

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INTOXICAÇÃO CÚPRICA EXPERIMENTAL EM OVINOS:
ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.**

Wanderson Adriano Biscola Pereira

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SP - BRASIL

Dezembro - 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

P436i Pereira, Wanderson Adriano Biscola
Intoxicação cúprica experimental em ovinos: aspectos clínicos e laboratoriais/ Wanderson Adriano Biscola Pereira. – – Jaboticabal, 2008
xvii, 59 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Mário Roberto Hatayde
Banca examinadora: Mário Roberto Hatayde, Pierre Castro Soares, José Jurandir Fagliari, Humberto Eustáquio Coelho, Antônio Carlos Alessi.
Bibliografia

1. Ovinos - intoxicação. 2. Ovinos - cobre. 3. Ovinos - hemácias. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.3:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INTOXICAÇÃO CÚPRICA EXPERIMENTAL EM OVINOS:
ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.**

Wanderson Adriano Biscola Pereira

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SP - BRASIL

Dezembro – 2008

Trabalho realizado com auxílio financeiro
concedido pela Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) – Processo 04/06513-0.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

WANDERSON ADRIANO BISCOLA PEREIRA – casado, nascido na cidade de Jaboticabal, São Paulo, em 21 de dezembro de 1980. Médico Veterinário formado pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – FAMEV/UFU, Uberlândia –MG, em 23 de julho de 2004. Durante o curso graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq durante 3 anos consecutivos e realizou vários estágios em áreas afins, realizando seu estágio de conclusão de curso no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Marques. Durante este período conheceu o Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde, responsável pela disciplina “Clínica das intoxicações e Plantas Tóxicas”, o qual possibilitou seu ingresso no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal – SP em 2004. Em 2006 iniciou o curso de Doutorado nesta mesma área de concentração e mesma instituição. No período de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008 atuou como docente do Curso de Medicina Veterinária do centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto – SP, ministrando as disciplinas de Clínica das Intoxicações e Plantas Tóxicas, Semiologia Veterinária e Clínica Médica de Grandes Animais. Atualmente realiza atividades de ensino, pesquisa e extensão do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba – MG.

***"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."***

Bertolt Brecht

DEDICATÓRIA

Aos meus avós,

Júlio José Biscola e Júlia Vieira Biscola

Exemplos de força e fé a serem seguidos!

Aos meus pais,

Wanderley Aparecido Pereira e Maria Sônia Biscola Pereira

A base de minhas conquistas!

A minha amada esposa,

Joice Lara Maia Faria

Minha razão de vida!

Pelo carinho, amor, exemplo, incentivo compreensão....

Se hoje venci mais uma etapa é porque vocês acreditaram em meu sucesso e caminharam a meu lado.

MUITO OBRIGADO!!!

AGRADECIMENTOS

Um trabalho é fruto do esforço e das idéias das pessoas que o fazem. Entretanto não se têm idéias e não se esforça grandiosamente se o ambiente em que se vive não é tranqüilo, e a tranqüilidade do ambiente é promovida pelas pessoas que o cercam. Assim, gostaria primeiramente de agradecer a Deus, por estar presente em todos os momentos, e em todas as horas, pois nos momentos mais difíceis é sempre a Ele que recorreremos. Agradeço a meus pais, Wanderley e Sônia, por serem meus pais, e isto já diz tudo. Agradeço meu irmão Gustavo, a meus avós Júlio e Júlia por terem participado de todos os momentos da minha luta, sempre me dando forças e me incentivando. Agradeço, também a todos os meus tios, em especial ao “Zê”, Marilda, Carlinhos, Maurícia e Ricardo, por tudo. Não poderia deixar de esquecer meu primo Junior, com o qual pude sempre contar em todos os momentos que necessitei.

Não poderia deixar de agradecer a uma pessoa especial, meu amor Joice, que faz parte de minha vida e me acompanha em todos os momentos, me ajudando, me tranqüilizando, me dando muito amor e carinho e me fazendo feliz. Obrigado por ser quem você é e obrigado por tudo!!!

Nestes anos, tive a oportunidade de trabalhar com pessoas maravilhosas, as quais tenho muita gratidão, em especial, agradeço ao Professor Mário Roberto Hatayde, que repartiu comigo seus conhecimentos com dedicação e amizade; que além de professor e orientador é um grande amigo e um segundo pai, com quem sempre pude contar. Seus ensinamentos e suas palavras sempre foram muito válidos e muito enriquecedores, e sempre os guardarei relatados ou na lembrança.

Agradeço também a todos os funcionários do Hospital Veterinário que considero como grandes amigos e com quem pude contar em todos os momentos. Em especial a Carlos Januário, Laerte, José Carlos Buzolli, Beto, Bertanha, Edson, Arildo e Zezão. Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa de Apoio ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Renata, Cláudia e Paulo que sempre me ajudaram e contribuíram para realização deste trabalho.

Aos Professores Antonio Carlos Alessi, Luiz Carlos Marques e José Jurandir Fagliari que sempre estiveram de braços abertos e jamais mediram esforços para

contribuir com meu aprendizado durante todos os momentos em que necessitei, e por terem contribuído grandiosamente para a melhoria deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Pierre Castro Soares, que em vários momentos de dificuldade e incerteza durante a realização deste trabalho, me ajudou a seguir em frente e me orientou.

Não posso deixar de agradecer meu amigo Guilherme Sellera Godoy, que me auxiliou na realização dos exames histopatológicos e contribuiu para realização deste trabalho, assim como ao amigo Gabriel de Mello do departamento de tecnologia que sempre contribuiu para o desenvolvimento de trabalhos, seja através de técnicas ou idéias.

Gostaria de agradecer os professores e amigos Pedro Carlos Lucas de Oliveira, Renato Linhares Sampaio, Paulo Henrique Zaiden Paro, Geison Morel Nogueira, Humberto Eustáquio Coelho e Moacir Santos Lacerda por fazerem parte de meu ambiente de trabalho, por contribuírem para meu aprendizado e confiarem em minhas atitudes me fortalecendo tanto como pessoa quanto profissional.

Agradeço também o professor Eustáquio Bittar, Coordenador do Curso de Medicina Veterinária da UNIUBE, por ter me dado uma oportunidade e ter confiado em meu potencial.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos verdadeiros, e esses sabem quem são, e a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram nesse trabalho, ou em minha vida, mas por algum motivo tenha esquecido de citá-los.

A todos vocês, muito obrigado. Saibam que sempre poderão contar comigo em todos os momentos que precisarem.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	01
2. JUSTIFICATIVA	06
3. OBJETIVOS	07
4. MATERIAL E MÉTODOS	08
4.1. ANIMAIS E INSTALAÇÕES	08
4.2. ALIMENTOS E ALIMENTAÇÃO	08
4.3. DELINEAMENTO E MODELO DE INDUÇÃO DA INTOXICAÇÃO CÚPRICA CUMULATIVA	08
4.4. EXAME FÍSICO	09
4.5. COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO	09
4.5.1. Amostras de sangue	09
4.5.2. Fragmentos de fígado	10
4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS	10
4.6.1. Amostras de sangue	10
4.6.1.1. Hemograma completo	10
4.6.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	11
4.6.1.3. Bioquímica Sérica	11
4.6.1.3.1. Proteinograma Sérico.....	12

4.6.1.3.2. Determinação dos teores séricos de Cobre	12
4.6.2. Exame histológico	13
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
5. RESULTADOS	14
5.1. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA.....	14
5.2. HEMOGRAMA	16
5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	21
5.4. LEUCOMETRIA.....	25
5.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO SANGUÍNEO.....	28
5.6. PROTEINOGRAMA SÉRICO	32
5.7. TEORES SÉRICOS DE COBRE	37
5.8. ACHADOS DE NECROPSIA	38
5.8.1. Achados Macroscópicos	38
5.8.2. Achados histopatológicos	44
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9. APÊNDICE 1	59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dose total de sulfato de cobre penta-hidratado fornecida (g) aos ovinos do grupo G-2 e período total de intoxicação.....14
- Tabela 2** – Valores médios e desvios padrão da contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....17
- Tabela 3** – Valores médios e desvios padrão do hematócrito (%) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....18
- Tabela 4** – Valores médios e desvios padrão de hemoglobina (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....19
- Tabela 5** – Valores médios e desvios padrão do volume corpuscular médio (fL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....20
- Tabela 6** – Valores médios e desvios padrão da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....21
- Tabela 7** – Valores médios e desvios padrão de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....26
- Tabela 8** – Valores médios e desvios padrão de neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....27
- Tabela 9** – Valores médios e desvios padrão de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....28

- Tabela 10** – Atividades séricas médias e desvios padrão da enzima aspartato aminotransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....29
- Tabela 11** – Atividades séricas médias e desvios padrão da enzima gama-glutamilttransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....30
- Tabela 12** – Atividades séricas médias e desvios padrão da enzima creatina cinase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....31
- Tabela 13** – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de proteínas, obtidas por eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....33
- Tabela 14** – Variação (%) das concentrações séricas de proteínas comparada com as concentrações basais em ovinos submetidos experimentalmente à intoxicação cúprica acumulativa (G-2).....37
- Tabela 15** – Valores médios e desvios padrão dos teores séricos de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....37
- Tabela 16** – Composição bromatológica do feno de capim Tifton e ração concentrada oferecidos aos ovinos, durante o experimento.....59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Apatia em ovino com intoxicação crônica experimental por cobre, no dia da crise hemolítica.....15
- Figura 2** – Fezes enegrecidas e moles de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre, 48 horas após a crise hemolítica.....15
- Figura 3** – Prostração e sialorréia em ovino com intoxicação crônica experimental por cobre, 48 horas após a crise hemolítica.....16
- Figura 4** – Representação gráfica dos valores médios de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6)17
- Figura 5** – Representação gráfica dos valores médios do hematócrito (%) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6)18
- Figura 6** – Representação gráfica dos valores médios de hemoglobina (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6)19
- Figura 7** – Representação gráfica dos valores médios do volume corpuscular médio (fL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....20
- Figura 8** – Representação gráfica dos valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....21
- Figura 9** – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase pré - hemolítica (M0 – M3) da intoxicação cúprica acumulativa. A, B, C e D - Aspecto normal das hemácias (discócitos) de ovinos nos momentos M0 e M1 da intoxicação cúprica acumulativa em diferentes aumentos.....22

Figura 10 – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase pré-hemolítica (M0 – M3) da intoxicação cúprica acumulativa. Principais alterações morfológicas vistas nas hemácias entre os momentos M2 e M3 da intoxicação cúprica acumulativa: A, B – Macrócito; C – Quinizócito; D – Dacriócito.....23

Figura 11 – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase hemolítica (M4 – M6) da intoxicação cúprica acumulativa. M4: A - Perda da homogeneidade morfológica das hemácias que apresentam-se em diferentes formas: macrócitos (↵), acantócitos (↶), e codócitos (↷); B - Presença de estomatócitos (→). M5: C - Presença de acantócitos (↷) e corpúsculo de Heinz (→). M6: D - Alterações marcantes no padrão celular e presença de acantócitos (↑) e corpúsculo de Heinz (→).24

Figura 12 – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase hemolítica (M4 – M6) da intoxicação cúprica acumulativa. M6: A - Alterações marcantes no padrão celular; B – queratócito; C - Presença de cristais de hemoglobina depositados na membrana de um eritrócito; D - Corpúsculo de Heinz.....25

Figura 13 – Representação gráfica dos valores médios de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....26

Figura 14 – Representação gráfica dos valores médios de neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....27

Figura 15 – Representação gráfica dos valores médios de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6)a.....28

Figura 16 – Representação gráfica das atividades séricas médias da enzima aspartato aminotransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....29

Figura 17 – Representação gráfica dos valores médios dos teores séricos de gama glutamiltransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....30

Figura 18 – Representação gráfica das atividades séricas médias de creatina cinase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por

cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....32

Figura 19 - Representação gráfica da concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....35

Figura 20 - Representação gráfica da concentração sérica de transferrina (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....35

Figura 21 - Representação gráfica da concentração sérica da proteína de 35.000 Da (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....36

Figura 22 - Representação gráfica da concentração sérica de IgG de cadeia leve (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....36

Figura 23 – Representação gráfica dos valores médios dos teores séricos de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).....38

Figura 24 – Mucosa ocular icterica de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....39

Figura 25 – Líquido espumoso na traquéia de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....39

Figura 26 – Tecidos subcutâneo, adiposo e muscular ictericos de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....40

Figura 27 – Grandes vasos da base cardíaca ictericos em ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....40

Figura 28 – Fígado aumentado de volume, com bordas arredondadas, coloração amarelada e vesícula biliar repleta de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....41

- Figura 29** – Superfície de corte de fígado (Figura 28) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....41
- Figura 30** - Baço aumentado de volume e com bordas arredondadas de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....42
- Figura 31** – Hiperemia na superfície de corte de baço (Figura 30) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....42
- Figura 32** - Rins aumentados de volume e com pontos enegrecidos no parênquima renal de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....43
- Figura 33** - Rim aumentado de volume com região cortical enegrecida e pelve renal amarelada de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.....43
- Figura 34** – Fotomicrografia de fígado, apresentando desorganização de cordões de hepatócitos de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 10x. HE.....44
- Figura 35** - Fotomicrografia de vesícula biliar exibindo edema e infiltrado inflamatório linfocitário (setas) na submucosa da vesícula biliar de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 10x. HE.....45
- Figura 36** - Fotomicrografia de fígado apresentando infiltrado inflamatório linfocítico periportal (setas) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 20x. HE.....45
- Figura 37** - Fotomicrografia de fígado exibindo infiltrado periportal (seta amarela) e acentuada colestase extra-hepática (seta fina) e intra-hepática (seta larga) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 4x. HE.....46
- Figura 38** - Fotomicrografia de fígado apresentando colestase extra-hepática (seta fina) e intra-hepática (seta larga) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.10x. HE.....46
- Figura 39** - Fotomicrografia de fígado exibindo desorganização de cordões de hepatócitos, megalocitose (seta fina) e áreas de necrose de hepatócitos (seta larga) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 40x. HE.....47

INTOXICAÇÃO CÚPRICA EXPERIMENTAL EM OVINOS: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.

RESUMO – Os ovinos possuem tendência a acumular cobre no organismo. Quando a capacidade de armazenagem hepática se esgota, o cobre é liberado para o sangue causando sinais clínicos da intoxicação. Para verificar as alterações presentes na bioquímica sérica, hemograma, morfologia eritrocitária, perfil de proteínas séricas e concentração de cobre sérico, durante as fases pré-hemolítica e hemolítica da intoxicação crônica por cobre, foram utilizados seis ovinos distribuídos aleatoriamente em dois grupos: G-1 (controle) e G-2 (experimentalmente intoxicados). Os três ovinos do G-2, além da dieta diária receberam 3mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{Kg PV}$, seguido de aumentos semanais de 3mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{Kg PV}$ na dose diária. Diariamente realizou-se o exame físico dos ovinos de ambos os grupos. Para obtenção do hemograma e dos componentes bioquímicos sanguíneos foram colhidas amostras com antes (M0 – M3), durante (M4) e após (M5 e M6) a crise hemolítica. Foram realizadas necropsias dos ovinos do G-2 que morreram e dos ovinos do G-1, submetidos à eutanásia ao fim do experimento e fragmentos do fígado desses animais foram colhidos para avaliação histopatológica. Durante a fase pré-hemolítica evidenciaram-se poucas alterações, entretanto durante a crise hemolítica os ovinos do G-2 apresentaram anemia macrocítica normocrômica, predomínio de hemácias com morfologia de acantócitos, leucocitose por neutrofilia, elevação nas atividades séricas de AST, GGT, CK e hipercupremia; Os teores séricos de ceruloplasmina apresentaram-se diminuídos e os teores de transferrina, proteína de 35.000 Da e IgG de cadeia leve apresentaram-se aumentados no M2; os animais intoxicados apresentaram anorexia, membranas mucosas ictéricas, fezes amolecidas de coloração verde-escura e hemoglobinúria. À necropsia observou-se mucosas, fígado e demais tecidos de coloração amarelada, rins enegrecidos e urina acastanhada e na histopatologia hepática a megalocitose de hepatócitos, a desorganização de cordões de hepatócitos, colestase e infiltrado inflamatório linfocítico peri-portal foram observados.

Palavras-chave: cobre, ovinos, intoxicação, hemácias, microscopia eletrônica de varredura, ceruloplasmina.

EXPERIMENTAL CUPRIC POISONING IN SHEEP: CLINICAL AND LABORATORIAL ASPECTS.

SUMMARY – Sheep have a tendency to accumulate copper in the body. When the liver storage capacity is exhausted, copper is released into the blood causing clinical signs of poisoning. Six lambs fed a basal diet were randomly assigned to 2 groups: G - 1 (control) and G-2 (experimentally intoxicated). The three sheep of the G-2, were drenched initially with 3 mg of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / kg bw daily for a week. Every week an additional dose of 3mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / kg bw was included in the drench until signs of copper poisoning appeared. Every day, the lambs were monitored clinically. before (M0 – M3), during (M4) and after (M5 and M6) to hemolytic crisis, sample blood were obtained for biochemical analysis of AST, GGT and CK, blood count, serum proteins and serum concentration of copper. The lambs of the G-2 that died in the course of the experiment and the lambs of the G-1 euthanized at the end, were necropsied and fragments of liver, were obtained for histopathology. During the pre-hemolytic phase few changes were evidenced, however through the hemolytic crisis the sheep of the G-2 were presented macrocytic normochromic anemia, a predominance of erythrocytes with acantocytes morphology, leukocytosis by neutrophilia, elevation in serum activities of AST, GGT and CK and hypercupremia; Serum levels of ceruloplasmin was presented reduced and the levels of transferrin, 35,000 of protein and IgG- light chain were increased in M2; the lambs of G-2 exhibited anorexia, jaundiced mucous membranes, soften and dark-green feces and hemoglobinuria. Gross examination of poisoned lambs revealed mucous membranes, liver and other tissues yellowish, dark kidneys and brownish urine. Histopathology of the liver showed megalocytose of hepatocytes, the disorganization of strands of hepatocytes, cholestasis and inflammatory infiltrate lymphocytic peri-portal.

Keywords: copper, sheep, poisoning, erythrocytes, scanning electron microscopy, caeruloplasmin.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Os tecidos animais, além das moléculas orgânicas também possuem moléculas inorgânicas que ocupam cerca de 2 a 5% do peso total do animal. Entre estes elementos, os minerais possuem funções essenciais tanto na estrutura de tecidos e biomoléculas, como no próprio metabolismo, participando como co-fatores enzimáticos, ativadores hormonais, e como responsáveis pela pressão osmótica e pelo equilíbrio ácido-base. (GONZÁLEZ et al., 2000).

Dentre os minerais, o cobre (Cu) é um elemento essencial para sobrevivência dos animais por atuar como componente de muitas metaloproteínas como a ceruloplasmina, a superóxido dismutase (CuZnSOD) e a citocromo oxidase (McDOWELL, 1992; UNDERWOOD & SUTTLE, 2001; BRADBERRY, 2007; ZHANG, et al., 2008).

Após a ingestão, o cobre é absorvido principalmente no intestino delgado e seu transporte através da mucosa intestinal é controlado por uma metaloproteína chamada metalotioneína. Quanto maior a concentração desta, menor a absorção de cobre (ORTOLANI, 2002). Após a passagem pela mucosa intestinal o cobre liga-se à albumina e é transportado via circulação porta-hepática ao fígado para ser incorporado à ceruloplasmina e posteriormente atingir a circulação sistêmica distribuindo-se para todo organismo (BRADBERRY, 2007).

