas por quilograma.

Desta forma, o fornecimento destes antagonistas conjuntamente com a ração ou o suplemento mineral pode ser uma forma viável de prevenção desta enfermidade.

3 OBJETIVOS

1. Avaliar a potencialidade que um sal mineral rico em molibdênio possa ter na prevenção da ICA em ovinos.

2. Comparar o metabolismo do cobre, em especial quanto a sua concentração nos estoques hepáticos e digestibilidade aparente em ovinos que receberam ou não sal mineral rico em molibdênio, e altas concentrações de cobre

3. Comparar o quadro clínico-laboratorial de ovinos jovens que recebam por um período relativamente prolongado dietas com teores normais, altos ou muito altos de cobre e suplementados ou não com sal mineral rico em molibdênio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Foram utilizados 25 ovinos machos, da raça Ile-de-France, hípidos, com idade ao redor de três meses de idade e com cerca de 25 kg de peso vivo no início do experimento. Após um breve período de adaptação, todos os animais foram vermifugados com anti-helmínticos a base de ivermectina.

4.1.2 Instalações

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas metálicas individuais, o que permitiu o controle sobre o alimento ingerido, nas dependências do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), no *campus* de Pirassununga. As gaiolas foram dispostas lado a lado a fim de diminuir o estresse dos animais.

4.1.3 Dieta e Manejo

Todos os ovinos receberão uma dieta basal composta de 80% da matéria seca (MS) de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylum* (L.) Pers) e 20% de MS de concentrado energético por um período de adaptação às gaiolas metabólicas, com duração de 30 dias antes do início do período experimental. A quantidade total

de MS oferecida foi a correspondente a 2,75% do peso corpóreo, corrigida quinzenalmente no decorrer do experimento.

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

COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA	FENO DE CAPIM COAST-CROSS	CONCENTRADO COMERCIAL
Matéria seca (%)	87,42	87,98
Matéria mineral (%)	6,44	10,01
Proteína bruta (%)	7,32	17,38
Fibra bruta (%)	26,54	5,75
Extrativos não nitrogenados (%)	57,32	61,10
Extrato etéreo (%)	2,14	5,85
Fibra em detergente ácido (%)	33,66	8,92
Fibra em detergente neutro (%)	73,20	37,42
Cálcio (%)	0,42	1,45
Fósforo (%)	0,15	0,94
Cobre (ppm)	6,5	9,0
Molibdênio (ppm)	1,1	0,6

Fonte: Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP e UFRPE
 Quadro 1 – Composição bromatológica do feno de capim Coast-Cross e do concentrado comercial oferecido aos ovinos, durante o período experimental – São Paulo – 2006

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Delineamento Experimental

Este experimento seguiu um delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema multifatorial (2 x 2) (cobre dietético alto e altíssimo e suplementação mineral com e sem molibdênio) adicionado de um grupo controle com teores normais de cobre e suplementado com sal mineral contendo molibdênio.

Os 25 ovinos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, de cinco animais cada, e receberam os seguintes tratamentos dietéticos:

Grupo 1 - Fornecimento de dieta composta de 80% da MS de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylum* (L.) Pers), 20% da MS de concentrado comercial e sal mineral contendo 600 ppm de cobre quelatado e 300 ppm de molibdênio (GRUPO CONTROLE);

Grupo 2 - Oferecimento de dieta composta de 50% da MS de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylum* (L.) Pers), e 50% da MS de ração concentrada comercial, e sal mineral contendo 600 ppm de cobre, sem a presença de molibdênio;

Grupo 3 - Dieta oferecida ao Grupo 2 mais a suplementação mineral contendo 300 ppm de molibdênio;

Grupo 4 - Dieta fornecida ao Grupo 2 acrescida de 150 mg/dia cobre, na forma de sulfato de cobre pentahidratado, misturado ao concentrado;

Grupo 5 - Dieta fornecida ao Grupo 3 acrescida de 150 mg/dia cobre, na forma de sulfato de cobre pentahidratado, misturado ao concentrado.

Os animais receberam essas dietas no decorrer de 20 semanas ou até o surgimento da crise hemolítica, caracterizado pela hemoglobinúria macroscópica, quando então os animais foram abatidos, conforme legislação vigente.

Todos os animais foram pesados quinzenalmente no decorrer do experimento em balança comercial Filizola[®], com capacidade para 300 kg e sensibilidade de 200 gramas.

4.2.2 Indução Experimental de Intoxicação por Cobre

A indução do quadro de intoxicação cúprica foi realizada através do fornecimento de alta quantidade de concentrado, associado ou não a 150 mg/dia de sulfato de cobre pentahidratado. Antes do fornecimento da ração concentrada aos animais, uma pequena quantidade desta era misturada com 150 mg de sulfato de cobre pentahidratado e oferecido aos ovinos dos grupos 4 e 5. Era aguardado o consumo total deste antes de fornecer o restante da alimentação. Caso algum animal recusasse o alimento com cobre, este era diluído em 20 ml de água e fornecido via oral com o auxílio de uma seringa de plástico.

4.2.3 Protocolo de Colheita de Materiais Biológicos

Amostras de sangue e urina foram coletadas a cada duas semanas durante o período experimental. A partir do momento que foram detectados aumentos significativos nas atividades de GGT e/ou AST sérico, as amostras de sangue foram coletadas semanalmente para monitoramento, assim como quando os animais passaram a apresentar apetite seletivo e/ou hiporexia e as amostras foram coletadas diariamente até o dia em que apresentaram hemoglobinúria macroscópica. Estas amostras visavam um monitoramento mais detalhado do quadro clínico do animal para determinar com mais precisão o momento em que o ovino entrasse no quadro de crise hemolítica por ICA. Também foram obtidos fragmentos de fígado através de três séries de biópsias hepáticas, sendo primeira no período adaptativo, a segunda após a 10^a semana de experimento, e a terceira ao término do experimento (após a 20^a semana em ovinos que não manifestaram crise hemolítica, ou logo em seguida à manifestação clínica da ICA).

4.2.4 Protocolo de Exame Clínico

No momento de cada colheita, os animais também foram avaliados clinicamente. As seguintes variáveis clínicas foram acompanhadas:

- A frequência cardíaca e a frequência respiratória foram mensuradas no decorrer de um minuto, com auxílio de um fonendoscópio.
- Os movimentos ruminais foram obtidos pela auscultação no decorrer de três minutos, na região da fossa paralombar esquerda.
- A temperatura retal foi obtida com um termômetro clínico, após três minutos.
- Demais sinais exibidos no decorrer do período experimental também foram registrados.

4.2.5 Colheita e Processamento das Amostras Sangüíneas

Todas as amostras sangüíneas foram coletadas da veia jugular externa, por venipunctura, em tubos de vidro siliconizados providos de rolha de borracha, marca Vacutainer[®] Becton-Dickinson. Para cada colheita foram utilizados: um tubo com capacidade de 10 ml sem anticoagulante para obtenção de soro.

Após cada colheita, as amostras eram armazenadas em temperatura ambiente até o seu processamento. Os tubos eram mantidos em banho-maria a 37°C por 20 minutos antes de serem centrifugados 1400 G por 10 minutos.

4.2.5.1 Concentração de Uréia Sérica

A determinação de uréia sérica foi realizada baseada em atividade cinética descrita por Talke; Schubert (1965) utilizando kit comercial Bayer[®] n^o T-011821-56, processada no analisador bioquímico automático marca AMS[®] modelo Lyasis.

4.2.5.2 Concentração de Creatinina Sérica

A creatinina sérica foi determinada pelo método cinético descrito por Lutsgarten; Wenk (1972), utilizando o kit comercial Sigma n^o 555. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático marca AMS[®] modelo Lyasis.

4.2.5.3 Atividade de Aspartato Aminotransferase Sérico (AST)

A atividade de AST foi determinada através de método cinético, utilizando kit comercial ByoSystems[®] nº 11531. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático marca AMS[®] modelo Lyasis.

4.2.5.4 Atividade de Gama Glutamiltransferase Sérico (GGT)

A atividade de GGT foi determinada através de método cinético, utilizando kit comercial ByoSystems[®] nº 11520. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático marca AMS[®] modelo Lyasis.

4.2.5.5 Atividade de Ceruloplasmina

A ceruloplasmina sérica foi determinada por método colorimétrico, segundo Schosinsky et al. (1974).

4.2.5.6 Concentração de Bilirrubina Sérica Total

A concentração de bilirrubina total foi determinada através de método colorimétrico direto de diazotação, segundo Jendrassik; Grof (1938), utilizando kit comercial. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático marca AMS[®] modelo Lyasis.

4.2.5.7 Concentração de Cobre Sérico

A concentração de cobre sérico foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica, segundo Ortolani (1997).

4.2.5.8 Concentração de Molibdênio Sérico

A concentração de Molibdênio sérico foi determinada por método catalítico, segundo Quin; Woods (1979).

4.2.6 Colheita e Processamento das Amostras de Urina

A colheita de urina foi realizada logo após a obtenção das amostras sanguíneas, utilizando-se de coletores de urina para humanos, modelo infantil, o qual era aderido temporariamente a região externa do prepúcio, com uso de cola comercial a base de cianoacrilato (Super Bonder[®]).

4.2.6.1 Mensuração de pH urinário

O pH da urina foi determinado logo em seguida a colheita em um potenciômetro de mesa (pHmetro) Digimed[®], modelo DM-20, previamente calibrado.

4.2.6.2 Densidade urinária

Após a colheita, procedia-se a mensuração da densidade urinária através da utilização de refratômetro portátil marca Atago[®], modelo Uricon-N.

4.2.6.3 Concentração de cobre urinário

A concentração de cobre sérico foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica, segundo Ortolani (1997).

4.2.6.4 Concentração de molibdênio urinário

O molibdênio foi determinado por método catalítico descrito por Quin; Woods (1979).

4.2.6.5 Exame do sedimento urinário

Após a centrifugação da amostra por três minutos a 1000 G, o sobrenadante era desprezado e o sedimento colocado entre lâmina e lamínula e examinado em microscópio óptico, em magnitude de 100 e 400 X.

4.2.7 Biópsia hepática

Foram realizadas três series de biópsias hepáticas durante o experimento. A primeira durante o período de adaptação dos ovinos, a segunda após 75 dias o início do período experimental, e a terceira ao término do experimento (150º dia em ovinos que não manifestaram crise hemolítica, ou logo em seguida à manifestação clínica da ICA).

As biópsias foram realizadas por meio de contenção, protocolo anestésico e técnica laparoscópica adaptada da técnica descrita por Silva et al. (1996). Após a coleta, as amostras de fígado foram mantidas congeladas a -20º C até seu

processamento para realização das determinações dos teores de cobre e molibdênio.

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 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 e zinco foram determinadas na solução final, tendo como base o peso seco das amostras de fígado, através de espectrofotometria de absorção atômica, segundo Ortolani (1997).

4.2.8 Ensaio de retenção aparente de cobre e molibdênio

Foram realizados três ensaios de retenção aparente por Método Clássico do cobre e do molibdênio, uma antes do início do experimento, outra na 10^a semana e a última na 20^a semana. Foi coletado no período de três dias o total de fezes e urina e quantificada o total de cobre e molibdênio excretados, além de determinar o total destes microelementos ingeridos no decorrer destes dias

As fezes foram coletadas utilizando bolsa coletora clássica, utilizada em ensaios de digestibilidade em ovinos, enquanto que a urina foi recolhida em recipientes plásticos sob o funil coletor da base da gaiola metabólica. Tanto o cobre nas fezes quanto na urina foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, segundo técnica citada por Ortolani (1997). O molibdênio presente nas fezes e urina foi determinado utilizando método catalítico descrito por Quin; Woods (1979).

4.2.9 Tratamento

A princípio, era pretendido realizar o tratamento a partir do momento em que fosse constatada a presença de hemoglobinúria macroscópica os animais, consistindo em administração lenta de solução de 3,4 mg/kg P.V. de tetratiomolibdato de amônia (TTM) diluída em 10 a 15 mL de solução salina, realizada uma vez por dia, por quatro dias consecutivos sempre no mesmo horário (MACHADO, 1998). Mas após o primeiro animal intoxicado, no qual foi realizado este procedimento, mostrar-se muito debilitado para a realização da terceira biópsia hepática, além da presença de muitas aderências na cavidade abdominal que prejudicavam a realização da 3ª biópsia hepática, optou-se pelo abate, realizado no Matadouro-Escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga – USP, conforme legislação vigente.

4.2.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram processadas com auxílio de dois programas estatísticos computadorizados (MINITAB RELEASE 13, 2000).

A freqüência de mortalidade dos grupos foi comparada pelo teste exato de Fisher (MASSAD et al., 2004).

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua distribuição paramétrica ou não pela prova de Kolmogorov-Smirnov (SIEGEL, 1975). Os dados que apresentaram distribuição não-paramétrica foram comparados pelo Teste de Mann-Whitney. Os dados que apresentaram distribuição paramétrica foram analisados inicialmente pelo teste F de ANOVA e quando significativas às médias foram confrontadas pelo teste de Duncan (SAMPAIO, 1998).

No estudo da relação entre duas variáveis foram calculados os coeficientes de correlação (SNEDCOR; COCKRAN, 1967) e as equações de regressão.

4.2.10.1 Distribuição de Dados

Apresentaram distribuição paramétrica as seguintes variáveis: ingestão diária de cobre, excreção diária de cobre, acúmulo diário de cobre, ingestão diária de molibdênio, excreção diária de molibdênio, acúmulo diário de molibdênio, cobre sérico, molibdênio sérico, peso vivo, ganho de peso global, frequência cardíaca, frequência respiratória, movimento ruminal, temperatura retal, uréia sérica, creatinina sérica, atividade de AST, atividade de GGT, atividade de ceruloplasmina, bilirrubina total, cobre hepático, molibdênio hepático, zinco hepático, pH urinário e densidade urinária.

Apresentaram distribuição não-paramétrica as seguintes variáveis: ganho de peso diário.

4.2.10.2 Cálculo dos valores preditivos

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.

4.2.10.3 Níveis de Significância

Foram consideradas significativas as diferenças cujo valor de “P” apresentou

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

5 RESULTADOS

GANHO DE PESO

Quando foi analisado o ganho de peso diário médio, verificou-se que os animais do grupo 1 mantiveram um pequeno ganho, mas observado de forma constante. Diferentemente dos ovinos dos grupos 2, 3, 4 e 5 que iniciaram com um ganho de peso elevado, diminuindo significativamente ao redor da 10ª semana de experimento, quando da biópsia hepática, voltando a elevar-se em torno da 16ª semana. Até a 8ª semana, o ganho de peso dos grupos 4 e 5 foi significativamente maior que o ganho de peso do grupo 1 (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1 - Valores de mediana, valor mínimo e valor máximo do ganho de peso vivo (g/dia) de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0-2	30 (7 – 50) ^{bA}	93 (50 – 110) ^{abA}	140 (100 – 217) ^{abA}	167 (150 – 217) ^{aA}	157 (123 – 173) ^{abA}
2-4	33 (15 – 50) ^{bA}	98 (50 – 110) ^{abáA}	130 (90 – 200) ^{abA}	156 (135 – 210) ^{aA}	163 (135 – 187) ^{abA}
4-6	17 (0 – 60) ^{bA}	83 (57 – 150) ^{abAB}	133 (100 – 133) ^{abAB}	133 (100 – 167) ^{aAB}	83 (67 – 133) ^{abAB}
6-8	20 (5 – 60) ^{bA}	82 (50 – 150) ^{abAB}	125 (90 – 132) ^{abAB}	128 (98 – 158) ^{aAB}	85 (67 – 125) ^{abAB}
8-10	15 (0 – 20) ^{aA}	32 (17 – 83) ^{aAB}	25 (-17 – 67) ^{aB}	33 (17 – 50) ^{aB}	17 (0 – 33) ^{aB}
10-12	15 (0 – 20) ^{aA}	34 (20 – 90) ^{aAB}	20 (0 – 60) ^{aB}	33 (12 – 60) ^{aB}	22 (12 – 33) ^{aB}
12-14	0 (0 – 30) ^{aA}	33 (0 – 33) ^{aB}	67 (30 – 100) ^{aAB}	60 (20 – 80) ^{aAB}	53 (0 – 80) ^{aAB}
14-16	0 (0 – 35) ^{aA}	33 (0 – 33) ^{aB}	60 (27– 107) ^{aAB}	50 (0 – 87) ^{aAB}	47 (0 – 87) ^{aAB}
16-18	13 (7 – 20) ^{bA}	30 (20 – 47) ^{abAB}	60 (33 – 80) ^{abAB}	47 (0 – 53) ^{abAB}	53 (33 – 80) ^{aAB}
18-20	7 (7 – 13) ^{bA}	36 (27 – 53) ^{abAB}	57 (40 – 67) ^{abAB}	53 (0 – 60) ^{abAB}	33 (27 – 60) ^{abAB}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

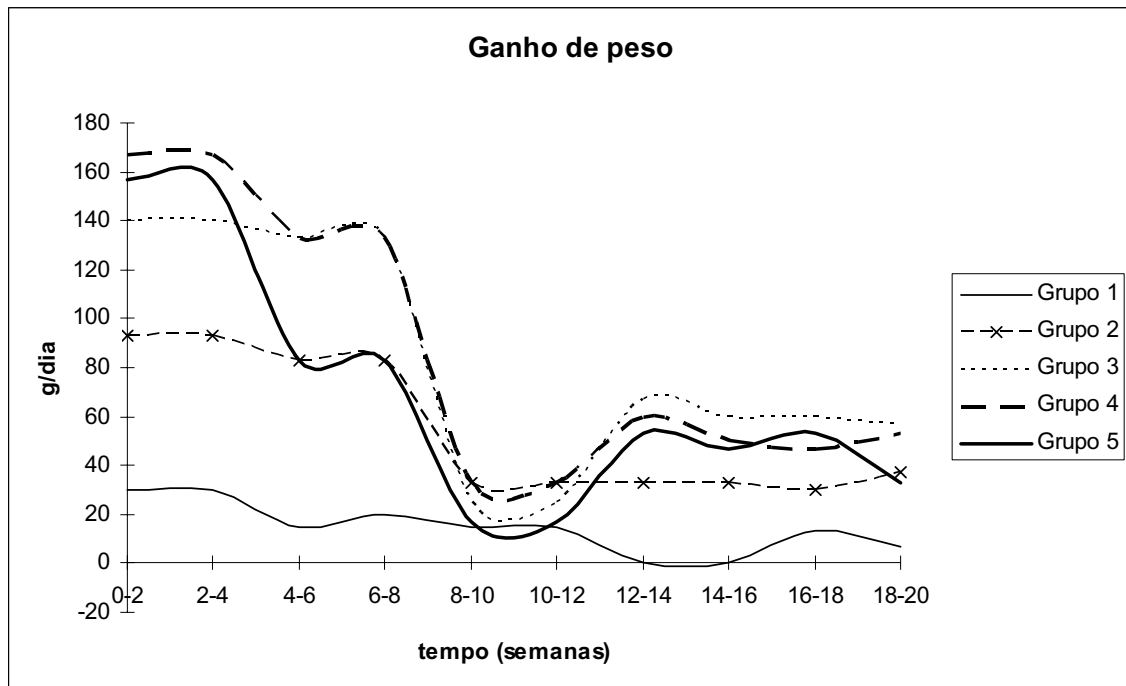


Gráfico 1 - Valores de mediana do ganho de peso vivo (g/dia) de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

GANHO DE PESO GLOBAL

Quando o peso total ganho durante o período experimental é computado, verifica-se que não houve diferença significativa no ganho de peso global entre os grupos 3, 4 e 5, mas que estes foram superiores ao grupo 2 que por seu turno foi maior que o grupo 1. (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão do ganho de peso global (kg) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

	Grupos				
	1	2	3	4	5
Ganho de peso global	2,7 ± 0,98 ^c	8,5 ± 1,68 ^b	12,7 ± 3,25 ^a	12,8 ± 1,33 ^a	10,6 ± 0,59 ^{ab}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

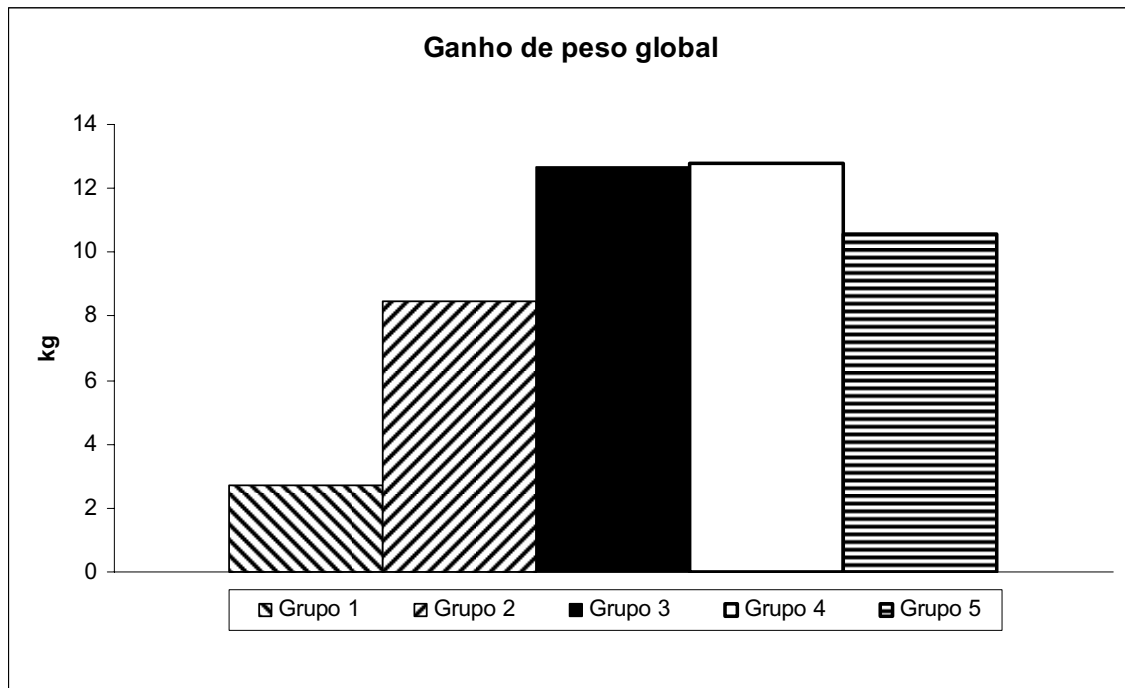


Gráfico 2 - Valores médios do ganho de peso global (kg) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

QUADRO CLÍNICO DOS ANIMAIS COM INTOXICAÇÃO CÚPRICA ACUMULATIVA

Nenhum ovino dos Grupos 1, 2 e 3 apresentou qualquer alteração clínica ou manifestação de intoxicação cúprica acumulativa (ICA) durante o período experimental. Contudo, quatro ovinos dos grupos suplementados com cobre (4 e 5) manifestaram quadro clínico definitivo de ICA, sendo três carneiros do Grupo 4 e um ovino do Grupo 5. Os três animais do Grupo 4 apresentaram ICA nas semanas 14, 18 e 20, respectivamente, enquanto que o ovino do Grupo 5 na semana 20. Aplicando-se o teste exato de Fisher, não se constatou diferença entre a frequência de mortalidade entre os grupos 4 e 5 ($P = 0,52$).

Todos os animais apresentaram quadro clínico considerado clássico, com presença de diminuição do apetite progressiva previamente ao surgimento de hemoglobinúria, apatia, andar cambaleante, diminuição dos movimentos ruminais, desidratação, mucosas aparentes e pele ictericas, fezes pastosas e oligúria. Os ovinos acometidos de ICA também apresentaram perda de peso, provavelmente decorrente da hiporexia progressiva e/ou anorexia. O quadro laboratorial dos animais que apresentaram ICA está demonstrado no quadro 2.

A condição corporal dos animais com ICA atingiu no final do quadro um escore de 2 (2/5), enquanto que os animais não acometidos dentro dos mesmos grupos situaram-se em torno de 3 a 3,5/5. Após ser medicado por 4 dias consecutivos com uma dose diária de tetratiomolibdato (3,4 mg/kg P.V.), o 1º ovino a apresentar ICA foi submetido ao procedimento de biópsia hepática, mas como seu estado geral não favorecia tal cirurgia, este sucumbiu no período pós-operatório. Desta forma adotou-se o procedimento de sacrifício humanitário, por meio de aprofundamento anestésico (tiopental), nos outros ovinos que manifestaram quadro de ICA, a fim de minimizar o sofrimento desses.

Quadro 2 - Variáveis bioquímicas e funções vitais dos ovinos com ICA no dia em que ocorreu hemoglobinúria macroscópica - São Paulo - 2006

Variáveis	Grupo 4			Grupo 5
	Ovino 1	Ovino 2	Ovino 3	Ovino 4
Tempo para intoxicação (dias)	85	116	138	140
Cobre sérico ($\mu\text{Mol/L}$)	50,9	45,6	45,5	47,1
Cobre hepático (ppm)	3186	2624	3872	2360
Retenção aparente diária de cobre (mg)	18,5	20,2	29,3	14,1
Molibdênio sérico ($\mu\text{Mol/L}$)	2,1	1,6	2,5	2,6
Molibdênio hepático (ppm)	3,8	3,7	4,6	5,3
Retenção aparente diária de molibdênio (mg)	-0,1	-0,65	0,3	0,35
Zinco hepático (ppm)	340	308	269	339
GGT sérica (U/L) (30° C)	138,3	117,7	189,3	195,8
AST sérica (U/L) (30° C)	1458	1090	345	259
Uréia sérica (mMol/L)	16,6	7,9	4,58	26,9
Creatinina sérica ($\mu\text{Mol/L}$)	221,9	151,2	118,1	511,8
Bilirrubina total ($\mu\text{Mol/L}$)	311	16,4	9,9	50,8
Freqüência cardíaca (bat/min)	136	125	118	120
Freqüência respiratória (mov/min)	36	32	36	36
Movimentos ruminais (mov/3' min)	0	1	1	1
Temperatura retal (° C)	40,2	39,8	39,9	39,8

O quadro clínico de ICA exibido pelos ovinos foi clássico e provocou uma série de alterações funcionais, como surgimento de taquicardia, oligopnéia, diminuição dos movimentos ruminais, ligeira hipertermia e anúria características. Por outro lado provocaram uma alteração súbita em algumas variáveis bioquímicas como a elevação nos teores de uréia, creatinina, bilirrubina além das atividades de AST e GGT. Tais alterações supracitadas foram amplamente verificadas e descritas por Machado (1998) e Soares (2004).

