



KILDER HENRIQUE GUIMARÃES ALVES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS, HEMOGASOMÉTRICOS E
METABOLISMO OXIDATIVO EM OVINOS INTOXICADOS COM COBRE, TRATADOS
OU NÃO COM TETRATIOMOLIBDATO**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Departamento:
Medicina Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Pierre Castro Soares

**Recife
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS, HEMOGASOMÉTRICOS E
METABOLISMO OXIDATIVO EM OVINOS INTOXICADOS COM COBRE, TRATADOS
OU NÃO COM TETRATIOMOLIBDATO**

Dissertação de mestrado elaborada por

Kilder Henrique Guimarães Alves

Aprovada em: 08 de outubro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Castro Soares
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Dr. José Augusto Bastos Afonso
Clínica de Bovinos de Garanhuns – UFRPE

Prof. Dr. Eduardo Ferreira Cole
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela oportunidade da vida.

Ao Prof. Dr. Pierre Castro Soares e Prof. Dr. Eduardo Ferreira Cole, que me fizeram resgatar a esperança e o convívio no retorno a Medicina Veterinária. Que mais do que orientadores, foram pessoas especiais no desenvolvimento do curso e na cura das feridas, limitações a que hoje posso dizer, estou livre.

DEDICATÓRIA

A todos que de maneira direta ou indiretamente me apóiam.



“NUNCA DEVEMOS TER MEDO DE SER UM SINAL DE CONTRADIÇÃO PARA O MUNDO”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

ALVES, K.H.G. Avaliação dos parâmetros físicos, hemogasométricos e metabolismo oxidativo em ovinos intoxicados com cobre, tratados ou não com tetratiomolibdato. [Physical parameters, blood gas and oxidative metabolism in lambs poisoned with cooper, treated or not with tetrathiomolybdate]. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

Para avaliar a influência da intoxicação cúprica cumulativa e do seu tratamento com tetratiomolibdato de amônia (TTM) no perfil clínico, hemogasométrico e metabolismo oxidativo, foram utilizados 10 cordeiros da raça Santa Inês que receberam doses crescentes de sulfato de cobre, até o surgimento de hemoglobinúria macroscópica. Neste momento foram distribuídos ao acaso cinco ovinos para cada um dos dois grupos; o primeiro foi mantido como controle (C) e o grupo subsequente (TTM) tratado diariamente, no decorrer de quatro dias, com 3,4 mg TTM por kg de peso vivo. Todos os ovinos do grupo C sucumbiram no decorrer de quatro dias, enquanto que tal fato só ocorreu em um animal tratado com TTM. A intoxicação provocou um quadro clínico típico, gerando grandes alterações em diferentes parâmetros físicos, concomitantemente com determinação de distúrbio metabólico, caracterizado por acidose respiratória e alcalose metabólica. No tocante ao metabolismo oxidativo o quadro tóxico provocou intensa formação de radicais livres, representada por elevada concentração sérica de malondialdeído, redução no teor de glutathione reduzida eritrocitária, embora tenha aumentado a capacidade antioxidante no plasma. Quanto maior foi a concentração de cobre livre no sangue maior foi a lipoperoxidação. O uso adequado de TTM na intoxicação cúprica cumulativa em ovinos propiciou redução na formação de radicais livres, aumento da glutathione reduzida eritrocitária, melhora gradual do quadro clínico e dos sinais clínicos e hemogasométrico.

Palavras Chaves: Patologia clínica, sangue, tratamento, oligoelementos, ruminantes.

ABSTRACT

ALVES, K.H.G. Physical parameters, blood gas and oxidative metabolism in lambs poisoned with cooper, treated or not with tetrathiomolybdate [Avaliação dos parâmetros físicos, hemogasométricos e metabolismo oxidativo em ovinos intoxicados com cobre, tratados ou não com tetratiomolibdato] 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

Ten Santa Inês lambs were used to study the effects of cumulative copper poisoning and the treatment with ammonium tetrathiomolybdate (TTM) on clinical profile, blood gas and oxidative metabolism. The lambs were drenched with increasing doses of copper sulfate until the onset of macroscopic hemoglobinuria. So the lambs were randomly distributed in two groups of five sheep each and treated (TTM) or not (C) with tetrathiomolybdate (3.4 mg/kg BW/ per day, for four days). All sheep C succumbed in four days of hemoglobinuria, while only one lamb died in the other group. The poisoning caused a typical clinical picture, creating major changes in various clinical parameters, together with determination of metabolic disorder, characterized by respiratory acidosis and metabolic alkalosis. With regard to the framework toxic oxidative metabolism caused intense formation of free radicals, showing a high serum malondialdehyde, reduction in the level of erythrocyte glutathione reduced, and increased the capacity anti-oxidant in plasma. High copper concentration in blood resulted in larger lipoperoxidation. The appropriate use of TTM in this status provided reduction in the formation of free radicals, increased the concentration of reduced erythrocyte glutathione, and also promoted gradual improvement of the clinical signs, clinical and gasometrical profile.

Key Words: Clinical pathology, blood, treatment, minerals, ruminants.

LISTA DE QUADRO

	Pg.
Quadro 1- Composição química da dieta, composta por feno de capim <i>Coast-cross</i> e do concentrado comercial, com base na matéria seca (MS)	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Identificação, dose acumulada de cobre (g) e total de dias necessários para ocorrência da intoxicação dos ovinos dos grupos controle e TTM	41
Tabela 2-	Valores de medianas e limites inferior e superior do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa	42
Tabela 3-	Valores individuais de cobre no tecido hepático dos ovinos induzidos à intoxicação cúprica cumulativa, tratados ou não com TTM	43
Tabela 4-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da frequência cardíaca (bpm) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	44
Tabela 5-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da frequência respiratória (mrp) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	46
Tabela 6-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	48
Tabela 7-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da motilidade ruminal (3 min) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	50