A deficiência e a toxicidade do cobre em ruminantes ocorrem freqüentemente em muitas partes do mundo (MILTIMORE & MASON, 1971). O desenvolvimento da deficiência ou do excesso de cobre depende tanto da concentração deste elemento na dieta como das concentrações dos antagonistas que interferem com a absorção e a subsequente utilização para os processos metabólicos (GOONERATNE et al., 1989).

Entre as espécies de animais, os ovinos são os mais sujeitos a apresentarem tanto quadros de deficiência quanto de intoxicação pelo cobre (ORTOLANI, 1996; GOONERATNE et al., 1989). A deficiência está ligada à menor capacidade de absorção do cobre por algumas raças ovinas, enquanto a intoxicação cúprica deve-se a uma menor capacidade de conjugação entre o cobre e a metalotioneína, diminuindo a

excreção deste elemento no organismo, pela via biliar, e permitindo que o mesmo acumule-se no fígado (SOARES, 2004).

Concentrações de 20 a 110 mg de Cu/ kg de matéria seca (MS) em ovinos são suficientes para causar quadros agudos de intoxicação, enquanto a ingestão de 3,5 mg de Cu/ kg de peso corporal (P.C.), com teores na dieta variando de 20 a 25 ppm é responsável por causar quadros crônicos de intoxicação (RADOSTITS et al., 2002; SMITH, 2006). HUMANN-ZIEHANK & BICKHARDT (2001) utilizando concentração de 3,7 mg de Cu/ kg de P.C. por 84 dias, não verificaram o aparecimento de sinais clínicos de intoxicação. SANSINANEA et al., (1996) induziram intoxicação cúprica em ovinos, com a utilização de 10ml/kg de P.C. de uma solução de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a 2% por cinco dias na semana e verificaram o aparecimento de sinais da intoxicação a partir da 12ª semana, com hemólise durante a 15ª semana. SOARES (2004), obteve sintomas de intoxicação crônica entre 30 e 96 dias com uma dose de 3 mg/ Kg P.C./ dia, crescendo semanalmente 3mg/ Kg P.C. na dose diária.

O acúmulo de cobre pode ocorrer em três circunstâncias: na intoxicação primária causada pela ingestão de quantidades excessivas de Cu; na intoxicação secundária fitógena, na qual, apesar do Cu ser ingerido em quantidades normais, se produz o acúmulo do microelemento em consequência dos baixos níveis de molibdênio; na intoxicação secundária hepatógena, na qual o Cu, ingerido em níveis normais, se acumula no fígado em consequência de lesões hepáticas causadas por plantas que contém alcalóides pirrolizidínicos (RIET-CORREA et al., 1989).

A intoxicação cúprica pode ser dividida em duas formas: intoxicação aguda, decorrente da ingestão abrupta de grandes quantidades de cobre, em um curto espaço de tempo; e intoxicação cúprica acumulativa, onde o acúmulo de cobre hepático é progressivo, podendo durar de meses a anos, até o desencadeamento da fase hemolítica (ORTOLANI et al., 2003).

A intoxicação crônica por cobre pode ser dividida em três fases distintas: a pré-hemolítica, a hemolítica e a pós-hemolítica. Durante a fase pré-hemolítica, ocorre o acúmulo de cobre no fígado, sem aparecimento de sinais clínicos. O cobre se acumula inicialmente nos hepatócitos perivenosos e posteriormente em outras áreas do fígado.

Durante o acúmulo, os hepatócitos aumentam consideravelmente seu número de lisossomos, organela na qual também se acumula o cobre. Atingindo o limiar máximo de acúmulo, ocorre morte celular difusa, promovendo a liberação expressiva de cobre e de lisozimas. O cobre livre desloca-se para a corrente circulatória, onde após entrar nas hemácias oxida a glutathione, substância responsável pela integridade destas células, culminando com a hemólise, cerca de 24 horas após (ORTOLANI, 1996).

Durante a crise hemolítica observa-se neutrofilia e anemia. Há aumento dos níveis sanguíneos de cobre e dos níveis séricos de sorbitol desidrogenase (SDH), arginase, aspartato amino transferase (AST), glutamato desidrogenase (GD), ceruloplasmina, uréia e bilirrubina (MÉNDEZ, 2001). Uma crise hemolítica aguda com hemoglobinemia e hemoglobinúria são achados importantes. Corpúsculos de Heinz podem ser encontrados nas hemácias coradas em esfregaços sangüíneos (INABA, 2000).

A morte pode advir das graves lesões hepáticas e renais e do grau de anemia. Raramente os animais sobrevivem ao quadro clínico característico de uma crise hemolítica (KOWALCZYK et al. 1964; MÉNDEZ, 2001). Aqueles que conseguem sobreviver se recuperam lentamente, no decorrer de duas a três semanas, durante a fase pós-hemolítica (ORTOLANI, 1996).

O mecanismo da hemólise promovida pela intoxicação cúprica não está bem elucidado. Segundo JAIN (1993) e INABA (2000) os efeitos citotóxicos ocorrem devido à interação do cobre com uma série de compostos presentes nas membranas dos eritrócitos gerando neste processo a formação de agentes oxidantes, além da inibição de enzimas importantes para os glóbulos vermelhos como a glutathione redutase e a piruvato quinase, levando ao aumento na formação de metahemoglobina. A ação direta dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio no interior dos eritrócitos culmina com a formação dos corpúsculos de Heinz.

O quadro clínico é variável. Na forma aguda, destaca-se a dor abdominal, sede intensa, diarreia e presença de fezes hipercólicas. Na forma acumulativa, chamam atenção a hemoglobinúria, a icterícia, a taquipnéia e a presença de vasos episclerais

com coloração achocolatada. Em ambas as formas clínicas a morte pode sobrevir ao redor de 30 a 40 horas (ORTOLANI, 1996; MÉNDEZ, 2001).

O diagnóstico pode ser obtido através do histórico, dos sinais clínicos, de provas laboratoriais e de achados de necropsia. Valores superiores a 800 ppm de Cu/ Kg MS no fígado e 100 ppm de Cu/ Kg MS no rim são considerados conclusivos (RIET-CORREA et al., 1989; ORTOLANI, 1996; LEMOS et al., 1997; MÉNDEZ, 2001). A análise de cobre na dieta também é recomendada. A dosagem de AST e GGT, juntamente com a concentração sérica de cobre são os principais testes bioquímicos para o diagnóstico e acompanhamento da intoxicação cúprica (AUZA, et al., 1999), além da dosagem de fosfatase alcalina (ALP) (TURK & CASTEEL, 1997), uma vez que as enzimas que indicam dano hepático podem estar elevadas 4 a 6 semanas antes da crise hemolítica (MÉNDEZ, 2001). A AST é a primeira enzima proposta para identificação de uma intoxicação crônica por cobre. O aumento nos níveis de GGT indica lesões muito antigas nos ductos biliares (UNDERWOOD & SUTTLE, 2001). Segundo TENNANT (1997), a determinação da função hepática deve ser realizada através da dosagem das enzimas AST, GGT e ALP, que indicam a presença de lesões hepáticas agudas ou crônicas.

A necropsia dos animais revela lesões macroscópicas caracterizadas por icterícia generalizada, líquido seroso nas cavidades peritoneal, torácica e pericárdica, fígado friável de cor amarelo ou alaranjado, rins de coloração marrom escuro, edemaciados e urina de cor vermelho escuro. No fígado, os hepatócitos estão aumentados de tamanho, pleomórficos e com vacúolos de diversos tamanhos em seu citoplasma. Alguns núcleos apresentam-se na periferia dos hepatócitos, em outros a cromatina está marginalizada, podendo observar-se vacúolos intranucleares. Observa-se presença de bile nos canalículos biliares. No espaço porta há proliferação de células dos ductos biliares, proliferação de tecido fibroso e infiltração de células inflamatórias. As células de Kupffer se apresentam com pigmento marrom amarelado. No rim os túbulos apresentam cilindros hialinos ou granulares avermelhados. Pode-se observar fibroplasia intersticial. As lesões renais são causadas pelo acúmulo de cobre nas células epiteliais, associado à hipercupremia e à hemoglobinúria que ocorrem durante a

crise hemolítica (BOSTWICK, 1982; RIET-CORREA et al., 1989; LEMOS, et al., 1997; MÉNDEZ, 2001).

A terapia consiste na imediata remoção da dieta rica em cobre. Recomenda-se a administração de 3,4 mg de tetratiomolibdato de amônio/ kg de peso corporal. Os animais tratados apresentam melhora clínica rápida, diminuindo sensivelmente os teores séricos de cobre e a atividade das enzimas indicadoras da função hepática, assim como interrompendo a hemólise (HUMPHRIES et al., 1988; ORTOLANI, 1996; AUZA et al., 1999; SOARES, 2004).

O controle desta intoxicação deve ser realizado, principalmente quando são utilizados ovinos de raças mais susceptíveis, como por exemplo Sulffolk e Texel, e em animais estabulados, que recebam concentrados por longos períodos. Nestes casos, recomenda-se que os níveis de cobre dietético não ultrapassem 10 ppm, a relação forragem/ concentrado não diminua de 60: 40 e os suplementos minerais não contenham mais que 800 ppm de cobre (ORTOLANI, 1996).

2. JUSTIFICATIVA

A intoxicação cúprica é um importante fato a ser considerado em uma criação de ovinos, uma vez que as exigências produtivas mediante a seleção genética e os sistemas de manejo intensivo têm aumentado o risco de desequilíbrios nutricionais e de doenças metabólicas no rebanho (GONZÁLEZ et al., 2000).

Os ovinos apresentam tendência de acumular o cobre no organismo, portanto, o uso de concentrados na alimentação destes animais pode acarretar um sério aumento nos teores hepáticos de cobre fazendo com que em situações de estresse, ou quando a capacidade de armazenagem hepática se esgote, o cobre seja liberado rapidamente para o sangue causando intoxicação (GONZÁLEZ et al., 2000).

Tal enfermidade assume grande importância, pois a grande maioria dos animais acometidos é de alto potencial genético e valor econômico, e a letalidade dos animais não tratados é superior a 80% (ORTOLANI, 1996).

3. OBJETIVOS

- Avaliar a função hepática, mediante a determinação da atividade sérica das enzimas AST, GGT e CK nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica dos animais intoxicados;
- Obter o hemograma dos animais experimentalmente intoxicados nas fases da intoxicação e do grupo controle, visualizando a morfologia eritrocitária em microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Detectar, com o auxílio da microscopia óptica, alterações no parênquima hepático dos ovinos intoxicados após a fase hemolítica da intoxicação;
- Identificar o perfil de proteínas séricas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos ovinos, nas fases de intoxicação e do grupo controle;
- Determinar a concentração sérica de cobre no soro sangüíneo dos animais, nas fases de intoxicação e do grupo controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e Instalações

Foram utilizados seis ovinos adultos castrados hígidos, sem raça definida, alojados individualmente em gaiolas metabólicas, equipadas com comedouros e bebedouros plásticos, situados em área coberta, junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/ UNESP/ *Campus* de Jaboticabal (FCAV/ UNESP). Antes do início do experimento os ovinos que estavam em uma pastagem de capim *Brachiaria decumbens* foram submetidos a um período de adaptação de quinze dias. Durante esse período, além do fornecimento da dieta realizou-se a desverminação desses animais com albendazole (15 mg/kg de peso corporal).

4.2. Alimentos e alimentação

Os animais receberam diariamente uma dieta composta de 700g de matéria seca de feno de tifton 85 (*Cynodon* spp), água à vontade e 200g de concentrado¹. Os alimentos foram submetidos a análise bromatológica antes do início do experimento, verificando-se principalmente as concentrações de cobre, molibdênio e enxofre (Apêndice 1).

4.3. Delineamento e modelo de indução da intoxicação cúprica acumulativa

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (G-1 e G-2) de três animais, ou seja:

- G-1: três ovinos que receberam apenas a dieta mencionada no item 4.2 (controle);
- G-2: três ovinos que receberam a dieta de G-1 + 3mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}^2$ / Kg PV/ dia, em solução aquosa 5%, por via oral, com auxílio de uma seringa, na primeira semana, seguido de aumentos semanais de 3mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / Kg PV na dose

¹ Nutriovinos - PURINA – Brasil.

² Sulfato de cobre pentahidratado – VETEC.

diária, seguindo as recomendações de Soares (2004) até o aparecimento de hemoglobinúria macroscópica.

Para a obtenção do hemograma e dos componentes bioquímicos do soro sanguíneo foram colhidas amostras de sangue nos momentos:

M0 – Momento basal;

M1 – \pm 30 dias anteriores á crise hemolítica;

M2 – \pm 15 dias anteriores à crise hemolítica;

M3 – \pm 7 dias anteriores à crise hemolítica;

M4 – Dia da crise hemolítica;

M5 – 24 horas após a crise hemolítica;

M6 – 48 horas após crise hemolítica.

4.4. Exame físico

Diariamente foi efetuado o exame físico dos ovinos do G-1 e do G-2. O exame iniciava-se com a inspeção a distância dos animais, avaliando-se o comportamento, atitude e postura dos ovinos comparando-se os animais intoxicados com os do grupo controle. Os ovinos que apresentaram algum tipo de alteração à inspeção foram submetidos a exame físico mais detalhado com avaliação da temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória, coloração de mucosas e motilidade rumenal.

4.5. Colheita de material biológico

4.5.1. Amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas em 2 tubos esterilizados e siliconizados³, devidamente identificados, sendo um, com capacidade para 4,5 mL, contendo em seu interior o ácido etileno diamino tetracético (EDTA) como anticoagulante e outro, sem anticoagulante, com capacidade para 10 mL para obtenção de sangue total e soro, respectivamente.

³Vacutainer®

As amostras contendo anticoagulante foram prontamente refrigeradas, conduzidas ao laboratório e utilizadas para realização do hemograma e esfregaço sangüíneo, e microscopia eletrônica de varredura. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas por durante 10 minutos a 3000 rpm e as alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos com capacidade de 2.000 μL ⁴ e armazenadas à temperatura de - 20°C, sendo utilizadas para realização dos testes bioquímicos e dosagem de cobre sérico.

4.5.2. Fragmentos de Fígado

Os fragmentos de fígado foram obtidos durante a necropsia, logo após a morte dos animais experimentalmente intoxicados e após a eutanásia dos animais do grupo controle. Após a coleta, os espécimes de fígado foram acondicionados em frascos contendo formol a 10% neutro e tamponado com fosfatos, para realização dos exames histopatológicos.

4.6. Métodos analíticos

4.6.1. Amostras de sangue (soro e sangue total).

4.6.1.1. Hemograma Completo

A contagem total de leucócitos e hemácias foi realizada manualmente por meio da diluição das amostras para contagem na câmara de Neubauer. Para contagem de hemácias realizou-se uma diluição de 1:200 em solução de NaCl 0,9% enquanto a contagem de leucócitos foi feita em uma diluição de 1:50 em solução lisante de hemácias.

Os valores de hemoglobina foram determinados por método colorimétrico, utilizando-se um conjunto de reagentes comerciais⁵ com leitura sendo realizada no analisador bioquímico semi-automático LABQUEST⁶ em comprimento de onda adequado ao parâmetro analisado.

⁴ Eppendorf®

⁵ Labtest, Belo Horizonte – MG

⁶ Labquest, Labtest, Belo Horizonte – MG

O volume globular foi obtido em tubos capilares de 75 mm, onde as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e, posteriormente, lidas em uma tabela de microhematócrito.

Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados com emprego de equações descritas por JAIN (1993).

As contagens diferenciais de leucócitos foram obtidas em esfregaços sangüíneos, corados pelo Rosenfeld, em microscópio óptico comum (THRALL, 2007).

4.6.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a avaliação da morfologia eritrocitária as amostras de sangue contendo EDTA foram preparadas para realização de MEV. Para isso, 100 µl de sangue foram colocados em glutaraldeído 1,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Após a fixação por uma hora à temperatura de 4°C, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato (0,1M e pH 7,4), desidratadas em uma série ascendente de acetona (25 a 100%), permanecendo 15 minutos em cada solução e com duas passagens na acetona absoluta. Posteriormente, as células foram novamente suspensas com 100 µl de acetona absoluta; duas gotas desta suspensão foram colocadas sobre lamínula de vidro e seca rapidamente por evaporação. As lamínulas foram cobertas com fina camada de ouro (15nm)⁷ e examinadas no microscópio eletrônico de varredura⁸ em uma angulação de 33 a 45 graus negativos e voltagem de 15 kV, sendo os melhores campos fotografados.

4.6.1.3. Bioquímica sérica

A avaliação da função hepática foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas aspartato aminotransferase - AST (metodo UV-IFCC), gama glutamil transferase – GGT (método de Szasz modificado) utilizando-se conjuntos de reagentes comerciais LABTEST com as leituras realizadas em analisador bioquímico

⁷ Metalizador DESK-II – DENTON VACCUM

⁸ JSM5410 - JEOL

semi-automático LABQUEST em comprimentos de ondas adequados aos parâmetros analisados. Para determinação da atividade da enzima creatina cinase foi realizada técnica de bioquímica seca com leitura no analisador bioquímico Reflotron⁹

4.6.1.3.1 Proteinograma sérico.

Os teores de proteína total (método do Biureto) foram obtidos com utilização de conjuntos de reagentes comerciais⁴; as leituras foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático LABQUEST⁵ em comprimento de onda adequado. Para o fracionamento das proteínas, utilizou-se eletroforese em gel de acrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por LAEMMLI (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 min em solução de azul de coomassie e, em seguida, colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado¹⁰. Como referência, utilizou-se solução marcadora¹¹ com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 dáltons (Da), além de proteínas purificadas⁷ - albumina, IgG, haptoglobina, α_1 -antitripsina e transferrina.

4.6.1.3.2 Determinação dos teores séricos de Cobre

O teor sérico de cobre foi determinado diluindo-se vinte vezes a amostra de soro em HCl 0,1N (200 μ L de soro e 1.800 μ L de HCl) e realizando-se a leitura em espectrofotometria de absorção atômica (KARGIN et al., 2004).

4.6.2 Exame histológico

As amostras de fígados coletadas durante a necropsia foram acondicionadas em formol a 10% tamponado com fosfatos, durante 24 horas. Após a fixação, os

⁹ Reflotron, Roche Sitemas de Diagnósticos

¹⁰ Shimadzu CS 9301 - Tokio, Japan.

¹¹ Sigma - Saint Louis, EUA.

fragmentos foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina, cortados em micrótomo numa espessura de 3,0 μ m e corados com hematoxilina e eosina (LUNA, 1968).

4.7 Análise estatística

Para avaliação das variáveis estudadas realizou-se análise de variância de medidas repetidas, com um fator tratamento com dois níveis entre os animais (G-1 e G-2) e um fator tempo com 7 níveis (M0, M1, M2, M3, M4, M5 e M6) dentro dos grupos.

Verificada significância dos fatores principais e da interação, aplicou-se o teste de Tukey ($P < 0,05$). Para duas amostras independentes foi utilizado um teste “t de Student” com 5% de significância (VIEIRA, 1998).

5 RESULTADOS

5.1. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

Com base nos dados obtidos pode-se verificar que o modelo de indução da intoxicação utilizado apresentou 100% de eficiência, uma vez que todos os animais experimentalmente intoxicados (G-2) apresentaram sinais clínicos da intoxicação e como não foram tratados morreram. A dose total de cobre fornecida aos ovinos até o desencadear da crise hemolítica encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Dose total de sulfato de cobre penta-hidratado fornecida (g) aos ovinos do grupo G-2 e período total de intoxicação.