FREQÜÊNCIA CARDÍACA

No concernente à freqüência cardíaca não foram encontradas diferenças dentro dos grupos, assim como entre os grupos em todas as semanas, conforme ilustra Tabela 3 e Gráfico 3 ($P > 0,05$).

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão da freqüência cardíaca (bat/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	92 ± 12	95 ± 17	95 ± 11	91 ± 12	93 ± 9
2	95 ± 17	92 ± 13	91 ± 13	93 ± 13	91 ± 12
4	88 ± 11	93 ± 14	94 ± 15	95 ± 11	94 ± 11
6	91 ± 15	87 ± 15	89 ± 16	92 ± 11	88 ± 15
8	92 ± 9	89 ± 10	93 ± 12	92 ± 15	89 ± 12
10	87 ± 11	92 ± 14	93 ± 14	88 ± 15	93 ± 11
12	98 ± 16	90 ± 11	92 ± 11	89 ± 11	92 ± 14
14	91 ± 14	89 ± 13	89 ± 11	92 ± 14	91 ± 11
16	93 ± 10	94 ± 11	95 ± 15	92 ± 12	96 ± 15
18	91 ± 12	95 ± 10	92 ± 12	94 ± 10	90 ± 11
20	89 ± 14	91 ± 9	92 ± 15	91 ± 13	93 ± 10

Nota: não houve diferença entre as médias obtidas

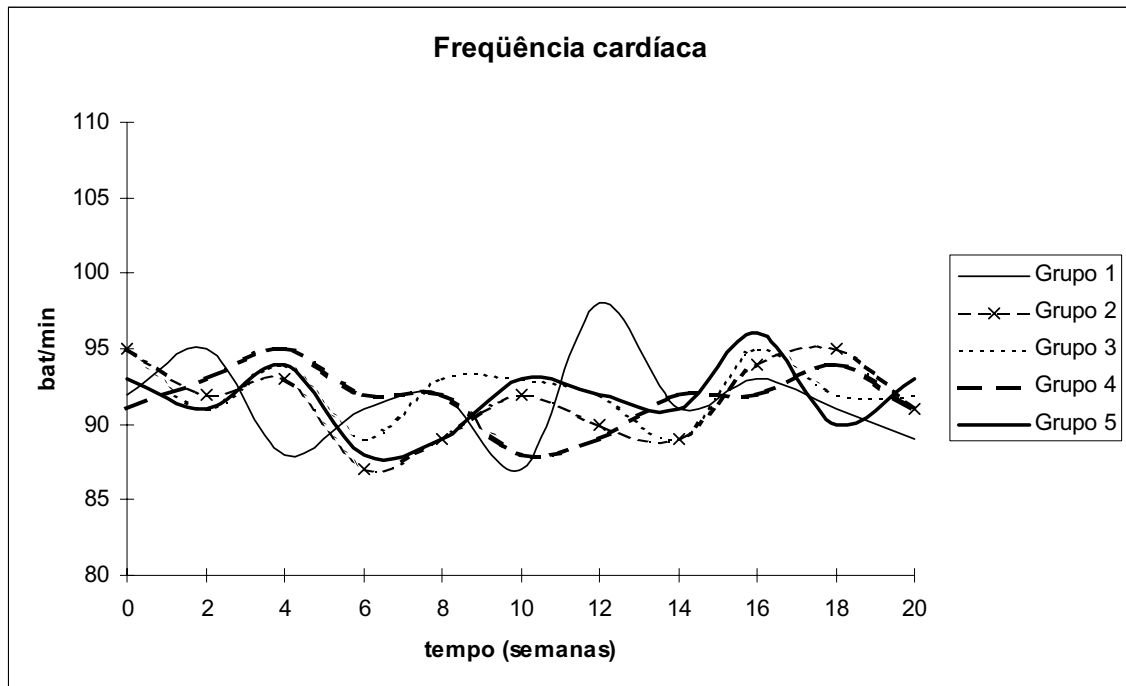


Gráfico 3 - Valores médios da frequência cardíaca (bat/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

Quando comparados os dados de batimentos cardíacos obtidos dos animais com ICA com os contados na 20ª semana dos grupos 4 e 5 constatou-se que os primeiros tiveram maiores médias (126 ± 7) que os outros grupos (92 ± 7) ($P < 0,001$).

FREQÜÊNCIA RESPIRATÓRIA

Não ocorreram quaisquer diferenças nas médias gerais de frequência respiratória em todos os grupos, assim como entre os grupos, como mostra a Tabela 4 e Gráfico 4 ($P > 0,05$).

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória (mov/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	51 ± 9	48 ± 7	49 ± 8	48 ± 9	52 ± 7
2	53 ± 11	51 ± 9	50 ± 9	52 ± 5	52 ± 9
4	48 ± 8	51 ± 8	52 ± 6	50 ± 7	49 ± 11
6	49 ± 7	50 ± 11	51 ± 9	52 ± 6	52 ± 7
8	51 ± 5	49 ± 10	48 ± 10	51 ± 7	50 ± 8
10	51 ± 6	51 ± 7	54 ± 12	49 ± 10	51 ± 6
12	53 ± 8	53 ± 11	49 ± 7	48 ± 9	54 ± 11
14	50 ± 6	48 ± 9	50 ± 6	52 ± 5	50 ± 8
16	51 ± 7	52 ± 5	49 ± 9	52 ± 7	51 ± 7
18	49 ± 8	51 ± 7	52 ± 5	49 ± 10	52 ± 9
20	52 ± 7	53 ± 9	51 ± 7	50 ± 7	52 ± 7

Nota: não houve diferença entre as médias obtidas

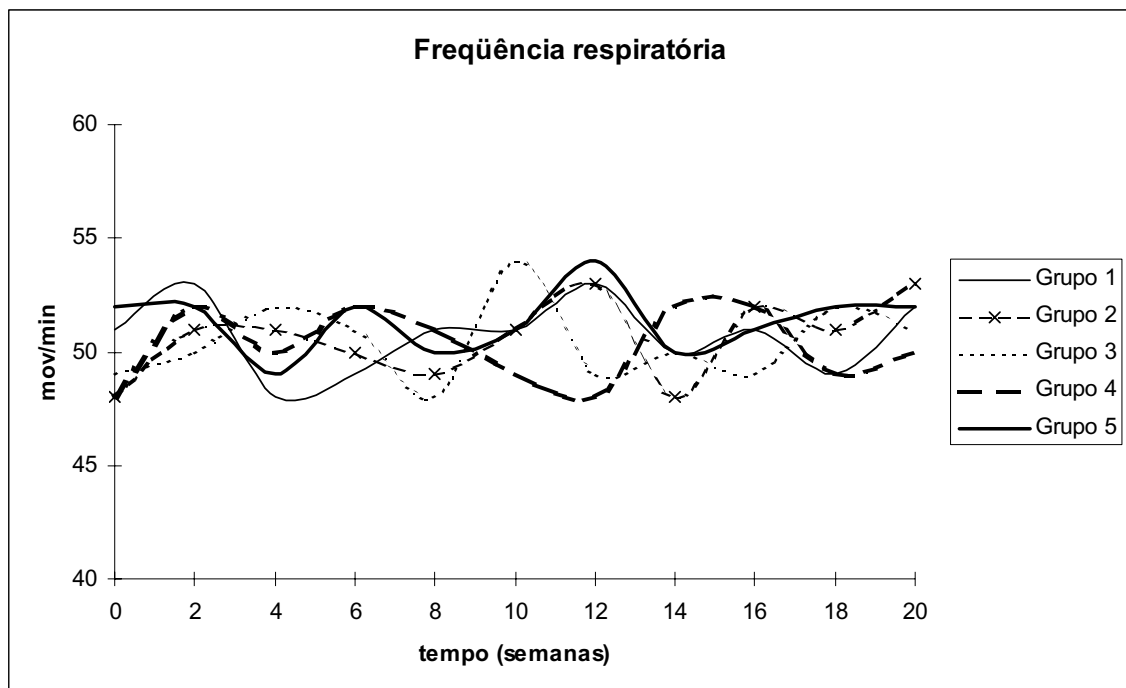


Gráfico 4 - Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória (mov/min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de frequência respiratória obtidos dos animais com ICA com os determinados na 20ª semana dos demais grupos constatou-se que os primeiros tiveram menores médias (35 ± 2) que os outros grupos (51 ± 4) ($P < 0,0001$).

MOVIMENTO RUMINAL

No concernente ao movimento ruminal não foram encontradas diferenças dentro dos grupos, assim como entre os grupos em todas as semanas, conforme ilustra Tabela 5 e Gráfico 5 ($P > 0,05$).

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão do movimento ruminal (mov/3 min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 1
2	3 ± 2	4 ± 1	4 ± 2	3 ± 1	3 ± 1
4	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 2
6	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 1
8	3 ± 2	4 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
10	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
12	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1
14	4 ± 1	3 ± 1	3 ± 2	3 ± 2	3 ± 1
16	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 2
18	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 1
20	3 ± 2	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	3 ± 1

Nota: não houve diferença entre as médias obtidas

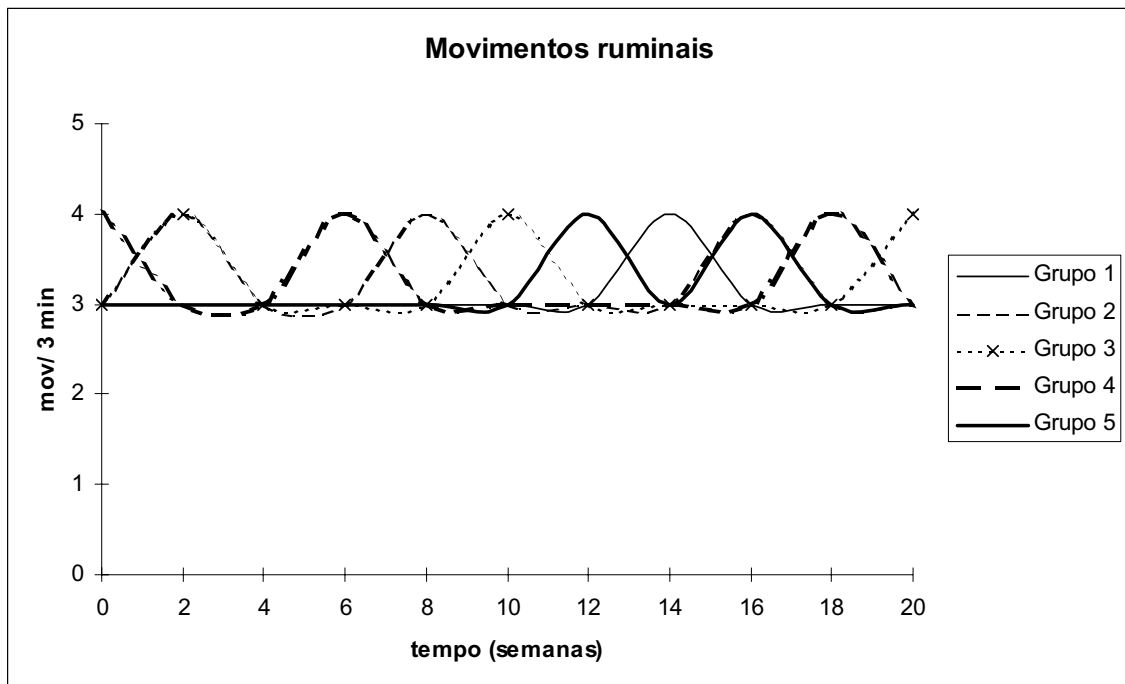


Gráfico 5 - Valores médios do movimento ruminal (mov/3 min) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de movimentos do rúmen obtidos dos animais com ICA com os contados na 20ª semana dos grupos 4 e 5 constatou-se que os primeiros tiveram menores médias ($0,75 \pm 0,5$) que os outros grupos (3 ± 1) ($P < 0,0001$).

TEMPERATURA RETAL

A temperatura retal não apresentou variação significativa no decorrer do experimento em todos os grupos, assim como não variou entre os grupos, como mostra a Tabela 6 e Gráfico 6 ($P > 0,05$).

Tabela 6 - Valores médios e desvios padrão da temperatura retal ($^{\circ}$ C) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	39,4 \pm 0,1	39,5 \pm 0,1	39,5 \pm 0,1	39,4 \pm 0,2	39,4 \pm 0,3
2	39,5 \pm 0,2	39,5 \pm 0,1	39,5 \pm 0,1	39,4 \pm 0,4	39,3 \pm 0,3
4	39,2 \pm 0,2	39,2 \pm 0,2	39,2 \pm 0,3	39,4 \pm 0,2	39,5 \pm 0,4
6	39,3 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,4 \pm 0,1	39,5 \pm 0,3	39,4 \pm 0,2
8	39,4 \pm 0,3	39,4 \pm 0,3	39,4 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,5 \pm 0,1
10	39,2 \pm 0,1	39,4 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,3 \pm 0,3	39,2 \pm 0,3
12	39,4 \pm 0,1	39,4 \pm 0,1	39,2 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1
14	39,3 \pm 0,1	39,4 \pm 0,1	39,3 \pm 0,2	39,5 \pm 0,1	39,4 \pm 0,1
16	39,5 \pm 0,3	39,2 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,1 \pm 0,2	39,3 \pm 0,1
18	39,5 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,2 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1
20	39,4 \pm 0,1	39,3 \pm 0,2	39,4 \pm 0,1	39,3 \pm 0,1	39,4 \pm 0,1

Nota: não houve diferença entre as médias obtidas

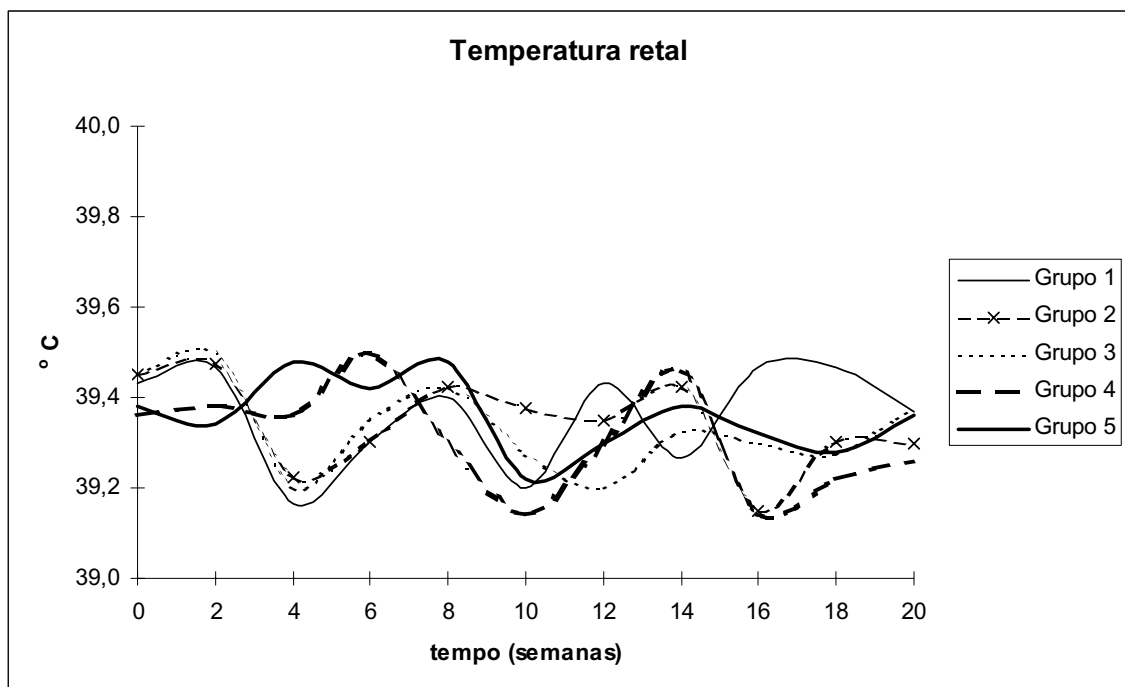


Gráfico 6 - Valores médios da temperatura retal ($^{\circ}$ C) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de temperatura retal obtidos dos animais com ICA com os mensurados na 20ª semana dos demais grupos constatou-se que os primeiros tiveram maiores médias ($39,9 \pm 0,2$) que os outros grupos ($39,3 \pm 0,1$) ($P < 0,01$).

INGESTÃO DE COBRE

Quando da análise dentro do próprio grupo, constataram-se que os grupos 3, 4 e 5 ingeriram maiores quantidades totais de cobre nas 10ª e 20ª semanas que no período pré-experimental (semana zero). Na análise entre os grupos no decorrer do experimento, ficou confirmado que os carneiros dos grupos 4 e 5 ingeriram quantidades muito maiores de cobre, por dia, que os grupos 1, 2 e 3; o grupo 3 consumiu maior quantidade de cobre que os grupos 1 e 2 nas 10ª e 20ª semanas (Tabela 7 e Gráfico 7).

Tabela 7 - Valores médios e desvios padrão do total de cobre ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

	Semana	Grupos				
		1	2	3	4	5
Cobre	0	$9,0 \pm 0,1^{aB}$	$9,3 \pm 0,3^{aB}$	$9,1 \pm 0,2^{aB}$	$9,2 \pm 0,2^{aB}$	$9,1 \pm 0,2^{aB}$
ingerido	10	$11,0 \pm 0,1^{cA}$	$18,6 \pm 0,8^{bA}$	$19,9 \pm 0,8^{bA}$	$171,1 \pm 0,9^{aA}$	$169,7 \pm 0,4^{aA}$
(mg)	20	$11,2 \pm 0,1^{cA}$	$18,8 \pm 0,6^{bA}$	$20,0 \pm 0,9^{bA}$	$171,1 \pm 0,9^{aA}$	$167,7 \pm 0,5^{aA}$

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

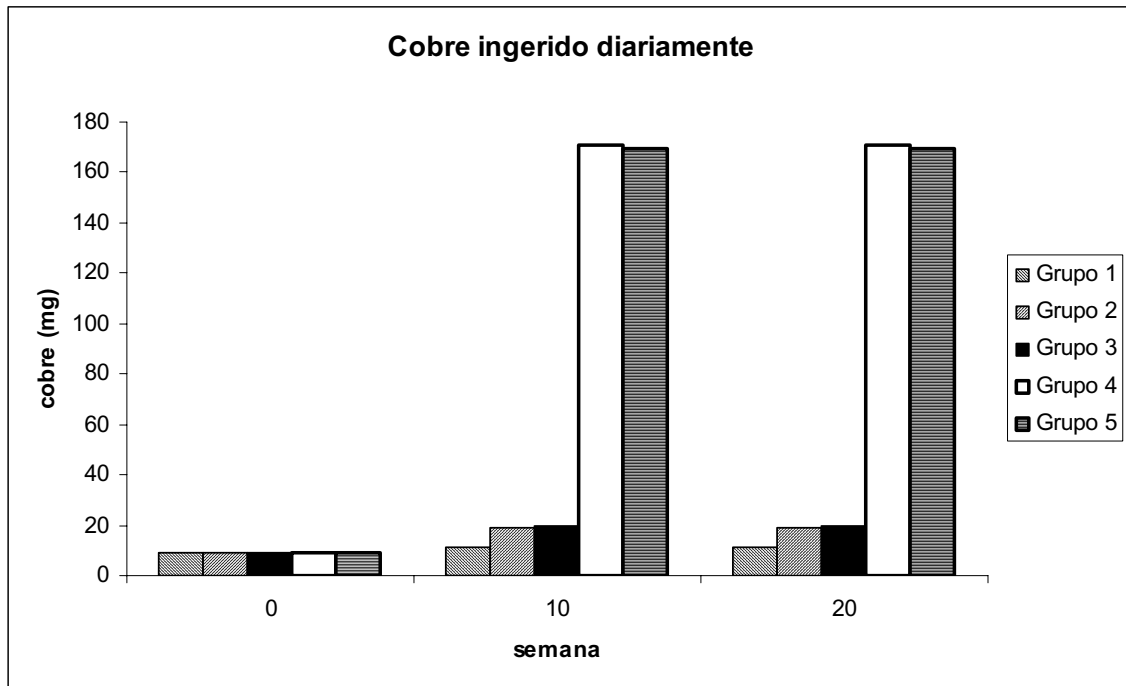


Gráfico 7 - Valores médios do total de cobre ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

EXCREÇÃO TOTAL DE COBRE PELAS FEZES E URINA

Dentro de cada grupo, ao se comparar a quantidade de cobre excretado pelas fezes e urina pelos ovinos dos vários grupos observamos que os animais dos grupos 3, 4 e 5 excretaram uma maior quantidade deste elemento nas 10^a e 20^a semanas quando comparadas com o período pré-experimental. Os carneiros dos grupos 4 e 5 excretaram uma alta quantidade de cobre quando comparado com os grupos 1, 2 e 3 nas 10^a e 20^a semanas em relação ao início do experimento (Tabela 8 e Gráfico 8).

Tabela 8 - Valores médios e desvios padrão do total de cobre excretado (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semana	Grupos					
	1	2	3	4	5	
Cobre excretado (mg)	0	10	20	10	20	10
	$10,7 \pm 5,8^{aA}$	$11,4 \pm 4,3^{bA}$	$12,3 \pm 3,3^{bA}$	$12,2 \pm 2,2^{aA}$	$16,7 \pm 3,5^{bA}$	$16,4 \pm 2,3^{bA}$
				$11,4 \pm 2,7^{aB}$	$20,0 \pm 2,9^{bA}$	$19,3 \pm 5,0^{bA}$
				$12,1 \pm 4,8^{aB}$	$149,8 \pm 14,9^{aA}$	$145,1 \pm 12,1^{aA}$
					$150,8 \pm 12,2^{aA}$	$151,4 \pm 7,4^{aA}$

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

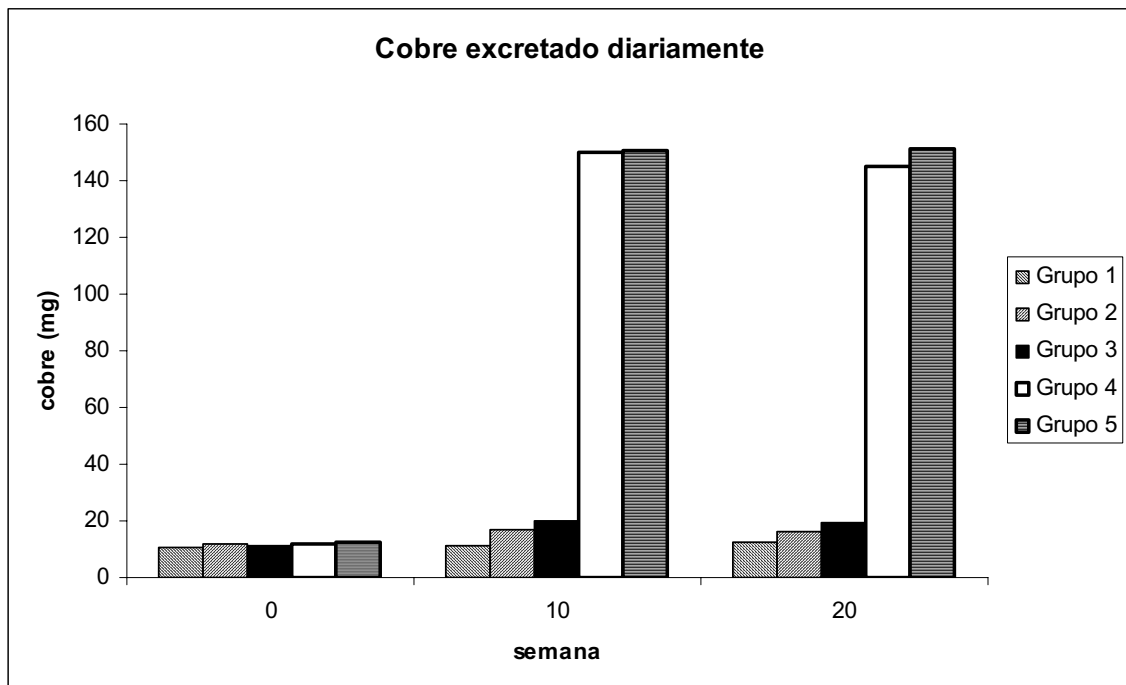


Gráfico 8 - Valores médios do total de cobre excretado (mg) nas fezes e urina por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

RETENÇÃO APARENTE DE COBRE NO ORGANISMO

A retenção aparente de cobre no organismo foi obtida da diferença dos teores de cobre ingerido menos o excretado por dia. Dentro de cada grupo, constataram-se maiores quantidades de cobre retido no organismo nos animais dos grupos 4 e 5 nas 10^a e 20^a semanas quando comparadas com o período pré-experimental, e os animais do grupo 3 na 20^a semana quando comparada com a semana zero. Na

comparação entre grupos, observaram-se maiores retenções de cobre nos carneiros dos grupos 4 e 5 em relação aos grupos 1, 2 e 3 tanto na 10^a como na 20^a semana (Tabela 9 e Gráfico 9).