Tabela 8-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) do peso vivo (Kg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	52
Tabela 9-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) do volume urinário (mL/3h) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	54
Tabela 10-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) do pH sanguíneo de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	56
Tabela 11-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da pressão parcial de gás carbônico (PCO ₂) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	58
Tabela 12-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da pressão parcial de oxigênio (PO ₂) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	60
Tabela 13-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da concentração de bicarbonato (HCO ₃) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	62
Tabela 14-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) do total de dióxido de carbono (tCO ₂) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	64

- Tabela 15- Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) do excesso ou déficit de base (ABE) sanguíneo (mEq/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008 66
- Tabela 16- Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da saturação de oxigênio (sO₂) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008 68
- Tabela 17- Valores de medianas, percentis (P₂₅ e P₇₅) e níveis de significância (*P*) da concentração sanguínea de malondialdeído (MDA) (μMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008 70
- Tabela 18- Valores de medianas, percentis (P₂₅ e P₇₅) e níveis de significância (*P*) da concentração da glutathiona (GSH) nos eritrócitos (mg de GSH/mL de sangue) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008 72
- Tabela 19- Valores de medianas, percentis (P₂₅ e P₇₅) e níveis de significância (*P*) da atividade da glicose – 6 – fostato – desidrogenase (G-6-PD) no sangue (UI/g Hb) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008 74
- Tabela 20- Valores de medianas, percentis (P₂₅ e P₇₅) e níveis de significância (*P*) da habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) (μMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008 76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Valores de mediana da concentração sérica de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa	42
Gráfico 2-	Valores médios e desvios-padrão da frequência cardíaca (bpm) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa	45
Gráfico 3-	Valores médios e desvios-padrão da frequência respiratória (mrp) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa	47
Gráfico 4-	Valores médios e desvios-padrão da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa	49
Gráfico 5-	Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (<i>P</i>) da motilidade ruminal (3 min) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa – Recife – 2008	51
Gráfico 6-	Valores médios e desvios-padrão do peso vivo (Kg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa	53
Gráfico 7-	Valores médios e desvios-padrão do volume urinário (mL/3h) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa	55
Gráfico 8-	Valores médios e desvios-padrão do pH sanguíneo de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa	57
Gráfico 9-	Valores médios e desvios-padrão da pressão parcial de gás carbônico (PCO_2) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa	59

- Gráfico 10- Valores médios e desvios-padrão da pressão parcial de oxigênio (PO_2) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 61
- Gráfico 11- Valores médios e desvios-padrão da concentração de bicarbonato (HCO_3) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 63
- Gráfico 12- Valores médios e desvios-padrão do total de dióxido de carbono (tCO_2) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 65
- Gráfico 13- Valores médios e desvios-padrão do excesso ou déficit de base (ABE) sanguíneo (mEq/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 67
- Gráfico 14- Valores médios e desvios-padrão da saturação de oxigênio (sO_2) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 69
- Gráfico 15- Valores de medianas da concentração sanguínea de malondialdeído (MDA) (μ Mol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 71
- Gráfico 16- Valores de medianas da concentração da glutathiona (GSH) nos eritrócitos (mg de GSH/mL de sangue) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 73

- Gráfico 17- Valores de medianas da atividade da glicose – 6 – fostato – desidrogenase (G-6-PD) no sangue (UI/g Hb) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 75
- Gráfico 18- Valores de medianas da habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) ($\mu\text{Mol/L}$) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 77
- Gráfico 19- Relação entre a concentração de HCO_3 (mMol/L) e ABE (mEq/L) sanguíneos em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 78
- Gráfico 20- Relação entre concentração de PCO_3 (mmHg) e tCO_2 (mMol/L) sanguíneos em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 79
- Gráfico 21- Relação entre a concentração de HCO_3 (mMol/L) e pH sanguíneos em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 80
- Gráfico 22- Relação entre a concentração do ABE (mEq/L) e o pH sanguíneo em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 81
- Gráfico 23- Relação entre a PCO_2 (mmHg) e o pH sanguíneo em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 82
- Gráfico 24- Relação entre o MDA ($\mu\text{mol/L}$) e a G6PD (UI/g Hb) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 83
- Gráfico 25- Relação entre o MDA ($\mu\text{mol/L}$) e o método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 84

- Gráfico 26- Relação entre concentração sérica do cobre ($\mu\text{Mol/L}$) e da concentração de MDA ($\mu\text{Mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 85
- Gráfico 27- Relação entre a concentração sérica do cobre ($\mu\text{Mol/L}$) e a atividade da GSH (mg GSH/mL de sangue) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 86
- Gráfico 28- Relação entre o teor sérico de cobre ($\mu\text{Mol/L}$) e a habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa 87

SUMÁRIO

		Pg.
1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Cobre	18
1.2.	Intoxicação por Cobre	19
1.3.	Equilíbrio Ácido-Básico	22
1.4.	Estresse Oxidativo e ICC	25
2.	OBJETIVOS	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1.	Animais	32
3.2.	Alimentos e Alimentação	32
3.3.	Delineamento Experimental e Modelo de Indução da Intoxicação Cúprica	33
3.4.	Tratamento dos Animais	35
3.5.	Exame Físico	35
3.6.	Exames Laboratoriais	35
3.6.1.	Coleta de Sangue	35
3.6.2.	Coleta de Fígado	36
3.7.	MÉTODOS ANALÍTICOS	36
3.7.1.	Determinação da Hemoglobina	36
3.7.2.	Análise Hemogasométrica	36
3.7.3.	Concentração Sérica de Cobre	37
3.7.4.	Índice de Peroxidação Lipídica (Malondialdeído)	37
3.7.5.	Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH)	37
3.7.6.	Atividade Enzimática da Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PD)	38
3.7.7.	Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)	38
3.7.8.	Determinação do Cobre no Fígado, Concentrado e Feno	39
3.7.9.	Análise Estatística	39
4.	RESULTADOS	40
4.1.	Modelo de Indução	40