Animais	Período total de intoxicação. (semanas)	Dose total de cobre fornecida aos animais (g)
2-A	31	147,44
2-B	26	115,18
2-C	33	131,63

Os primeiros sinais clínicos foram evidenciados 24 horas antes da crise hemolítica. Neste momento os ovinos apresentaram um quadro de inapetência principalmente quando se oferecia ração concentrada aos animais, e apatia caracterizada pelo decúbito esternal e por não reagirem a estímulos ambientais, como a colocação de comida nos comedouros. Além disso, os animais apresentaram as mucosas levemente pálidas e não apresentaram hemoglobinúria macroscópica. No momento da crise hemolítica (M4), pode-se verificar hemoglobinúria macroscópica, marcada pela coloração acastanhada da urina e mucosas oculares amareladas e/ ou achocolatadas. A apatia era acentuada (Figura 1) e os ovinos apresentavam-se anoréxicos. Ao exame físico evidenciou-se taquicardia, taquipnéia, hipotermia leve (37,8°C), tempo de preenchimento capilar (TPC) de 2-3 segundos, atonia rumenal, oligúria ou anúria. Nos momentos M5 e M6 os ovinos apresentaram prostração, desidratação, taquicardia, taquipnéia, TPC maior que 3 segundos, fezes enegrecidas e moles (Figura 2), sialorréia (Figura 3), tremores musculares, bruxismo, hipotermia severa (35,6°C), atonia rumenal, anúria ou oligúria, ataxia e halitose urêmica. A auscultação pulmonar, neste momento, revelou a presença de crepitações. A sobrevivência dos animais após a crise hemolítica foi de 2 a 5 dias.



Figura 1 – Apatia em ovino com intoxicação crônica experimental por cobre, no dia da crise hemolítica.



Figura 2 – Fezes enegrecidas e moles de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre, 48 horas após a crise hemolítica.



Figura 3 – Prostração e sialorréia em ovino com intoxicação crônica experimental por cobre, 48 horas após a crise hemolítica.

5.2. HEMOGRAMA

O hemograma assim como o leucograma revelou-se com variação dentro dos limites estabelecidos para a espécie durante todo o período pré-hemolítico (M0 – M3). Alterações consideráveis apenas foram encontradas após o desencadeamento da crise hemolítica. Na Tabela 2 e Figura 4 está representado o número médio de hemácias dos ovinos dos grupos G-1 e G-2.

O número de hemácias apresentou-se dentro da faixa de normalidade para a espécie ($9-15 \times 10^6/\mu\text{L}$, PUGH, 2005) mostrando que no modelo de intoxicação não ocorreram alterações na contagem de hemácias antes da fase hemolítica da intoxicação (M0 - M3). Após o desencadeamento da crise hemolítica (M4 – M6) os valores de eritrócitos declinaram consideravelmente ($P < 0,05$).

Os valores do hematócrito acompanharam os valores do número de hemácias, conforme ilustrado na Tabela 3.

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão da contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	MOMENTOS						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	10,0 \pm 0 ^{Aa}	9,3 \pm 0,6 ^{Aa}	10,3 \pm 1,6 ^{Aa}	9,3 \pm 1,5 ^{Aa}	9,7 \pm 1,5 ^{Aa}	9,0 \pm 1,0 ^{Aa}	9,3 \pm 0,6 ^{Aa}
G-2	10,3 \pm 0,6 ^{Aa}	8,7 \pm 0,6 ^{Aa}	8,7 \pm 1,5 ^{Aa}	8,3 \pm 1,5 ^{Aa}	6,0 \pm 1,0 ^{Bb}	4,7 \pm 2,1 ^{Bb}	3,3 \pm 1,5 ^{Cb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

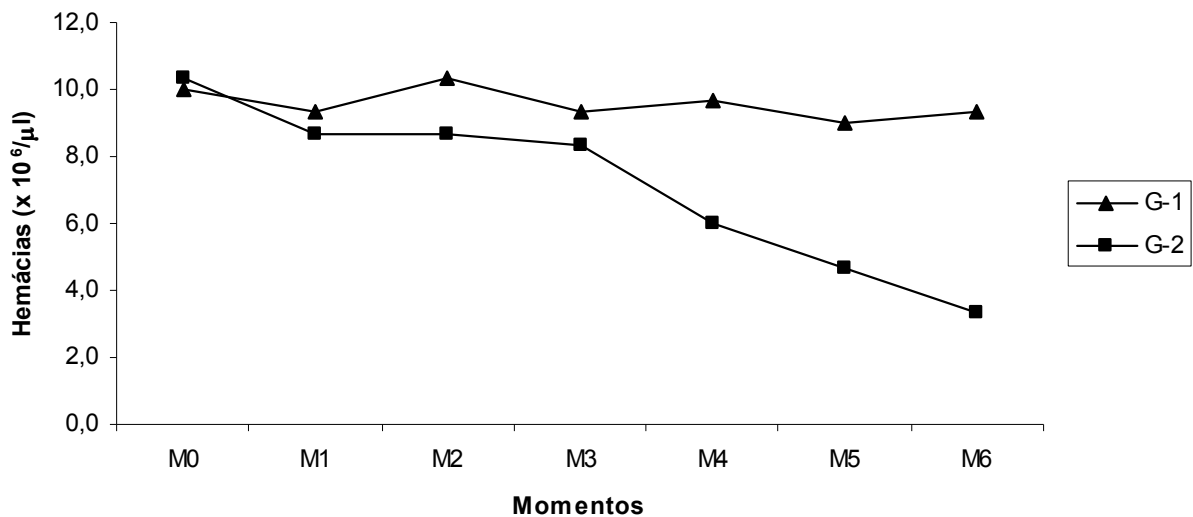


Figura 4 – Representação gráfica dos valores médios de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Os valores de hematócrito permaneceram dentro da faixa de normalidade até o aparecimento da crise hemolítica. A partir de 24 horas após o desencadeamento da crise hemolítica (M5 e M6) esses valores reduziram-se significativamente ($P < 0,05$). O comportamento deste componente em função dos momentos da intoxicação é expresso na Figura 5.

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão do hematócrito (%) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	32,7 ± 0,6 ^{Aa}	35,0 ± 1,7 ^{Aa}	34,3 ± 2,1 ^{Aa}	37,3 ± 2,5 ^{Aa}	34,3 ± 4,9 ^{Aa}	36,3 ± 2,3 ^{Aa}	33,7 ± 1,2 ^{Aa}
G-2	31,7 ± 0,6 ^{Aa}	32,6 ± 2,1 ^{Aa}	31,3 ± 2,1 ^{Aa}	31,7 ± 3,1 ^{Aa}	27,3 ± 6,6 ^{Bb}	18,0 ± 3,6 ^{Cb}	15,7 ± 3,1 ^{Cb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

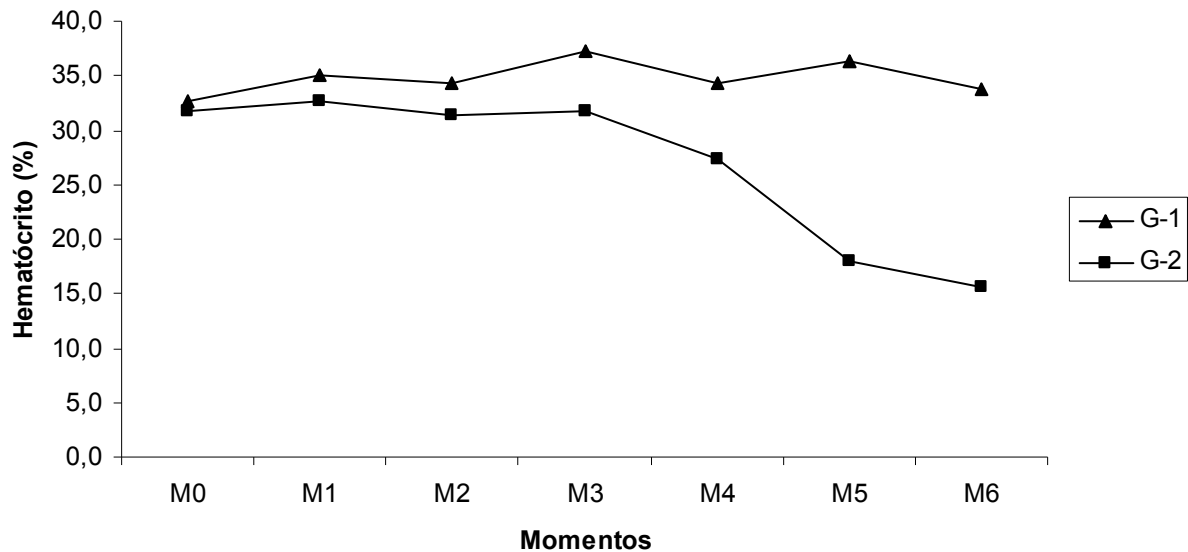


Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios do hematócrito (%) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Os teores de hemoglobina mantiveram-se sem alterações significativas entre os ovinos dos grupos G-1 e G-2 nos momentos M0, M1, M2 e M3, encontrando-se com variação dentro dos valores estabelecidos para espécie (10 - 15,4 g/dL, PUGH, 2005). A partir de M4, que representa o aparecimento da crise hemolítica pode-se notar uma redução significativa ($P < 0,05$) nos teores de hemoglobina dos animais do G-2, quando comparados ao G-1 e aos momentos anteriores (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 4 – Valores médios e desvios padrão de hemoglobina (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	MOMENTOS						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	10,5± 0,4 ^{Aa}	10,0± 3,4 ^{Aa}	10,3± 3,4 ^{Aa}	9,3± 3,68 ^{Aa}	8,9± 1,4 ^{Aa}	8,6± 0,95 ^{Aa}	8,6± 0,7 ^{Aa}
G-2	10,0± 0,3 ^{Aa}	9,2± 3,0 ^{Aa}	8,7± 1,8 ^{Aa}	8,7± 2,8 ^{Aa}	5,8± 1,6 ^{Bb}	4,2± 1,0 ^{Bb}	3,8± 1,2 ^{Bb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

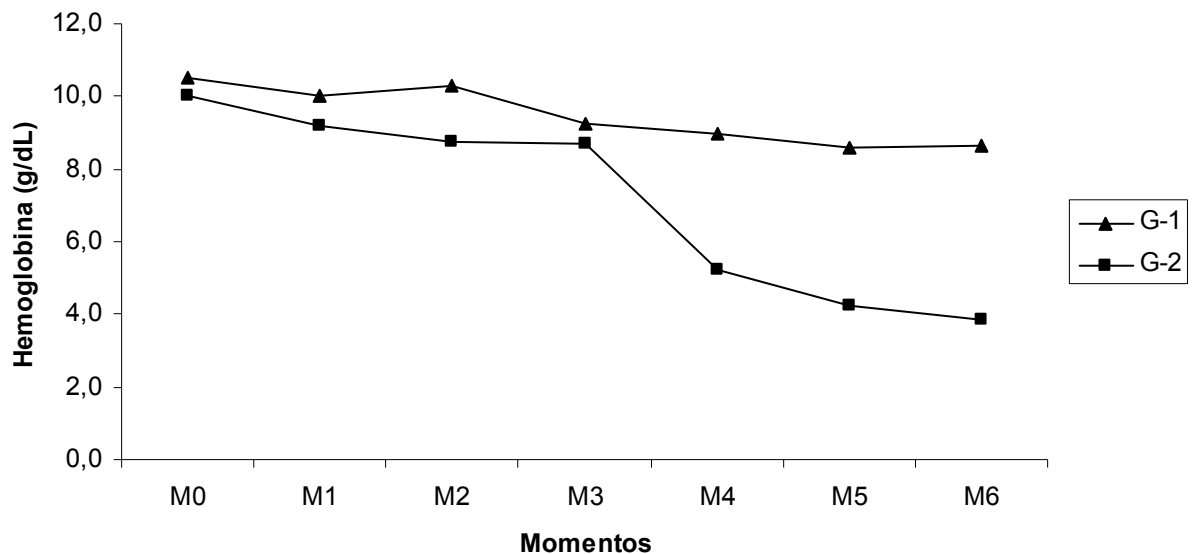


Figura 6 – Representação gráfica dos valores médios de hemoglobina (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Com base nos valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos (Tabelas 5 e 6). A Figura 7 representa o comportamento do volume corpuscular médio (VCM) dos eritrócitos em função do tempo, enquanto a Figura 8 representa a cinética dos valores de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os valores considerados normais são de 28 – 40 fL para VCM e 31-34 g/dL para CHCM, segundo PUGH (2005).

Os ovinos dos grupos G-1 e G-2 apresentaram até o momento M3 hemácias normocíticas e normocrômicas. Quando o processo hemolítico se iniciou (M4), os ovinos do grupo G-2 passaram a apresentar um quadro de anemia macrocítica normocrômica que durou dois dias, enquanto as hemácias dos ovinos do grupo G-1 mantiveram-se normocíticas e normocrômicas.

Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão do volume corpuscular médio (fL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	31,9±0,9 ^{aa}	35,9±0,9 ^{aa}	32,1±3,9 ^{aa}	38,1±3,5 ^{aa}	33,7±2,0 ^{aa}	37,4±2,0 ^{aa}	33,7±0,4 ^{aa}
G-2	29,1±2,2 ^{aa}	35,9±3,2 ^{aa}	33,5±0,7 ^{aa}	35,8±6,6 ^{aa}	44,1±13,9 ^{bb}	45,3±15,5 ^{bb}	36,9±9,3 ^{aa}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

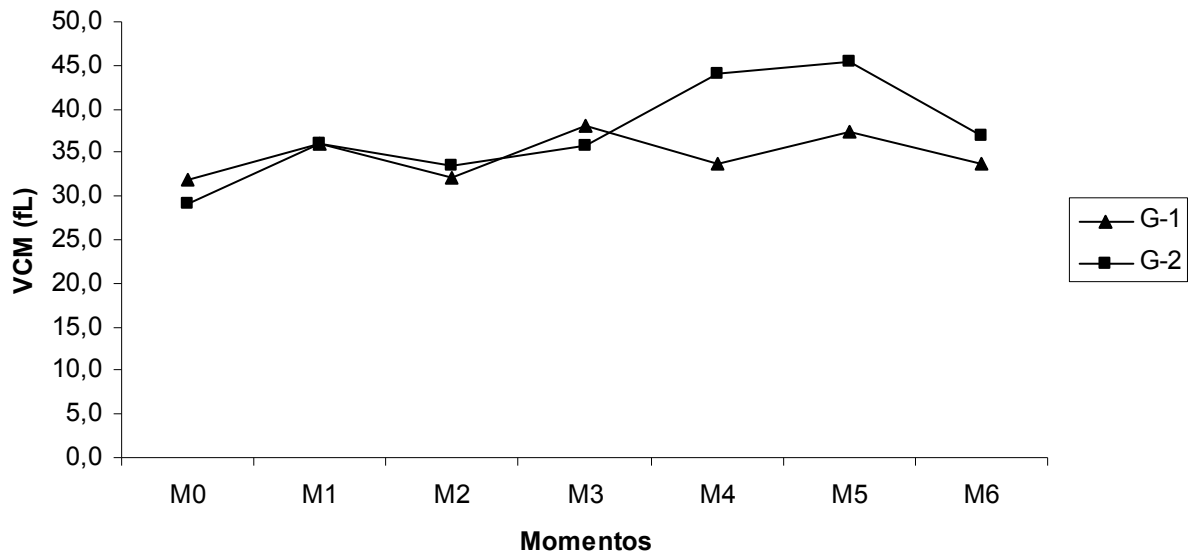


Figura 7 – Representação gráfica dos valores médios do volume corpuscular médio (fL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	32,3±1,6 ^{Aa}	28,3±8,0 ^{Aa}	29,9±9,5 ^{Aa}	24,5±7,8 ^{Aa}	26,1±0,4 ^{Aa}	23,5±1,6 ^{Aa}	25,6±1,8 ^{Aa}
G-2	31,6±0,6 ^{Aa}	28,2±9,7 ^{Aa}	27,7±3,9 ^{Aa}	27,5±9,4 ^{Aa}	25,23±10,7 ^{Aa}	25,2±2,5 ^{Aa}	26,1±7,4 ^{Aa}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os grupos.

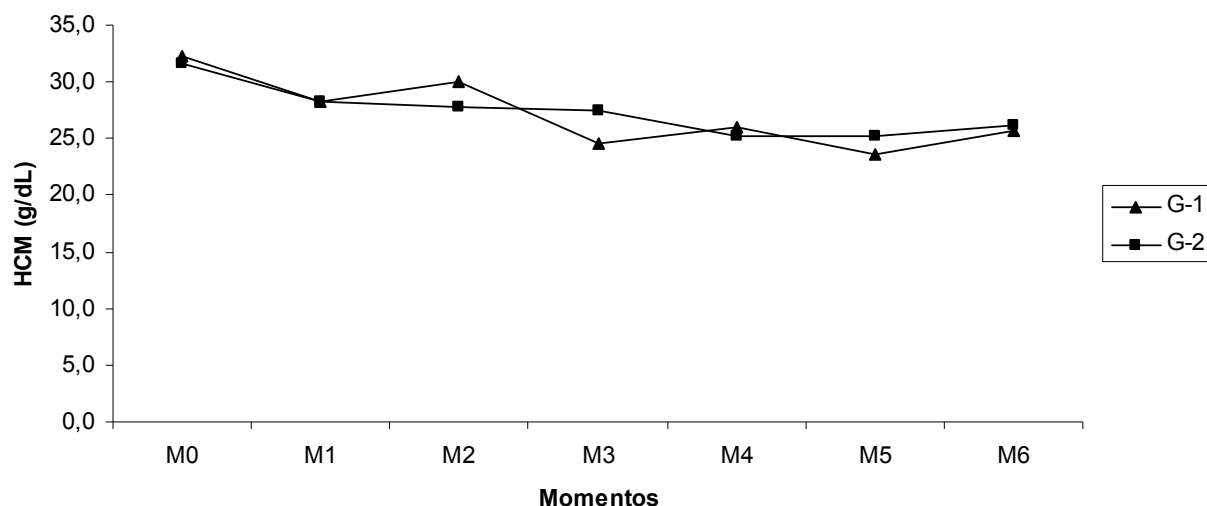


Figura 8 – Representação gráfica dos valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Durante a fase pré-hemolítica da intoxicação cúprica (M0 – M3) verificou-se que 85% das hemácias visualizadas através da microscopia eletrônica de varredura apresentavam-se com o padrão normal, também denominado discóide (Figura 9).

Entretanto nos momentos M2 e M3 desta fase o padrão morfológico dos eritrócitos começou a se alterar e outros formatos de hemácias, como macrócitos (Figura 10A e 10B), quinizócitos (Figura 10C) e dacriócitos (figura 10D) passaram a serem visualizados em maiores proporções. No momento em que foi desencadeada a crise hemolítica evidenciou-se alterações marcantes e persistentes na morfologia das hemácias dos ovinos do grupo G-2 (Figuras 11 e 12).