Tabela 9 - Valores médios e desvios padrão do total de cobre retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semana	Grupos				
	1	2	3	4	5
Cobre					
0	-1,7 ± 5,9 ^{aA}	-2,9 ± 2,1 ^{aB}	-2,3 ± 2,5 ^{aA}	-2,9 ± 4,6 ^{aB}	-3,4 ± 3,3 ^{aB}
acumulado					
10	-0,4 ± 1,4 ^{bA}	1,9 ± 4,3 ^{bAB}	0,0 ± 2,8 ^{bA}	21,2 ± 15,4 ^{aA}	18,8 ± 12,2 ^{aA}
(mg)					
20	-1,1 ± 2,4 ^{bA}	2,4 ± 2,4 ^{bA}	0,7 ± 4,9 ^{bA}	25,9 ± 12,2 ^{aA}	18,4 ± 7,6 ^{aA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

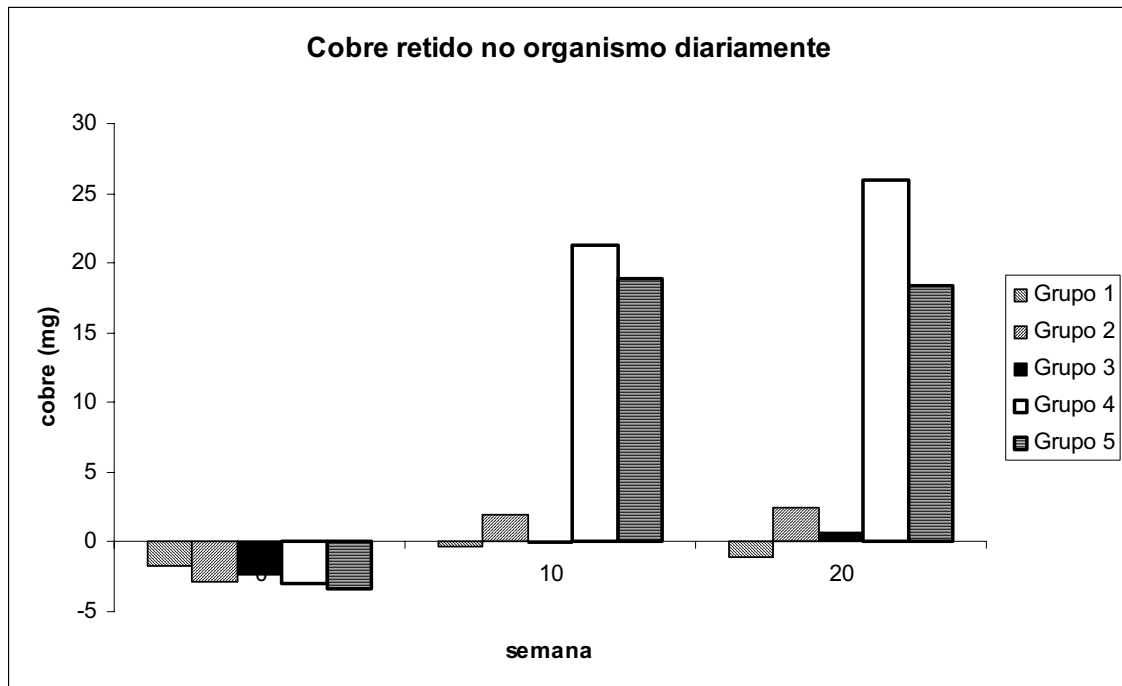


Gráfico 9 - Valores médios do total de cobre retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

TEORES DE COBRE HEPÁTICO

A Tabela 10 e o Gráfico 10 apresentam os valores médios da concentração hepática de cobre dos grupos experimentais nas três biópsias realizadas durante o

experimento. Destaca-se nesta tabela o aumento nos teores de cobre nos grupos 2, 4 e 5, atingindo seus valores mais altos na 3ª biópsia, enquanto que não existiu diferença dentro dos grupos 1 e 3. Quando comparamos os resultados obtidos entre os grupos, verificou-se que já na 2ª biópsia os grupos 4 e 5 apresentavam valores superiores aos do grupo 1, e na 3ª biópsia os grupo 4 e 5 continuavam a apresentar valores superiores aos grupos 1, 2 e 3, e que os animais do grupo 2 mostravam resultados superiores aos ovinos do grupo 1.

Tabela 10 - Valores médios e desvios padrão do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	320 ± 20,3 ^{aA}	339 ± 27,0 ^{aB}	325 ± 36,1 ^{aA}	330 ± 34,5 ^{aC}	328 ± 36,3 ^{aC}
10	318 ± 53,2 ^{bA}	387 ± 49,2 ^{bAB}	329 ± 22,7 ^{bA}	1490 ± 254 ^{aB}	1413 ± 253 ^{aB}
20	297 ± 13,7 ^{cA}	436 ± 63,0 ^{bA}	368 ± 23,7 ^{bcA}	3097 ± 544 ^{aA}	2068 ± 419 ^{aA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

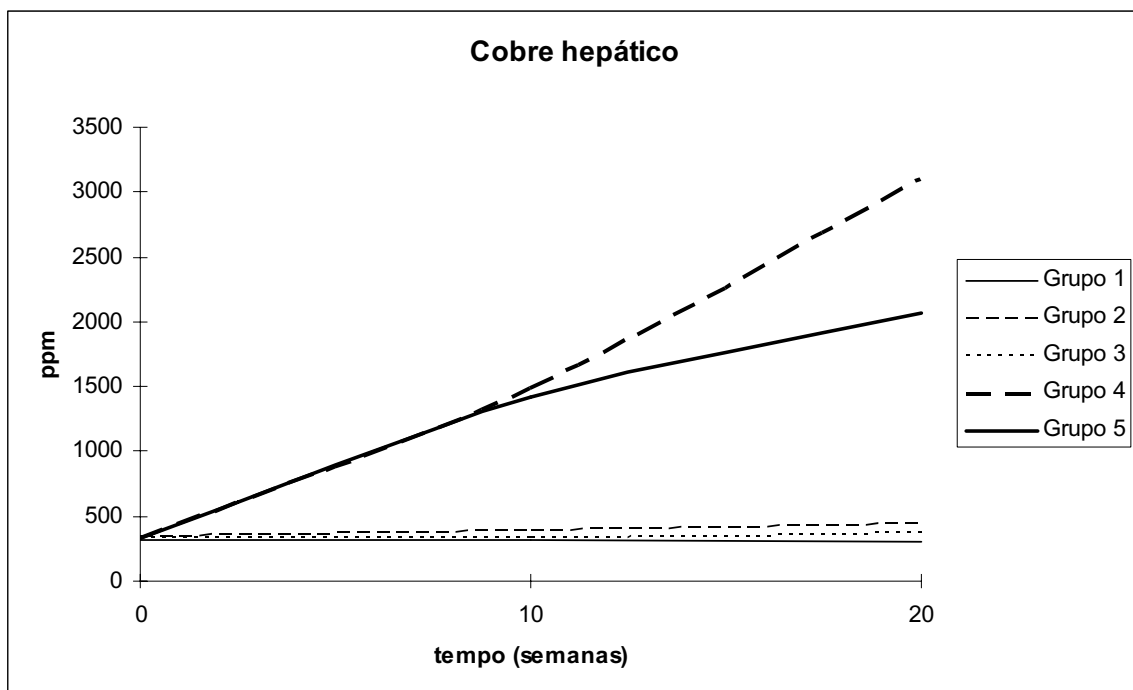


Gráfico 10 - Valores médios do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparadas as medianas obtidas dos animais com ICA com os mensurados na 20ª semana dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 constatou-se que os primeiros apresentaram valores mais altos (2905 ppm) que os outros grupos (430 ppm) ($P < 0,006$). Quando agrupados em 2 grupos, sendo um dos animais que receberam sal com molibdênio (3 e 5) e outro dos ovinos que não foram suplementados com molibdênio (2 e 4) foi constatado que ambos os grupos apresentaram uma elevação nos teores de cobre hepático na 20ª semana em relação ao tempo zero. Já quando confrontados entre si, os ovinos dos grupos 2 e 4 apresentaram valores medianos superiores aos dos grupos 3 e 5 na 20ª semana (Tabela 11 e Gráfico 11).

Tabela 11 - Medianas e valores mínimos e máximos do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos	
	2 e 4 (- Mo)	3 e 5 (+ Mo)
0	332 (283; 377) ^{aB}	330 (273; 371) ^{aB}
10	1175 (334; 1793) ^{aAB}	1022 (308; 1667) ^{aAB}
20	2450 (359; 3872) ^{aA}	1518 (346; 2427) ^{bA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

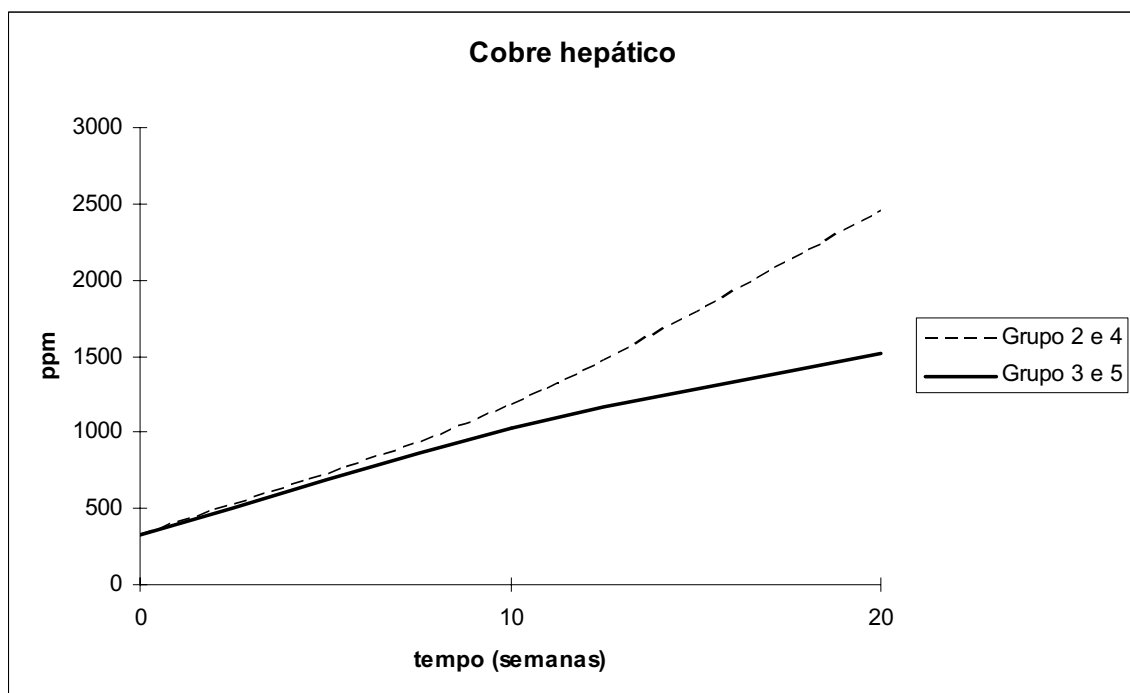


Gráfico 11 - Valores medianos do cobre hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio - São Paulo – 2006

INGESTÃO DE MOLIBDÊNIO

Quando da análise dentro do próprio grupo, constataram-se que os 1, 3 e 5 grupos ingeriram maiores quantidades totais de molibdênio nas 10^a e 20^a semanas que no período pré-experimental (semana zero). Na análise entre os grupos no decorrer do experimento, ficou confirmado que os carneiros dos grupos 1, 3 e 5 ingeriram quantidades muito maiores de molibdênio, por dia, que os grupos 2 e 4 (Tabela 12 e Gráfico 12).

Tabela 12 - Valores médios e desvios padrão do total de molibdênio ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semana	Grupos				
	1	2	3	4	5
Molibdênio ingerido (mg)	0	10	20		
	3,6 ± 0,5 ^{aB}	3,4 ± 0,5 ^{aA}	3,6 ± 0,8 ^{aB}	3,5 ± 0,8 ^{aA}	3,4 ± 0,6 ^{aB}
	10,4 ± 0,8 ^{aA}	4,3 ± 0,6 ^{bA}	10,9 ± 1,1 ^{aA}	4,2 ± 0,7 ^{bA}	10,5 ± 0,8 ^{aA}
	10,8 ± 0,6 ^{dA}	4,4 ± 0,6 ^{bA}	10,7 ± 1,0 ^{aA}	4,6 ± 1,0 ^{bA}	10,6 ± 1,0 ^{aA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

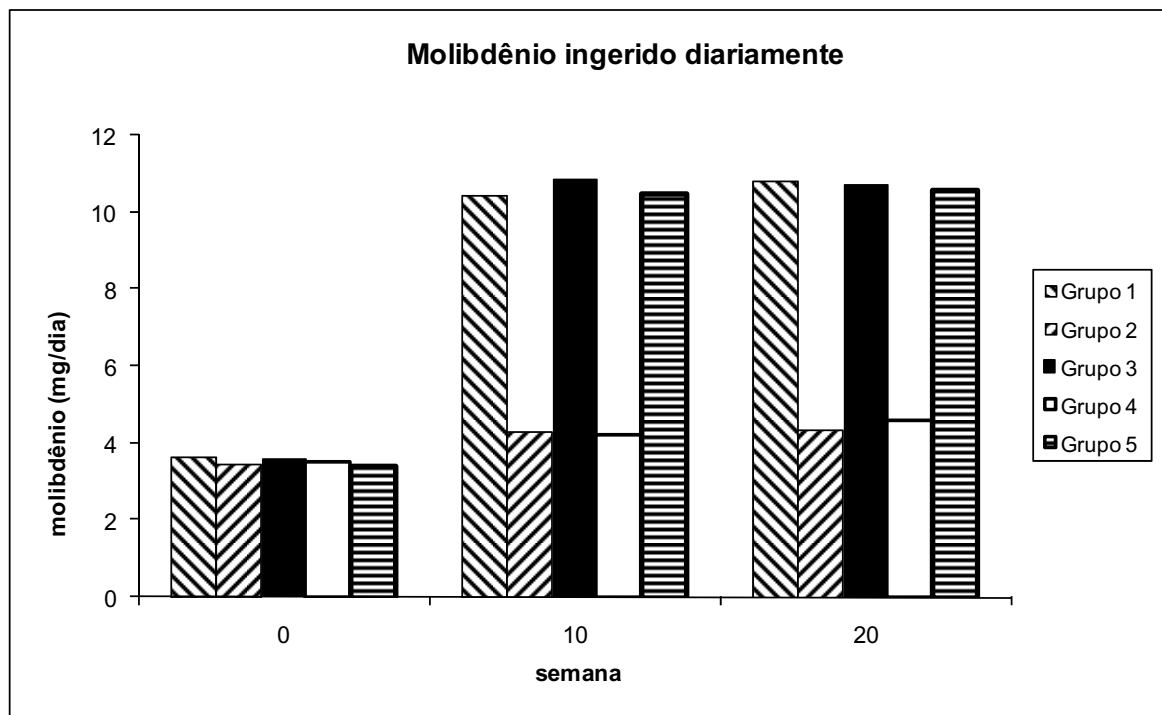


Gráfico 12 - Valores médios do total de molibdênio ingerido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

EXCREÇÃO TOTAL DE MOLIBDÊNIO PELAS FEZES E URINA

Dentro de cada grupo, ao se comparar a quantidade de molibdênio excretado pelos ovinos dos vários grupos observamos que os animais dos grupos 1, 3, 4 e 5 excretaram uma maior quantidade deste elemento nas 10^a e 20^a semanas quando comparadas com o período pré-experimental. Os carneiros dos grupos 1, 3 e 5 excretaram uma alta quantidade de molibdênio quando comparado com os grupos 2 e 4 nas 10^a e 20^a semanas, enquanto que os ovinos do grupo 5 excretaram mais molibdênio que os do grupo 1 nas 10^a e 20^a semanas (Tabela 13 e Gráfico 13).

Tabela 13 - Valores médios e desvios padrão do total de molibdênio excretado (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semana	Grupos				
	1	2	3	4	5
Molibdênio excretado (mg)					
0	2,7 ± 0,5 ^{aB}	3,0 ± 0,5 ^{aA}	3,0 ± 0,4 ^{aB}	3,0 ± 0,4 ^{aB}	3,1 ± 0,6 ^{aB}
10	6,4 ± 0,5 ^{bA}	4,1 ± 0,5 ^{cA}	7,5 ± 1,6 ^{abA}	4,2 ± 0,5 ^{cA}	8,6 ± 0,9 ^{aA}
20	6,6 ± 0,7 ^{bA}	3,8 ± 0,6 ^{cA}	7,5 ± 1,0 ^{abA}	4,3 ± 0,5 ^{cA}	8,5 ± 0,7 ^{aA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

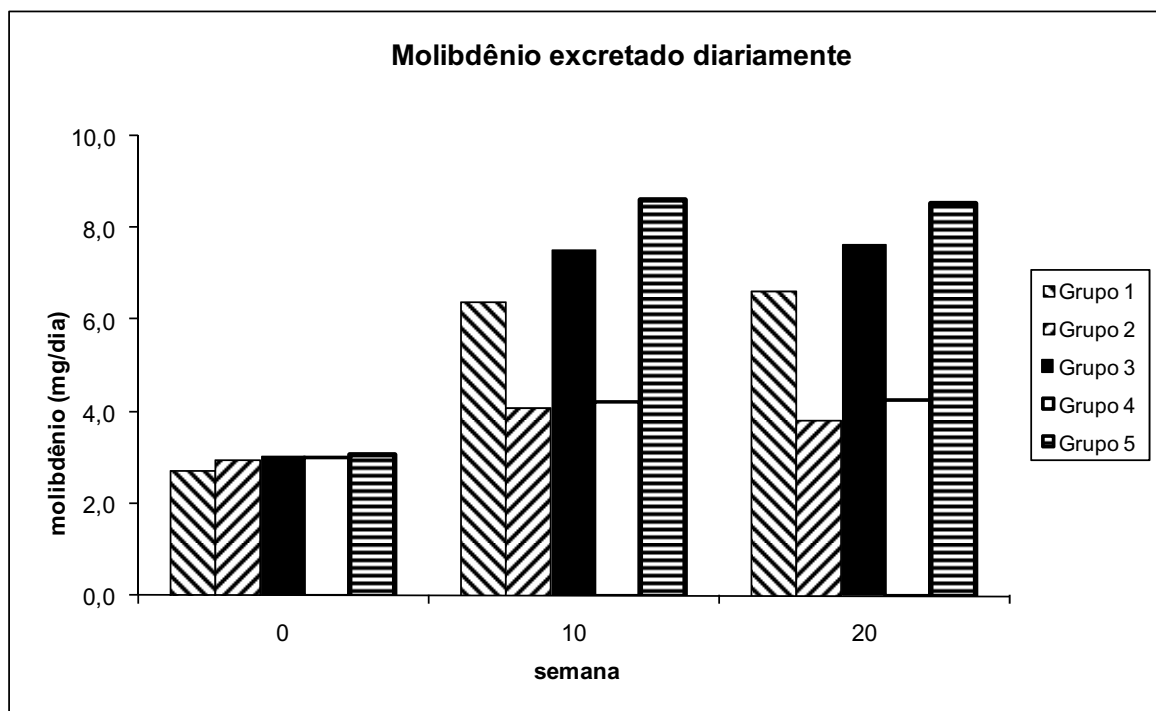


Gráfico 13 - Valores médios do total de molibdênio excretado (mg) nas fezes e urina por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

RETENÇÃO APARENTE DE MOLIBDÊNIO NO ORGANISMO

A retenção aparente de molibdênio no organismo foi obtida da diferença dos teores de molibdênio ingerido menos o excretado por dia. Dentro de cada grupo, constataram-se maiores quantidades de molibdênio retido no organismo nos ovinos dos grupos 1 e 3 nas 10^a e 20^a semanas quando comparadas com o período pré-experimental. Na comparação entre grupos, observaram-se maiores retenções de molibdênio nos carneiros dos grupos 1 e 3 em relação aos grupos 2 e 4 tanto na 10^a semana, e os ovinos do grupo 1 apresentaram valores mais elevados do que os apresentados pelos grupos 2 e 4, assim como os animais do grupo 3 apresentaram maior retenção aparente de molibdênio que os animais do grupo 4 na 20^a semana (Tabela 14 e Gráfico 14).

Tabela 14 - Valores médios e desvios padrão do total de molibdênio retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

	Semana	Grupos				
		1	2	3	4	5
Molibdênio	0	0,9 ± 0,8 ^{ab}	0,5 ± 0,8 ^{aA}	0,6 ± 0,5 ^{ab}	0,5 ± 1,0 ^{aA}	0,3 ± 1,0 ^{aA}
acumulado	10	4,0 ± 1,1 ^{aA}	0,2 ± 0,8 ^{bA}	3,4 ± 2,4 ^{aA}	0,0 ± 0,6 ^{bA}	1,8 ± 0,8 ^{abA}
(mg)	20	4,2 ± 0,6 ^{aA}	0,5 ± 1,0 ^{bcA}	3,1 ± 1,8 ^{abA}	0,3 ± 0,6 ^{cA}	2,1 ± 1,3 ^{abcA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

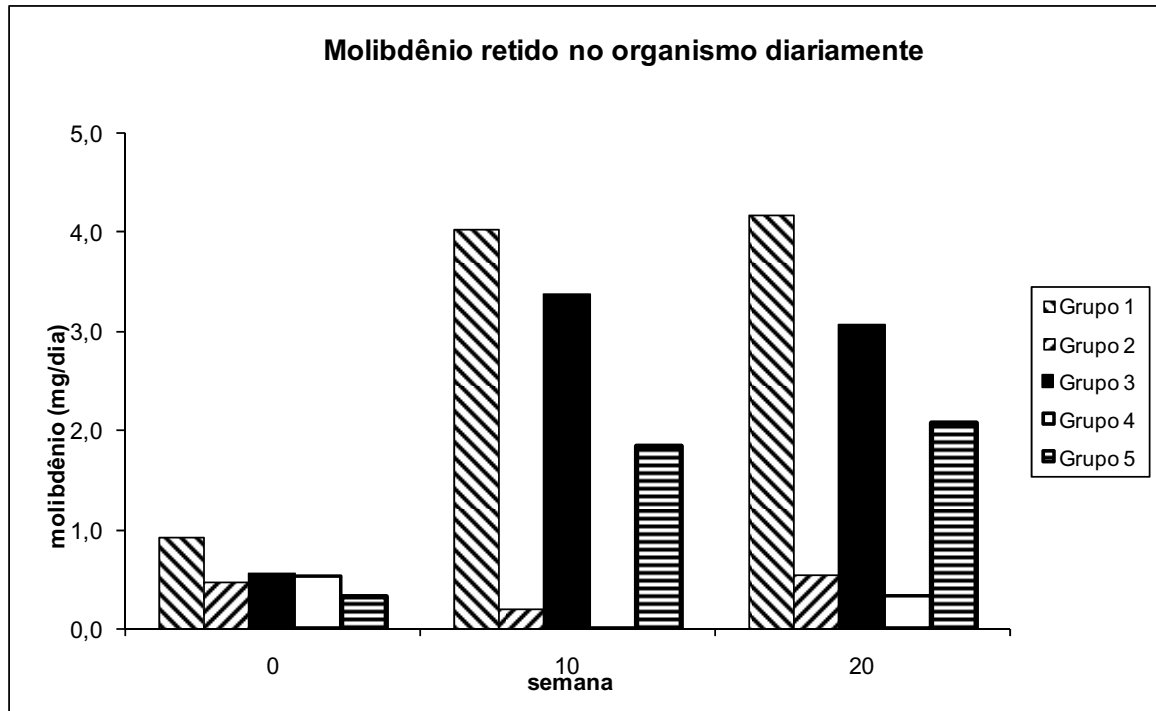


Gráfico 14 - Valores médios do total de molibdênio retido (mg) por dia em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

TEORES DE MOLIBDÊNIO HEPÁTICO

A Tabela 15 e o Gráfico 15 apresentam os valores médios da concentração hepática de molibdênio dos grupos experimentais nas três biópsias realizadas durante o experimento. Destaca-se nesta tabela o aumento nos teores de molibdênio no grupo 1, atingindo seus valores mais altos na 2ª biópsia, enquanto que não existiu diferença dentro dos grupos 2, 3, 4 e 5. Quando comparamos os resultados obtidos entre os grupos, verificou-se que já na 2ª biópsia os grupos 1 e 5 apresentavam valores superiores aos dos grupos 2 e 4, e na 3ª biópsia o grupo 1 continuava a apresentar valores superiores ao grupos 2.

Tabela 15 - Valores médios e desvios padrão do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	3,7 ± 0,9 ^{Ba}	3,5 ± 1,7 ^{Aa}	3,6 ± 0,9 ^{Aa}	3,7 ± 0,8 ^{Aa}	3,6 ± 1,1 ^{Aa}
10	6,8 ± 1,8 ^{Aa}	3,5 ± 1,8 ^{Ab}	5,7 ± 2,3 ^{Aab}	3,9 ± 1,1 ^{Ab}	4,8 ± 1,1 ^{Aa}
20	5,9 ± 1,3 ^{ABa}	3,4 ± 0,5 ^{Ab}	5,4 ± 1,5 ^{Aab}	3,8 ± 0,9 ^{Aab}	4,8 ± 1,0 ^{Aab}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

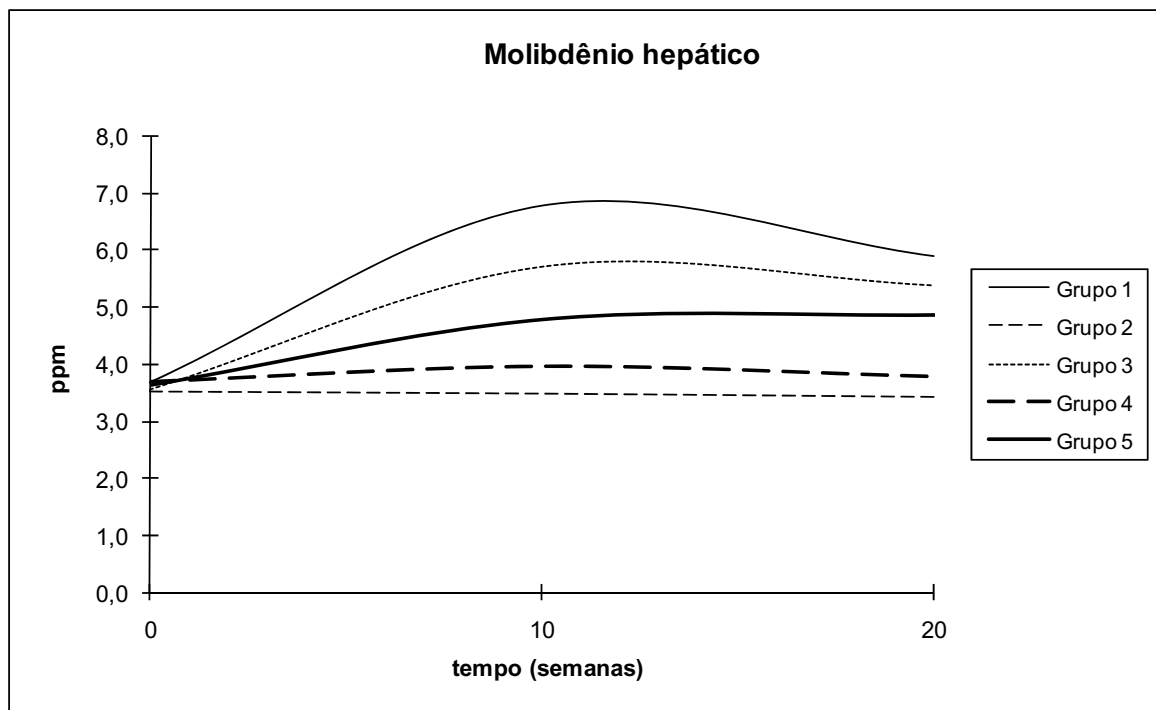


Gráfico 15 - Valores médios do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando agrupados em 2 grupos, sendo um dos animais que receberam sal com molibdênio (3 e 5) e outro dos ovinos que não foram suplementados com molibdênio (2 e 4) foi constatado que o grupo dos animais que receberam suplementação de molibdênio apresentou uma elevação nos teores de molibdênio hepático nas 10^a e 20^a semanas em relação ao tempo zero. Já quando confrontados entre si, os ovinos dos grupos 3 e 5 apresentaram valores médios superiores aos dos grupos 2 e 4 nas 10^a e 20^a semana (Tabela 16 e Gráfico 16).