4.2.	Cobre Sérico	41
4.3.	Cobre Hepático	42
4.4.	PARÂMETROS CLÍNICOS	44
4.4.1.	Freqüência Cardíaca	44
4.4.2.	Freqüência Respiratória	46
4.4.3.	Temperatura Retal	48
4.4.4.	Motilidade Ruminal	50
4.4.5.	Peso Vivo	52
4.4.6.	Volume Urinário	54
4.5.	PARÂMETROS HEMOGASOMÉTRICOS	56
4.5.1.	pH sanguíneo	56
4.5.2.	Pressão Parcial de Gás Carbônico Sanguíneo	58
4.5.3.	Pressão Parcial de Oxigênio Sanguíneo	60
4.5.4.	Concentração de Bicarbonato Sanguíneo	62
4.5.6.	Total de Dióxido de Carbono Sanguíneo	64
4.5.7.	Excesso ou Déficit de Base Sanguíneo	66
4.5.8.	Saturação de Oxigênio Sanguíneo	68
4.6.	METABOLISMO OXIDATIVO	70
4.6.1.	Concentração Sanguínea de Malondialdeído	70
4.6.2.	Concentração de Glutathiona nos Eritrócitos	72
4.6.3.	Atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	74
4.6.4.	Habilidade de Redução Férrica Plasmática	76
4.7.	ANÁLISE DE RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS	78
5.	DISCUSSÃO	89
5.1.	Aspectos Clínicos da Intoxicação Cúprica e Tratamento	89
5.2.	Perfil Hemogasométrico	92
5.3.	Metabolismo Oxidativo	97
6.	CONCLUSÕES	103
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A relação mútua entre a agropecuária e agroindústria foi um dos fatores notáveis para o processo de crescimento da economia dos países hoje desenvolvidos. Historicamente está provado que o crescimento desses dois setores da economia aconteceu de forma estritamente entrelaçada e dependente.

Nesse contexto, a agroindústria vem adquirindo importância cada vez maior no processo de desenvolvimento, pela possibilidade de gerar maior valor agregado à produção no meio rural, além de reunir a economia do campo ao sistema industrial.

A agroindústria associada à atividade da ovino-caprinocultura ainda é pouco expressiva quando comparada a outros segmentos do setor. Isso ocorre devido às deficiências do setor produtivo primário com relação aos manejos reprodutivo, alimentar e sanitário; falta de organização dos produtores na busca de crescimento da atividade e, principalmente, devido a formas tradicionais de relacionamento entre produtores e os diversos elos da cadeia produtiva (RIET-CORREA et al., 2003).

Em diversas regiões do Brasil grande contingente de animais é alimentados com dietas que apresentam falhas em seus constituintes de energia, proteínas, vitaminas e minerais, não correspondem efetivamente os seus requerimentos. Quanto aos minerais, esses podem estar presentes em quantidades regulares ou não, porém frequentemente são observados teores deficientes ou mesmo em proporções desequilibradas entre eles.

Os minerais desempenham funções essenciais para o organismo dos animais e do homem. A principal delas diz respeito a sua participação como componentes estruturais dos tecidos corporais, como no caso do cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg); o flúor (F) nos ossos e dentes e P e enxofre (S) nas proteínas musculares. Também atuam nos tecidos e fluidos corporais como eletrólitos para manutenção do equilíbrio ácido-básico, da pressão osmótica e da permeabilidade das membranas celulares [Ca, magnésio (Mg), sódio (Na), cloro (Cl), potássio (K)]; síntese dos sistemas enzimáticos [ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu) e molibdênio (Mo)] e de vitaminas [cobalto (Co)], além do metabolismo hormonal [Ca e iodo (I)]. Os minerais

estão presentes no meio celular e demais fluidos orgânicos do organismo como sais solúveis (SUTTLE, 1991; ORTOLANI, 1999).

A disponibilidade de nutrientes minerais na dieta são responsáveis por expressivas modificações no desempenho do animal, considerando-se os aspectos de deficiência, intervalo de normalidade e tóxico. Neste contexto, existe um limiar onde determinado nutriente passa do intervalo de deficiência para o de normalidade, conhecido como “limiar mínimo de exigência”. As quantidades destes nutrientes podem ser aumentadas dentro de certo limite, uma vez que o animal pode responder com quadros clínicos de toxidez, devido à oferta exagerada destes nutrientes (SUTTLE, 1991).

Diferentes fatores determinam resposta do animal aos limites considerados mínimos e máximos, como a taxa de crescimento, função fisiológica (gestação, parto, lactação), idade, doenças, estresse térmico, inter-relação entre minerais, manejo nutricional (energia, proteína, vitaminas e água).

1.1. COBRE

O cobre é um microelemento essencial para o organismo animal, sendo encontrado em diversas enzimas que atuam na produção da hemoglobina, formação dos ossos e pigmentação dos pêlos. Além de estar presente em muitas enzimas, o cobre está presente em metaloproteínas como a ceruloplasmina, que regula a atividade da transferrina, e a metalotioneína, que regula a absorção de zinco e do próprio cobre (ORTOLANI, 1999).

É absorvido tanto no intestino (COUSINS, 1985; UNDERWOOD & SUTTLE, 1999). Pode ser tóxico no organismo animal e sua toxicidade é variável entre os ruminantes, sendo o ovino a mais sensível das espécies (SOLI, 1980).

No Brasil, já foram descritos vários surtos de intoxicação cúprica cumulativa (ICC) nesta espécie (RIET-CORREA et al., 1989; RIBEIRO et al., 1995; LEMOS et al., 1997; MAIORKA et al., 1998; PEREIRA et al., 1999 e SANTOS et al., 1999; CASTRO et al., 2007). Como a maioria dos ovinos acometidos é de grande valor zootécnico e como

a letalidade é superior a 80% as perdas econômicas causadas por esta intoxicação são bastante expressivas em nosso meio (ORTOLANI et al., 2003).

A disponibilidade do cobre para o animal é influenciada pelos teores de Mo, S e Fe no trato gastrointestinal. Tais elementos antagonizam a disponibilidade do Cu. (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999). Quando os ovinos são alimentados com dieta rica em concentrados energéticos, pobres em Mo e S, aumenta significativamente o risco de intoxicação cúprica devida à maior disponibilidade do cobre dietético (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999; ORTOLANI, 1999).