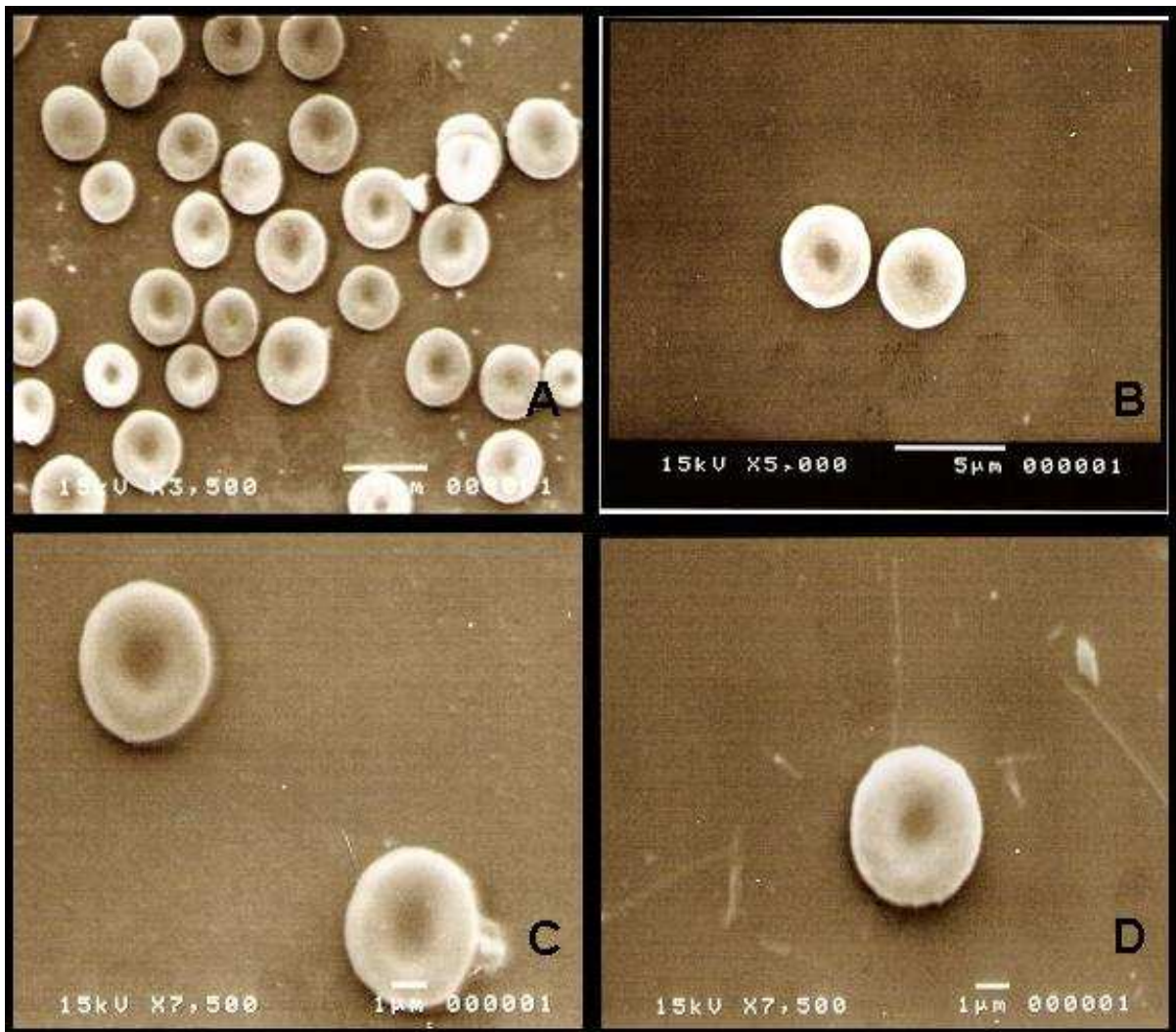


Figura 9 – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase pré - hemolítica (M0 – M3) da intoxicação cúprica acumulativa. A, B, C e D - Aspecto normal das hemácias (discócitos) de ovinos nos momentos M0 e M1 da intoxicação cúprica acumulativa em diferentes aumentos.

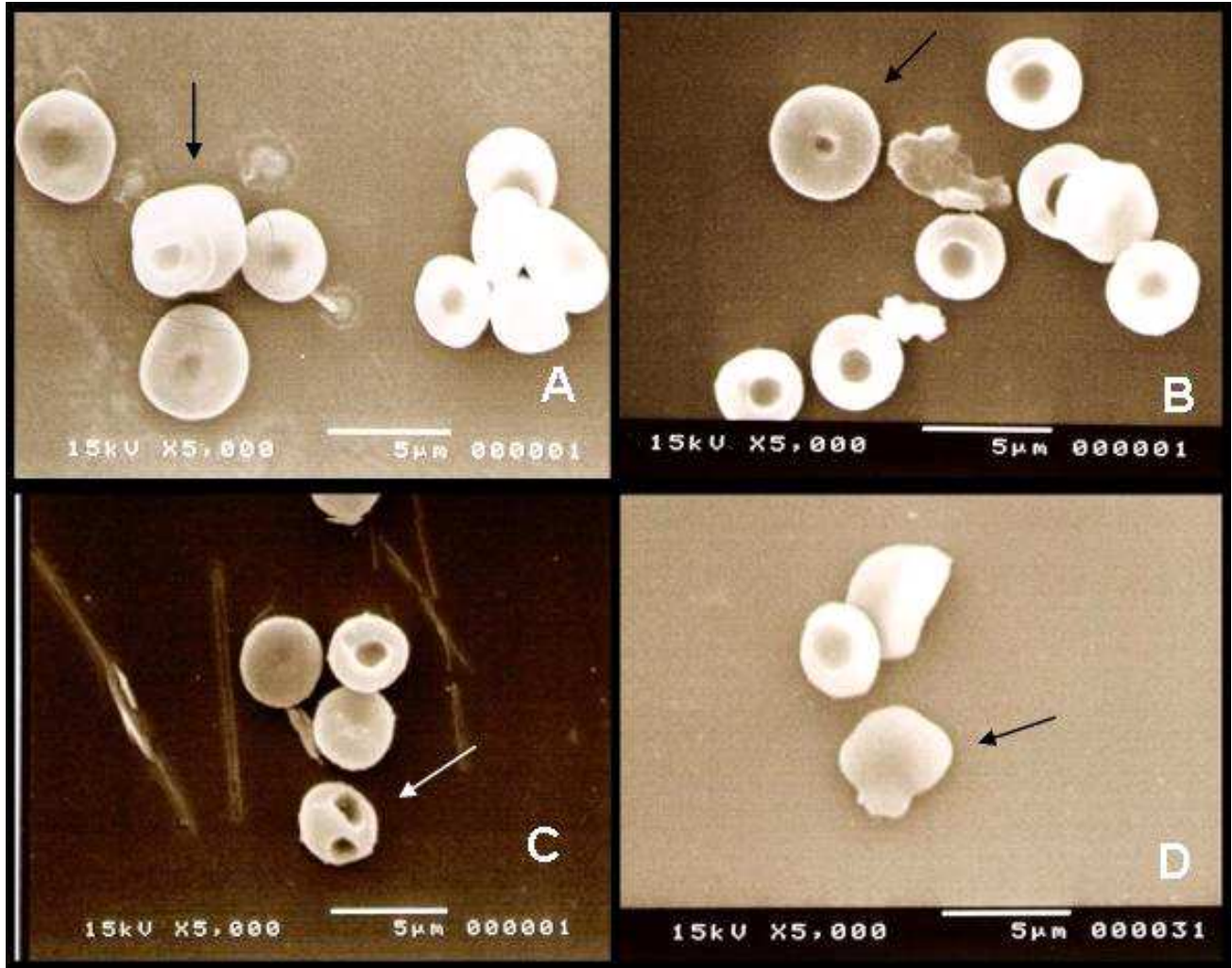


Figura 10 – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase pré-hemolítica (M0 – M3) da intoxicação cúprica acumulativa. Principais alterações morfológicas vistas nas hemácias entre os momentos M2 e M3 da intoxicação cúprica acumulativa: A, B – Macrócito; C – Quinizócito; D – Dacriócito.

Durante a crise hemolítica (M4 – M6) destacou-se a presença de acantócitos (Figuras 11A, 11B e 11C), que são eritrócitos espiculados, com severas projeções em sua superfície; estomatócitos, codócitos e ceratócitos, além de corpúsculos de Heinz.



Figura 11 – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase hemolítica (M4 – M6) da intoxicação cúprica acumulativa. M4: A - Perda da homogeneidade morfológica das hemácias que apresentam-se em diferentes formas: macrócitos (↔), acantócitos (↗), e codócitos (↘); B - Presença de estomatócitos (→). M5: C - Presença de acantócitos (↗) e corpúsculo de Heinz (→). M6: D - Alterações marcantes no padrão celular e presença de acantócitos (↗) e corpúsculo de Heinz (→).

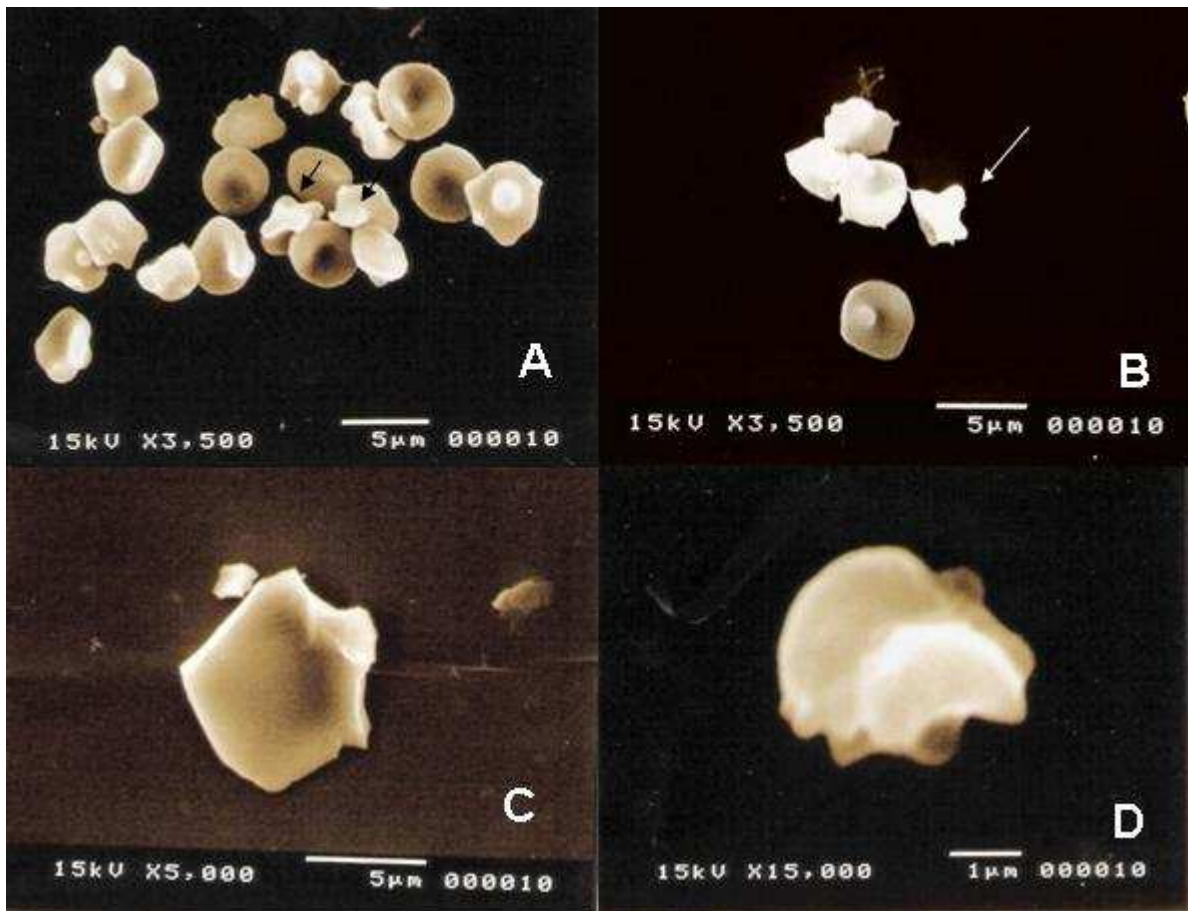


Figura 12 – Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase hemolítica (M4 – M6) da intoxicação cúprica acumulativa. M6: A - Alterações marcantes no padrão celular; B – queratócito; C - Presença de cristais de hemoglobina depositados na membrana de um eritrócito; D - Corpúsculo de Heinz.

5.4. Leucometria

Assim como as hemácias, não ocorreram alterações na contagem de leucócitos nos momentos M0 a M3, conforme valores ilustrados na Tabela 7. Os valores permaneceram na faixa de normalidade para a espécie (4.000 a 12.000/ μ l – PUGH, 2005). A partir do momento M4 o número de leucócitos totais aumentou, atingindo valores significativos ($P < 0,05$) nos momentos M5 e M6. O comportamento dos leucócitos em função dos momentos da intoxicação esta representado na Figura 13.

A leucocitose constatada nos momentos M4, M5 e M6 deve-se ao aumento de neutrófilos segmentados, sendo este aumento significativo ($P < 0,05$) nos momentos M5 e M6 (Tabela 8 e Figura 14). Os linfócitos por sua vez, permaneceram nos valores de referência para a espécie (2.000 a 9.000/ μL – PUGH, 2005), entretanto, apresentaram uma redução quando comparados aos valores do grupo G-1 (Tabela 9 e Figura 15).

Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

GRUPOS	MOMENTOS						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	10,6 \pm 2,9 ^{Aa}	7,7 \pm 1,7 ^{Aa}	8,4 \pm 2,2 ^{Aa}	7,2 \pm 1,6 ^{Aa}	8,3 \pm 2,0 ^{Aa}	8,6 \pm 0,9 ^{Aa}	9,1 \pm 0,8 ^{Aa}
G-2	10,7 \pm 4,7 ^{Aa}	11,7 \pm 3,9 ^{Aa}	9,9 \pm 1,2 ^{Aa}	8,3 \pm 1,3 ^{Aa}	12,6 \pm 7,2 ^{Aa}	14,6 \pm 5,3 ^{Bb}	15,4 \pm 8,3 ^{Bb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos

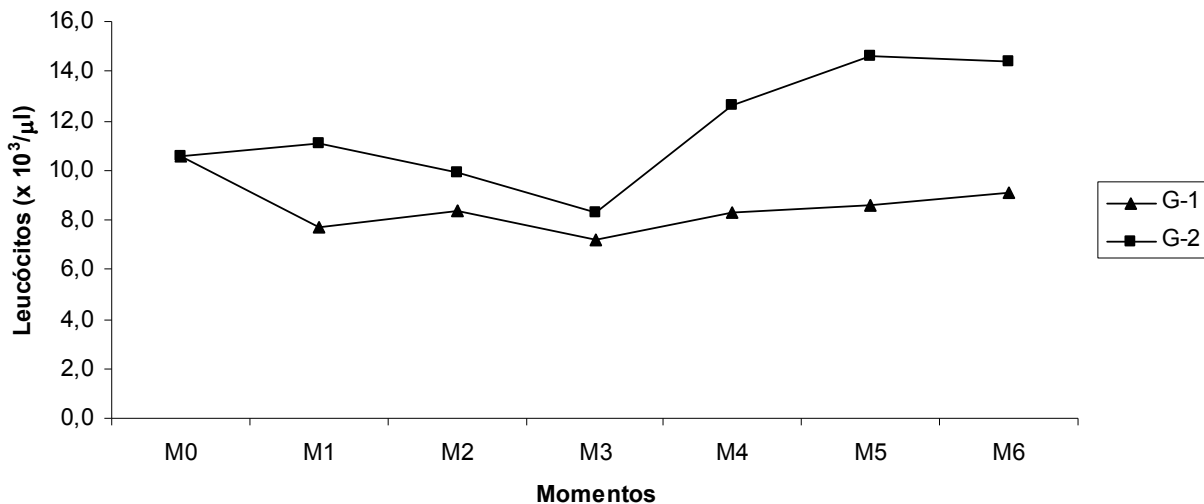


Figura 13 – Representação gráfica dos valores médios de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Tabela 8 – Valores médios e desvios padrão de neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	$3,4 \pm 1,1^{Aa}$	$2,1 \pm 0,5^{Aa}$	$2,4 \pm 0,5^{Aa}$	$1,6 \pm 0,3^{Aa}$	$2,7 \pm 0,3^{Aa}$	$2,6 \pm 0,7^{Aa}$	$2,8 \pm 0,55^{Aa}$
G-2	$4,3 \pm 1,5^{Aa}$	$3,6 \pm 1,6^{Aa}$	$3,6 \pm 0,7^{Aa}$	$3,2 \pm 0,7^{Ab}$	$6,9 \pm 4,6^{Ab}$	$8,6 \pm 5,3^{Bb}$	$10,6 \pm 5,8^{Bb}$

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

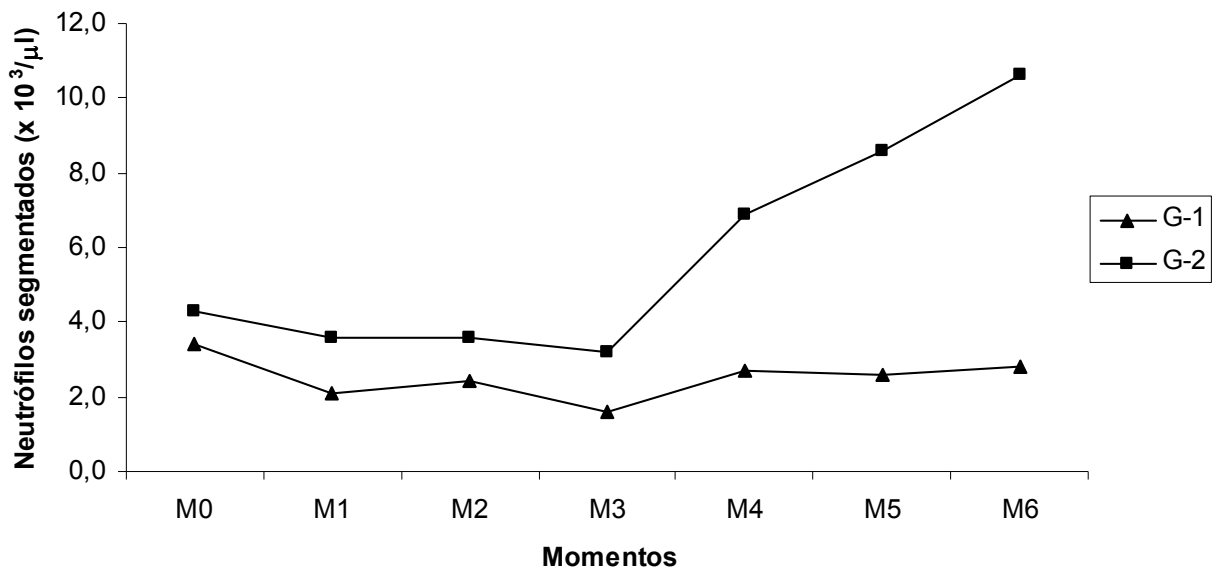


Figura 14 – Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão de neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Tabela 9 – Valores médios e desvios padrão de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	6,8 ± 3,0 ^{Aa}	5,5 ± 1,9 ^{Aa}	5,7 ± 1,9 ^{Aa}	5,4 ± 1,7 ^{Aa}	5,4 ± 1,9 ^{Aa}	5,8 ± 1,6 ^{Aa}	6,0 ± 1,3 ^{Aa}
G-2	5,6 ± 3,3 ^{Aa}	5,9 ± 2,2 ^{Aa}	5,7 ± 0,8 ^{Aa}	4,7 ± 0,9 ^{Aa}	4,6 ± 1,3 ^{Aa}	5,4 ± 1,5 ^{Aa}	4,4 ± 2,1 ^{Aa}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