Tabela 16 - Valores médios e desvios padrão do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos	
	2 e 4 (- Mo)	3 e 5 (+ Mo)
0	3,6 ± 1,2 ^{aA}	3,6 ± 1,0 ^{aB}
10	3,7 ± 0,9 ^{bA}	5,2 ± 1,6 ^{aA}
20	3,6 ± 0,6 ^{bA}	5,1 ± 1,2 ^{aA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

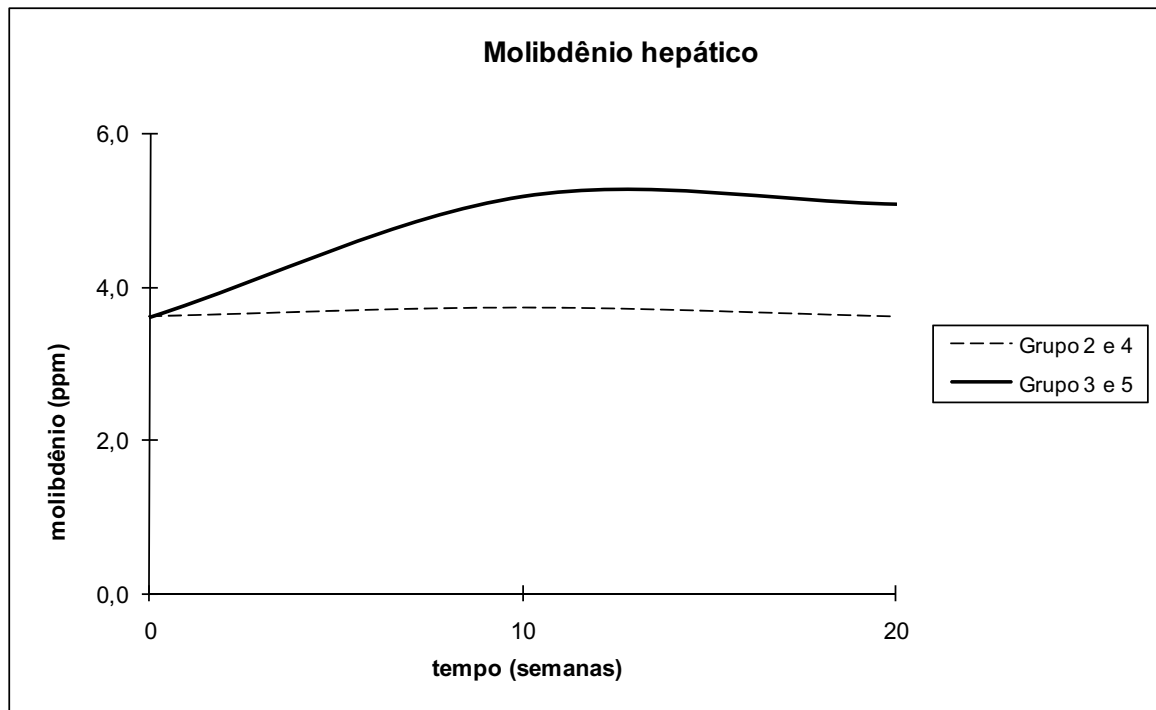


Gráfico 16 - Valores médios do molibdênio hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio - São Paulo – 2006

TEORES DE ZINCO HEPÁTICO

A Tabela 17 e o Gráfico 17 apresentam os valores médios da concentração hepática de zinco dos grupos experimentais nas três biópsias realizadas durante o experimento. Destaca-se nesta tabela o aumento nos teores de zinco nos grupos 4 e 5, atingindo seus valores mais altos já na 2ª biópsia, enquanto que não existiu

diferença dentro dos grupos 1, 2 e 3. Quando comparamos os resultados obtidos entre os grupos, verificou-se que já na 2ª biópsia os grupos 4 e 5 apresentavam valores superiores aos do grupo 1, 2 e 3, assim como na 3ª biópsia.

Tabela 17 - Valores médios e desvios padrão do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	138 ± 22 ^{Aa}	127 ± 31 ^{Aa}	127 ± 22 ^{Aa}	130 ± 15 ^{Ba}	120 ± 20 ^{Ba}
10	139 ± 11 ^{Ab}	126 ± 46 ^{Ab}	115 ± 21 ^{Ab}	241 ± 85 ^{Aa}	217 ± 57 ^{Aa}
20	143 ± 32 ^{Ab}	140 ± 28 ^{Ab}	120 ± 11 ^{Ab}	257 ± 92 ^{Aa}	259 ± 96 ^{Aa}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

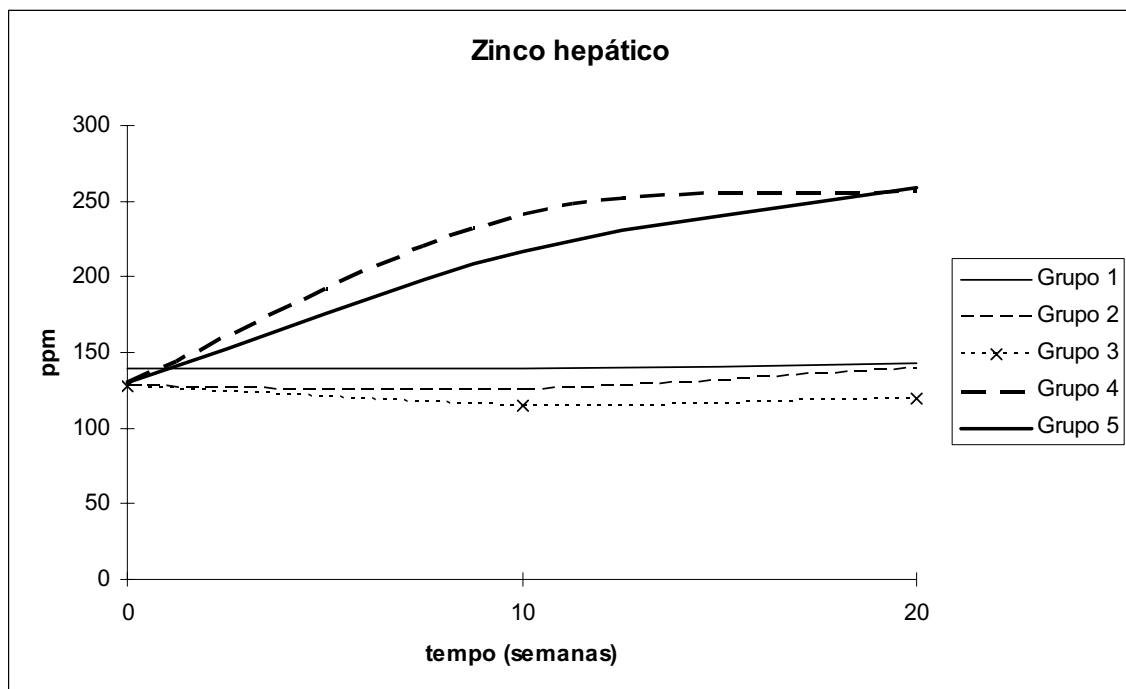


Gráfico 17 - Valores médios do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético e sal mineral contendo ou não molibdênio - São Paulo – 2006

Quando os ovinos dos grupos 4 e 5 foram reagrupados em 2 grupos, sendo um dos animais que apresentaram ICA e outro dos ovinos que não apresentaram ICA foi constatado que ambos o grupo dos animais intoxicados apresentaram uma

elevação nos teores de zinco hepático nas 10^a e 20^a semanas em relação ao tempo zero. Já quando confrontados entre si, não ocorreu diferença em nenhum dos tempos (Tabela 18 e Gráfico 18).

Tabela 18 - Valores médios e desvios padrão do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos	
	intoxicaram	não intoxicaram
0	132 ± 19 ^{Ba}	129 ± 23 ^{Aa}
10	253 ± 97 ^{Aa}	153 ± 33 ^{Aa}
20	305 ± 87 ^{Aa}	185 ± 88 ^{Aa}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

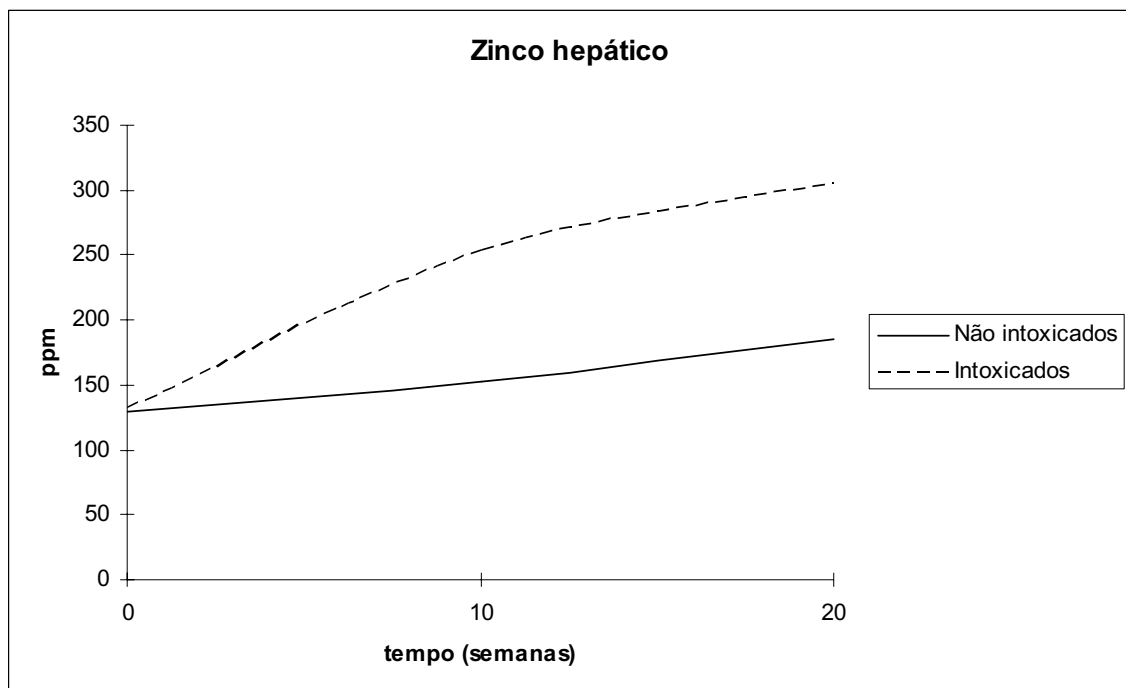


Gráfico 18 - Valores médios do zinco hepático (ppm) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA - São Paulo – 2006

COBRE SÉRICO

O cobre sérico não apresentou variação significativa no decorrer do experimento em todos os grupos, assim como não variou entre os grupos, como mostra a Tabela 19 e Gráfico 19.

Tabela 19 - Valores médios e desvios padrão da concentração de cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	11,6 \pm 0,64	10,5 \pm 1,57	11,2 \pm 1,87	10,9 \pm 1,19	10,7 \pm 1,19
2	10,3 \pm 1,58	10,3 \pm 0,98	10,1 \pm 0,85	10,7 \pm 1,22	10,8 \pm 1,65
4	11,0 \pm 0,46	10,5 \pm 0,95	10,0 \pm 2,13	10,8 \pm 1,05	11,1 \pm 1,57
6	10,7 \pm 1,23	11,0 \pm 1,16	10,3 \pm 1,38	11,0 \pm 1,18	11,0 \pm 1,05
8	10,8 \pm 1,78	10,7 \pm 1,09	9,8 \pm 1,15	10,8 \pm 0,81	10,7 \pm 0,98
10	10,7 \pm 1,06	11,3 \pm 0,82	11,4 \pm 1,34	11,3 \pm 1,30	11,7 \pm 1,38
12	11,0 \pm 1,84	10,4 \pm 1,07	11,0 \pm 0,91	11,9 \pm 2,08	11,2 \pm 0,79
14	10,5 \pm 1,32	10,8 \pm 1,46	10,3 \pm 0,89	14,0 \pm 8,60	10,7 \pm 1,28
16	11,3 \pm 1,51	11,2 \pm 2,18	10,7 \pm 1,67	20,8 \pm 17,31	13,5 \pm 3,43
18	11,2 \pm 1,15	10,9 \pm 1,84	11,5 \pm 2,80	23,1 \pm 15,6	14,2 \pm 3,49
20	10,6 \pm 0,90	10,1 \pm 1,14	11,3 \pm 2,53	25,0 \pm 17,7	21,4 \pm 14,4

Nota: não houve diferença entre as médias obtidas

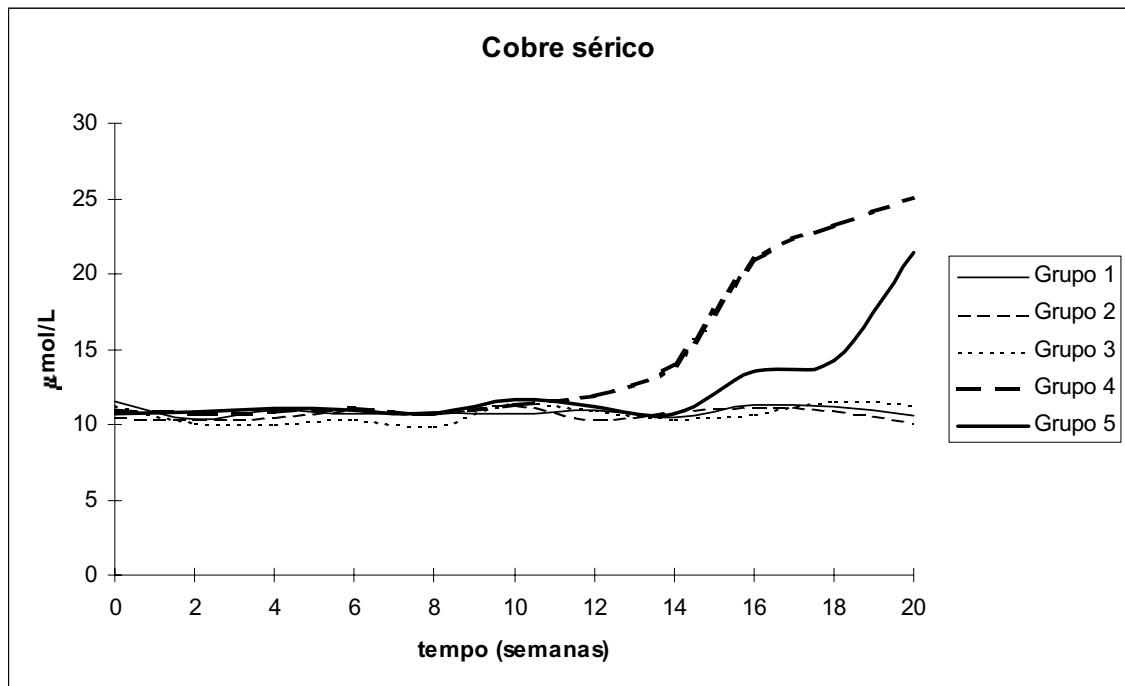


Gráfico 19 - Valores médios da concentração de cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando os ovinos dos grupos 4 e 5 foram reagrupados em 2 grupos, sendo um dos animais que apresentaram ICA e outro dos ovinos que não apresentaram ICA, definindo apenas neste item como tempo zero o momento em que os animais apresentaram hemoglobinúria macroscópica, ou o término do experimento, foi constatado que ambos o grupo dos animais intoxicados apresentou uma elevação nos teores de cobre sérico na quinzena que antecedeu o tempo zero, atingindo seus valores mais altos no momento em que ocorreu a hemoglobinúria macroscópica. Já os animais que não intoxicaram apresentaram valores mais elevados apenas no final do experimento em relação a 4^a a 16^a semanas antes do fim do período experimental. Quando confrontados entre si, o grupo dos ovinos intoxicados apresentou valores mais altos para cobre sérico na semana em que ocorreu a hemoglobinúria macroscópica, assim como 14 dias antes da crise hemolítica (Tabela 20 e Gráfico 20).

Tabela 20 - Valores médios e desvios padrão do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA - São Paulo – 2006

Semanas antes do surgimento da hemoglobinúria macroscópica ou para o fim do experimento	Grupos	
	intoxicaram	não intoxicaram
-16	$10,0 \pm 1,1$ ^{aC}	$11,3 \pm 1,3$ ^{aB}
-14	$10,3 \pm 1,2$ ^{aC}	$10,4 \pm 0,7$ ^{aB}
-12	$10,3 \pm 0,8$ ^{aC}	$11,0 \pm 1,0$ ^{aB}
-10	$9,9 \pm 0,8$ ^{aC}	$10,3 \pm 0,6$ ^{aB}
-8	$10,7 \pm 0,4$ ^{aC}	$11,1 \pm 1,3$ ^{aB}
-6	$11,8 \pm 1,0$ ^{aC}	$10,4 \pm 1,2$ ^{aB}
-4	$15,5 \pm 4,8$ ^{aBC}	$12,1 \pm 2,3$ ^{aB}
-2	$20,2 \pm 7,8$ ^{aB}	$12,8 \pm 1,9$ ^{bAB}
0	$47,3 \pm 2,5$ ^{aA}	$14,9 \pm 1,1$ ^{bA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

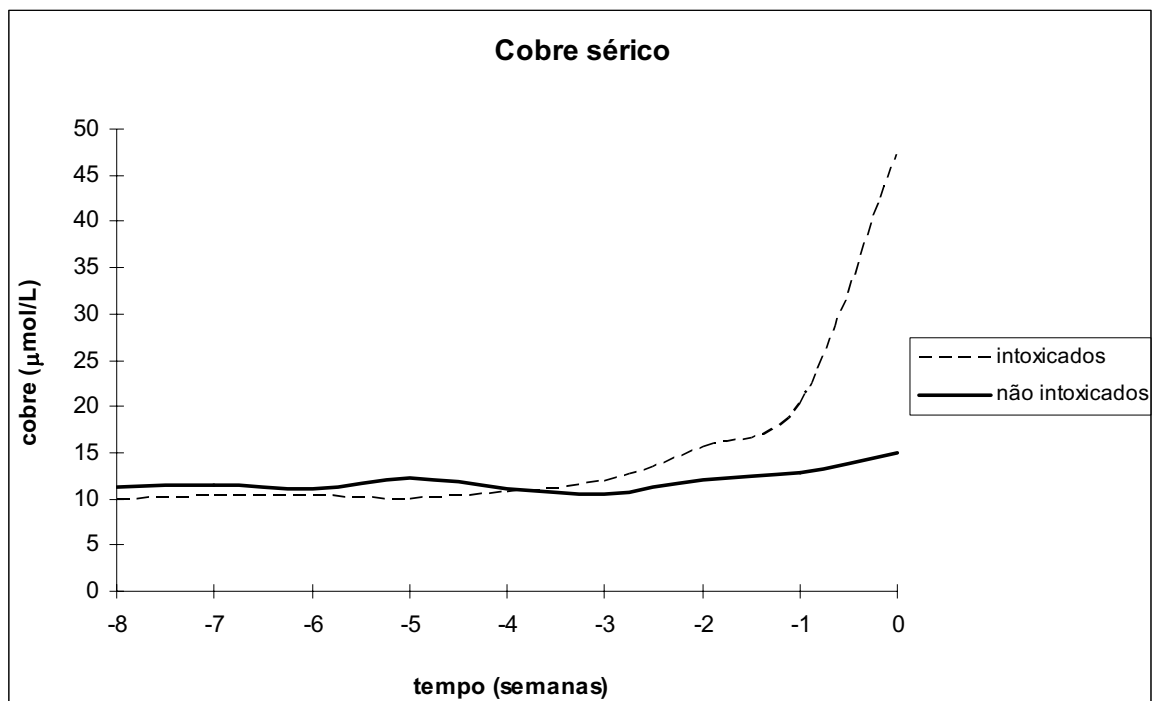


Gráfico 20 - Valores médios e desvios padrão do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético e apresentaram ou não ICA - São Paulo – 2006

MOLIBDÊNIO SÉRICO

Em relação ao molibdênio sérico, o período pré-experimental apresentou os valores mais baixos em relação aos demais tempos em todos os grupos. Na comparação entre os grupos, até a 8ª semana não houve diferença entre os grupos. Nas 14ª e 20ª semanas os ovinos do grupo 1 apresentaram valores superiores aos animais dos demais grupos. Já nas 10ª, 12ª e 16ª semanas o grupo 1 apresentou valores médios de molibdênio sérico superiores aos apresentados pelos grupos 2 e 4, enquanto que na 18ª semana os animais do grupo 1 mostraram teores de molibdênio sérico superiores apenas aos obtidos pelos animais do grupo 4 (Tabela 21 e Gráfico 21).

Tabela 21 - Valores médios e desvios padrão da concentração de molibdênio sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	0,7 \pm 0,18 ^{aB}	0,8 \pm 0,16 ^{aB}	0,8 \pm 0,17 ^{aB}	0,8 \pm 0,23 ^{aB}	0,9 \pm 0,21 ^{aB}
2	3,7 \pm 1,72 ^{aA}	2,4 \pm 0,62 ^{aA}	3,0 \pm 0,81 ^{aA}	2,2 \pm 0,77 ^{aA}	3,7 \pm 1,27 ^{aA}
4	3,8 \pm 1,51 ^{aA}	2,5 \pm 0,62 ^{aA}	3,0 \pm 0,99 ^{aA}	2,0 \pm 0,30 ^{aA}	2,9 \pm 0,86 ^{aA}
6	3,2 \pm 0,48 ^{aA}	2,4 \pm 0,53 ^{aA}	2,9 \pm 0,47 ^{aA}	2,4 \pm 0,73 ^{aA}	3,0 \pm 0,91 ^{aA}
8	3,6 \pm 0,99 ^{aA}	2,8 \pm 0,86 ^{aA}	2,8 \pm 0,98 ^{aA}	2,2 \pm 0,56 ^{aA}	3,1 \pm 0,68 ^{aA}
10	4,7 \pm 1,00 ^{aA}	2,6 \pm 0,33 ^{bA}	3,1 \pm 0,68 ^{abA}	2,3 \pm 0,73 ^{bA}	4,7 \pm 1,45 ^{abA}
12	4,6 \pm 0,97 ^{aA}	2,7 \pm 0,55 ^{bA}	2,9 \pm 0,64 ^{abA}	2,4 \pm 0,64 ^{bA}	3,4 \pm 1,08 ^{abA}
14	5,8 \pm 0,65 ^{aA}	2,9 \pm 0,72 ^{bA}	3,0 \pm 0,25 ^{bA}	2,3 \pm 0,67 ^{bA}	3,3 \pm 0,68 ^{bA}
16	4,6 \pm 1,06 ^{aA}	2,4 \pm 0,85 ^{bA}	2,9 \pm 0,75 ^{abA}	2,2 \pm 0,59 ^{bA}	3,0 \pm 0,95 ^{abA}
18	4,3 \pm 1,71 ^{aA}	2,8 \pm 0,97 ^{abA}	2,8 \pm 0,65 ^{abA}	2,2 \pm 0,48 ^{bA}	3,1 \pm 0,68 ^{abA}
20	4,3 \pm 0,85 ^{aA}	2,4 \pm 0,67 ^{bA}	3,0 \pm 0,40 ^{bA}	2,2 \pm 0,62 ^{bA}	3,0 \pm 0,57 ^{bA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

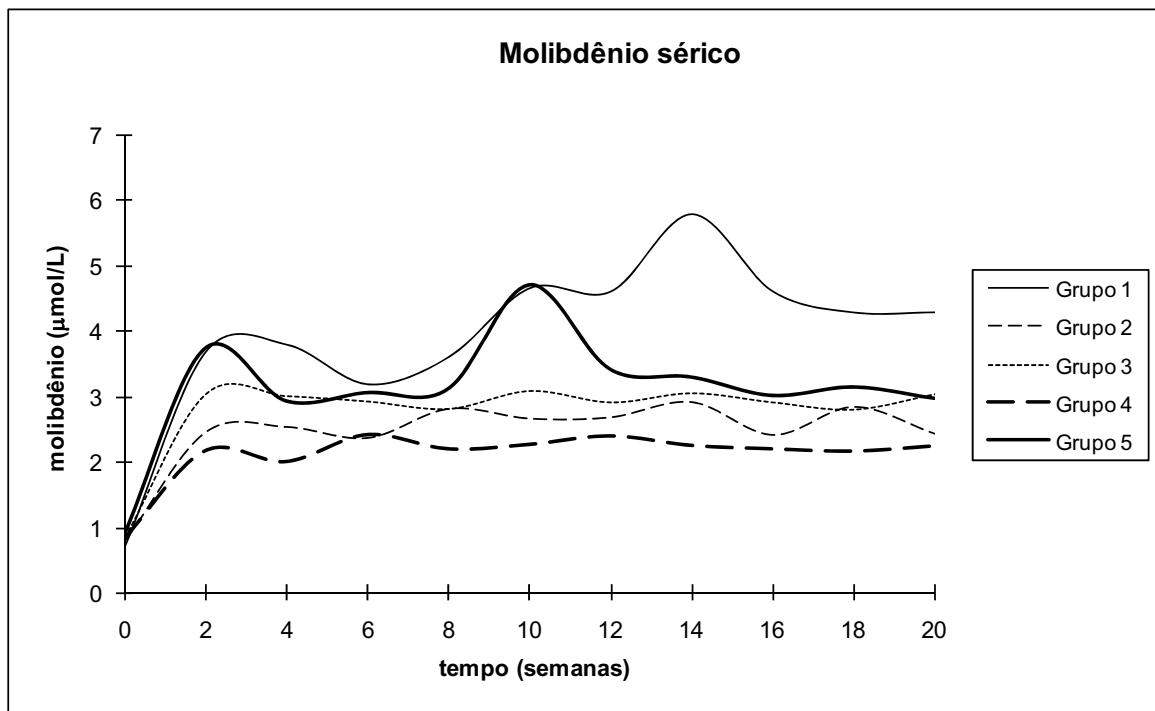


Gráfico 21- Valores médios da concentração de molibdênio sérico ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

URÉIA SÉRICA

Quando analisamos os valores de uréia sérica, verificamos que houve um aumento significativo, atingindo seus valores mais altos em todos os grupos na 12^a semana, com subsequente diminuição gradativa em todos os grupos, exceto no 5 que manteve o mesmo patamar até o final do experimento (Tabela 22 e Gráfico 22).