O cobre é importante componente de algumas metaloproteínas, muitas das quais são enzimas vitais, quase todas participando de reações de oxido-redução, também participa da hematopoiese por favorecer a absorção intestinal de ferro, bem como sua mobilização. Participa ainda da integridade do sistema nervoso central e da manutenção da estrutura do miocárdio (LEMOS et. al, 1997)

1.2. INTOXICAÇÃO POR COBRE

O excesso ou a falta de cobre, semelhante a outros macros e microelementos, pode provocar a intoxicação ou a carência deste elementos nos animais (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; ANTONELLI, 2007). Dentre as espécies domésticas, sem dúvida a ovina é a mais predisposta a desenvolver tanto o quadro carencial como de intoxicação. Estes quadros estão ligados a diferenças marcantes no metabolismo do cobre relacionadas a raça, pois enquanto algumas têm menor capacidade de retenção do elemento em seus estoques orgânicos, outras o acumulam em demasia, uma vez que os ovinos têm uma maior dificuldade de excretar cobre (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; ORTOLANI, 1993). Também é reconhecido que ovinos jovens em crescimento são muito mais susceptíveis a desenvolverem quadros de intoxicação por cobre, pois podem absorver o cobre dietético de duas a três vezes mais eficientemente que os adultos (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

O aumento na incidência da intoxicação cúprica cumulativa (ICC) no decorrer das últimas décadas está ligado à mudanças de manejo realizadas pelos ovinocultores, que fornecem a seus rebanhos dietas com altos teores de cobre, em especial com o

uso de sais minerais formulados para bovinos, que contém até 5000 ppm deste elemento. Associa-se também o fato, na grande maioria dos casos, dos criadores alimentarem os ovinos com altas quantidades de rações concentradas, a base de grãos como o trigo, milho e soja. Embora a quantidade de cobre presente nestes alimentos não seja tão alta, a sua disponibilidade o é, pois o cobre está ligado à proteínas facilitando a sua absorção pelos ovinos (ANTONELLI, 2007).

A ingestão abrupta de grande quantidade de cobre em curto período de tempo desenvolve um quadro agudo. Ortolani (1996) e Castro et al. (2007) relatam que na forma aguda, o cobre ingerido acima de 500mg em uma única dosagem pode caracterizar intoxicação. Howell e Gawthorne (1987) demonstraram que é mais freqüente a ingestão de quantidades superiores a um grama de cobre. Quando o acúmulo de cobre é progressivo em meses ou anos, até o desenvolvimento do quadro hemolítico é denominado de intoxicação cúprica acumulativa.

A patogenia da ICC em ovinos tem uma seqüência de eventos bioquímicos, apresentando duas fases distintas: pré-hemolítica e hemolítica. No decorrer de meses ou mesmo anos após a ingestão de dietas ricas em cobre vai ocorrendo o acúmulo do mesmo no organismo, principalmente nos hepatócitos periféricos à veia central e na zona pericanular. Com o aumento do acúmulo nos hepatócitos, a distribuição do cobre se modifica nas células. Em condições normais este microelemento está em maior quantidade no núcleo, mas com o acúmulo ele passa a ser estocado também nos lisossomos, que aumentam de tamanho e número dentro das células hepáticas. Quando os estoques hepáticos de cobre ultrapassam determinado limite, geralmente superior a 1400 ppm, pode ocorrer rompimento dos lisossomos provocando necrose intracelular, resultando em morte celular de inúmeros hepatócitos, ocorrendo súbita liberação do cobre para o organismo, que em pouco tempo migra aos eritrócitos provocando intensa hemólise e severos danos renais, que constituem a principal *causa mortis* (MACHADO, 1998; ORTOLANI, 1999; ANTONELLI, 2007).

Os sinais de intoxicação cúprica incluem taquipnéia, depressão, fraqueza, hemoglobinúria, icterícia e morte súbita. O exame macroscópico de animais acometidos revela crise hemolítica grave e rins escuros impregnados com hemoglobina (RIET-CORREA et al., 1989; SOARES, 2004; ANTANELLI, 2007)

Na fase pré-hemolítica verifica-se um menor ganho de peso em cordeiros (VAN SAUN, 1988). Na hemoglobinúria sinais físicos tornam-se evidentes como: anorexia, depressão, fraqueza, sede, taquipnéia, icterícia das mucosas, e na forma aguda diarreia (LEMOS et al.1997; RADOSTITS et al.2000; SARGISON et al, 1994; SOLI, 1980)

Blood e Radostitis (1989) classificam como fatores de causas determinantes para a intoxicação o envenenamento, iatrogenia e dieta, relacionados com a ingestão de água em recipientes com cobre, usam de sulfato de cobre em anti-helmínticos e injeções para correção de fatores carenciais e uso de rações em grãos de alta concentração de energia. Suttle (1991) relata esse processo em concentração maior de cobre de 8 – 15ppm em disposição aos animais.

Ovinos acometidos pela ICA e não devidamente tratados podem sucumbir na sua grande maioria. Quando o tratamento é realizado nos primeiros sinais típicos, em especial na presença de hemoglobinúria, com um quelante específico denominado tetratiomolibdato de amônia a cura pode atingir índices próximo a 100% (MACHADO, 1998; SOARES, 2004).

A terapia da intoxicação cúprica pode ser extremamente eficiente se for iniciada precocemente no decorrer do 1º ao 2º dia após o início da hemoglobinúria, e se for utilizado antídoto específico à base de tetratiomolibdato (TTM), na dose de 3,4 mg/kg do peso vivo (PV) (MACHADO, 1998; SOARES, 2004) ou mesmo utilizar antagonistas capazes de controlar o efetivo metabolismo orgânico do cobre e atender às demandas orgânicas de modo satisfatório (ANTONELLI, 2007).