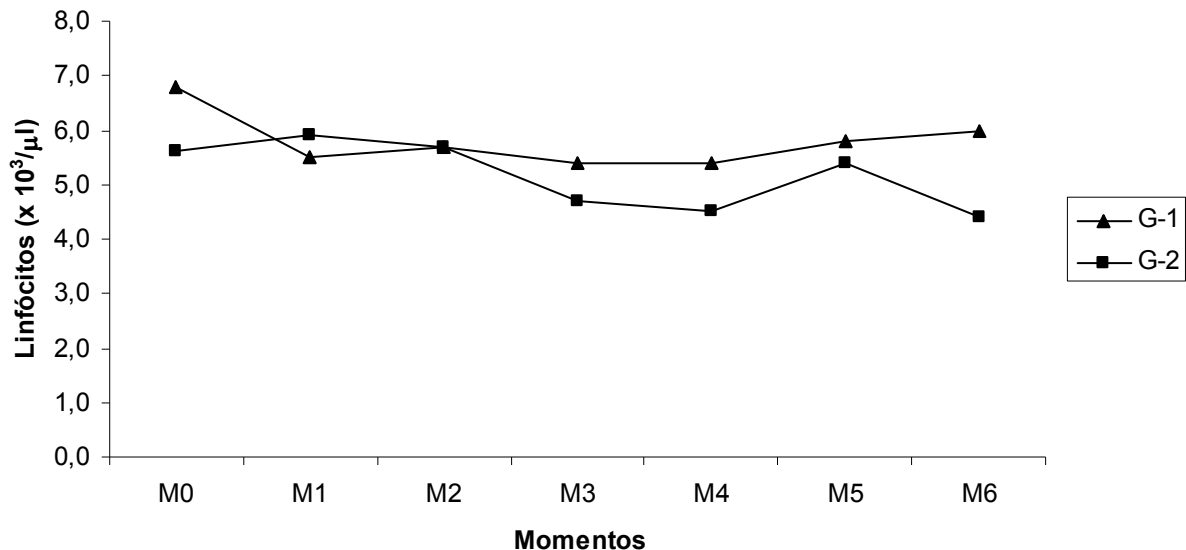


Figura 15 – Representação gráfica dos valores médios de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

5.5. Análises Bioquímicas do soro sanguíneo

As atividades de AST, GGT e CK estão representados nas Tabelas 10, 11 e 12. Os valores de AST mostraram que a atividade desta enzima manteve-se dentro dos valores estabelecidos para espécie em todos os momentos nos animais do G-1. Em relação ao G-2, pode-se verificar que a atividade sérica desta enzima aumentou

significativamente a partir do M2, entretanto no M3 sua atividade foi mais marcante. No M4 a atividade desta enzima atingiu valores mais elevados, entretanto a maior atividade foi detectada no M6. A cinética desta enzima está representada na Figura 16.

Tabela 10 – Atividades séricas médias e desvios padrão da enzima aspartato aminotransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	86 ± 15 ^{Aa}	86 ± 15 ^{Aa}	103 ± 29 ^{Aa}	96 ± 13 ^{Aa}	70 ± 4 ^{Aa}	96 ± 23 ^{Aa}	130 ± 45 ^{Aa}
G-2	139 ± 22 ^{Ab}	137 ± 14 ^{Ab}	177 ± 20 ^{Bb}	388 ± 76 ^{Cb}	567 ± 134 ^{Cb}	440 ± 65 ^{Cb}	1030 ± 552 ^{Bb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

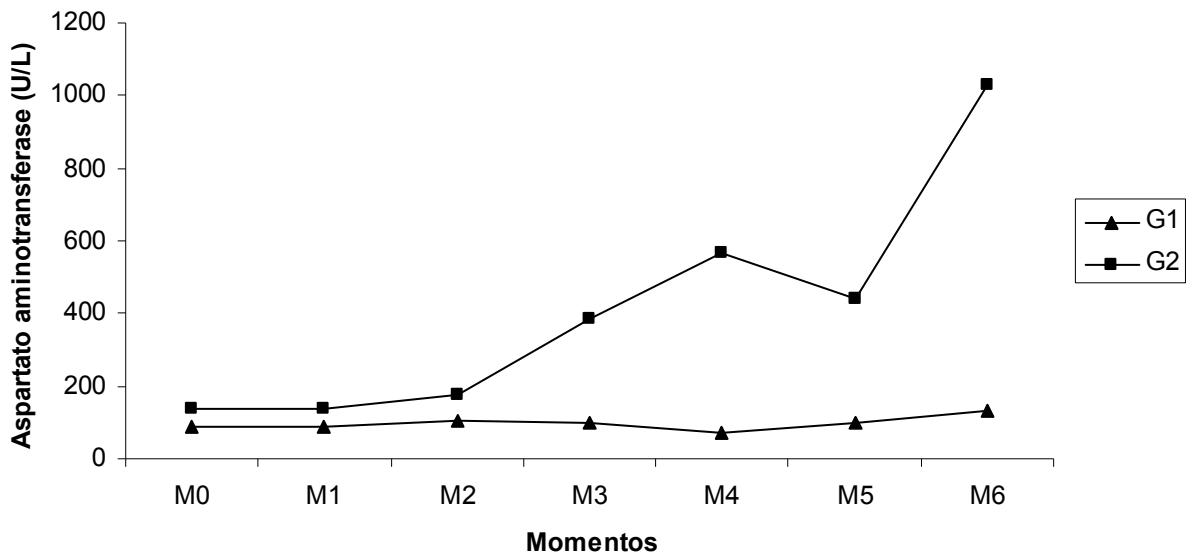


Figura 16 – Representação gráfica das atividades séricas médias da enzima aspartato aminotransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

A Tabela 11 apresenta os valores médios da enzima gama glutamiltransferase em diferentes momentos. A cinética desta enzima está representada na Figura 17.

Tabela 11 – Atividades séricas médias e desvios padrão da enzima gama-glutamiltransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	62±2 ^{Aa}	60±3 ^{Aa}	71±23 ^{Aa}	71±15 ^{Aa}	57±11 ^{Aa}	66±15 ^{Aa}	71±15 ^{Aa}
G-2	74±10 ^{Ab}	103±28 ^{Ab}	175±75 ^{Bb}	379±156 ^{Bb}	486±286 ^{Bb}	302±147 ^{Bb}	193±71 ^{Bb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

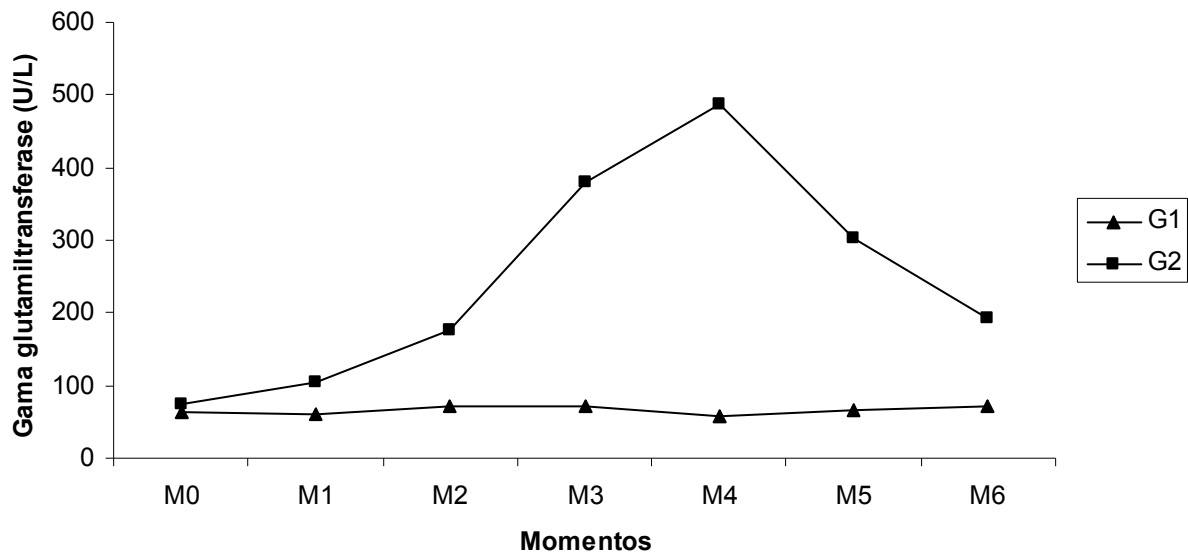


Figura 17 – Representação gráfica dos valores médios dos teores séricos de gama glutamiltransferase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

A atividade sérica de GGT manteve-se em valores superiores aos estabelecidos para espécie tanto nos ovinos do G-1, quanto do G-2. Nos ovinos do G-2, a enzima gama - glutamiltransferase foi um excelente indicador da crise hemolítica uma vez que a mesma apresentou uma atividade crescente quando comparada aos animais do G-1, atingindo teores séricos 40% maiores que o momento basal (M0) no M2. Posteriormente a atividade sérica de GGT aumentou significativamente até o M4. Após o aparecimento da crise hemolítica a atividade sérica de GGT diminuiu, entretanto manteve-se acima dos valores estabelecidos para espécie.

As atividades séricas de CK (Tabela 12) apresentaram alterações significativas apenas nos momentos M4 a M6, nos ovinos do G-2. Nos ovinos do G-1 não foram observadas elevações na atividade sérica de CK. A cinética da enzima creatina cinase encontra-se representada na Figura 18.

Tabela 12 – Atividades séricas médias e desvios padrão da enzima creatina cinase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Grupos	Momentos						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	51 ± 13 ^{Aa}	62 ± 24 ^{Aa}	110 ± 50 ^{Aa}	39 ± 4 ^{Aa}	31 ± 3 ^{Ba}	54 ± 17 ^{Aa}	95 ± 44 ^{Aa}
G-2	54 ± 4 ^{Aa}	168 ± 172 ^{Aa}	43 ± 12 ^{Aa}	35 ± 6 ^{Ba}	89 ± 65 ^{Ab}	436 ± 219 ^{Cb}	840 ± 385 ^{Cb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

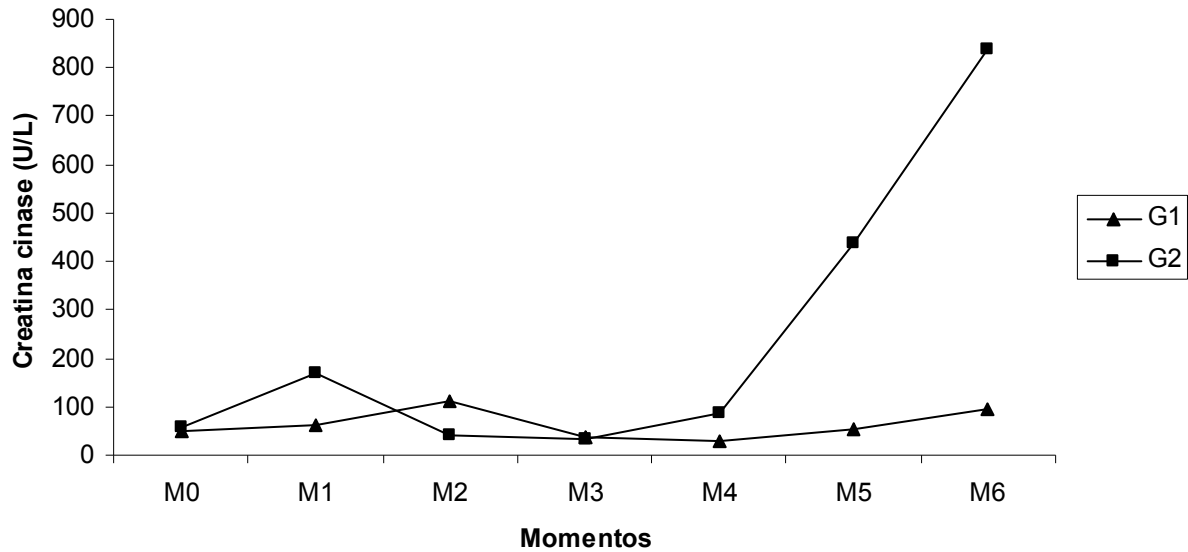


Figura 18 – Representação gráfica das atividades séricas médias de creatina cinase (U/L) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

5.6. Proteinograma Sérico

A técnica de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) permitiu a identificação de diferentes frações protéicas com pesos moleculares que variaram de 22.000 a 260.000 daltons (Da) em seis ovinos. Dentre as frações protéicas identificadas (Tabela 13) ficou evidente que a proteína com peso molecular de 122.000 Da (ceruloplasmina) com o decorrer da intoxicação manteve seus níveis abaixo dos valores basais, aumentando apenas no momento M5 da intoxicação cúprica acumulativa. Em contrapartida, as proteínas com peso molecular de 83.000 Da (transferrina), 35.000 Da e 27.000 Da (IgG de cadeia leve) tiveram aumentos de 326, 128 e 22% respectivamente, nos 15 dias que antecederam a crise hemolítica (M2). A porcentagem de variação dessas proteínas encontra-se descrita na Tabela 14, e sua cinética representada nas Figuras 20, 21, 22 e 23.

Tabela 13 – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de proteínas, obtidas por eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Proteína (PM) e grupo	M0		M1		M2		M3		M4		M5		M6	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
MOMENTOS														
Proteína sérica total (g/dL)														
G-1	6,1	0,4	5,9	0,7	5,9	0,3	5,6	0,4	5,9	1,0	6,0	1,1	7,5	0,6
G-2	6,3	0,2	5,8	0,2	6,0	0,3	5,8	0,4	5,9	0,1	5,7	0,2	5,9	0,6
α-lipoproteína (PM 232.000; mg/dL)														
G-1	3,9	0,6	2,6	0,9	3,6	4,5	8,2	5,0	5,8	2,5	5,9	2,9	8,4	6,7
G-2	7,2	5,9	4,4	3,8	2,8	2,6	7,5	2,3	6,5	3,3	2,3	1,1	5,7	7,0
Ceruloplasmina (PM 122.000; mg/dL)														
G-1	20,1	6,4	16,0	3,8	24,6	11,0	17,3	5,0	15,3	7,1	23,0	14,8	19,4	9,1
G-2	28,8	11,3	21,0	14,8	19,3	7,9	26,5	4,2	28,0	16,4	39,4	23,3	22,7	18,5
PM 109.000 (mg/dL)														
G-1	23,8	12,7	19,3	5,8	22,6	6,7	18,7	7,3	17,6	6,6	15,0	11,8	30,6	10,9
G-2	26,1	12,7	24,6	5,0	22,6	12,6	18,6	8,6	32,9	11,9	28,9	17,6	26,6	12,2
Proteína C-reativa (PM 102.000; mg/dL)														
G-1	5,2	0,1	7,3	1,8	7,4	0,9	10,0	3,8	6,1	3,8	6,5	2,5	7,4	1,2
G-2	9,0	2,4	8,4	1,7	9,6	0,8	6,7	1,7	9,6	1,2	9,1	2,2	8,9	2,2
Transferrina (PM 83.000; mg/dL)														
G-1	235	48	216	67	217	28	220	72	285	85	300	48	553	191
G-2	204	149	318	117	460	203	264	153	359	194	228	55	242	200
Albumina (PM 65.000; g/dL)														
G-1	4,4	0,6	4,4	0,6	4,0	0,1	3,8	0,8	3,8	0,9	3,8	1,3	4,6	1,3
G-2	4,2	0,3	3,7	0,6	3,7	0,6	3,6	0,9	3,5	0,3	3,6	0,1	3,9	0,8

Continua

Continuação

IgG c adeia pesada (PM 55.000; mg/dL)

G-1	939	426	661	150	870	118	836	209	956	15	852	97	1201	306
G-2	934	69	1016	283	1063	252	1076	366	1117	173	1048	280	1035	250

PM 35.000 (mg/dL)

G-1	10,5	6,6	4,6	2,5	10,5	11,5	5,9	8,4	4,2	2,0	9,1	3,8	53,5	44,3
G-2	5,4	3,1	7,5	6,8	23,2	18,2	11,9	15,9	17,5	17,6	5,9	3,6	9,2	3,7

IgG cadeia leve (PM 27.000; mg/dL)

G-1	238	230	261	147	290	51	291	92	318	23	301	45	441	184
G-2	297	45	302	288	361	185	174	153	444	183	380	178	394	194

PM 25.000 (mg/dL)

G-1	89,8	20,8	105,5	28,0	117,1	20,4	104,2	19,0	111,6	27,4	124,5	28,1	149,2	44,8
G-2	137,6	26,1	105,7	21,3	127,6	13,3	90,3	20,3	119,0	18,1	113,4	24,4	132,9	25,7

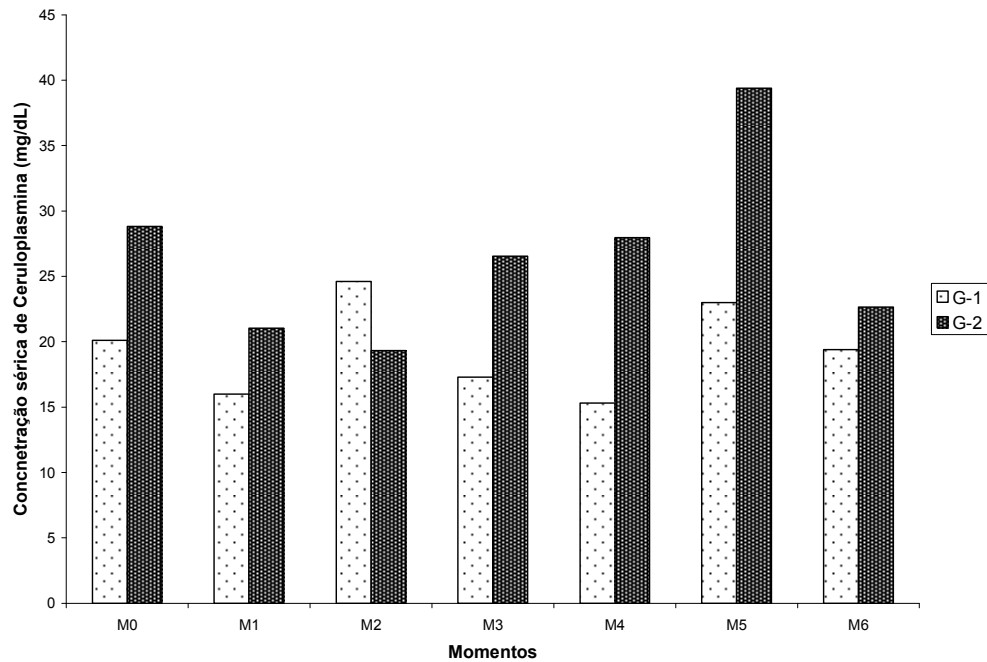


FIGURA 19 - Representação gráfica da concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