Tabela 22 - Valores médios e desvios padrão da concentração de uréia sérica (mmol/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	3,0 ± 0,57 ^B	3,0 ± 1,01 ^B	2,7 ± 0,32 ^D	3,0 ± 0,26 ^C	2,9 ± 0,27 ^D
2	3,0 ± 0,35 ^B	3,0 ± 0,15 ^B	2,7 ± 0,76 ^D	3,2 ± 0,65 ^{BC}	3,0 ± 0,35 ^D
4	2,8 ± 0,46 ^B	3,2 ± 0,59 ^B	2,9 ± 0,82 ^D	3,6 ± 0,57 ^{BC}	3,1 ± 0,26 ^D
6	2,8 ± 0,50 ^B	3,5 ± 0,57 ^B	3,1 ± 0,15 ^{CD}	3,5 ± 0,75 ^{BC}	3,0 ± 0,11 ^D
8	3,2 ± 0,41 ^B	3,4 ± 0,53 ^B	3,1 ± 0,33 ^D	3,7 ± 0,34 ^{BC}	3,2 ± 0,19 ^D
10	3,3 ± 0,79 ^B	3,4 ± 0,63 ^B	3,0 ± 0,63 ^D	3,6 ± 0,92 ^{BC}	3,1 ± 0,23 ^D
12	5,2 ± 0,43 ^{bA}	7,6 ± 0,63 ^{aA}	5,9 ± 0,83 ^{bA}	6,9 ± 1,10 ^{abA}	5,6 ± 0,52 ^{bA}
14	4,6 ± 0,51 ^{abA}	5,7 ± 0,80 ^{aA}	4,4 ± 0,24 ^{abBC}	4,8 ± 0,53 ^{abB}	4,2 ± 0,53 ^{bAC}
16	3,2 ± 0,76 ^{bB}	3,9 ± 0,51 ^{abB}	5,1 ± 0,31 ^{aAB}	4,7 ± 0,75 ^{abB}	4,4 ± 0,14 ^{abABC}
18	3,4 ± 0,44 ^{bB}	3,6 ± 0,39 ^{abB}	3,6 ± 0,18 ^{abCD}	4,3 ± 1,10 ^{abBC}	5,1 ± 0,96 ^{aAB}
20	3,2 ± 0,23 ^{cB}	4,0 ± 0,34 ^{bcB}	3,7 ± 0,12 ^{bcCD}	4,5 ± 0,31 ^{abBC}	5,1 ± 0,6 ^{aAB}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

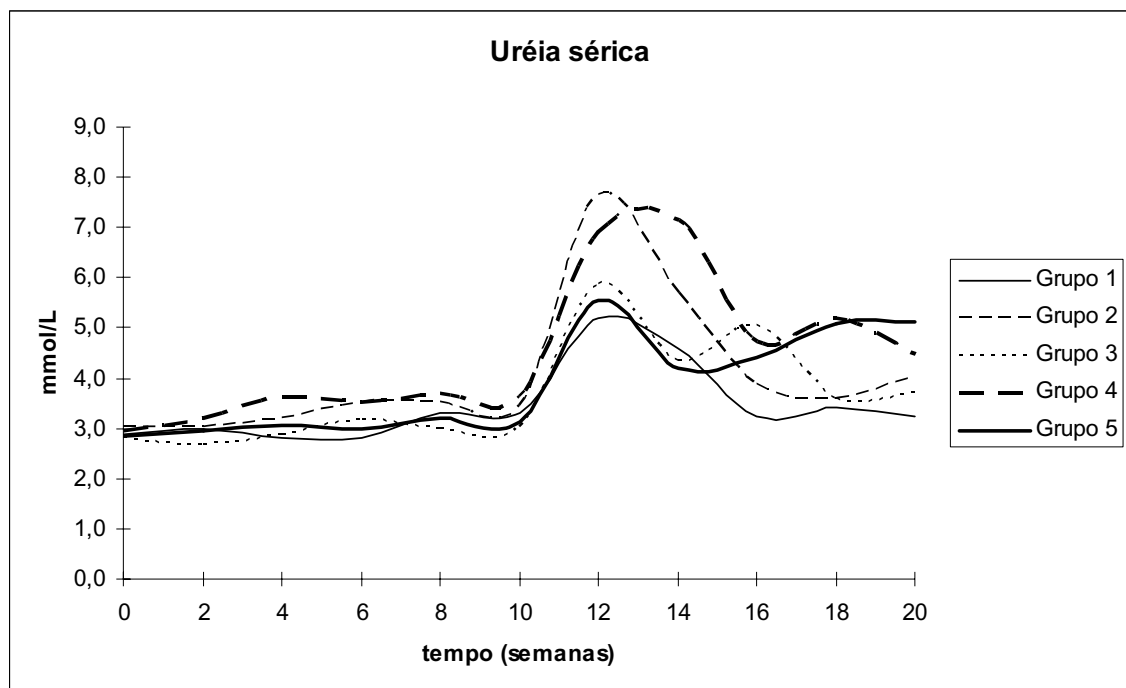


Gráfico 22 - Valores médios da concentração de uréia sérica (mmol/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de mediana concentração de uréia sérica obtidos dos animais com ICA com os mensurados na 20ª semana dos grupos 4 e 5 constatou-se que os primeiros tiveram maior mediana (12,35 mmol/L) que os outros grupos (4,74 mmol/L) ($P < 0,05$).

CREATININA SÉRICA

Em relação a creatinina sérica, não houve variação significativa dentro do próprio grupo durante o período experimental apenas nos grupos 1 e 3. No grupo 2 a creatinina atingiu seu valor significativamente mais elevado em relação ao início na 12ª semana assim como no grupo 4. Já o grupo 5 atingiu seu valor mais alto na 14ª semana. Quando comparados, os valores obtidos nos grupos entre si apenas na 6ª semana houve diferença significativa, onde os grupos 4 e 5 apresentaram valores superiores aos grupos 2 e 3 (Tabela 23 e Gráfico 23).

Tabela 23 - Valores médios e desvios padrão da concentração de creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	118 \pm 4,1 ^{aA}	115 \pm 7,3 ^{aB}	115 \pm 10,4 ^{aA}	117 \pm 4,0 ^{aCDE}	119 \pm 3,1 ^{aBC}
2	117 \pm 9,3 ^{aA}	115 \pm 10,4 ^{aB}	114 \pm 6,1 ^{aA}	118 \pm 3,3 ^{aCDE}	119 \pm 3,8 ^{aBC}
4	116 \pm 4,5 ^{aA}	115 \pm 9,1 ^{aAB}	114 \pm 6,8 ^{aA}	121 \pm 10,1 ^{aABCDE}	118 \pm 4,0 ^{aBC}
6	122 \pm 3,0 ^{abA}	119 \pm 3,3 ^{bAB}	119 \pm 3,1 ^{bA}	135 \pm 11,1 ^{aAB}	133 \pm 4,3 ^{aAB}
8	113 \pm 4,8 ^{aA}	117 \pm 7,4 ^{aAB}	114 \pm 4,2 ^{aA}	127 \pm 11,1 ^{aABCDE}	124 \pm 8,0 ^{aABC}
10	116 \pm 11,0 ^{aA}	114 \pm 4,7 ^{aB}	115 \pm 2,9 ^{aA}	118 \pm 6,0 ^{aCDE}	120 \pm 5,8 ^{aBC}
12	123 \pm 8,4 ^{aA}	126 \pm 3,8 ^{aA}	120 \pm 8,1 ^{aA}	139 \pm 13,8 ^{aA}	135 \pm 10,0 ^{aAB}
14	119 \pm 6,4 ^{aA}	126 \pm 4,6 ^{aA}	122 \pm 2,0 ^{aA}	132 \pm 9,3 ^{aABCE}	142 \pm 20,5 ^{aA}
16	114 \pm 4,4 ^{aA}	114 \pm 8,1 ^{aB}	118 \pm 1,7 ^{aA}	115 \pm 5,2 ^{aBCDE}	117 \pm 2,7 ^{aBC}
18	118 \pm 4,0 ^{aA}	113 \pm 2,8 ^{aB}	114 \pm 2,8 ^{aA}	108 \pm 11,7 ^{aD}	110 \pm 12,7 ^{aC}
20	118 \pm 1,3 ^{aA}	117 \pm 2,5 ^{aAB}	116 \pm 3,2 ^{aA}	110 \pm 8,9 ^{aCD}	111 \pm 4,6 ^{aC}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

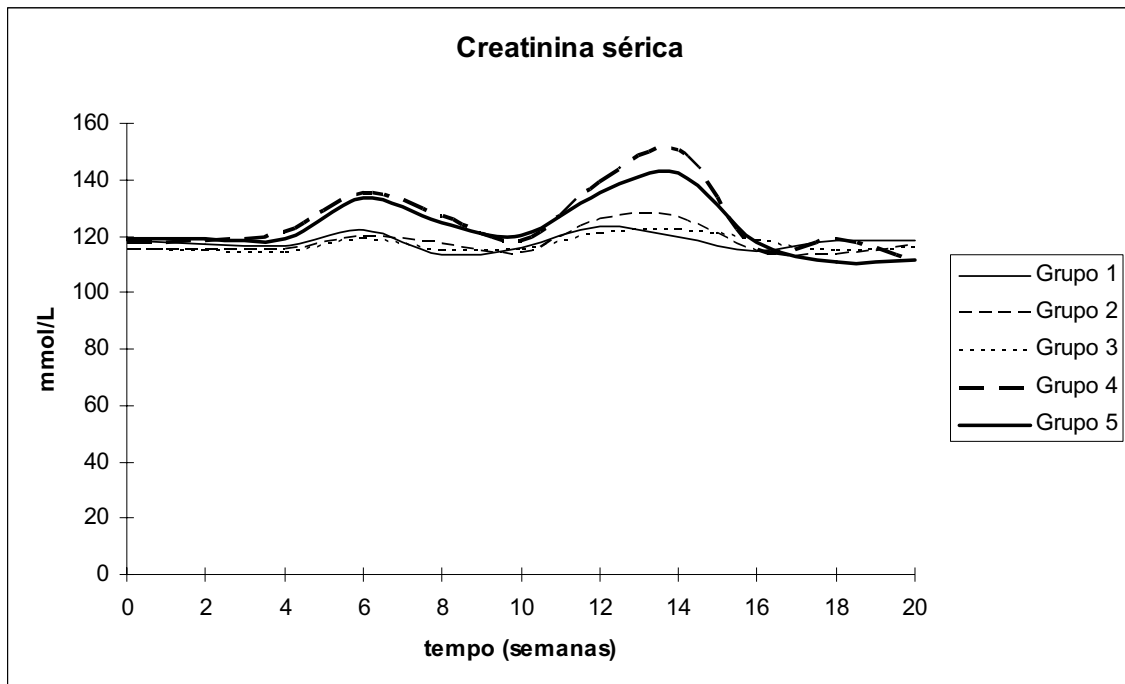


Gráfico 23 - Valores médios da concentração de creatinina sérica ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de mediana concentração de creatinina sérica obtidos dos animais com ICA com os mensurados na 20^a semana dos grupos 4 e 5 constatou-se que os primeiros tiveram maior mediana ($186,6 \mu\text{mol/L}$) que os outros grupos ($115,2 \mu\text{mol/L}$) ($P < 0,02$).

ATIVIDADE DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

Não existiram diferenças nas atividades de aspartato aminotransferase (AST) sérico dentro do grupo 1. Já nos grupos 2 e 3 foram constatadas diminuições até atingir os valores mais baixos significativamente em relação ao início do experimento na 20^a semana. Mas foram constatadas maiores atividades de AST em relação ao tempo zero a partir da 12^a semana nos grupos 4 e 5, atingindo seus valores mais elevados e mantendo-se neste patamar até o final da 20^a semana. Quando comparamos os valores de AST obtidos entre os grupos, constatou-se que a partir da 14^a semana os grupos 4 e 5 apresentaram valores significativamente mais elevados do que os grupos 1, 2 e 3, como mostra Tabela 24 e Gráfico 24.

Tabela 24 - Valores médios e desvios padrão da atividade de AST sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	61,3 ± 14,3 ^{aA}	64,1 ± 5,1 ^{aA}	66,3 ± 1,8 ^{aAB}	57,1 ± 8,8 ^{aB}	63,0 ± 6,3 ^{aC}
2	67,1 ± 18,7 ^{aA}	60,8 ± 4,9 ^{aA}	69,6 ± 6,26 ^{aA}	65,5 ± 23,4 ^{aB}	69,6 ± 4,6 ^{aBC}
4	65,3 ± 18,5 ^{aA}	60,2 ± 6,9 ^{aAB}	70,6 ± 9,5 ^{aA}	72,6 ± 44,9 ^{aB}	73,2 ± 9,8 ^{aBC}
6	65,8 ± 17,2 ^{aA}	65,6 ± 4,7 ^{aA}	66,3 ± 7,9 ^{aAB}	95,0 ± 67,1 ^{aB}	99,2 ± 46,6 ^{aABC}
8	67,2 ± 13,4 ^{aA}	66,4 ± 2,9 ^{aA}	69,9 ± 7,2 ^{aA}	134,6 ± 93,0 ^{aAB}	175,2 ± 99,1 ^{aABC}
10	64,9 ± 14,8 ^{bA}	65,4 ± 6,2 ^{bA}	66,9 ± 8,42 ^{abAB}	102,8 ± 66,5 ^{abAB}	146,4 ± 87,5 ^{aABC}
12	54,6 ± 11,9 ^{bA}	58,8 ± 6,4 ^{bABC}	64,9 ± 10,5 ^{abAB}	152,3 ± 143,4 ^{abA}	248,3 ± 198,0 ^{aAB}
14	56,1 ± 16,4 ^{bA}	61,2 ± 6,2 ^{bA}	63,6 ± 5,7 ^{bAB}	403,6 ± 292,6 ^{aA}	260 ± 120,1 ^{aA}
16	62,3 ± 20,6 ^{bA}	57,9 ± 7,8 ^{bABC}	58,8 ± 3,0 ^{bAB}	239,1 ± 224,6 ^{aA}	244,0 ± 113,5 ^{aAB}
18	47,4 ± 17,6 ^{bA}	45,0 ± 2,5 ^{bBC}	54,1 ± 7,3 ^{bAB}	410,3 ± 261,6 ^{aA}	239,1 ± 150,3 ^{aABC}
20	32,4 ± 8,0 ^{bA}	44,3 ± 5,0 ^{bC}	49,8 ± 10,4 ^{bB}	229,0 ± 127,5 ^{aA}	271,5 ± 68,8 ^{aA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

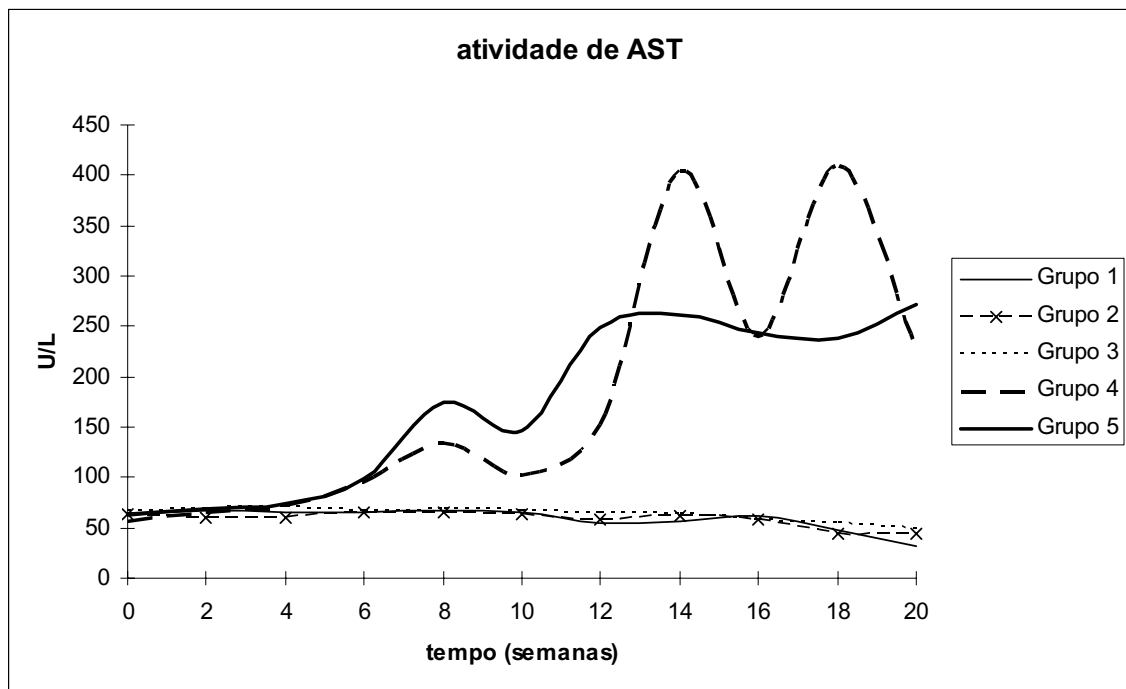


Gráfico 24 - Valores médios da atividade de AST sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de mediana da atividade de AST obtidos dos animais com ICA com os avaliados na 20ª semana dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 constatou-se que os primeiros tiveram maior mediana (717,5 U/L) que os outros grupos (57,3 U/L) ($P < 0,01$).

ATIVIDADE DE GAMA GLUTAMILTRANSFERASE (GGT)

Não existiram diferenças nas atividades de gama glutamiltransferase (GGT) sérica dentro dos grupos 1, 2 e 3. Mas foram constatadas maiores atividades de GGT nos grupos 5 a partir da 12ª semana e 4 a partir da 14ª semana, atingindo o pico de seus valores na 20ª semana. Quando comparamos os grupos entre si, até a 12ª semana não houve diferença significativa entre os grupos, mas a partir da 14ª semana, os grupos 4 e 5 apresentaram valores de GGT superiores aos obtidos pelos grupos 1, 2 e 3, como mostra Tabela 25 e Gráfico 25.

Tabela 25 - Valores médios e desvios padrão da atividade de GGT sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	37,7 ± 5,0 ^{aA}	34,9 ± 8,4 ^{aA}	38,6 ± 7,1 ^{aA}	39,0 ± 8,2 ^{aC}	38,7 ± 10,25 ^{aB}
2	37,1 ± 2,2 ^{aA}	34,8 ± 9,1 ^{aA}	37,9 ± 4,0 ^{aA}	36,3 ± 7,5 ^{aC}	41,5 ± 9,47 ^{aB}
4	38,7 ± 4,0 ^{aA}	33,1 ± 4,2 ^{aA}	42,8 ± 8,4 ^{aA}	45,2 ± 12,0 ^{aC}	43,0 ± 13,4 ^{aB}
6	38,2 ± 4,7 ^{aA}	36,2 ± 1,1 ^{aA}	41,4 ± 6,1 ^{aA}	50,2 ± 11,6 ^{aBC}	52,4 ± 2,9 ^{aB}
8	36,2 ± 1,4 ^{aA}	33,0 ± 2,36 ^{aA}	39,2 ± 8,1 ^{aA}	55,1 ± 9,4 ^{aBC}	61,5 ± 38,0 ^{aB}
10	39,3 ± 3,5 ^{aA}	34,6 ± 5,2 ^{aA}	40,4 ± 8,4 ^{aA}	57,1 ± 10,7 ^{aBC}	67,6 ± 41,5 ^{aB}
12	39,4 ± 1,6 ^{aA}	35,7 ± 4,2 ^{aA}	37,6 ± 8,9 ^{aA}	69,0 ± 14,2 ^{aBC}	85,0 ± 50,7 ^{aAB}
14	37,8 ± 2,1 ^{bA}	36,1 ± 6,3 ^{bA}	39,4 ± 8,1 ^{bA}	98,2 ± 38,2	106,9 ± 50,9
16	40,2 ± 5,4 ^{bA}	38,2 ± 5,2 ^{bA}	38,0 ± 5,9 ^{bA}	80,8 ± 27,9 ^{aBC}	102,1 ± 43,1
18	41,2 ± 12,2 ^{bA}	30,0 ± 3,7 ^{bA}	34,0 ± 8,3 ^{bA}	101,6 ± 42,42	96,9 ± 38,9 ^{aAB}
20	36,6 ± 2,9 ^{bA}	35,1 ± 5,1 ^{bA}	38,2 ± 3,4 ^{bA}	145,7 ± 41,6 ^{aA}	162,3 ± 57,7 ^{aA}

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

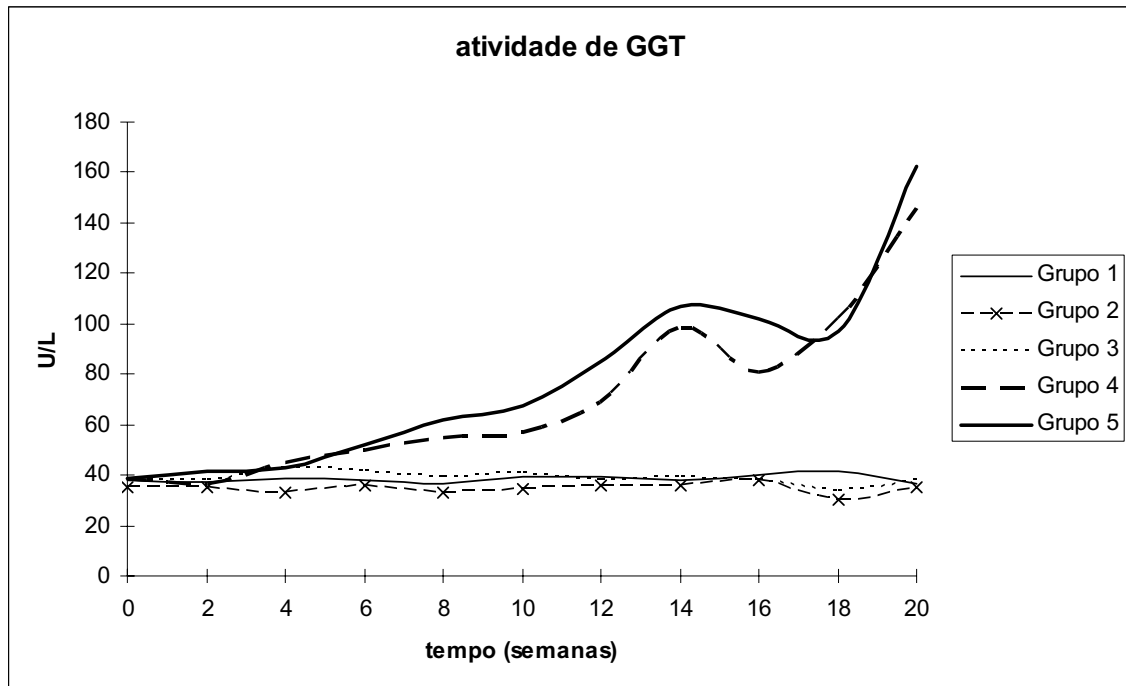


Gráfico 25 - Valores médios da atividade de GGT sérico (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de mediana da atividade de GGT obtidos dos animais com ICA com os mensurados na 20ª semana dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 constatou-se que os primeiros tiveram maior mediana (163,8 U/L) que os outros grupos (40,6 U/L) ($P < 0,04$).

BILIRRUBINA TOTAL

Os resultados obtidos de bilirrubina total foram analisados apenas entre os grupos pelo fato de haver uma variação grande entre os tempos, talvez devido à calibração do analisador bioquímico. Desta forma apenas na 14ª semana verificou-se que o grupo 5 apresentou valores significativamente superiores aos obtidos nos grupos 2 e 3, e na 20ª semana os valores de bilirrubina apresentados pelos grupos 4 e 5 foram significativamente mais elevados dos que os dos grupos 1, 2 e 3 (Tabela 26 e Gráfico 26).