O TTM é um antídoto que tem grande capacidade de quelar o cobre, bloqueando assim seus efeitos imediatos. Gooneratne et al. (1986) também identificaram que o TTM se liga ao cobre presente no complexo cobre-hemoglobina-lisossomo reduzindo ou praticamente inativando o efeito deste composto como agente nefrotóxico. Machado (1998) comprovou a redução dos teores de uréia e creatinina sérica após o emprego de TTM e Soares (2004) estudaram com detalhes o efeito desse medicamento na melhora da função renal de ovinos com intoxicação cúprica, análise esta comparada à mesma função de animais não-tratados, onde forneceu importantes detalhes dos locais de lesão funcional nos rins assim como outros importantes mecanismos envolvidos na

recuperação da insuficiência renal decorrente desta enfermidade. Vale ressaltar que o estudo foi efetivo até 30 dias após a crise hemolítica, ficando constatada necessidade de estudos para avaliar não só a função renal em longo prazo, como os aspectos produtivos destes animais.

Embora o tratamento com TTM promova reconhecida melhora no estado clínico dos ovinos intoxicados (MACHADO, 1998; SOARES, 2004) ainda novos estudos necessitam ser realizados em que seja avaliado o real papel que o TTM tem como antagonista na formação de radicais livres (SOARES, 2004), assim como sobre os seus efeitos deletérios celulares, considerando, particularmente, o perfil metabólico. É de se esperar que a ação do TTM reduza a formação de radicais livres por meio da sua combinação com o cobre livre, reduzindo assim a reação em cascata desencadeada por este íon altamente reativo. Sabe-se, contudo, que para prevenir à ação peroxidativa, as células são equipadas com um sistema de rastreamento (SIES, 1993), constituído de antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathiona redutase (GSH) ou a G-6-PD (WRIGHT et al, 1981; SIES, 1993; HOLOVSKÁ et al., 1996), bem como dos produtos de oxidação, como o malonildialdeído (SANSINANEJA et al., 1993; BREMNER, 1998; TEMPLER, 2000).

1.3. EQUILÍBRIO ÁCIDO – BÁSICO

A manutenção da vida animal requer uma série de reações químicas anabólicas e catabólicas com objetivo de manter a homeostase. As reações enzimáticas mantêm o funcionamento do organismo e as enzimas são bastante sensíveis a variações do pH, assim como da temperatura (LEVRAUT et al., 1996; ALMOSNY, 2003).

A composição bioquímica do plasma sanguíneo reflete, de modo fiel, a situação metabólica dos tecidos animais, de forma a poder avaliar lesões teciduais, transtornos no funcionamento de órgãos, adaptação do animal diante de desafios nutricionais e fisiológicos e desequilíbrios metabólicos (GONZÁLES e SCHEFFER, 2003).

Entre muitas funções que o organismo deve manter em equilíbrio, destaca-se a estabilidade do pH dos fluidos corpóreos contidos nos espaços extracelulares, em especial intravascular, e o espaço intracelular. Para tal manutenção o organismo desenvolve uma série de mecanismos para que o pH permaneça dentro de limites

estritos. Em condições normais, os ácidos e bases absorvidos ou gerados endogenamente são tamponados, transformados e eliminados. Dos órgãos envolvidos no equilíbrio ácido-básico, relacionamos os pulmões, intestinos, rins, fígado e o sistema sanguíneo (ORTOLANI, 2003).

O sangue é usado como parâmetro para a avaliação do estado ácido-básico dos animais e este é fisiológico, próximo da neutralidade, com leve tendência à alcalinidade (aproximadamente 7,4). O organismo conta com muitos mecanismos para regular o pH e mantê-lo dentro de limites estreitos entre 7,35 e 7,45. Variações fora do intervalo de 7,0 a 7,7 são críticas para a vida do animal (QUIROZ-ROCHA et al., 2000). As reações metabólicas, porém tendem a desviar continuamente este pH para ácido ou básico. Para que não ocorram grandes variações séricas de pH, existem sistemas amortecedores plasmáticos ou sistemas tamponantes, como proteínas plasmáticas, hemoglobina, sistema fosfato-ácido fosfórico e sistema bicarbonato-ácido carbônico (ALMOSNY, 2003; ORTOLANI, 2003). O sistema bicarbonato-ácido carbônico é clinicamente importante, pois a determinação de pH, HCO_3 , e pCO_2 por hemogasometria é o principal procedimento empregado na avaliação laboratorial de rotina do equilíbrio ácido-básico (MARTINELLI, 2006; DiBARTOLA, 2007).

Segundo Ortolani (2003), Os valores normais para o conjunto de variáveis da análise gasométrica para a espécie ovina criados em condições brasileiras são: pH (7,23 – 7,42); HCO_3 (19 - 25); tCO_2 (19 - 26); ABE (-4 – 2); PCO_2 (34 - 45) e PO_2 (83 – 95), sendo este último referência para sangue arterial. Machado (1998) encontrou valores de PO_2 em sangue venoso de ovinos intoxicados por cobre nos limites de 30,8 a 39,9 na fase pré-hemolítica e de 28,8 a 40, 6 na fase pós-hemolítica, até 30 dias, para o grupo controle e de 31,1 a 41,5 e 31,1 a 42,1 para os grupos tratados com 1,7 mg/kg PV e 3,4 mg/kg PV, respectivamente de TTM.

Existe grande quantidade de doenças e alterações metabólicas que podem causar desbalanços no equilíbrio ácido-básico dos ruminantes. Entre as causas patológicas que originam esses desequilíbrios estão as que se relacionam com o sistema urinário, digestivo, respiratório e endócrino, com a homeostase e os processos metabólicos (QUIROZ-ROCHA et al., 2000).

A acidose metabólica caracteriza-se pela redução da concentração plasmática de HCO_3 e do pH (aumento da $[\text{H}^+]$) causada pela perda de HCO_3 ou pelo tamponamento de um ácido não-carbônico. A alcalose metabólica é caracterizada pelo aumento da concentração plasmática de HCO_3 e do pH (redução de $[\text{H}^+]$), geralmente causado por perda corporal desproporcional de íons (perda de fluido cuja concentração de cloro é maior do que aquela do fluido extracelular) ou por hipoalbuminemia (ácido fraco). Não havendo depleção de volume ou disfunção renal, é extremamente difícil induzir alcalose metabólica pela administração de base (QUIROZ-ROCHA ET AL., 2000; MARTINELLI, 2006; DiBARTOLA, 2007).