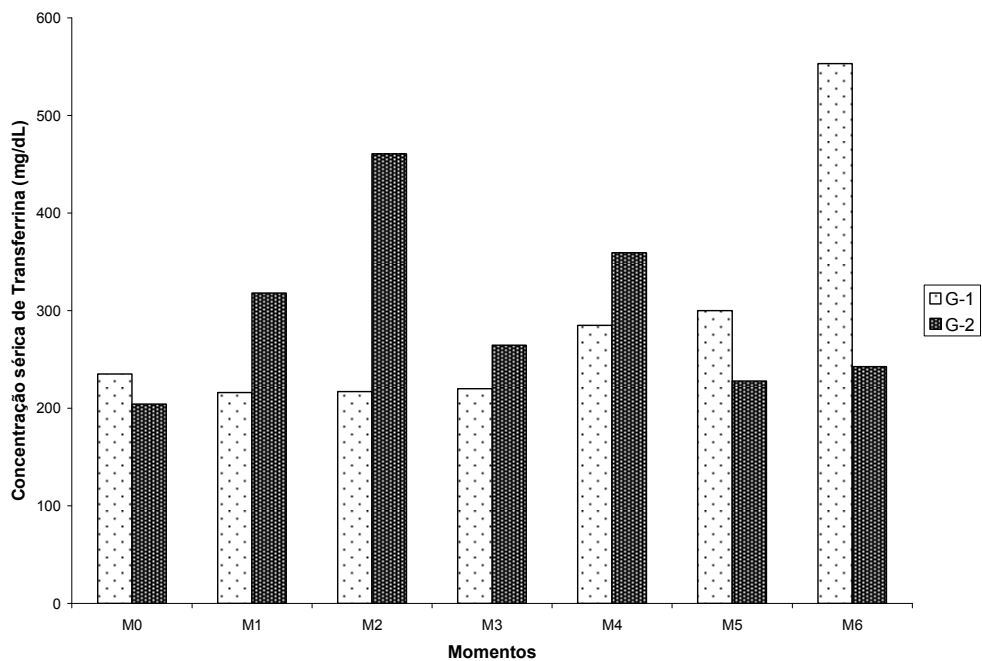


FIGURA 20 - Representação gráfica da concentração sérica de transferrina (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

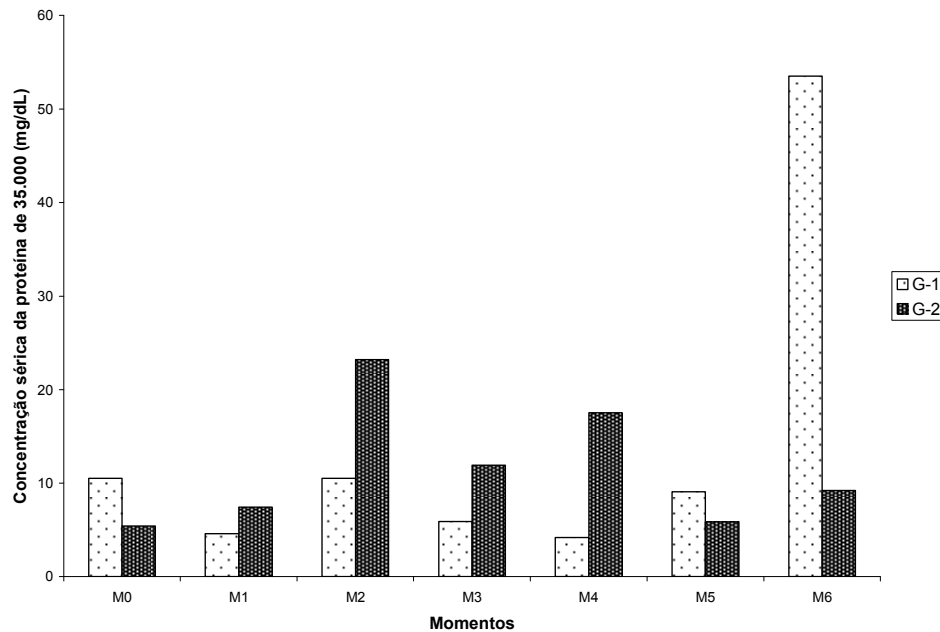


FIGURA 21 - Representação gráfica da concentração sérica da proteína de 35.000 Da (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

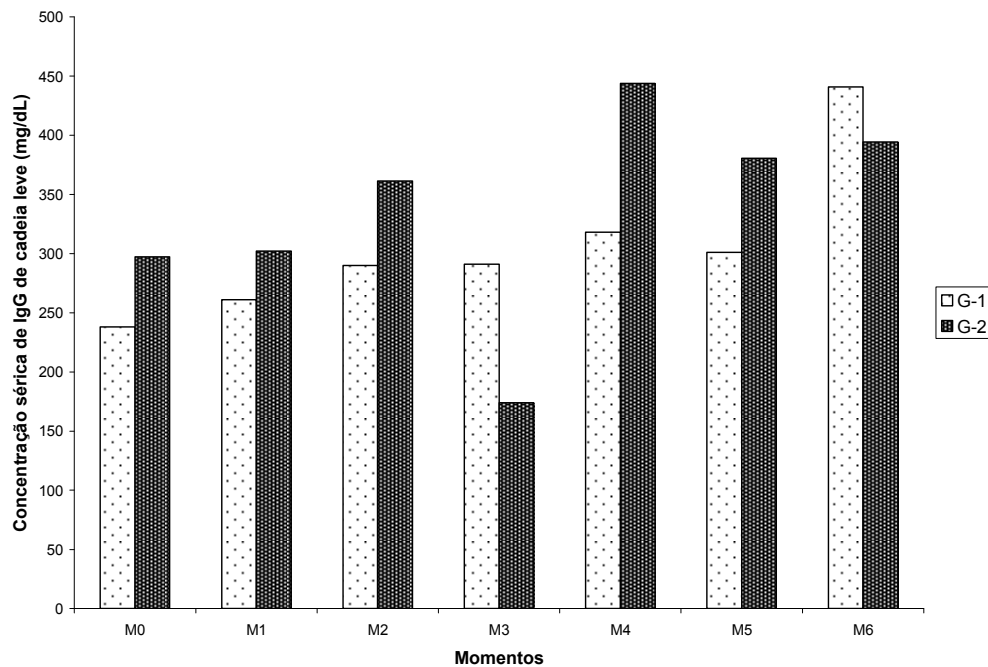


FIGURA 22 - Representação gráfica da concentração sérica de IgG de cadeia leve (mg/dL) dos ovinos do grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

Tabela 14 – Variação (%) das concentrações séricas de proteínas comparada com as concentrações basais em ovinos submetidos experimentalmente à intoxicação cúprica acumulativa (G-2).

Proteína (PM)	Momentos					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Ceruloplasmina	-27	-33	-8	-3	37	-21
Transferrina	56	126	30	76	12	19
PM 35.000	38	328	120	223	8	70
IgG cadeia leve	2	22	-42	49	28	33

5.7. Teores Séricos de Cobre

Os teores séricos de cobre permaneceram nos limites de normalidade da espécie (9,13 a 25,2 $\mu\text{mol/L}$ – PUGH, 2005) durante toda fase pré-hemolítica, correspondente aos momentos M0 a M3; entretanto, os animais do grupo G-2, que receberam o sulfato de cobre, mantiveram os teores de cobre séricos significativamente maiores ($P < 0,05$) quando comparados com o grupo controle (Tabela 15).

Os dados apresentados na tabela 09 demonstram que no momento em que foi detectado o aparecimento da crise hemolítica os teores de cobre sérico aumentaram significativamente ($P < 0,05$) e continuaram elevados por mais 72 horas. A cinética deste microelemento está representada na Figura 24.

Tabela 15 – Valores médios e desvios padrão dos teores séricos de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

GRUPOS	MOMENTOS						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
G-1	11,5 \pm 0,4 ^{Aa}	8,3 \pm 1,7 ^{Aa}	8,7 \pm 1,7 ^{Aa}	9,9 \pm 2,7 ^{Aa}	8,6 \pm 2,7 ^{Aa}	10,9 \pm 5,6 ^{Aa}	8,8 \pm 2,3 ^{Aa}
G-2	14,3 \pm 0,9 ^{Aa}	19,3 \pm 12,4 ^{Ab}	15,6 \pm 4,0 ^{Ab}	17,6 \pm 5,5 ^{Ab}	136,8 \pm 96,0 ^{Eb}	66,2 \pm 35,8 ^{Cb}	48,0 \pm 26,6 ^{Cb}

Nota: letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os momentos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

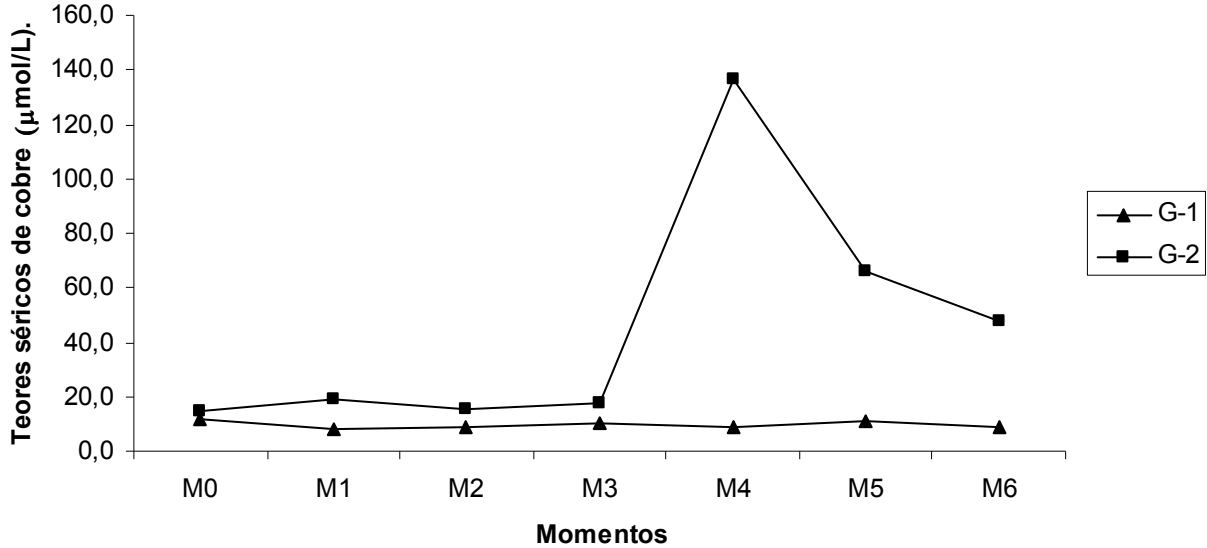


Figura 23 – Representação gráfica dos valores médios dos teores séricos de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos grupo controle (G-1) e dos experimentalmente intoxicados por cobre (G-2), antes (M0 – M3), durante (M4) e após a crise hemolítica (M5 e M6).

5.8. ACHADOS DE NECROPSIA

5.8.1. Achados macroscópicos

Durante a necropsia dos ovinos do grupo G-2 foram verificadas alterações como: mucosas oculares e oral pálidas ou amareladas, icterícia difusa, edema pulmonar, fígado aumentado de volume, amarelado, com bordas arredondadas. Os baços dos animais intoxicados quando comparados aos dos ovinos do grupo controle apresentavam-se congestionados e com volumes maiores, os rins apresentavam-se enegrecidos após a retirada da cápsula renal, e nas bexigas urinárias encontrou-se urina com coloração âmbar devido à hemoglobinúria decorrente da anemia hemolítica. Os principais achados de necropsia estão nas Figuras 24 a 33. Nos ovinos do grupo controle, não se encontraram alterações dignas de nota.

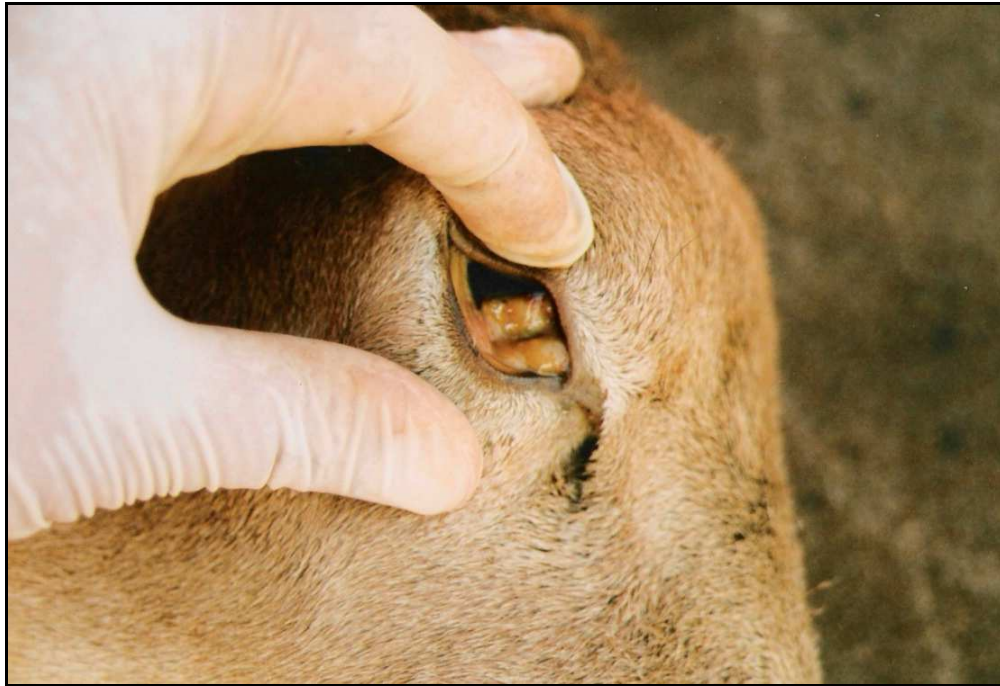


Figura 24 – Mucosa ocular icterica de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.



Figura 25 – Líquido espumoso na traquéia de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.



Figura 26 – Tecidos subcutâneo, adiposo e muscular ictericos de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.

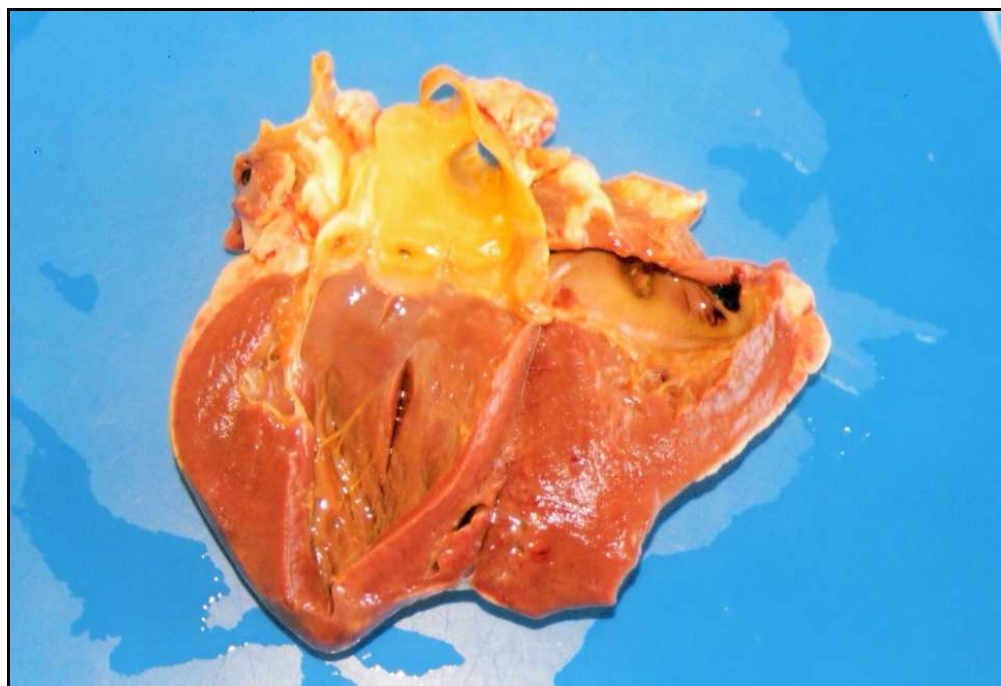


Figura 27 – Grandes vasos da base cardíaca ictericos em ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.

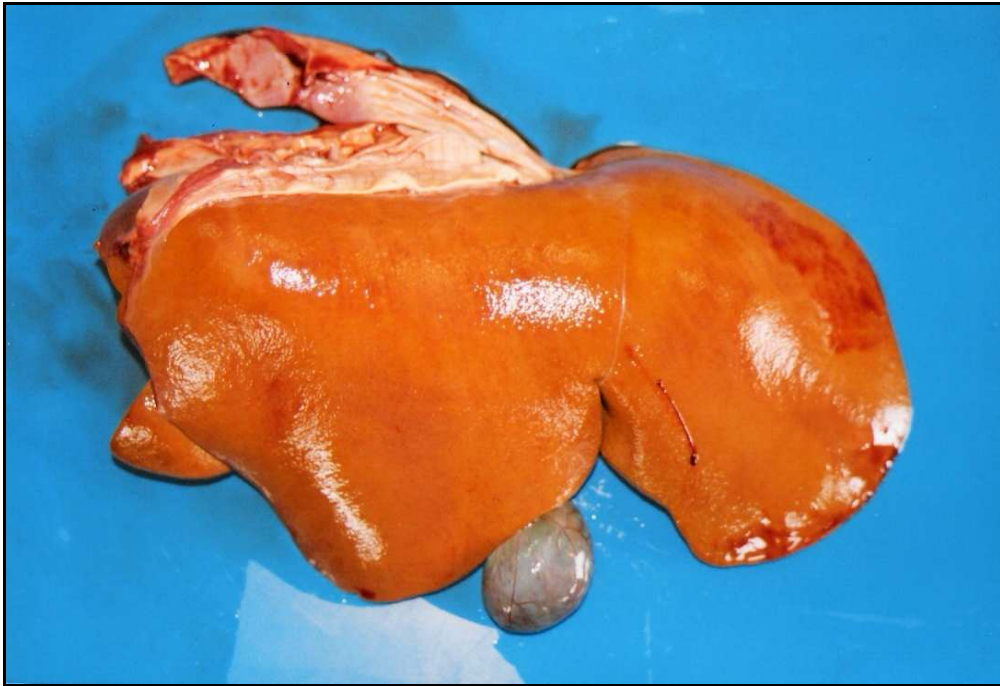


Figura 28 – Fígado aumentado de volume, com bordas arredondadas, coloração amarelada e vesícula biliar repleta de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.

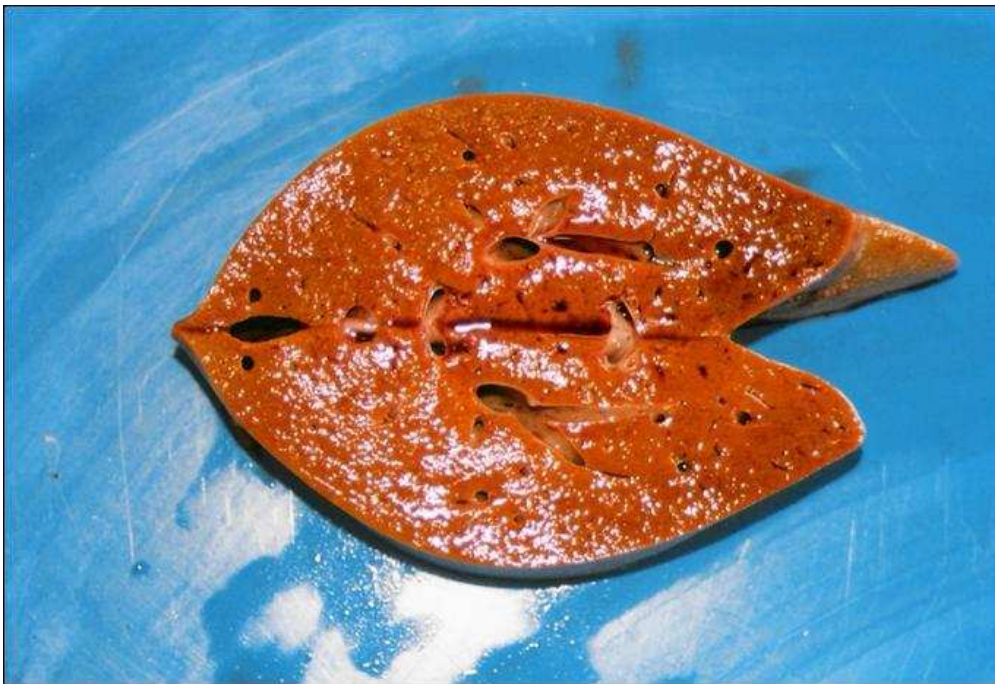


Figura 29 – Superfície de corte de fígado (Figura 28) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.