Tabela 26 - Valores médios e desvios padrão da concentração de bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	2,11 \pm 0,86	1,88 \pm 0,92	1,80 \pm 0,80	1,87 \pm 0,21	1,76 \pm 0,31
2	6,04 \pm 0,10	6,03 \pm 0,26	6,03 \pm 0,32	6,02 \pm 0,08	6,19 \pm 0,37
4	9,18 \pm 0,26	9,19 \pm 0,43	9,58 \pm 0,28	9,30 \pm 0,39	9,13 \pm 0,43
6	4,62 \pm 0,30	4,79 \pm 0,37	5,04 \pm 0,41	4,62 \pm 0,30	5,03 \pm 0,31
8	6,38 \pm 0,26	6,58 \pm 0,10	6,54 \pm 0,32	6,57 \pm 0,09	6,46 \pm 0,28
10	0,74 \pm 0,52	0,51 \pm 0,14	0,64 \pm 0,38	0,72 \pm 0,44	0,62 \pm 0,19
12	2,28 \pm 0,20	2,18 \pm 0,16	1,92 \pm 0,09	2,19 \pm 0,52	2,53 \pm 0,67
14	1,03 \pm 0,17 ^{ab}	0,90 \pm 0,26 ^b	0,90 \pm 0,26 ^b	1,28 \pm 0,34 ^{ab}	1,64 \pm 0,54 ^a
16	1,54 \pm 0,17	1,41 \pm 0,45	1,84 \pm 0,90	1,53 \pm 0,23	1,88 \pm 0,34
18	1,48 \pm 0,60	1,80 \pm 0,22	1,80 \pm 0,30	1,85 \pm 0,36	1,88 \pm 0,27
20	7,01 \pm 0,17 ^b	6,54 \pm 0,26 ^b	6,80 \pm 0,38 ^b	8,49 \pm 1,24 ^a	9,11 \pm 0,61 ^a

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

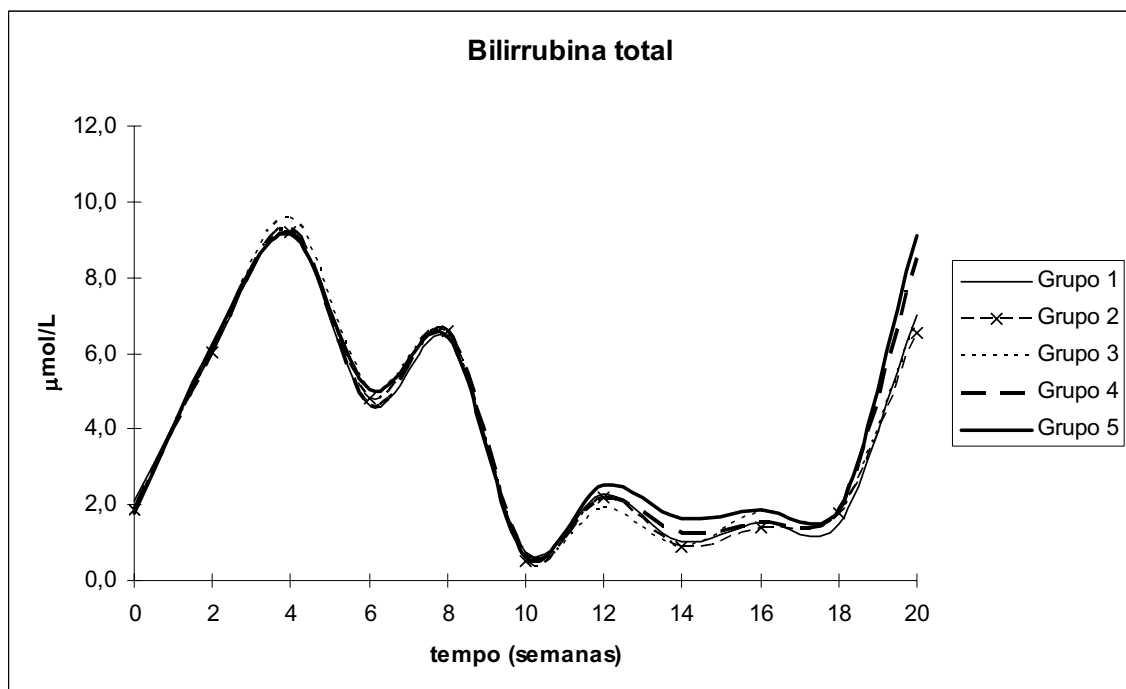


Gráfico 26 - Valores médios da concentração de bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Quando comparados os dados de mediana da concentração de bilirrubina total sérica obtidos dos animais com ICA com os mensurados na 20ª semana dos grupos 1, 2, 3 4 e 5 constatou-se que os primeiros tiveram maior mediana (33,6 $\mu\text{mol/L}$) que os outros grupos (7,1 $\mu\text{mol/L}$) ($P < 0,004$).

ATIVIDADE DE CERULOPLASMINA

Quando avaliada a atividade de ceruloplasmina dentro de cada grupo, foi demonstrado que não houve diferença nos grupos 3 e 5, enquanto que no grupo 1 a 16ª semana mostrou o valor mais elevado em relação às semanas 0, 4, 6, 8, 10, 12 e 20, e nos grupos 2 e 4 a 16ª semana mostrou os maiores valores de atividade de ceruloplasmina em relação às demais semanas. Não ocorreram quaisquer diferenças nas médias gerais da atividade de ceruloplasmina entre os grupos, como mostra a Tabela 27 e Gráfico 27.

Tabela 27 - Valores médios e desvios padrão da atividade de ceruloplasmina (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	9,3 \pm 2,3 ^B	7,9 \pm 3,3 ^B	11,3 \pm 5,4	8,8 \pm 4,0 ^B	9,6 \pm 3,0
2	14,4 \pm 5,4 ^{AB}	7,8 \pm 1,1 ^B	12,5 \pm 4,3	9,1 \pm 3,8 ^B	8,5 \pm 5,3
4	9,8 \pm 4,4 ^B	6,3 \pm 0,9 ^B	9,2 \pm 3,3	9,1 \pm 3,7 ^B	8,8 \pm 4,7
6	8,8 \pm 5,3 ^B	6,1 \pm 0,9 ^B	9,5 \pm 2,7	5,3 \pm 1,4 ^B	8,8 \pm 5,9
8	9,6 \pm 3,0 ^B	7,2 \pm 1,9 ^B	9,8 \pm 5,1	6,5 \pm 2,5 ^B	8,8 \pm 6,0
10	7,7 \pm 3,5 ^B	5,3 \pm 3,2 ^B	10,0 \pm 3,1	7,0 \pm 2,6 ^B	8,4 \pm 5,3
12	9,8 \pm 3,8 ^B	5,8 \pm 3,2 ^B	12,5 \pm 3,7	7,6 \pm 3,1 ^B	10,3 \pm 5,0
14	12,9 \pm 4,7 ^{AB}	6,4 \pm 1,6 ^B	13,3 \pm 5,4	9,5 \pm 5,2 ^B	9,1 \pm 4,6
16	23,1 \pm 5,9 ^A	15,3 \pm 5,9 ^A	15,6 \pm 2,8	22,8 \pm 7,1 ^A	18,8 \pm 8,7
18	15,0 \pm 4,1 ^{AB}	7,5 \pm 3,2 ^B	9,9 \pm 3,0	9,5 \pm 4,9 ^B	13,8 \pm 7,6
20	6,9 \pm 3,3 ^B	5,7 \pm 4,8 ^B	6,6 \pm 2,2	2,3 \pm 1,4 ^B	6,6 \pm 5,3

Nota: Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

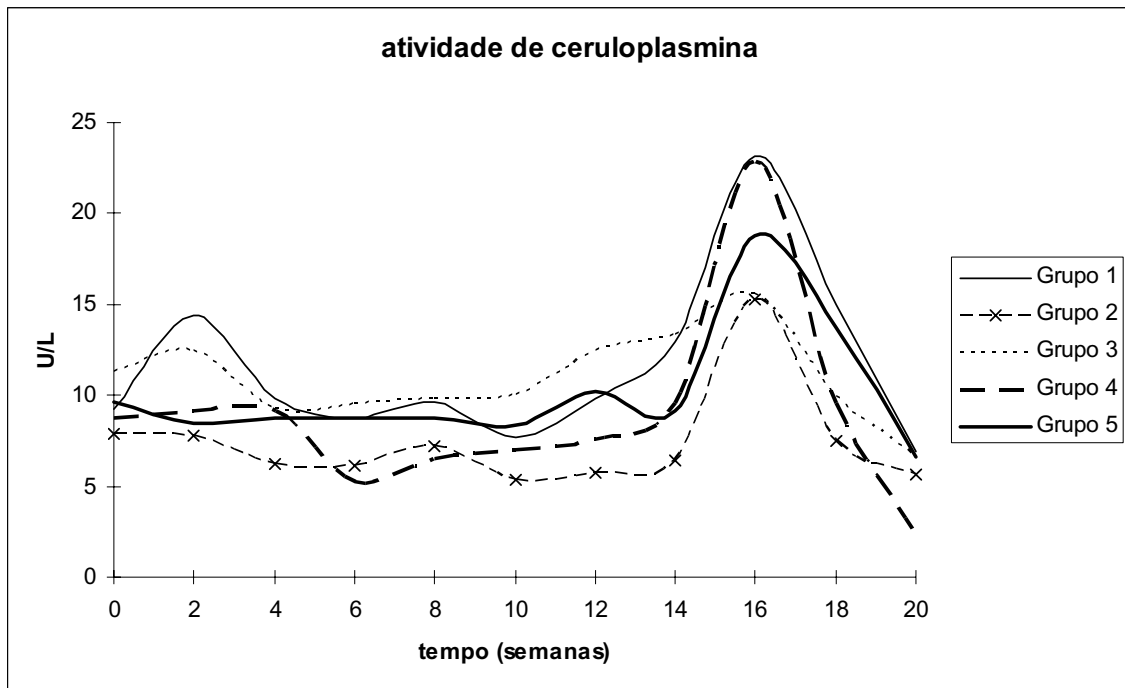


Gráfico 27 - Valores médios da atividade de ceruloplasmina (U/L) em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

Não existiu diferença em relação à atividade de ceruloplasmina entre os animais com ICA e os demais ovinos de todos grupos na 20^a semana ($P > 0,67$).

pH URINÁRIO

Não ocorreram quaisquer diferenças nas médias gerais de pH urinário em todos os grupos, assim como entre os grupos, como mostra a Tabela 28 e Gráfico 28.

Tabela 28 - Valores médios e desvios padrão do pH urinário de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	7,2 ± 0,5	6,9 ± 0,7	6,9 ± 0,7	6,8 ± 0,7	6,7 ± 0,8
2	7,2 ± 1,0	6,8 ± 1,2	6,9 ± 1,0	6,6 ± 1,4	7,1 ± 1,0
4	7,2 ± 1,5	7,4 ± 1,0	6,7 ± 0,5	7,1 ± 1,2	7,8 ± 0,7
6	7,1 ± 0,9	6,9 ± 1,1	6,1 ± 0,6	7,2 ± 1,1	7,2 ± 0,9
8	6,7 ± 1,4	6,3 ± 0,8	5,8 ± 0,6	6,5 ± 0,9	6,4 ± 1,0
10	6,2 ± 1,3	6,3 ± 0,9	6,0 ± 0,6	6,5 ± 1,1	7,0 ± 1,0
12	6,6 ± 1,3	7,2 ± 1,2	6,8 ± 0,4	6,8 ± 1,9	6,3 ± 0,9
14	7,3 ± 0,9	7,0 ± 1,4	6,2 ± 1,0	6,7 ± 0,9	6,4 ± 0,7
16	6,6 ± 1,7	6,9 ± 1,1	6,5 ± 1,0	6,5 ± 1,3	6,0 ± 0,9
18	7,1 ± 1,7	6,4 ± 1,2	6,2 ± 0,4	5,9 ± 1,2	6,2 ± 1,3
20	7,2 ± 1,4	6,8 ± 1,1	6,5 ± 0,6	6,2 ± 1,0	6,7 ± 0,8

Nota: não houve diferença entre as médias obtidas

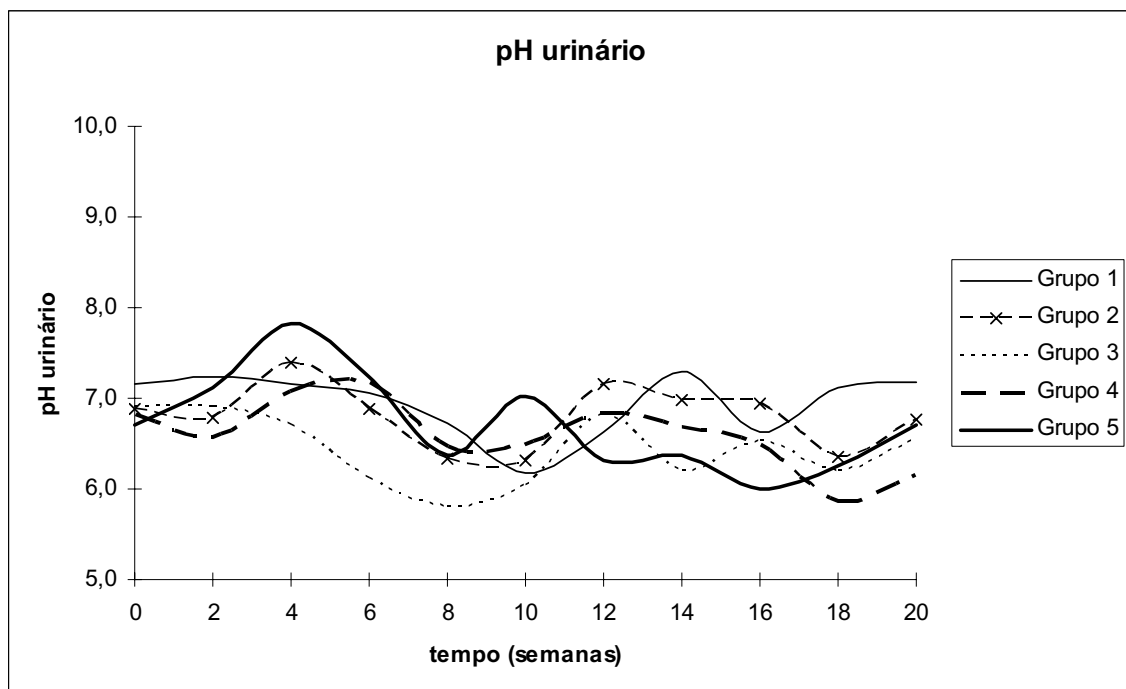


Gráfico 28 - Valores médios do pH urinário de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Não existiu diferença entre o pH urinário dos animais com ICA e os demais ovinos de todos grupos na 20ª semana ($P > 0,34$).

DENSIDADE URINÁRIA

Não ocorreram quaisquer diferenças nas médias gerais de densidade urinária em todos os grupos, assim como entre os grupos, como mostra a Tabela 29 e Gráfico 29.

Tabela 29- Valores médios e desvios padrão da densidade urinária de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Semanas	Grupos				
	1	2	3	4	5
0	1020 ± 13	1017 ± 12	1022 ± 10	1022 ± 8	1021 ± 9
2	1021 ± 10	1022 ± 10	1021 ± 6	1022 ± 10	1025 ± 8
4	1026 ± 6	1028 ± 8	1027 ± 8	1027 ± 5	1025 ± 14
6	1028 ± 3	1022 ± 15	1025 ± 6	1019 ± 10	1018 ± 9
8	1020 ± 10	1022 ± 10	1019 ± 11	1021 ± 12	1021 ± 5
10	1028 ± 3	1025 ± 10	1030 ± 4	1021 ± 12	1020 ± 12
12	1023 ± 8	1022 ± 14	1021 ± 10	1022 ± 8	1019 ± 7
14	1016 ± 14	1019 ± 13	1022 ± 15	1024 ± 13	1024 ± 9
16	1023 ± 11	1022 ± 10	1020 ± 8	1021 ± 5	1018 ± 10
18	1026 ± 6	1024 ± 7	1022 ± 10	1024 ± 11	1022 ± 8
20	1021 ± 8	1026 ± 4	1024 ± 6	1020 ± 9	1024 ± 6

Nota: não houve diferença entre as médias obtidas

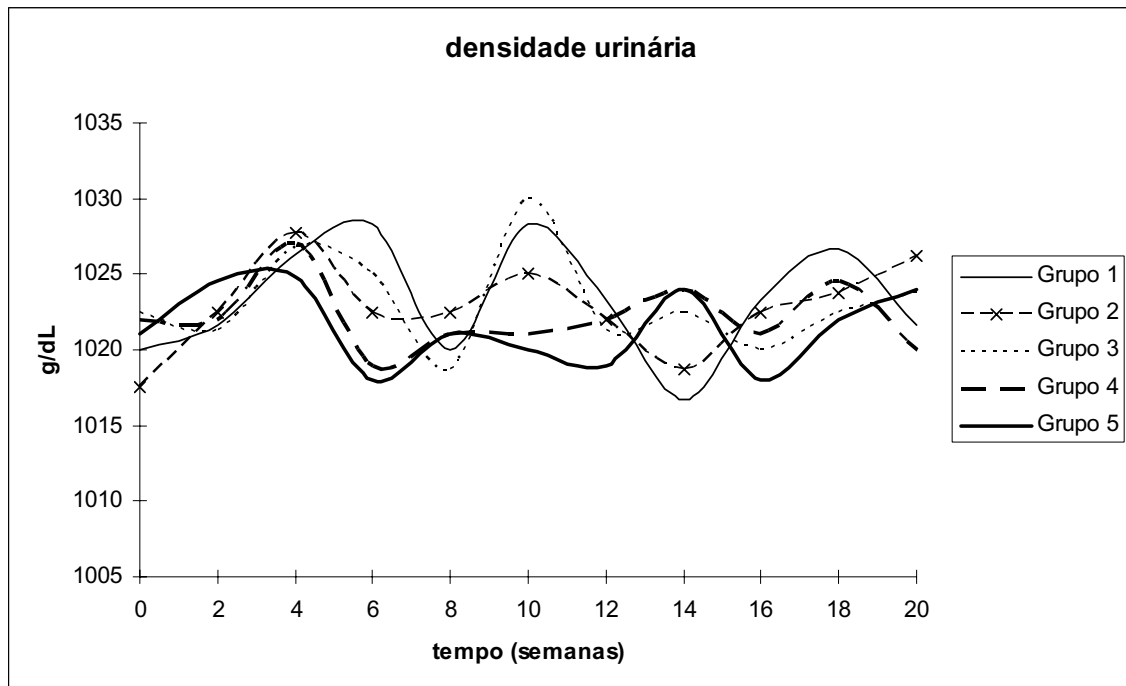


Gráfico 29- Valores médios da densidade urinária de ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

Não existiu diferença entre a densidade urinária dos animais com ICA e os demais ovinos de todos grupos na 20^a semana ($P > 0,56$).

SEDIMENTO URINÁRIO

A análise do sedimento urinário não mostrou nenhuma diferença entre os grupos ou dentro dos grupos, a qual mostrou a presença ocasional em todos os animais de células de epiteliais, cristais de fosfato amorfo em baixa quantidade, e mais raramente a presença baixa de leucócitos. A presença de hemáceas também foi notada em alguns ovinos.

A análise da relação entre o cobre hepático e a atividade de AST evidenciou uma alta relação positiva ($r = 0,78$), e está expressa pela equação:

$$y = 0,115x + 22,59$$

e ilustrada no Gráfico 30.

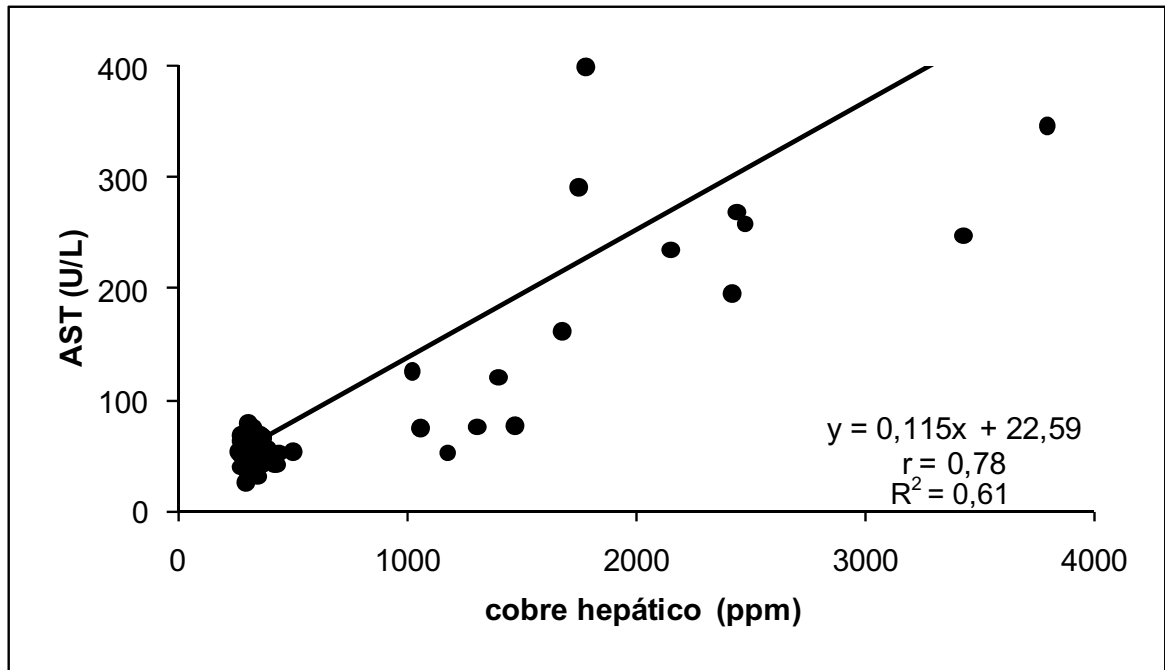


Gráfico 30 - Influência do acúmulo de cobre hepático sobre a atividade de AST em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Considerando-se o valor de 1.000 ppm como um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA buscou-se linha de corte da atividade de AST para poder ser indicada como teste diagnóstico. 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). O valor preditivo positivo foi máximo (100%) enquanto que o negativo foi de 94% quando a atividade de AST foi 120 U/L. Foram obtidas uma sensibilidade de 73%, especificidade de 100% e acurácia de 95% para esse teste (Gráfico 31).

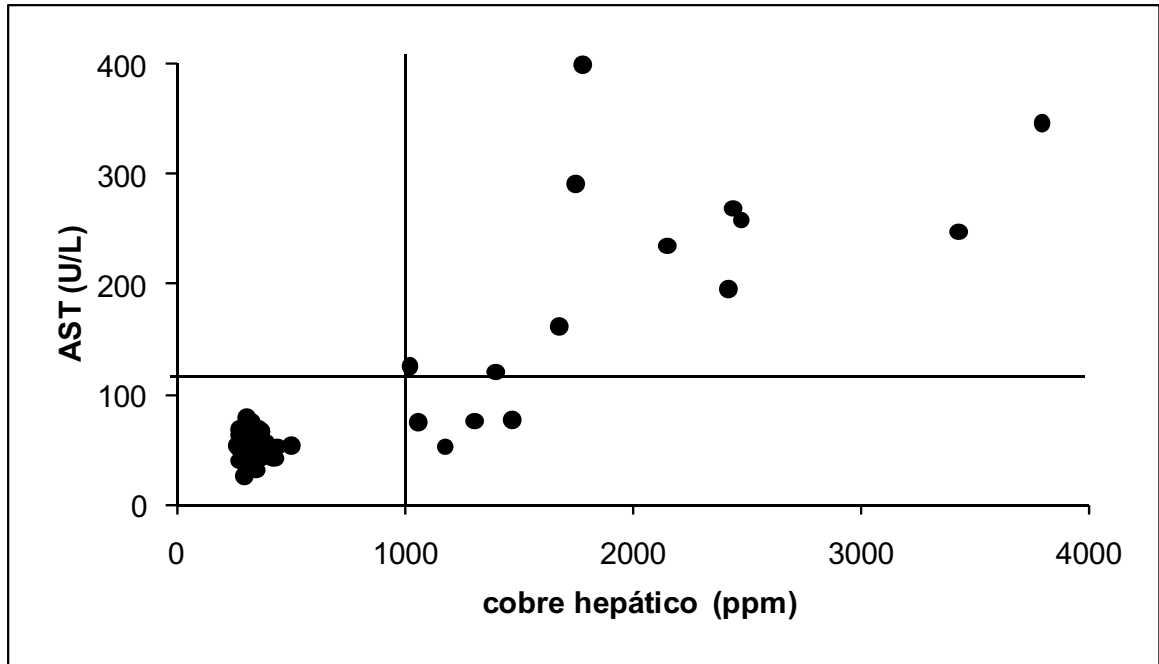


Gráfico 31 - Linha de corte ("cut-off line") indicativa do valor preditivo da AST em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos - São Paulo – 2006

A análise da relação entre o cobre hepático e a atividade de GGT evidenciou uma alta relação positiva ($r = 0,86$), e está expressa pela equação:

$$y = 0,041x + 23,8$$

e ilustrada no Gráfico 32

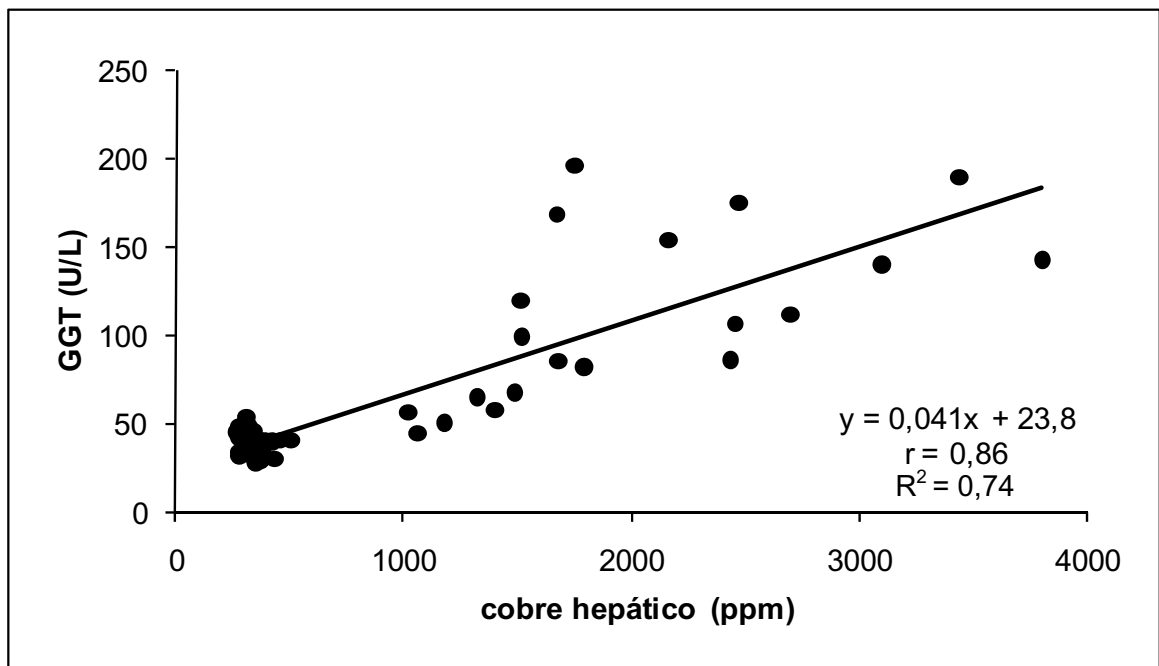


Gráfico 32 - Influência do acúmulo de cobre hepático sobre a atividade de GGT em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

Considerando-se também o valor de 1.000 ppm como um acúmulo de cobre hepático indicativo de futuro desencadeamento de ICA determinou-se que a melhor linha de corte da atividade de GGT para poder ser indicada como teste diagnóstico foi de 56,5 U/L. Com essas delimitações obteve-se um valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 96%, uma sensibilidade de 90% , especificidade de 100% e acurácia de 97% (Gráfico 33).