Na acidose respiratória, verifica-se aumento da PCO_2 (hipercapnia) causada por hipoventilação alveolar. A alcalose respiratória caracteriza-se pela diminuição da PCO_2 provocada pela hiperventilação alveolar (hipocapnia) (ALMOSNY, 2003; DiBARTOLA, 2007).

Segundo Levraut et al. (1996), a amostra ideal para hemogasometria é o sangue arterial total coletado em condições anaeróbicas em heparina sódica e refrigerado com rápida análise. O pH, PCO_2 , PO_2 , tCO_2 , HCO_3 , ABE e sO_2 caracterizam as principais determinações para hemogasometria. Porém Sucupira e Ortolani (2002) demonstram que a hemogasometria pode ser realizada tanto em sangue venoso e arterial, indicando que o sangue venoso pode refletir precisamente o estado ácido-básico. Deve-se lembrar que a PCO_2 é maior no sangue venoso e a PO_2 é maior no sangue arterial. Neste contexto, existem vários trabalhos que consideram somente sangue venoso (ALMOSNY, 2003). Pode-se utilizar sangue venoso para avaliação do estado ácido-básico, e, neste caso, não se devem considerar os dados da PO_2 , além de que a diferença de pH entre sangue arterial e venoso é pequena (ALMOSNY, 2003).

Após uma precisa coleta e análise gasométrica, devem-se avaliar primeiramente o pH, o que indicará acidose ou alcalose; em seguida verifica-se o estado ácido-básico, observando-se o parâmetro que está alterado, se metabólico ou respiratório (ORTOLANI, 2003; DiBARTOLA, 2007).

Com relação à intoxicação pelo cobre nos ovinos, Morgado et al., (2007) reportam a insipiência na avaliação dos gases sanguíneos nos casos de ICC, visto que apenas Machado (1998) apresentou resultados em tese do perfil hemogasométrico em

ovinos com tal condição, necessitando-se, portanto, de estudos que venha a revelar o verdadeiro estado ácido-básico nesses animais.

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO e ICC

Atualmente existe crescente interesse nos estudos com espécies reativas ao oxigênio (ERO), em virtude de que vários sistemas sofrem modificações funcionais devido aos danos causados por sua elevada produção, interferindo nas suas estruturas e funções (RIVLIN et al., 2004). Estudos têm demonstrado que a capacidade antioxidante dos eritrócitos está diminuída na ICC (SANSINANEA et al., 1993). Essa menor capacidade está associada com o aumento da reatividade do ácido tiobarbitúrico (TBA) na lipoperoxidação induzida pelo peróxido de hidrogênio.

A produção de ERO ocorre em sistemas aeróbicos, ou parcialmente aeróbicos, a partir de radicais ânions superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH). Sob condições oxidantes extremas, todos os componentes celulares incluindo lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são alvos para o estresse oxidativo, cuja extensão dos danos depende não somente da natureza e quantidade de ERO, mas também do momento e da duração de exposição, associado aos fatores extracelulares, como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (AGARWAI et al., 2003), que podem resultar na morte celular (SHARMA et al. 1999).

Altas concentrações de ERO são citotóxicas e podem estar presentes em condições como inflamação, doenças imunológicas, anemia, uremia e na diminuição da concentração de vitaminas antioxidantes (FONTEQUE, 2005).

O mecanismo pelo qual a intoxicação cúprica contribui para o estresse oxidativo ainda não está totalmente compreendido na espécie ovina, mas se sabe que as lesões estruturais em nível de fígado e rins são marcantes (SANSINANEA et al., 1998, MACHADO, 1998; SOARES, 2004).

Para prevenir a ação peroxidativa, as células são equipadas com um sistema de rastreamento (SIES, 1993), constituído de antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutatona, vitaminas C, E e outros; enzimas citosólicas, como a glutatona peroxidase (GSH – Px), glutatona – S – transferase e superóxido dismutase (SOD); além de enzimas ancilares, como a glutatona redutase (GSH) ou a G6PD (WRIGHT et al, 1981;

HOLOVSKÁ et al., 1996). Os eritrócitos são ricos em glutations. Mais de 95% da glutations presente no interior dos eritrócitos então na forma reduzida (GSH). A forma redutase (GSSG) é a forma mais sensível na indicação de estresse oxidativo que a GSH (SIEMS et al., 2000).

A G6PD está presente em todos os tecidos mamíferos e está localizada exclusivamente no citoplasma onde sua função é parte integrante da via pentose-fosfato. A primeira reação desta via é a desidrogenação enzimática da G6P para G6Pd para a forma 6-fosfatogluconato com NADP⁺ como um elétron aceitador. Esta via é a única fonte de NADPH no eritrócito e, por esta razão, atividade diminuída da G6PD reduz a produção de NADPH. O NADPH é também o substrato para a enzima GSH e, contudo, é importante para a produção de GSH (BEUTLER, 1993).

Os peróxidos são reduzidos via glutations peroxidase, envolvendo a glutations reduzida. Esta última é um tripeptídeo constituído por glicina, cisteína e ácido glutâmico. Na reação catalizada pela enzima glutations peroxidase, esta é o substrato redutor de peróxidos orgânicos e do peróxido de hidrogênio. Mantém, também, a estabilidade da hemoglobina, das enzimas intracelulares, protegendo os lipídeos da membrana contra peroxidação e constitui a principal fonte de grupos sulfidrilas no interior da hemácia (SIE, 1993). A GSH produzida no eritrócito é requerida para prevenir a peroxidação de ácidos graxos insaturados na membrana celular e para rastrear íons de ferro da hemoglobina na sua forma ferrosa (Fe⁺⁺). No sangue, quase toda a GSH é encontrada dentro do eritrócito (SANSINANE et al., 1996).