Figura 30 - Baço aumentado de volume e com bordas arredondadas de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.



Figura 31 - Hiperemia na superfície de corte de baço (Figura 30) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.



Figura 32 - Rins aumentados de volume e com pontos enegrecidos no parênquima renal de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.

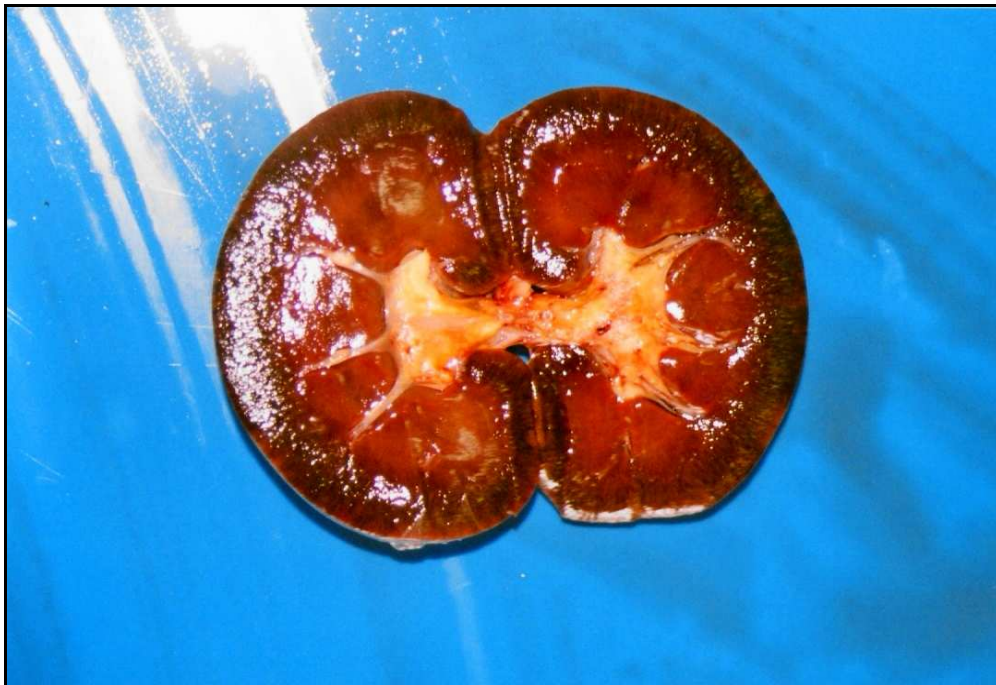


Figura 33 - Rim aumentado de volume com região cortical enegrecida e pelve renal amarelada de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre.

5.8.2. Achados histopatológicos

Foram encontradas alterações microscópicas nos fígados, rins e baços dos animais experimentalmente intoxicados com cobre. Outros órgãos, como coração, bexiga, intestinos, adrenal, pré-estômagos, olhos, músculos esqueléticos e sistema nervoso central não apresentaram alterações dignas de nota. Os cortes histológicos de fígado apresentaram: desorganização de cordões de hepatócitos (Figuras 34 e 39); presença de infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal e leve (Figuras 35 e 36); megalocitose, colestase intra-hepática e extra-hepática multifocal (Figuras 37 e 38); necrose de hepatócitos centrolobulares. O baço dos animais apresentava congestão difusa e acentuada de polpa vermelha, e a microscopia dos rins exibia degeneração de túbulos renais corticais, com presença de pigmento avermelhado e amarronzado no citoplasma, presença de acentuada quantidade de hemácias na luz de túbulos renais corticais, infiltrado inflamatório linfocítico multifocal no interstício, congestão difusa e moderada de vasos sanguíneos, edema glomerular multifocal leve e calcificação multifocal e moderada de túbulos renais medulares.

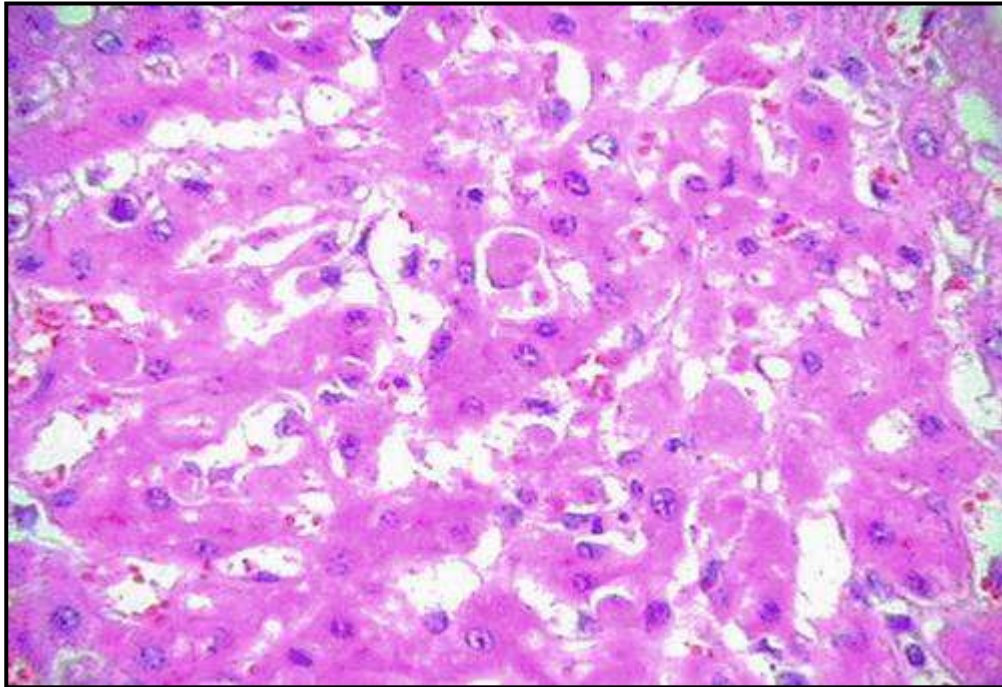


Figura 34 – Fotomicrografia de fígado, apresentando desorganização de cordões de hepatócitos de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 10x. HE.

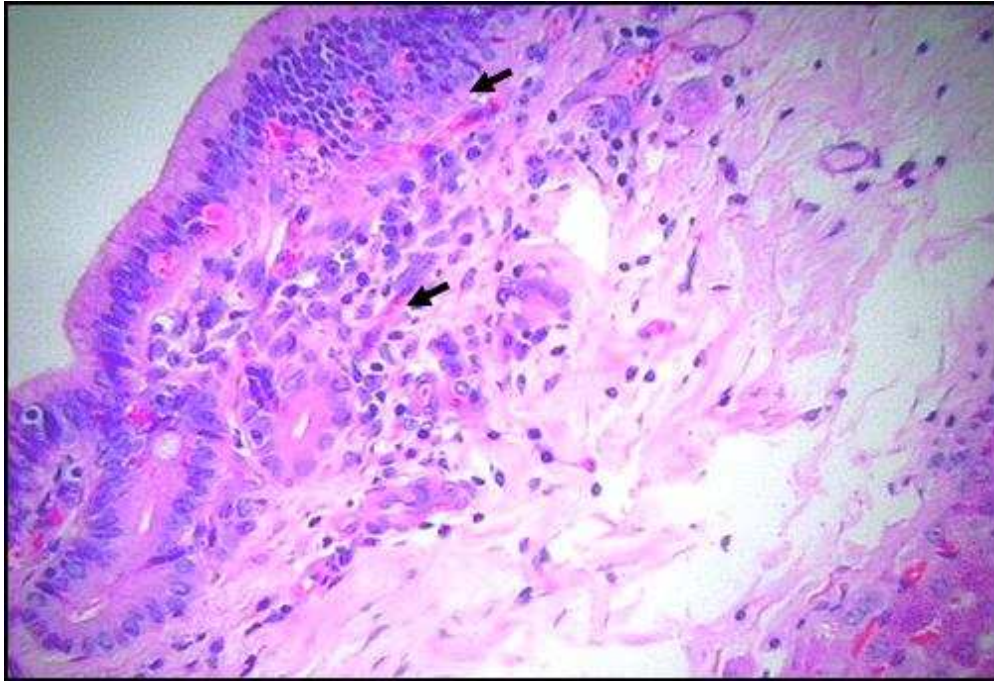


Figura 35 - Fotomicrografia de vesícula biliar exibindo edema e infiltrado inflamatório linfocitário (setas) na submucosa da vesícula biliar de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 10x. HE.

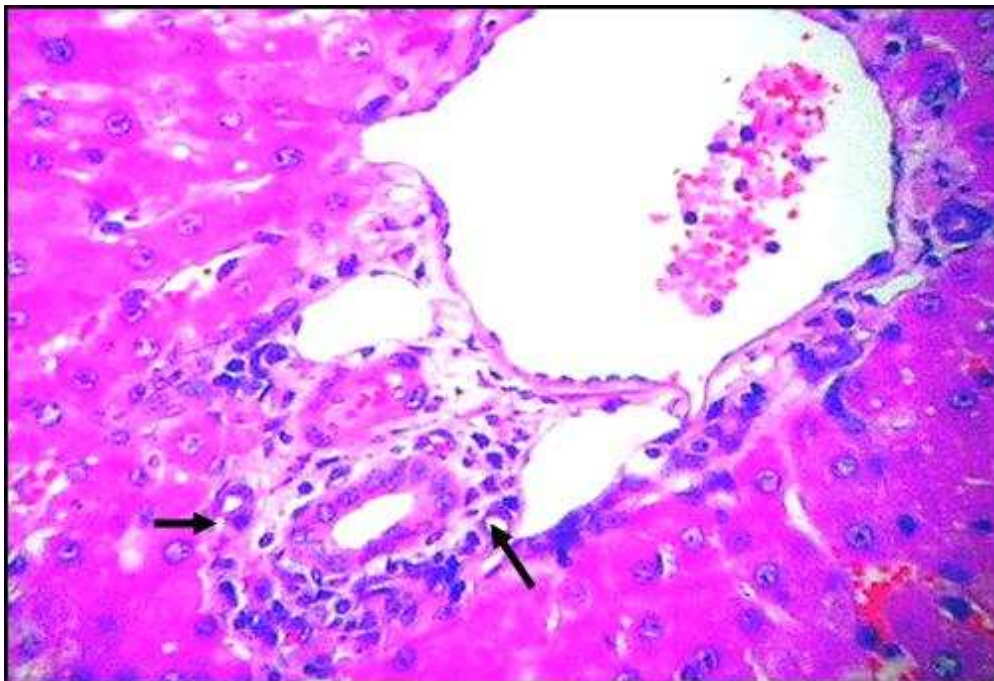


Figura 36 - Fotomicrografia de fígado apresentando infiltrado inflamatório linfocítico periportal (setas) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 20x. HE.

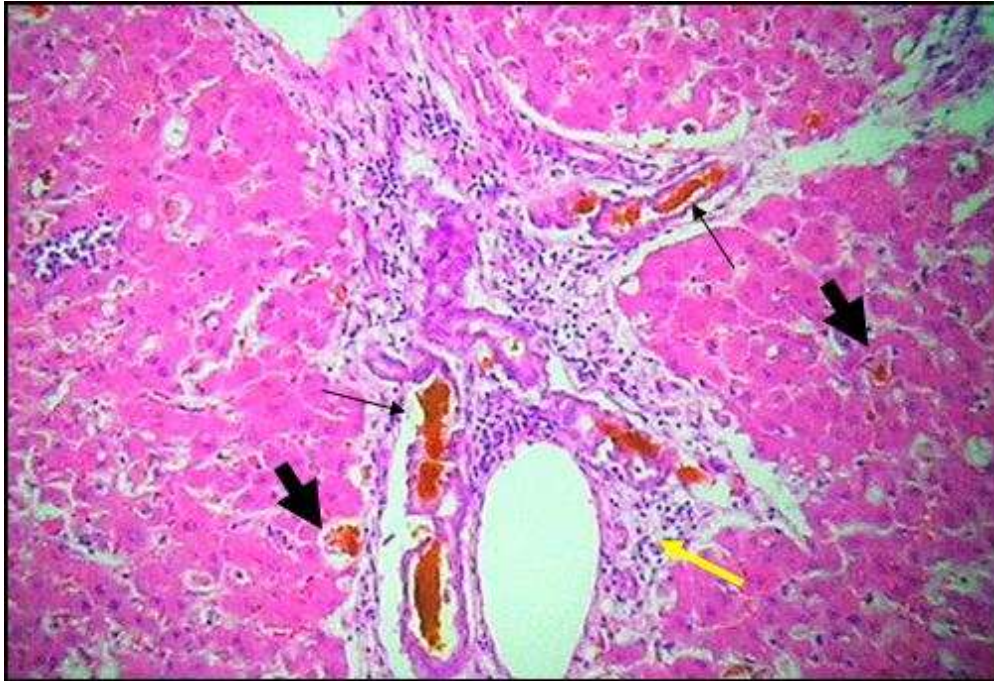


Figura 37 - Fotomicrografia de fígado exibindo infiltrado periportal (seta amarela) e acentuada colestase extra-hepática (seta fina) e intra-hepática (seta larga) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 4x. HE.

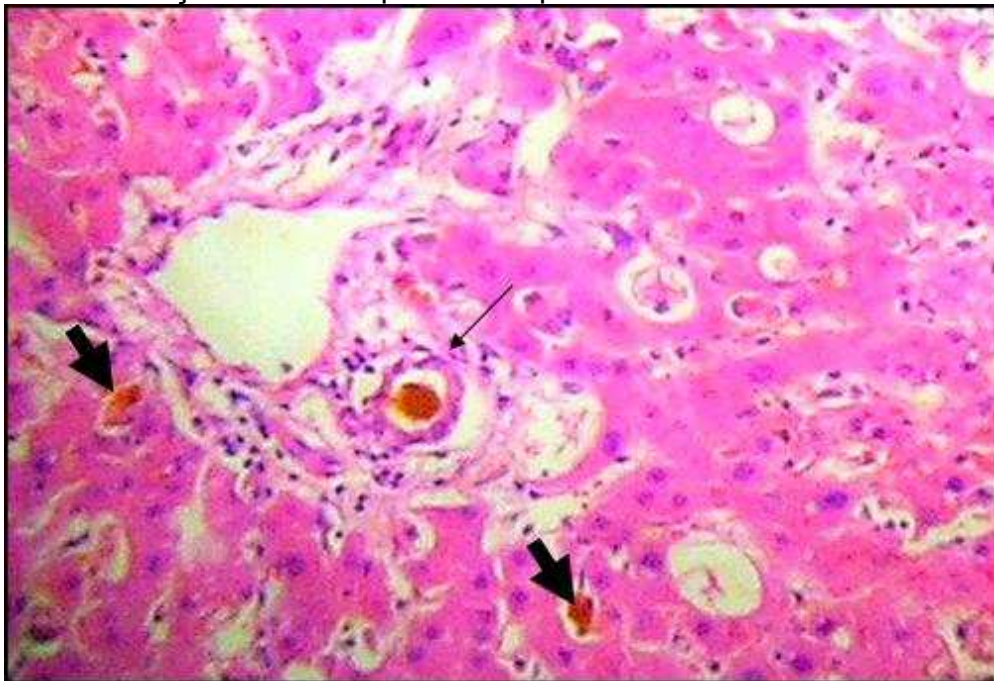


Figura 38 - Fotomicrografia de fígado apresentando colestase extra-hepática (seta fina) e intra-hepática (seta larga) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 10x. HE.

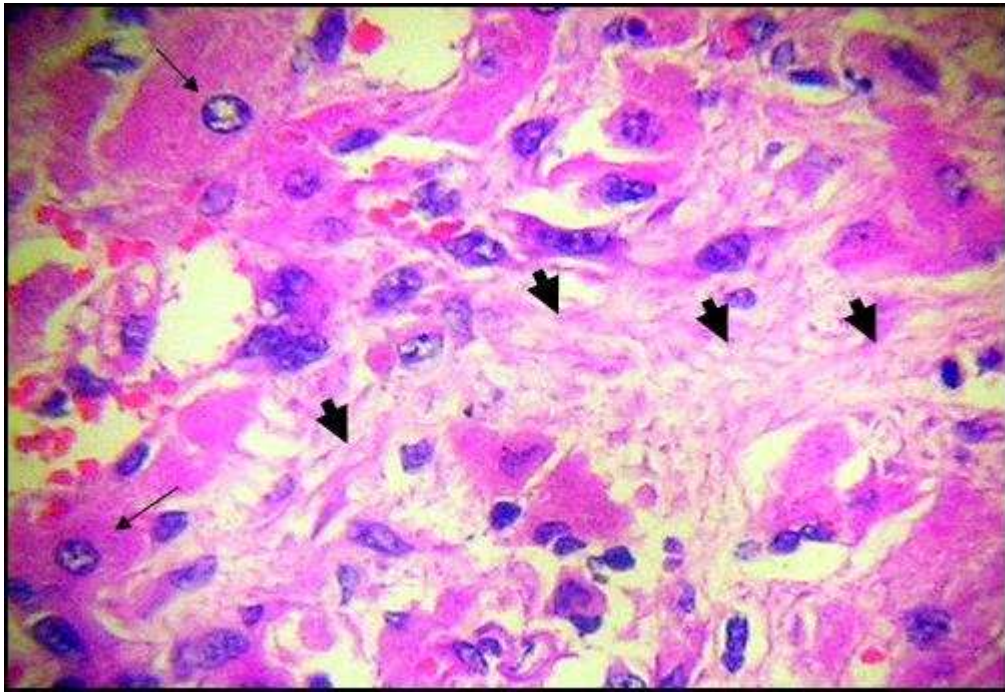


Figura 39 - Fotomicrografia de fígado exibindo desorganização de cordões de hepatócitos, megalocitose (seta fina) e áreas de necrose de hepatócitos (seta larga) de ovino com intoxicação crônica experimental por cobre. 40x. HE.

6. DISCUSSÃO

Conforme trabalhos realizados por ORTOLANI (1996), MACHADO (1998) e SOARES (2004) a intoxicação crônica por cobre em ovinos apresenta uma fase pré-hemolítica e hemolítica, sendo que durante a fase pré-hemolítica, sem que haja informações relevantes no histórico dos animais, o diagnóstico clínico é extremamente difícil.