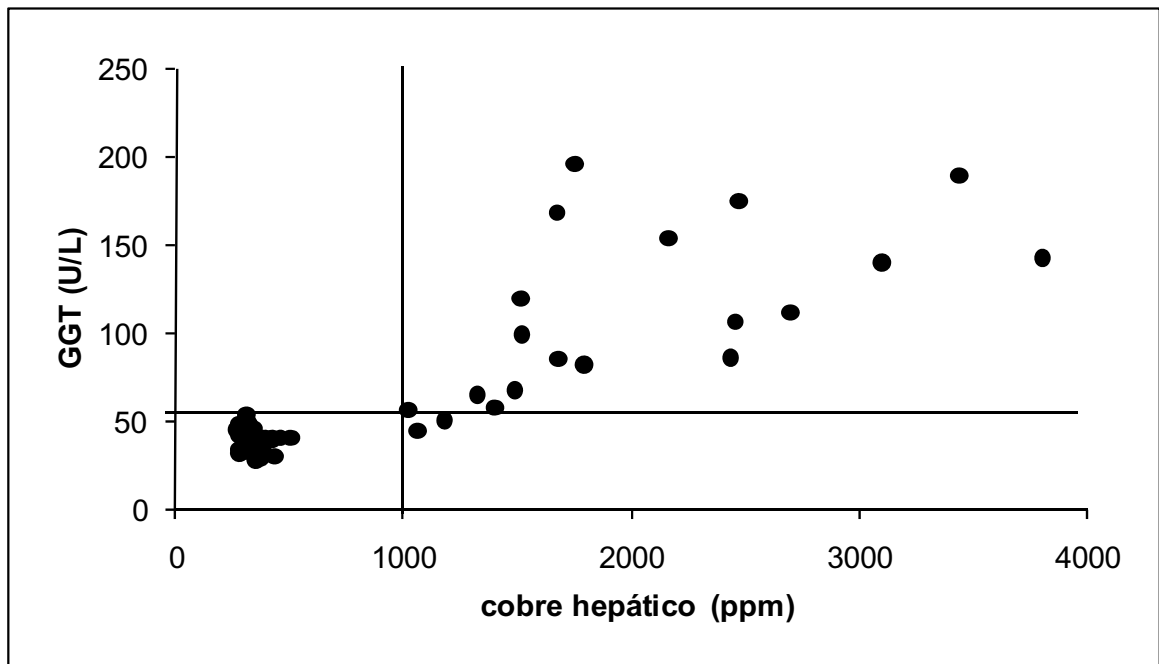


Gráfico 33 - Linha de corte ("cut-off line") indicativa do valor preditivo da GGT em relação ao acúmulo hepático de cobre em ovinos - São Paulo – 2006

A análise da relação entre o cobre hepático e a atividade de ceruloplasmina evidenciou uma alta relação negativa ($r = - 0,71$), e está expressa pela equação:

$$y = 10,022e^{-0,0005x}$$

e ilustrada no Gráfico 34.

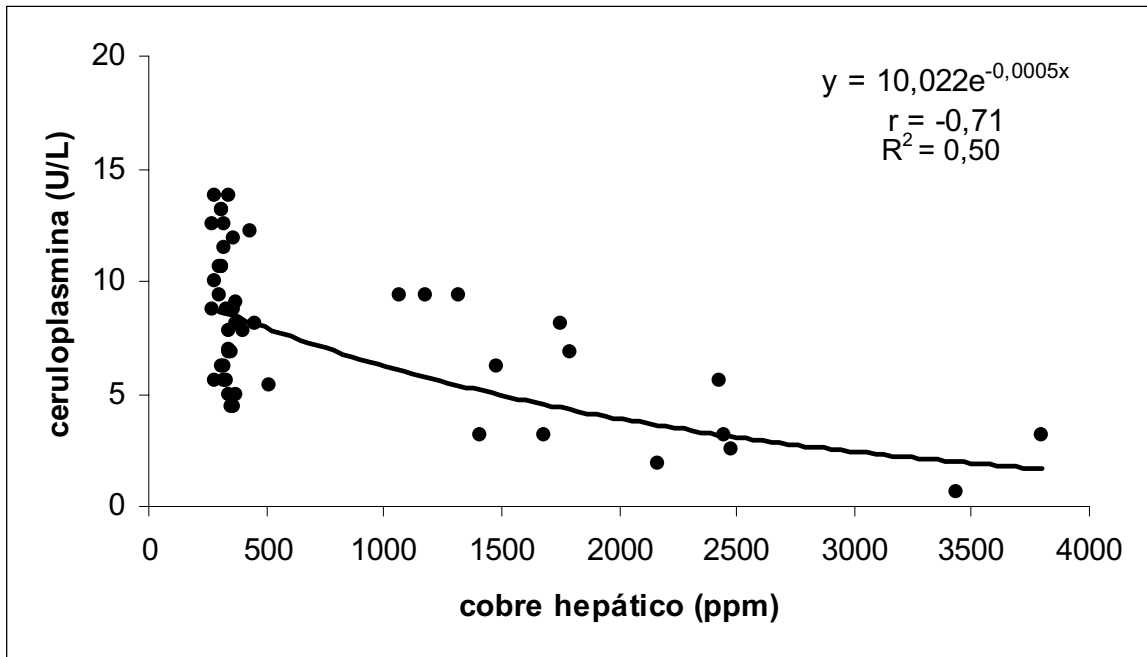


Gráfico 34 - Influência do acúmulo de cobre hepático sobre a atividade de ceruloplasmina em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

A análise da relação entre a retenção diária de cobre e o cobre hepático evidenciou uma alta relação positiva ($r = 0,83$), e está expressa pela equação:

$$y = 412,69e^{0,053x}$$

e ilustrada no gráfico 35.

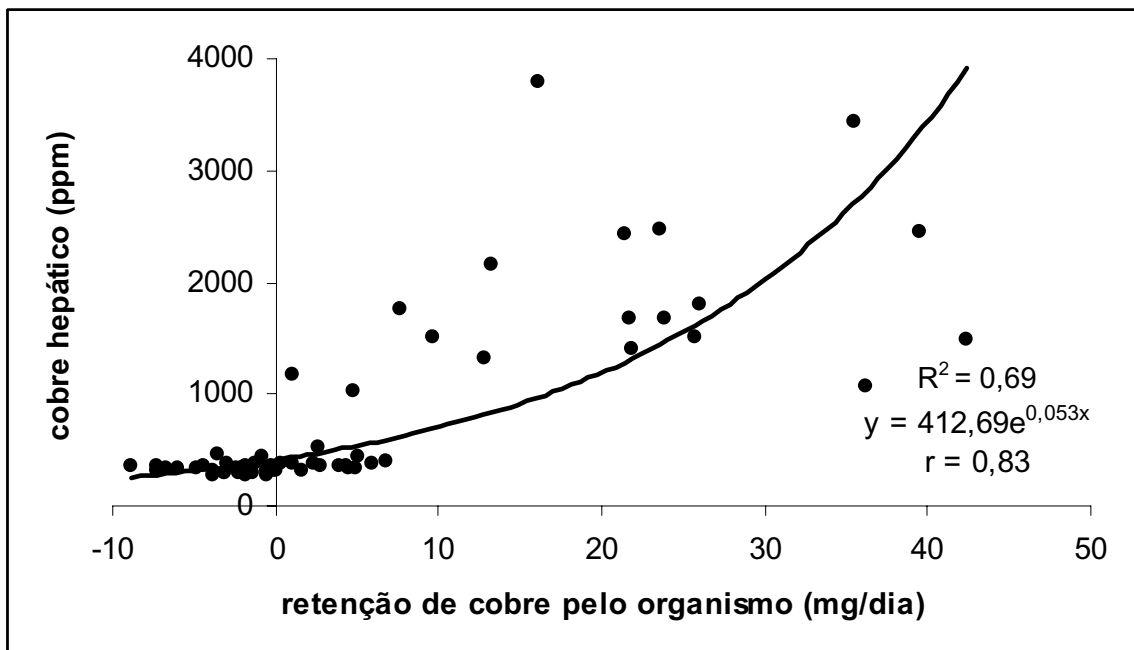


Gráfico 35 - Influência do acúmulo diário de cobre sobre a reserva de cobre hepático em ovinos que receberam diferentes doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

A análise da relação entre o cobre hepático e a concentração de zinco hepático mostrou uma alta correlação positiva ($r = 0,74$), expressada pela equação:

$$y = 23,39x^{0,2954}$$

e ilustrada no Gráfico 36.

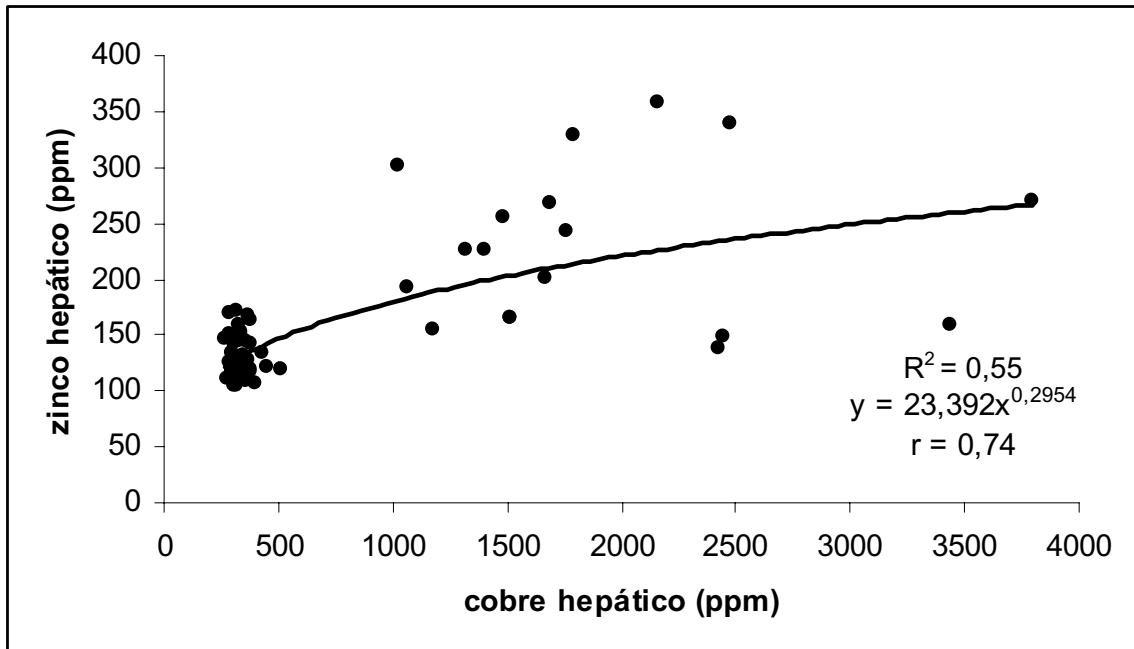


Gráfico 36 - Influência do cobre hepático sobre a reserva de zinco hepático em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

A análise da relação entre a ingestão de molibdênio e a retenção diária de cobre pelo organismo nos animais que receberam altas doses de cobre dietético, no final do experimento, mostrou uma alta correlação negativa ($r = -0,62$), expressada pela equação:

$$y = -16,486\ln(x) + 57,106$$

e ilustrada no Gráfico 37.

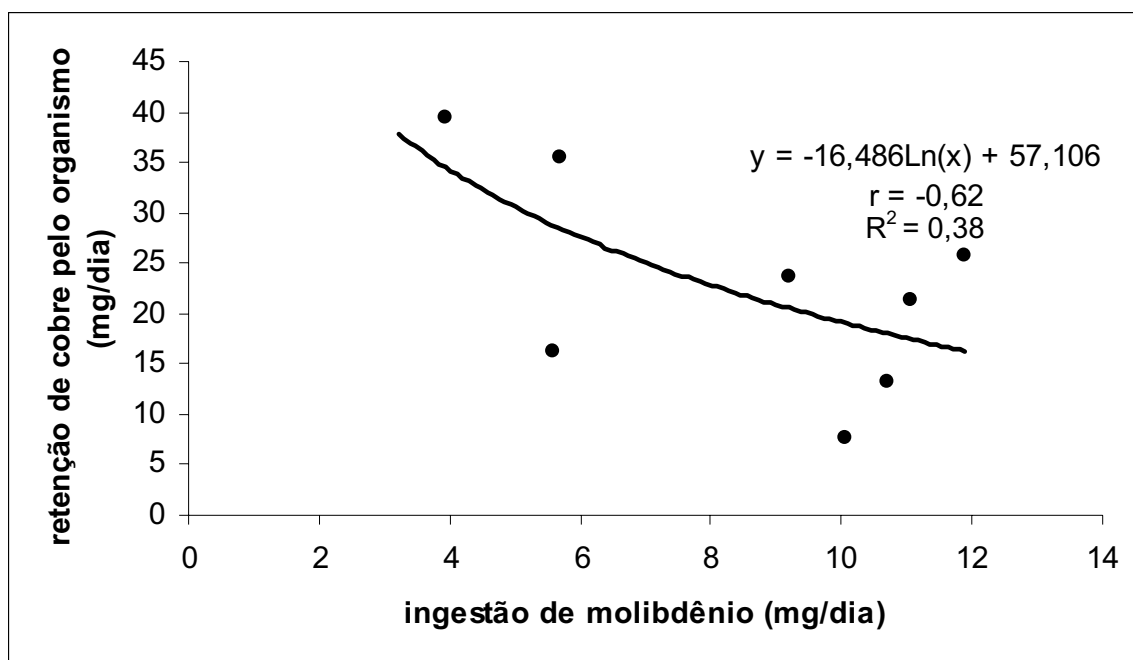


Gráfico 37 - Relação da ingestão de molibdênio sobre a retenção de cobre no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

A análise da relação entre excreção de molibdênio e a retenção diária de cobre pelo organismo nos animais que receberam altas doses de cobre dietético, no final do experimento, mostrou uma alta correlação negativa ($r = -0,84$), expressada pela equação:

$$y = -27,998\text{Ln}(x) + 78,272$$

e ilustrada no Gráfico 38.

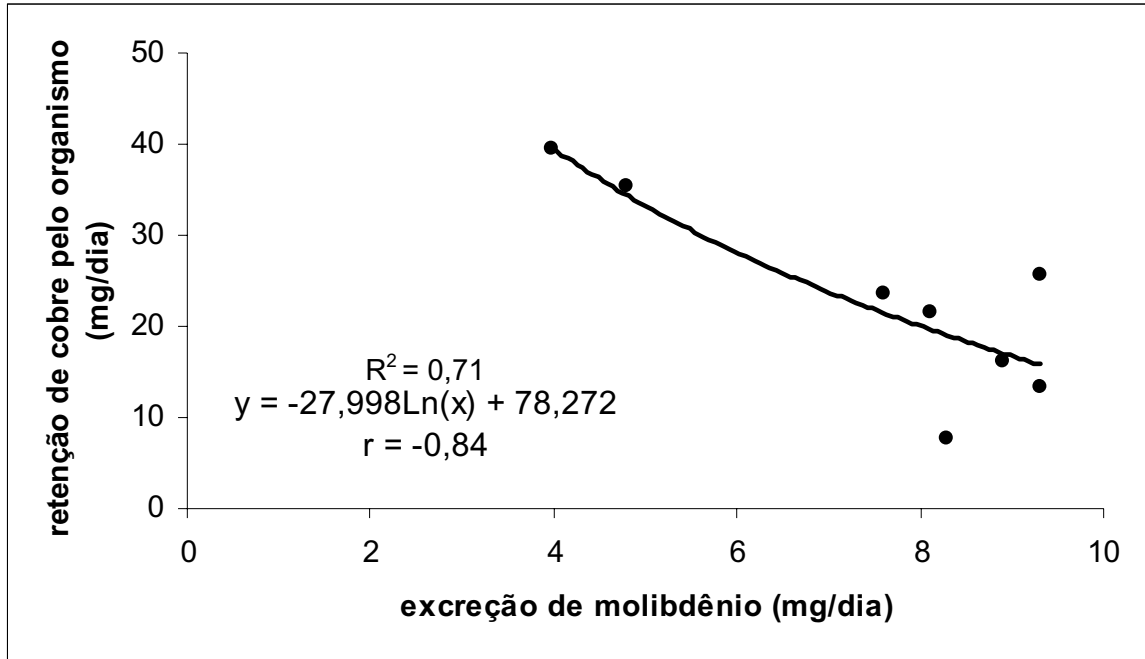


Gráfico 38 - Relação da excreção de molibdênio sobre a retenção de cobre no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

A análise da relação entre ingestão de molibdênio e o teor de cobre hepático nos animais que receberam altas doses de cobre dietético, no final do experimento, mostrou uma alta correlação negativa ($r = -0,72$), expressada pela equação:

$$y = 4515,4e^{-0,074x}$$

e ilustrada no Gráfico 39.

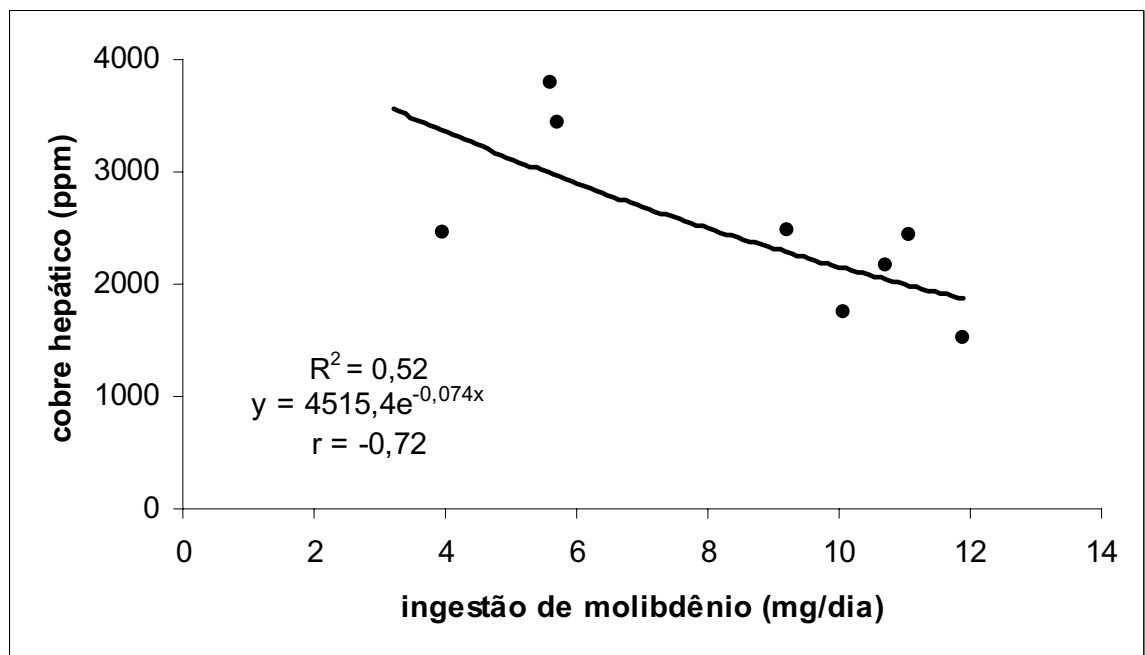


Gráfico 39 - Relação da ingestão de molibdênio sobre o cobre hepático no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

A análise da relação entre excreção de molibdênio e o teor de cobre hepático nos animais que receberam altas doses de cobre dietético, no final do experimento, mostrou uma alta correlação negativa ($r = -0,72$), expressada pela equação:

$$y = -227,73x + 4051,3$$

e ilustrada no Gráfico 40.

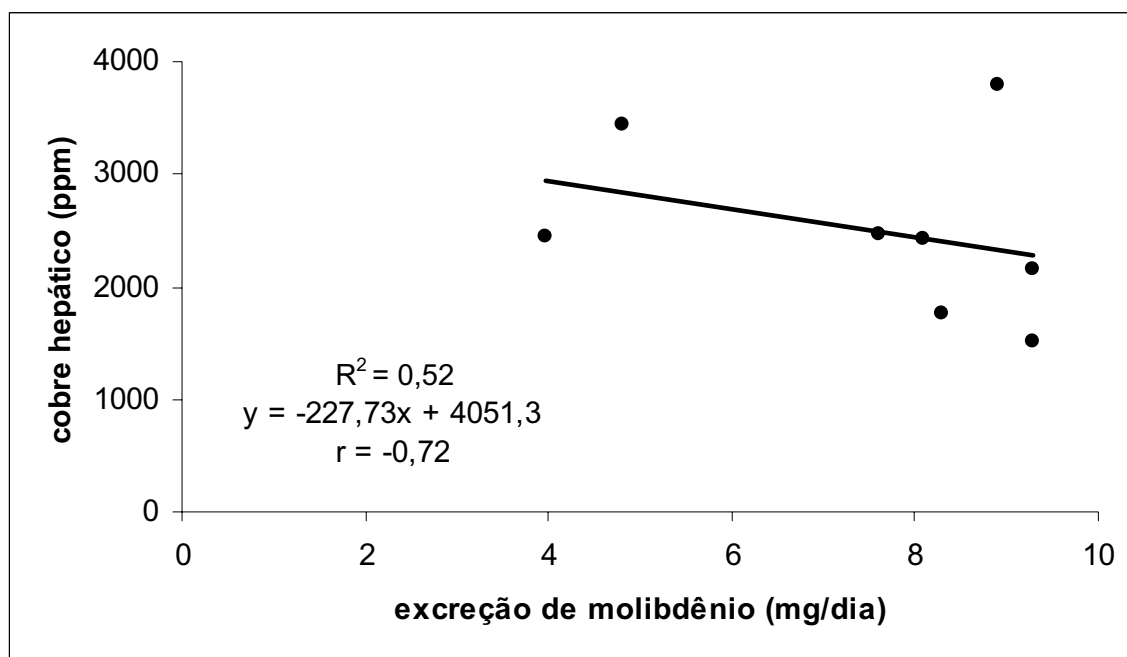


Gráfico 40- Relação da excreção de molibdênio sobre o cobre hepático no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético - São Paulo – 2006

A análise da relação entre excreção de molibdênio e a excreção de cobre nos animais que receberam altas doses de cobre dietético, no final do experimento, mostrou uma alta correlação ($r = 0,84$), expressada pela equação:

$$y = 0,861x + 8,389$$

e ilustrada no Gráfico 41.

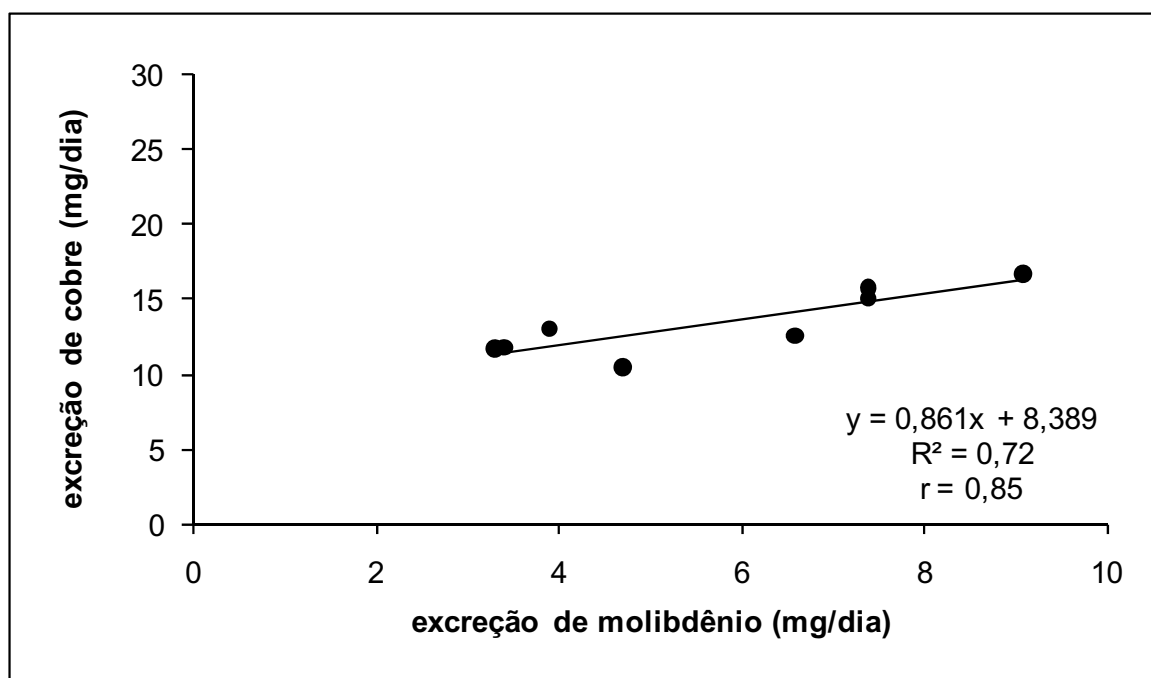


Gráfico 41- Relação da excreção de molibdênio sobre a excreção de cobre no final do experimento em ovinos que receberam altas doses de cobre dietético - São Paulo - 2006

6 DISCUSSÃO

Os pontos-chaves deste trabalho se encontram no número de animais que manifestaram quadro de ICA e os teores de cobre realmente retidos no organismo, avaliado pela concentração de cobre hepático. Grande parte do cobre dietético absorvido durante a fase pré-hemolítica fica retido no fígado e nos rins. Estudo feito com ovinos acometidos de ICA indicou que na fase pré-hemolítica a concentração de cobre por quilograma de matéria seca era 12,8 maior no fígado que nos rins, ou seja, o fígado comprovadamente é o grande órgão-estoque de cobre (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; SANSINANEIA et al., 1993).