Níveis elevados de peróxidos nos eritrócitos, como conseqüências de algum fator determinante da produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (ERO), induzem injúria oxidativa, peroxidação lipídica em diferentes tipos celulares, envolvendo alterações da estrutura da membrana, hemoglobina e metabolismo intra-eritrocitários. Verifica-se, portanto, a geração de grande quantidade de superóxidos, os quais são precursores necessários para a formação dos peróxidos de hidrogênio, radical hidroxil e outras espécies reativas, que iniciam os processos deletérios sobre a membrana celular e danos sobre o DNA, mediados por radicais livres (BREMNER, 1998; COSTA et al., 2004).

Em relação à lipoperoxidação causada pelos EROs, verifica-se que esta tem sido processo mais extensivamente estudado (FONTEQUE, 2005). No organismo os EROs reagem com ácidos graxos poliinsaturados para formar lipoperóxidos que compõem a cascata de reações degenerativas dos lipídeos (BIESALSKY, 2002). Como consequência deste efeito, o peróxido lipídico é liberado para a circulação sangüínea elevando sua concentração sérica ou plasmática, indicando a ocorrência de lesão de membrana celular (YAGI, 1987; SOARES, 2004).

A lipoperoxidação induzida pelo cobre foi inicialmente reportada por Hochstein et al. (1980), os quais postularam que o cobre catalisa a reação de radicais livres que define a decomposição de ácidos graxos nos fosfolipídios em membranas, contudo causando dano oxidativo para o eritrócito (SANSINANEA et al., 1996).

Danos tissulares, induzidos por estresse oxidativo, são minimizados pelos elementos de defesa oxidativa, ou seja, pelos antioxidantes. Dentre os mecanismos de defesa, estão reconhecidamente envolvidos na proteção das membranas biológicas contra a lipoperoxidação a vitamina E e o selênio, os quais atuam sinergicamente (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; TEMPLER, 2000). A vitamina E previne a peroxidação, rastreando os EROs nos estágios iniciais da lipoperoxidação, enquanto que o selênio atuando como centro ativo da enzima glutathione peroxidase a qual reduz o peróxido de hidrogênio e hidróxidos de lipídeos a produtos menos reativos (ORTOLANI, 1999; VAN METRE e CALLAN, 2001). Concernente a ICC, não existem estudos que comprovem a viabilidade do uso associado de TTM com substâncias capazes de atenuar a peroxidação, rastreando efetivamente os EROs, associado à quelatação do cobre livre no organismo pelo TTM.

Durante a fase hemolítica é marcante a alta presença de cobre livre no organismo. Esta substância marcadamente reativa combina-se com uma série de compostos presentes nas membranas dos eritrócitos e outras células gerando neste processo grande quantidade de radicais livres, em especial superóxido, sendo este precursor de outras substâncias reativa tais como: peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Estas substâncias provocam severos danos à membrana celular e ao DNA, podendo levar a diferentes graus de injúria celular, assim como necrose (BREMNER, 1998; SANSINANEA et al., 1993; SANSINANEA et al., 1998; GRUNE et al., 2000).

A produção exacerbada de radicais livres é controlada pelo sistema antioxidante eritrocitário, representado por sistema enzimático. A determinação dos radicais livres é extremamente difícil devido a curta vida-média e a tecnologia para detectar diretamente os radicais em sistemas biológicos (FONTEQUE, 2005). Devido a esses problemas analíticos relacionados ao estresse oxidativo e do mecanismo de lesão dos radicais livres, utilizam-se os biomarcadores para monitorar o envolvimento na patogênese da lesão. A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o malondialdeído (MDA) são os testes mais freqüentemente utilizados para a mensuração da lipoperoxidação de membranas (BIESALSKY, 2002).

Segundo Martins-Mateo et al. (1999) concentrações de MDA e GSH em pacientes sob condição de hemodiálise podem ser usadas como indicadores de danos de lipoperoxidação de membrana celular, mas podem ser usadas com esta finalidade a de terminação da atividade da catalase e dismutase. Estes parâmetros, ainda não foram amplamente utilizados na avaliação clínica de ovinos intoxicados pelo cobre. O estresse oxidativo afeta a membrana eritrocitária por causa da lipoperoxidação acometido pelos EROs. A concentração do MDA está elevada e as atividades das enzimas estão modificadas nas causas de estresse oxidativo como resposta celular do ataque dos radicais livres (SOARES, 2004).

A atividade dos EROs pode ser avaliada indiretamente pela mensuração dos produtos de sua reação com ácidos poliinsaturados de membrana celular, tais como o malondialdeído, ou ainda pela interferência nas quantidades de substâncias e enzimas com atividade antioxidante, tais como a glutathione e suas enzimas conjugadas (McGRATH et al., 1995; GRUNE et al., 2000).

Algumas variáveis com atividade antioxidante são classicamente indicadas na avaliação de animais com condição de estresse oxidativo, como é o caso dos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não enzimáticos (glutathione, vitamina C e E, selênio, ergotioneína, flavonóides polifenólicos) em diferentes matrizes biológicas (CHIHUAILAF et al., 2002).

Nenhuma pesquisa ainda foi feita no campo da bioquímica clínica de caprinos sob estresse térmico testicular, a fim de determinar, com acurácia, os efeitos desse fator sobre o organismo e suas implicações na produção e reprodução animal.

Novos testes que mensuram o efeito antioxidante em fluidos biológicos podem ser úteis em prover um índice de habilidade que o organismo tem de resistir ao dano oxidativo determinado por algum fator (BENZIE e STRAIN, 1996). Deste modo, o radical hidroxila (-OH) é, provavelmente, a ERO que causa mais danos aos sistemas biológicos (BETTERIDGE, 1999), devido sua alta reatividade com biomoléculas. Este radical é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em reação catalisada por íon de metais (Fe^{2+} ou Cu^+), geralmente ligados em complexos com proteínas como a ferritina (HALLIWELL, 1997).

Segundo Mates (2000), tanto o ânion superóxido, como o peróxido de hidrogênio, têm a capacidade de redução do íon metálico ferro (Fe^{3+}), formando novo íon (Fe^{2+}), uma vez que o ferro é o principal metal de transição responsável pela transformação do H_2O_2 em OH^- , por meio da reação de Fenton.