Para desencadeamento da fase hemolítica, o protocolo experimental proposto por MACHADO (1998) e utilizado neste trabalho apresentou grande eficácia. Entretanto, a quantidade total de sulfato de cobre fornecida aos animais do G-2, foi elevada quando comparada aos resultados encontrados por MACHADO (1998) e SOARES (2004). A provável explicação para essa diferença encontra-se no padrão racial dos animais, sendo que MACHADO (2008) utilizou animais cruzados ($\frac{1}{2}$ sangue Sulfok x $\frac{1}{2}$ sangue Crioulo) e SOARES (2004) ovinos da raça Santa Inês, enquanto no presente estudo os animais eram sem raça definida. Esses resultados fortalecem a premissa de que algumas raças de ovinos como a Sulfok e a Texel são mais susceptíveis à intoxicação do que a Scottish Blackface, a Merino e a Welch, e a predisposição tem relação direta com uma maior capacidade de absorver o cobre dietético e posteriormente retê-lo no fígado (ORTOLANI, 1996).

Após a saturação hepática e a liberação de cobre no plasma, ocorrem danos expressivos nas membranas dos eritrócitos, culminando com um quadro de anemia hemolítica, promovendo uma redução de 60% dos valores iniciais de eritrócitos. A eliminação de hemoglobina pela urina, induz um quadro de hemoglobinúria macroscópica, levando a necrose tubular aguda, assim, mesmo que os ovinos se recuperem da anemia, os mesmos podem desenvolver um quadro de insuficiência renal aguda, levando-os a morte (ORTOLANI, 1996). Entretanto vale ressaltar que antes do início da crise hemolítica os animais exibem sinais clínicos, como apatia, inapetência e anorexia. O momento do aparecimento desses sinais clínicos foi semelhante aos obtidos por ORTOLANI et al. (2003), enquanto SOARES (2004) notou o aparecimento de diarreia com muco e anorexia cerca de quatro e dois dias antes da crise hemolítica, respectivamente. A presença dos sinais clínicos evidenciados neste estudo associados com um histórico compatível de intoxicação indicaria o início de tratamento preventivo à crise hemolítica.

Com o desenvolvimento da crise hemolítica o quadro clínico do animal se agrava rapidamente. Neste momento os sinais clínicos apresentados pelos ovinos do G-2 foram semelhantes aos relatados por ROUBIES et al. (2008). No dia da crise, ocorre uma baixa no número de hemácias afetando o transporte de oxigênio e nutrientes adequados para manutenção da homeostase corporal, fazendo com que os animais apresentem um quadro marcante de apatia e dispnéia. Além desses sinais, a presença de mucosas achocolatadas foi muito comum. MACHADO (1998) observou mucosas achocolatadas até o terceiro dia após a crise hemolítica, sendo que posteriormente a coloração das mucosas passou para ictérica. Segundo JAIN (1993), a observação de mucosas achocolatadas deve-se à presença de metahemoglobina.

Devido á hemólise, ocorreram alterações significativas nos hemogramas dos animais do G-2, quando comparados aos do G-1 e aos momentos anteriores ao M4. Dessa maneira, o número de hemácias declinou aproximadamente 50% no decorrer de 48 horas após a detecção da crise hemolítica. Resultados semelhantes foram obtidos por MACHADO (1998), ORTOLANI (2003), SOARES (2004) e ROUBIES (2008). A redução no número de hemácias associada ao processo hemolítico possibilitou uma redução significativa nos valores de hematócrito e de hemoglobina.

Em relação à morfologia eritrocitária pode-se verificar que durante os momentos M0 a M3 houve predomínio de hemácias com padrão discóide e cerca de 15% na forma de macrócitos, quinizócitos e dacriócitos. Segundo JAIN (1993) e FELDMAN (2000) a presença de dacriócitos se deve a alterações no citoesqueleto protéico das hemácias devido a eventos deformantes. Estas alterações são observadas principalmente nas anemias associadas com a presença de corpúsculos de Heinz, talassemias e mielofibrose. Os macrócitos representam eritrócitos morfologicamente normais possuindo volume corpuscular médio acima do normal, enquanto os quinizócitos compreendem hemácias com uma faixa central de hemoglobina, formando dois espaços livres na superfície das hemácias, criando um aspecto de uma célula tricôncava. Apesar deste tipo de células estarem associadas a quadros de anemia em humanos e cães (FELDMAN, 2000), no presente estudo o encontro de baixa porcentagem destas células tanto no G-1 quanto no G-2 sugere que alterações morfológicas podem estar presentes devido ao metabolismo e constante renovação eritrocitária.

Os mecanismos que promovem as alterações morfológicas nas membranas das hemácias não estão completamente elucidados. O mecanismo da hemólise promovida pela intoxicação cúprica não está bem elucidado. Segundo JAIN (1993) e INABA (2000) os efeitos citotóxicos ocorrem devido à interação do cobre com os grupos sulfidrilas das proteínas de membrana dos eritrócitos e da peroxidação lipídica das membranas, gerando neste processo a formação de agentes oxidantes, além da inibição de enzimas importantes para os glóbulos vermelhos como a glutathione redutase, 6-glicose-D-fosfato e a piruvato quinase, ocasionando inibição do metabolismo oxidativo celular, permitindo que o cobre lesione a membrana eritrocitária, alterando sua morfologia e gerando um quadro hemolítico. Entretanto, pode-se afirmar baseado nos estudos de SOARES (2004), que todas as lesões a membrana dos eritrócitos estão relacionadas a alterações no metabolismo oxidativo eritrocitário gerado pelo cobre.

O padrão eritrocitário nos momentos M4 a M6 foi marcado pela presença de acantócitos, que são eritrócitos espiculados, com severas projeções em sua superfície. A presença destes deve-se às alterações nos fosfolípidos de membrana dos eritrócitos, e geralmente estão associados à presença de doenças hepáticas difusas, e dietas com altos níveis de colesterol. Segundo SOARES (2004), Durante a crise hemolítica ocorre uma diminuição na quantidade de glutathione reduzida eritrocitária e aumento dos teores séricos de malonildialdeído, confirmando a presença de danos oxidativos nos eritrócitos e demais tecidos. Estomatócitos estão relacionados com a presença de doença hepática obstrutiva e associados a anemias crônicas em cães. Os codócitos, comumente chamados de células alvo (“target cells”) são eritrócitos com uma área central densa de hemoglobina, devido a alterações da membrana celular ou pelo decréscimo dos níveis de hemoglobina celular ou ambas as causas. São encontrados nas anemias hipocrômicas e em doenças hepáticas que levam a colestase (FELDMAN, 2000).

Além de acantócitos e codócitos evidenciou-se a presença de queratócitos, que são eritrócitos irregulares com espículas, estando relacionados com a presença de coagulação intravascular disseminada, anemia hemolítica microangiohepática e falência renal. A presença de corpúsculos de Heinz foi constatada 48 horas após a crise hemolítica.

Durante a crise hemolítica os animais do G-2 apresentaram um quadro de leucocitose com neutrofilia e linfócitos dentro dos valores estabelecidos para a espécie (PUGH, 2005); entretanto, os linfócitos apresentaram-se em menor número quando comparados ao G-1. Estes achados corroboram os resultados de MÉNDEZ,(2001).

A enzima gama glutamiltransferase foi um excelente indicador da intoxicação crônica por cobre nos ovinos do grupo G-2, uma vez que sua atividade começou a aumentar 30 dias antes do aparecimento da crise hemolítica (M1) possuindo atividades mais intensas nos momentos M2 e M3 da intoxicação experimental. Com o desencadeamento da crise hemolítica sua atividade foi ainda maior. Resultados semelhantes foram encontrados por MACHADO (1998), AUZA, et al., (1999) e MÉNDEZ (2001), que verificaram que a atividade de GGT se elevou em torno de 28 dias antes da manifestação da crise hemolítica. LEMOS et al. (1997), também evidenciaram aumentos nos níveis de GGT, entretanto, esses aumentos foram identificados a partir de 21 dias antes do aparecimento das alterações clínicas. A possível explicação para um aumento precoce de GGT, pode estar relacionado a um quadro de compressão de ductos biliares, devido a congestão hepática.

Tratando-se da AST, enquanto MACHADO (1998) obteve aumentos significativos na atividade desta enzima com 14 dias antes da crise hemolítica, neste estudo o aumento na atividade de AST foi notado sete dias antes da manifestação clínica da intoxicação experimental (M3), apresentando atividade sérica superior a 300 U/L. UNDERWOOD & SUTTLE (2001), relataram que a enzima AST é um excelente indicador de intoxicação cúprica, entretanto pode-se evidenciar neste estudo que a atividade de GGT apresentou um aumento mais precoce. Apesar da GGT ser um indicador precoce da intoxicação cúprica, os aumentos de AST, podem indicar com maior precisão o aparecimento da crise hemolítica, uma vez que esta enzima indica a presença de necrose hepática (TENNANT, 1997).

Em relação á atividade sérica de CK evidenciou-se que sua cinética tanto nos ovinos do G-1, quanto no G-2 mantiveram-se sem diferença considerável até o M4. Nos momentos M5 e M6 notou-se um aumento significativo na atividade sérica de CK nos ovinos do G2. O aumento na atividade sérica da CK, nos momentos M5 e M6, pode estar relacionado com o decúbito apresentado pelos ovinos intoxicados, o que gera um quadro de lesão muscular.

Os teores séricos de proteína total mantiveram-se semelhantes entre os ovinos do G-1 e G-2 durante todas as fases da intoxicação crônica por cobre. Através da eletroforese em gel de poliacrilamida pode-se evidenciar o comportamento de algumas proteínas durante os momentos da intoxicação. Dentre essas proteínas, a ceruloplasmina, a transferrina, a proteína de 35.000 Da e a IgG de cadeia leve foram as que apresentaram alterações marcantes durante os momentos de intoxicação.

A ceruloplasmina apresentou redução de seus teores séricos nos ovinos do G2 durante os momentos M1 a M4, quando comparados aos valores basais, e no M5 (24 horas após a crise hemolítica) sua atividade aumentou 37%. FLORIS et al. (2000) descrevem que em pacientes humanos com a doença de Wilson (intoxicação crônica por cobre) apresentam teores circulantes de ceruloplasmina reduzidos ou indetectáveis. O aumento de ceruloplasmina observado no M5 ocorre pelo fato da ceruloplasmina ser uma proteína de fase aguda e responder ao processo inflamatório desencadeado pela hemólise. GUTTERIDGE et al. (1980) relatam que a ceruloplasmina atua como um importante antioxidante, inibindo processos de peroxidação lipídica de forma muito mais potente que a superóxido dismutase e a catalase. Assim durante a crise hemolítica a ceruloplasmina executa um papel de proteção celular contra radicais livres corroborando com o trabalho de SOARES (2004) que encontrou a presença de maior atividade antioxidante durante o auge da crise hemolítica.

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, cujos teores séricos tendem a diminuir na presença de condição inflamatória (KANEKO, 1997). Entretanto neste estudo essa proteína apresentou-se com atividade elevada nos ovinos do G-2 nos momentos M1 a M6 da intoxicação cúprica acumulativa, tendo seu aumento máximo no M2, quando atingiu 126% quando comparado ao M0. O aumento da transferrina no M2 coincidiu com o momento em que ocorreu a maior redução sérica da ceruloplasmina nos ovinos do G-2. No M4 a transferrina apresentou um aumento de 76% nos ovinos do G-2. O aumento dos teores séricos de transferrina podem estar associados à lesão hepática (KANEKO, 1997) relacionada com o acúmulo de cobre.

O aumento de IgG de cadeia leve principalmente no momento M4 pode estar relacionado tanto às lesões hepáticas quanto à anemia hemolítica presente (KANEKO,

1997). A proteína de 35.000 Da apresentou-se elevada durante os momentos M1 a M6 da intoxicação cúprica acumulativa, apresentando uma elevação de 328% em sua atividade no M2.

O quadro clínico patológico assim como as alterações morfológicas nos eritrócitos foram influenciados diretamente pela quantidade de cobre liberado, além da resposta individual apresentada dos animais.

A liberação de cobre na circulação sanguínea ocorreu no M4, nos ovinos do G-2. Entretanto, notou-se que os animais do G-2 apresentaram teores séricos de cobre significativamente mais elevados que os ovinos do G-1 nos momentos M2 e M3, porém essa elevação encontrou-se dentro dos limites estabelecidos para a espécie. No momento M4 os teores séricos de cobre elevaram-se significativamente e nos momentos M5 e M6 esses valores reduziram em relação ao M4, entretanto permaneceram elevados.

Os achados bioquímicos associados às alterações obtidas no proteinograma sérico sugerem que a lesão hepática tenha se iniciado no M2, ocorrendo um período de 15 dias para completa saturação dos hepatócitos e liberação de cobre na corrente circulatória.

A necropsia dos animais intoxicados revelou icterícia generalizada, fígado friável de cor amarelada, rins de coloração marrom escuro, e urina com coloração acastanhada. Na histopatologia hepática evidenciou-se hepatócitos aumentados de tamanho, pleomórficos e com vacúolos de diversos tamanhos em seu citoplasma e colestase intra e extra-hepática corroborando com os trabalhos de BOSTWICK (1982), RIET-CORREA et al. (1989), LEMOS, et al. (1997), MÉNDEZ, (2001) e ROUBIES et al. (2008) A desorganização dos cordões de hepatócitos e a presença de infiltrado inflamatório linfocítico periportal não foi evidenciada em outros trabalhos.

7. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho pode-se concluir que:

- O modelo experimental utilizado apresentou-se eficaz;
- A enzima GGT apresentou-se como um indicador precoce da intoxicação cúprica acumulativa;
- Os teores séricos de ceruloplasmina apresentaram-se diminuídos e os teores de transferrina, proteína de 35.000 Da e IgG de cadeia leve apresentaram-se aumentados 15 dias antes da crise hemolítica;
- Os principais sinais clínicos dos animais intoxicados foram: anorexia, mucosas amareladas, fezes amolecidas de coloração verde-escura e hemoglobinúria;
- Durante a crise hemolítica os ovinos intoxicados apresentaram um quadro de anemia macrocítica normocrômica associado a leucocitose por neutrofilia, elevação nas atividades séricas de AST e GGT, predomínio de hemácias com morfologia de acantócitos e hipercupremia;
- Os principais achados de necropsia caracterizam-se por mucosas, fígado e demais tecidos de coloração amarelada, rins enegrecidos e urina acastanhada;
- As principais alterações histológicas no fígado dos animais intoxicados foram: megalocitose de hepatócitos, desorganização de cordões de hepatócitos, colestase intra e extra-hepática e infiltrado inflamatório linfocítico peri-portal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUZA, N. J.; OLSON, W. G.; MURPHY, M. J.; LINN, J. G. Diagnosis and treatment of copper toxicosis in ruminants. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 214, n. 11, p. 1624 – 1628, 1999.
- BOSTWICK, J. L. Copper toxicosis in sheep **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 180, n. 4, p. 386 – 387, 1982.
- BRADBERRY, S. Copper. **Medicine**, v. 35, n. 11, p. 608, 2007.
- FLORIS, G.; MEDDA, R.; PADIGLIA, A.; MUSCI, G. The physiopatological significance of ceruloplasmin/ a posible therapeutic approach. **Bio. Pharm.**, v. 60, p. 1735 – 1741, 2000.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS. 2000. 438p.
- GOONERATNE, S.R., BUCKLEY, W.T., CHRISTENSEN, D.A. Rewiew of copper deficiency and metabolism in ruminants. **Can. J. Anim. Sci.**, v.69, p.819-845, 1989.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; RICHMOND, R.; HALLIWELL, B. Oxygen free-radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein caeruloplasmin. **Febs Letters**. v. 112, n. 2, p. 269 – 271, 1980.
- HUMANN-ZIEHANK, E.; BICKHARDT, K. Effects so d-penicillamine on urinary copper excretion in high-copper supplemented sheep. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v. 48, n. 9, p.537-544, 2001.
- HUMPHRIES, W. R.; MORRICE, P. C.; BREMNER, I. A convenient method for the treatment of chronic copper poisoning in sheep using subcutaneous ammonium tetrathiomolybdate. **Vet. Rec.**, v. 123, n. 2, p. 51-53, jul.1988.
- INABA, M. Red blood cell membrane defects. In: FELDMAN, B. F.; JOSEPH, G. Z.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**, 5. ed. Canada: Lippincot Williams & Wilkins, 2000. p. 1012 – 1020.

- JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
- KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, cap. 5, p. 117 - 138.
- KARGIN, F.; SEYREK, K.; BILDIK, A.; AYPAK, S. Determination of the levels of zinc, copper, calcium, phosphorus and magnesium of chios ewes in the Aydin region. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v 28 p. 609 -612, 2004.
- KOWALCZYK, T.; POPE, A. L.; BERGER, K. C.; MUGGENBURG, B. A. Chronic copper toxicosis in sheep fed dry feed. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 145, n. 4, p. 352 – 358, aug. 1964.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**. v. 227, p. 680 – 685, 1970.
- 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 – 463, 1997.
- LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3 ed., New York: McGraw-hill, 1968, 258p.
- MACHADO, C. H. **Uso de tetratiomolibdato no tratamento de intoxicação cúprica experimental, em ovinos: avaliações clínica e toxicológica**. São Paulo, 1998, 138.f. (Doutorado em Clínica Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1998.
- MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992. 524p.

MÉNDEZ, M. C. Intoxicação crônica por cobre. In: RIET-CORREA, F.; SCHIELD, A. C.; MÉNDEZ, M. C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. v. 1. São Paulo: Livraria Varela, 2001, cap. 2, p.181-186.

MILTIMORE, J.E., MASON, J.L. Cooper to molybdenun ratio and molybdenun and copper concentration in ruminant feeds. **Can. J. Anim. Sci.**, v.51, p.193 – 200, 1971.

ORTOLANI, E. L. Intoxicações e doenças metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica, urolitíase e toxemia da prenhez. In: 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 – 258.

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

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

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005, 513 p.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1747 p.

RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J. A.; MENDEZ, M. C. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 9, n. 3/ 4, p. 51-54, 1989.

ROUBIES, N.; GIADINIS, N. D.; POLIZOPOULOU, Z.; ARGIROUDIS, S. A retrospective study of chronic copper poisoning in 79 sheep flocks in Greece (1987 – 2007). **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, n. 31, p. 181 – 183, 2008.

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

SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna Veterinária de Grandes Animais**. São Paulo: Manole, 3. ed., 2006.

SOARES, P. C. **Efeitos da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratimolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos**. São Paulo, 2004, 117.f. (Doutorado em Clínica Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

TENNANT, B. C. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, cap. 13, p. 327-349.

TURK, J. R.; CASTEEL, S. W. Clinical biochemistry in toxicology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, cap. 28, p. 829-832.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, 582p.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3 ed. Wallingford: Cabi Publishing, 2001. 614 p.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1998. 196p.

ZHANG, Y.; LI, B.; CHEN, C.; GAO, Z. Hepatic distribution of iron, copper, zinc and cadmium-containing proteins in normal and iron overload. **Biometals**. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/j2r366022l7kt481/>> Acesso em: setembro de 2008.

APÊNDICE 1

Tabela 16 – Composição bromatológica do feno de capim Tifton e ração concentrada oferecidos aos ovinos, durante o experimento.

Composição Bromatológica	Alimentação	
	Feno	Concentrado
Matéria seca (%)	88,25	89,34
Matéria mineral (%)	4,75	17,81
Proteína Bruta (%)	5,25	9,43
Fibra Bruta (%)	34,25	20,10
Extrato Etéreo (%)	1,78	1,52
Extrato Não Nitrogenado (%)	53,98	51,16
Cálcio (%)	0,47	1,56
Fósforo (%)	0,21	0,34
Enxofre (%)	0,15	0,19
Cobre (ppm)	5,0	7,0
Molibdênio (ppm)	1,15	0,30

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)