Ficou atestado que existiu um acúmulo de cobre hepático no decorrer do experimento nos grupos que foram intencionalmente suplementados com sulfato de cobre (4 e 5) e que o oferecimento de quantidades maiores de ração concentrada ao grupo 2 (sem adição de molibdênio) também contribuiu significativamente para a retenção hepática de cobre quando comparados com o grupo 1 (Tabela 10).

Era de se esperar que a suplementação com sulfato de cobre aumentasse as reservas de cobre nos animais, visto que a disponibilidade desse elemento neste composto é alta e gira em torno de 50 % (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Porém, chama atenção o efeito da adição de ração concentrada no grupo 2 estimulando a retenção de cobre hepático (Tabela 10). Nesse grupo a ração concentrada se elevou de 20% para 50 % da MS ingerida e concomitantemente existiu a diminuição nos teores de volumoso, de 80% para 50%.

Essa nova dieta provocou acúmulo de cobre hepático, aumentando em quase 30% os teores de cobre ao fim de 20 semanas. Várias condições poderiam explicar este acúmulo de cobre no fígado. Embora os teores de cobre na ração concentrada (9 ppm) fossem ligeiramente mais elevados que na forragem (6,5 ppm), a disponibilidade do cobre nos concentrados é cerca de três a cinco vezes maior que nos capins (ORTOLANI, 2006; SUTTLE, 1986; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999), além de normalmente apresentarem teores baixos de molibdênio (ORTOLANI, 1996). Esse último alimento diminui a disponibilidade de cobre no conteúdo ruminal, pois aumenta a quantidade de fase líquida no rúmen o que incrementa a ligação do cobre com os tiomolibdatos nesse meio (SUTTLE, 1991). Outro fato que deve ser ressaltado é que os teores de cobre oferecido na dieta do grupo 2 (cerca de 18 ppm), via ração concentrada, volumoso e sal mineral, estiveram muito acima dos

requeridos (4,1 ppm) para as raças mais predispostas à ICA, como a Ile de France utilizada no presente experimento (SUTTLE,1987).

O uso metafilático contra ICA de sal mineral contendo molibdênio deve ser interpretado com muita atenção neste experimento. Numericamente, poder-se-ia dizer que esse sal contribui para uma menor mortalidade de ovinos no grupo 5 (20%; 1/5) em relação ao grupo 4 (60%; 3/5) que atuou como controle sem molibdênio, ambos altamente expostos a expressiva ingestão de cobre. Contudo, quando foi aplicado o teste de exato de Fisher não existiu diferença ($P = 0,52$) entre essas taxas de mortalidade. Deve-se ressaltar que devido ao pequeno número de graus de liberdade este teste é altamente rigoroso e apenas seria significativo caso houvesse uma diferença de no mínimo quatro mortos entre os grupos 5 e 4 (Quadro 2).

Outro dado que se deve avaliar com cuidado é o balanço entre a ingestão de cobre e a excreção deste elemento nas fezes e urina. A análise estatística indicou que o molibdênio não aumentou a quantidade diária de excreção de cobre (Tabela 8), nem mesmo diminuiu a retenção aparente diária de cobre no organismo no decorrer do experimento (Tabela 9). Uma hipótese que poderia ser levantada para explicar os resultados poderia ser a não detecção pelo aparelho de absorção atômica do cobre complexado com os tiomolibdatos formados a partir do molibdênio dietético tanto no grupo 3 como 5, já que quanto maior foi a retenção diária de cobre, maior foi o acúmulo de cobre hepático ($r = 0,83$) (Gráfico 35). Mas, por outro lado, os teores de cobre hepáticos foram numericamente bem menores no grupo 5 que 4 ao término do experimento, assim como os valores obtidos no grupo 2 foram superiores ao controle (grupo 1) diferentemente do grupo 3 que não mostrou diferença quando comparado com o grupo 1 ao término do experimento (Tabela 10), embora os ovinos do grupo 3 tenham ingerido mais cobre dietético do que os animais dos grupo 1 e 2 (Tabela 7).

Deve-se ressaltar que existiu uma tendência ($P = 0,09$) de menor concentração hepática de cobre no grupo 5 em relação ao grupo 4 na 20ª semana de experimento (Tabela 10). Mas quando esses teores de cobre hepático foram somados nos grupos 3 e 5 (que receberam Mo) e comparados com os que não receberam molibdênio constatou-se uma diferença significativa entre eles, indicando que o molibdênio preveniu o acúmulo de cobre no tecido hepático (Tabela 11). Essa constatação foi também comprovada pela significativa correlação negativa entre a ingestão de molibdênio e os teores de cobre hepático ($r = -0,72$; $R^2 = 0,51$; Gráfico

39) e retenção de cobre no organismo ($r = -0,62$; $R^2 = 0,38$; Gráfico 37). As mesmas conclusões podem ser obtidas quando foram avaliadas as correlações entre a excreção de molibdênio os teores de cobre hepático ($r = -0,72$; $R^2 = 0,51$; Gráfico 40) e retenção de cobre no organismo ($r = -0,84$; $R^2 = 0,66$; Gráfico 38).

Enquanto que os dados de ingestão, excreção e retenção aparente espelharam um resultado pontual pelo fato de ser um resultado diário, enquanto que os teores de cobre hepático ao término do experimento foram resultantes de status mais prolongado do acúmulo de cobre no decorrer do ensaio. Em outras palavras, o molibdênio promoveu um efeito preventivo no surgimento de ICA, visto que o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,51$) indicou que a menor retenção de cobre no fígado foi promovida em 51 % pela adição de desse elemento na dieta.

Como era de se esperar a retenção diária de cobre pelo organismo refletiu de maneira muito significativa os teores de cobre hepático nos animais (Gráfico 35; $r = 0,83$; $R^2 = 0,69$), confirmando o conceito clássico que o fígado é o grande órgão-estoque de cobre nos ovinos.

O molibdênio excretado diariamente foi maior no grupo 5 que no 1, 2 e 4 (Tabela 13 e Gráfico 13). Era de se esperar que o grupo 5 fosse superior aos grupos 2 e 4, pois esses últimos não foram suplementados com molibdênio. Embora o grupo 1 fosse identicamente suplementado com esse microelemento em relação ao grupo 5, como identificado na Tabela 12, este último excretou maiores quantidades de molibdênio nas fezes e urina, sugerindo que maior parte deste foi provavelmente combinada com o cobre. O estudo de correlação entre cobre e molibdênio excretados nesses grupos 1 e 5 se mostra pouco significativo, pois no segundo grupos os teores de cobre ingerido são tão altos que interferem no resultado. Porém, se tal estudo de correlação for feito entre os grupos 2 e 3 que ingeriram quantidades praticamente idênticas de cobre, mas com certa diferença de ingestão de molibdênio, fica claro que quanto maior a excreção de molibdênio maior a de cobre (Gráfico 41; $R^2 = 0,72$). Tal resultado sugere que esse cobre excretado foi provavelmente complexado ao molibdênio no rúmen, sendo eliminado nas fezes em forma de tetra ou tritiomolibdato.

A cinética dos teores de cobre sangüíneo variou segundo a distribuição dos dados a serem analisados (Tabelas 19 e 20; Gráficos 19 e 20). No primeiro grupo de tabela e gráfico os teores de cobre foram avaliados dentro de todos os grupos e tempos, sofrendo influência de um menor número de ovinos que sucumbiram nos

grupos 4 e 5, ao término do experimento. Esta forma de distribuição não permitiu a constatação de diferenças entre os grupos. Contudo, quando foram agrupados os animais intoxicados ou não (Tabela 20 e Gráfico 20), independente se pertenciam ao grupo 4 ou 5, foi possível identificar uma elevação dos teores de cobre sérico no grupo intoxicado já no 14º dia que antecedia a crise hemolítica, apresentando uma diferença marcante quando da crise hemolítica. Tal resultado destoa do classicamente descrito, que afirma que os teores de cobre sangüíneo têm um incremento apenas nos 2º ou 3º dia que antecede a crise hemolítica (HOWELL; GAWTHORNE, 1987; MACHADO, 1998). Provavelmente, tal diferença foi detectada pelos baixos valores de coeficiente de variação encontrados no grupo não intoxicado, que nunca foram superiores a 19% (2ª quinzena anterior a crise hemolítica), o que favorece o surgimento de diferenças quando se compararam os grupos. No experimento realizado por Machado (1998) tal coeficiente sempre foi superior a 25%. O valor médio de cobre sérico encontrado no 2ª semana que antecedia a hemoglobinúria (20,2 µmol/L) já se apresenta dentro da faixa marginal (20-25 µmol/L) indicativa de ICA descrita por Underwood; Suttle (1999).

Um fato interessante ocorreu com os teores de zinco hepático nos animais dos grupos submetidos à grande suplementação de cobre (4 e 5), estes tiveram um acúmulo muito maior de zinco do que os outros grupos (Tabela 17). Quanto mais alto os teores de cobre também maiores foram os de zinco no fígado (Gráfico 36). Idêntico resultado foi recentemente obtido por Minervino (2007) que intoxicou experimentalmente bovinos e búfalos com cobre. O zinco é o principal estimulador da síntese de metalotioneína hepática. Segundo López-Alonso et al. (2005) quanto maior a concentração de zinco no fígado maior é o teor de metalotioneína neste órgão ($R^2 = 0,69$). Esse composto é responsável pela complexação com o cobre estocado no órgão para ser posteriormente excretado pela bile no processo de desintoxicação. Embora não tenha determinado os teores de metalotioneína, Minervino (2007) sugeriu que ruminantes prestes a se intoxicarem por cobre passam a acumular zinco no fígado no afã de aumentar a desintoxicação do cobre. Os ovinos de todos os grupos receberam, quantidades superiores a mínima recomendada (40 ppm) de zinco na dieta (entre 55 a 75 mg/ovino/dia). Mas ficou comprovado que aqueles animais que desenvolveram ICA já passaram a concentrar maiores quantidades de zinco no fígado na 10ª semana (Tabela 18). Este fenômeno pode ser interpretado como uma reação de alarme dos ovinos 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, apesar de os ovinos produziram menor quantidade de metalotioneína hepática (BREMNER, 1987). 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 ovinos foi bastante superior desencadeando um quadro fatal.

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. É possível que tenha ocorrido também uma menor absorção de cobre originada por uma maior produção intestinal de metalotioneínas.

Os dados de atividade de AST e GGT demonstraram que ambas enzimas podem ser indicativas precoces de ICA e de acumulação definitiva de cobre hepático em ovinos dos grupos 4 e 5 (Tabelas 24 e 25). Existiu um aumento significativo de atividade de AST e GGT do momento basal para a 12^a e 14^a semana, respectivamente. Ortolani et al. (2003) constataram que o GGT elevou sua atividade duas semanas antes que o AST em ovinos experimentalmente intoxicados com cobre. Mas, deve-se ressaltar que enquanto no experimento de Ortolani et al. (2003) a suplementação com cobre foi em doses crescentes no presente experimento a quantidade de cobre oferecida aos grupos 4 e 5 foi constante, num processo mais demorado para atingir um quadro de intoxicação. É possível que em quadros mais agressivos como o instituído por Ortolani et al. (2003) haja um maior estímulo para proliferação de células do sistema excretor biliar levando a uma maior produção e secreção de GGT para o plasma, diferente do que ocorreu no presente experimento. Os presentes resultados, indicando uma elevação de AST de forma mais precoce, são idênticos aos descritos por Schee et al. (1983) em ovinos que não sucumbiram

de ICA, mas que acumularam de maneira significativa o cobre no fígado ($r = 0,78$; gráfico 30). Mas os resultados mostraram que a influência do acúmulo de cobre hepático na atividade de GGT ($R^2 = 0,74$; gráfico 32) é maior que na atividade de AST ($R^2 = 0,61$; gráfico 30).

Além disso, as atividades de GGT e AST foram de valia para subsidiar o diagnóstico precoce de ovinos que acumularam quantidades significativas de cobre no fígado (mais de 1000 ppm). Neste presente trabalho a linha de corte indicativa de risco de quadro de ICA em ovinos a partir dos valores de GGT e AST, expressos a 30° C, é de 56,5 e 120 U/L, respectivamente. Tanto a AST (Gráfico 31) como a GGT (Gráfico 33) apresentaram coeficientes de determinação altos e sendo que a diferença principal está na maior sensibilidade (detecção de verdadeiros positivos) da GGT em relação ao AST (90% e 73%, respectivamente) em predizer altas concentrações de cobre hepático nos ovinos. Por outro lado, tanto as atividades de AST como GGT foram altamente específicas (100 %), pois não detectaram em nenhum caso falsos negativos (Gráficos 31 e 33). Diferentemente dos achados de Gummow (1996) em bovinos, no presente estudo a GGT, e em menor grau o AST, mostrou-se como uma possível ferramenta diagnóstica para o acúmulo hepático de cobre em ovinos, semelhante ao descrito por Ortolani et al. (2003) e Minervino (2007), e diferente de MacPherson; Hemingway (1969) que concluíram que a atividade de AST apresentou melhor desempenho como indicador precoce de intoxicação, que a de GGT.

Como era de se esperar o ganho de peso foi superior nos animais que receberam uma dieta mais rica em concentrados (2 a 5) que o grupo 1 (controle) (Tabelas 1 e 2). O maior ganho de peso inicial provavelmente ocorreu devido a um “ganho compensatório”, maior nas primeiras duas semanas com declínio gradativo no decorrer das próximas seis a oito semanas. Este ganho compensatório aconteceu por uma súbita melhora na qualidade na dieta, com incremento de ração concentrada, e pelo fato dos mesmos se encontrarem numa certa restrição alimentar anterior, ocorrida durante os dois meses de período de adaptação, em que os ovinos foram submetidos a um processo de biópsia hepática. Na 10ª semana ocorreu uma queda abrupta no ganho de peso devido a segunda biópsia, indicando que esta intervenção diminuí temporariamente o desempenho produtivo dos ovinos. Após duas a quatro semanas todos os grupos recuperaram o ganho de peso, e mesmo

com o acúmulo de cobre hepático não existiu interferência na produção, como anteriormente descrito por Ortolani et al. (2003).

Nos animais dos grupos 4 e 5 que não manifestaram ICA, assim como nos ovinos dos grupos 1, 2 e 3 não ocorreram alterações nos parâmetros clínicos no decorrer do experimento (tabelas 3, 4, 5 e 6), semelhante ao descrito por Machado (1998). Já quadro clínico de ICA exibido pelos ovinos foi clássico e provocou uma série de alterações funcionais, como surgimento de taquicardia, oligopnéia, diminuição dos movimentos ruminais, diarreia, mucosas ictéricas, ligeira hipertermia e anúria características, como já descrito por vários autores (LEMOS et al. 1997; MACHADO, 1998; RADOSTITS et al., 2007; SARGISON et al. 1994; SOARES, 2004; SOLI, 1980). Por outro lado provocaram uma alteração súbita em algumas variáveis bioquímicas como a elevação nos teores de uréia, creatinina, bilirrubina além das atividades de AST e GGT (Quadro 2). Tais alterações supracitadas foram amplamente verificadas e descritas por Machado (1998) e Soares (2004).

A 2ª biópsia (10ª semana) promoveu uma significativa elevação dos teores de uréia sangüínea (Tabela 22). No decorrer dos dois a três dias após a realização da biópsia os animais apresentaram um quadro de apatia e grande diminuição no consumo de alimentos. Maruta (2005) constatou que ruminantes submetidos a jejum têm uma grande elevação dos teores de uréia sérica devido a um destacado processo temporário de proteólise.

As atividades de ceruloplasmina variaram bastante durante o experimento, em especial na 16ª semana, quando ocorreu uma elevação inesperada dos valores (Tabela 27).

Embora não existisse uma diferença significativa na atividade de ceruloplasmina entre os animais que sucumbiram ou não com ICA (Tabela 27), deve-se ressaltar que existiu uma correlação negativa de alta intensidade ($r = -0,71$) entre a concentração hepática de cobre e a atividade de ceruloplasmina, em outras palavras, a ceruloplasmina sinalizou com diminuição em sua atividade com o acúmulo de cobre no fígado (Gráfico 34). Os mecanismos que regem este fenômeno não foram estudados até o momento, mas de forma semelhante ao aqui descrito Paynter (1987) descreveu que o cobre ligado a ceruloplasmina diminuí em 20 a 50 % nos casos de intoxicação por cobre.

Os exames rotineiros de urina, pH, densidade e sedimento urinário nada contribuíram como indicadores precoces do surgimento de um quadro de ICA,

sugerindo que as alterações devido a insuficiência renal conforme descrito por Jones et al. (1984) e Gooneratne et al. (1986) ocorrem a partir da crise hemolítica (Tabelas 28 e 29). Com o comprovado dano hepático que já ocorre algumas semanas antes do desencadeamento da crise hemolítica, e a não ocorrência de dano renal prévio, reafirmam as considerações de diversos autores (CARLSON; GEORGE, 1990; HOWELL; GAWTHORNE, 1987; ISHMAEL et al. 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; SOLI, 1980; VAN SAUN, 1988) de que o principal quadro mórbido responsável pela morte do animal com ICA estão ligados a lesões hepáticas e não a lesões renais.

7 CONCLUSÕES

- A adição de ração na dieta provocou uma maior retenção de cobre no fígado dos ovinos;
- O uso metafilático de sal mineral com molibdênio promoveu numericamente uma redução de 40% na mortalidade em ovinos que receberam dietas muito ricas em cobre;
- Quanto maior a ingestão de molibdênio na dieta menor foi o acúmulo de cobre hepático ao término do experimento e maior foi a excreção de cobre pelo organismo;
- Os ovinos que apresentaram ICA tiveram elevação de cobre sanguíneo já no 14º dia prévio a hemoglobinúria em relação aos que receberam altos teores de cobre foram resistentes à intoxicação;
- Quanto mais alto os teores de cobre no fígado maior a concentração de zinco neste órgão;
- As altas atividades de GGT e de AST podem indicar o acúmulo de cobre nos tecidos hepáticos destas espécies. Tanto o GGT como o AST podem ser indicadores precoces da intoxicação cúprica. Contudo a primeira enzima apresenta maior sensibilidade diagnóstica que o AST.

REFERÊNCIAS

ARORA, R. G.; ANDERSON, L.; BUCHT, R. S.; FRANK, A.; KRONEVI, T. Chronic copper toxicosis in sheep. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 29, n. 4-5, p. 181-187, 1977.

BARDEN, P. J.; ROBERTSON, A. Experimental copper poisoning in sheep. **The Veterinary Record**, v. 74, n. 9, p. 252-256, 1962.

BOTHA, C. J.; SWAN, G. E.; MINNAAR, P. P. Pharmacokinetics of ammonium tetrathiomolybdate following intravenous administration in sheep. **Journal of South African Veterinary**, v. 66, n. 1, p. 6-10, 1995.

BREMNER, I. Involvement of metallothionein in hepatic metabolism of copper - critical review. **Journal of Nutrition**, v. 117, n. 1, p. 19-29, 1987.

CARLSON, G. P.; GEORGE, L. W. Diseases of the hematopoietic and hemolymphatic systems - Cooper toxicosis. In: SMITH, B. P. **Large animal internal medicine**. Davis: Mosby, 1990. p. 1101-1102.

COUSINS, R. J. Absorption, transport and hepatic metabolism of cooper and zinc with special reference to metallothionein and caeruloplasmin. **Physiological Reviews**, v. 65, p. 238-309, 1985.

DINCER, Z.; HAYWOOD, S.; HUMPHRIES, W.R Copper associated toxic encephalopathy in copper-poisoned sheep treated with tetrathiomolybdate. In: SCHMIDT, A. **Trace elements in man and animais**. Media touristk, Dreden, 1993. p. 982-983. Tema 8.

GOONERATNE, S. R.; CHRISTENSEN, D. A. Effect of chelating agents on the excretion of copper, zinc and iron in the bile and urine of sheep. **Veterinary Journal**, v. 153, n. 3, p. 171-178, 1997.

GOONERATNE, S. R.; HOWELL, J. M. Creatine kinase release and muscle changes in chronic copper poisoning in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 28, n. 4, p. 351-353, 1980.

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

GOONERATNE, S. R.; HOWELL, J. M.; GAWTHORNE, J. M. Intravenous administration of thiomolybdate for the prevention and treatment of chronic copper poisoning in sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 457-467, 1981.

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

HOWELL, J. M.; GAWTHORNE, J. M. **Copper in animals and man**. CRC Press, 1987. v. II, p. 53-78: the pathology of copper toxicity in animals.

HUMPHRIES, W. R; MILLS, C. F.; CREIG, 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.

HUMPHRIES, W. R; MORRICE, P. E.; BREMNER, I. A convenient method for the treatment of chronic copper poisoning in sheep using subcutaneous ammonium tetrathiomolybdate. **The Veterinary Record**, v. 123, n. 2, p. 51-53, 1988.

ISHMAEL, J.; GOPINATH, C.; HOWELL, J. Experimental chronic copper toxicity in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 22-29, 1972.

JENDRASSIK, L.; GROF, P. Vereinfachte Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. **Biochemische Zeitschrift**, v. 297, n. 12, p. 81-89, 1938.

JENSEN, R.; SWIFT, B. L. Diseases of sheep. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. p.311-3: Chronic copper poisoning.

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

KUMARATILAKE, J. S.; HOWELL, J. M. Intravenously administered tetrathiomolybdate and the removal of copper from the liver of copper loaded sheep. **Journal Comparative Pathology**, v. 101, n. 27, p. 175-199, 1989.

LEMOS, R. A. A.; RANGEL, J. M. R. R.; OSÓRIO, A. L. A. R.; MORAES, S. S.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S. C.; MARTINS, S. Alterações clínicas, patológicas e laboratoriais na intoxicação crônica por cobre em ovinos. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 457-63, 1997.

LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. **Agricultural experimentation: design and analysis**. New York: John Wiley, 1978. 350 p.

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.

MacPHERSON, A.; HEMINGAY, R. G. The relative merit of various blood analyses and liver function tests in giving an early diagnosis of chronic copper poisoning in sheep. **British Veterinary Journal**, v. 125, n. 5, p. 213-221, 1969.

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

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.

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

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

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

OLGIVIE, D. D. Chronic copper poisoning of sheep. **Veterinary Record**, v. 66, n. 1, p. 279-281, 1954.

OLIVEIRA, J. A.; GIESTA, S. M.; SCHILD, A. C.; RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M. C. Intoxicação por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1984, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1984. p.326.

ORTOLANI, E. L. **Efeitos da suplementação dietética de molibdênio e enxofre sobre a infestação de Haemonchus contortus (Rudolphi, 1803), em ovinos. Estudo de alguns aspectos do metabolismo de cobre sódio e da resposta celular do hospedeiro.** 1987. 94p. São Paulo, Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1997.

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

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

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

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.; 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.

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

PIERSON, R. E.; AANES, W. A. Treatment of chronic copper poisoning in sheep. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 133, n. 6, p. 307-311, 1958.

QUIN B. F.; WOODS P. H. Automated catalytic method for the routine determination of molybdenum in plant materials. **Analyst**, v. 194, p. 552-559, 1979.

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

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

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

RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J. A.; 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**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SANSINANEIA, A. S.; CERONE, S. I.; NAJLE, R.; AUZA, N. Lipid peroxidation in erythrocyte membranes of sheep with chronic copper poisoning. **Journal of Clinical Biochemical Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 65-72, 1994.

SANSINANEIA, A. S.; CERONE, S. I.; QUIROGA, M.; AUZA, N. Antioxidant capacity of erythrocytes from sheep chronically poisoned by copper. **Nutrition Research**, v. 13, n. 8, 891-899, 1993.

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

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

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

SEYMOUR, C. A. **Copper in animals and man**. CRC Press, 1987. v. II, p.79-106.

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

SILVA, L. C. 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, 11., 1996, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 1996. p.108-109.

SMITH, R. D. **Veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. 236 p.

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

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

SOLI, N. E. Chronic copper poisoning in sheep - a review of literature. **Nordisk Veterinær Medicin**, v. 32, n. 2, p. 75-89, 1980.

SOLI, N. E.; FROSLIE, A. Chronic copper poisoning in sheep. I. The relationship of methaemoglobinemia to Heinz body formation and haemolysis during the terminal crisis. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 40, n. 3, p. 169-177, 1977.

SOLI, N. E.; NAFSTAD, I. The mobilization of copper in sheep by chelating agents. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 19, n. 8, p. 422-429, 1978.

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

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

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

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

SUTTLE, N. F.; ABRAHAMS, P.; THORNTON, I. The role of a soil x dietary sulphur interaction in the impairment of copper absorption by ingested soil in sheep. **Journal Agricultural Science**, v. 103, n. 2, p. 81-86, 1984.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. **Klinische Wochenschrift**, v.43, p.174, 1965.

TODD, J. R.; GRACEY, J. F.; THOMPSON, R. H. Studies on chronic copper poisoning: I toxicity of copper sulphate and copper acetate in sheep. **British Veterinary Journal**, v. 118, n. 12, p. 482-491 ,1962.

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

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

WOOLLIAMS, J. A.; SUTTLE, N. F.; WIENER, G.; FIELD, A. C.; WOOLLIAMS, C. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of different copper content. **Journal of Agricultural Science**, v. 100, n. 7, p. 441-449, 1983.

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