Neste contexto, o poder antioxidante pode ser referido analogamente como a habilidade de redução. Assim sendo, utilizar um método com potencial de redução, em método colorimétrico, ligado a um oxidante reduzido, facilmente poderia oferecer uma simples metodologia para avaliar esta habilidade. O método FRAP, o qual mede a habilidade de redução férrica plasmática (BENZIE e STRAIN, 1996), tem sido recomendado por estes autores como um indicador de estresse oxidativo. Tal método ainda é pouquíssimo aplicado na rotina clínica em Medicina Veterinária (SOARES, 2004).

Ressalta-se, portanto, a necessidade de estudos sobre o assunto, utilizando-se provas laboratoriais possíveis que revelem as condições clínicas metabólicas que possam melhor elucidar a patogênese da ICC induzida pelo Cu em ovinos.

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar o efeito do tratamento com tetratiomolibdato de amônio além do perfil físico, hemogasométrico e do metabolismo oxidativo de ovinos da raça Santa Inês nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica intoxicados experimentalmente com cobre;

2.2. Verificar a relação entre os parâmetros clínicos, hemogasométricos e do metabolismo oxidativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para realização do referido delineamento experimental, foram utilizados 10 ovinos da raça Santa Inês, machos, com idade aproximada de seis meses e com peso corporal médio de 35 kg, ao início do experimento.

Os animais passaram por um período de adaptação de 90 dias, quando foram submetidos a exame físico para averiguar o estado de saúde. No início desse período, todos os animais foram vermifugados e alocados em gaiolas metabólicas individuais, afim de se acostumarem ao meio ambiente às instalações e ao novo manejo de alimentação e limpeza.

As gaiolas metabólicas eram providas de comedouro e bebedouro, onde eram oferecida a dieta. No período de adaptação a dieta foi ajustada, com base nas sobras do dia anterior, de modo que permitisse sobra em torno de 20% do feno utilizado.

3.2. ALIMENTOS E ALIMENTAÇÃO

A dieta oferecida (Quadro 1) foi oferecida para atender às exigências de manutenção. Os animais receberam dieta composta de feno de capim *Coast-cross* (*Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*, além de 200 g de ração comercial. A dieta foi oferecida diariamente, uma vez ao dia, em todo o período experimental e adaptação. Todo o concentrado oferecido era consumido prontamente pelos ovinos e em média o consumo de feno era de 600 g MS/cabeça, que fornecia diariamente na dieta cerca de 11 ppm de cobre.

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

Quadro 1 – Composição química da dieta, composta por feno de capim *Coast-cross* e do concentrado comercial, com base na matéria seca (MS)

Composição Química (% MS)	Fenos de capim	
	<i>Coast-cross</i>	Concentrado
Matéria Orgânica		
Proteína Bruta (%)	6.12	18.50
Matéria Seca (%)	87.03	85.26
Matéria Mineral (%)	7.59	13.34
Fibra Bruta (%)	32.70	4.68
Extrato Etéreo (%)	1.74	5.96
Extrato Não Nitrogenado (%)	51,85	57,52
Fibra em Detergente Neutro (%)	39.23	7.46
Fibra em Detergente Ácido (%)	77.34	19.88
Minerais		
Cálcio (%)	0.27	1.48
Fósforo (%)	0.13	0.95
Cobre (ppm)	14,45	23,01
Ferro (ppm)	138,26	146,02
Molibdênio (ppm)	1,15	0,30

Fonte: Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) do Estado de São Paulo.

3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MODELO DE INDUÇÃO DA INTOXICAÇÃO CÚPRICA CUMULATIVA

O experimento seguiu o delineamento de blocos ao acaso, onde todos os animais foram intoxicados, sendo que metade deles foi tratada com TTM (n=5; Grupo TTM) e a outra metade mantida sem tratamento específico (n=5; Grupo Controle), recebendo apenas placebo. As variáveis estudadas foram coletadas e avaliadas nos seguintes momentos:

A descrição dos momentos referentes às coletas de materiais biológicos dos ovinos nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa foram: 30d A - 30 dias anterior à crise hemolítica; 15d A - 15 dias anterior a crise hemolítica; 7dA - Sete dias anterior a crise hemolítica; CH - Crise hemolítica, caracterizada pela hemoglobinúria macroscópica acompanhada de tira reagente com quatro cruzeiros; 1d D - 24 horas após a crise hemolítica; 2d D - 48 horas após a crise hemolítica; 3d D - 72 horas após a crise hemolítica; 4d D - 96 horas após a crise hemolítica; 5d D - 120 horas após a crise hemolítica; 15d D - 15 dias após a crise hemolítica; 30d D - 30 dias após a crise hemolítica.

O modelo de intoxicação foi efetivado conforme modelo preconizado por Machado (1998). Todos os animais intoxicados receberam, por via oral, uma solução de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MERCK®). Os animais receberam doses iniciais de 3mg Cu/ kg / PV/d, no decorrer da primeira semana e, semanalmente, caso não ocorresse intoxicação a dose era acrescida de mais 3mg Cu, até a obtenção do quadro de hemoglobinúria. Os animais eram pesados semanalmente para a correção da dose. Com o aparecimento da hemoglobinúria macro e microscópica (tira reagente com indicação de presença de hemoglobina) caracterizadas, encerrava-se a oferta oral do sulfato de Cu.

3.4. TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Após a detecção da hemoglobinúria, iniciava-se o período de tratamento com a injeção intravenosa de TTM na dose de 3,4 mg/ kg do peso vivo. O TTM era pesado e diluído em 20 mL de solução salina estéril, a qual era previamente aquecida a 40°C, conforme descrito por Machado (1998). Esta solução era infundida, lentamente, por venopunção jugular. O tratamento foi realizado uma vez ao dia, no decorrer dos quatro dias seguintes à hemoglobinúria. Nestes mesmos dias o grupo controle recebia idêntica dose de solução salina isotônica, aplicada pela mesma via.

3.5. EXAME FÍSICO

Foram aferidas as seguintes funções vitais, conforme Dirksen et al. (1993): frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, motilidade ruminal, além do peso vivo e volume urinário. Este último foi considerado como sendo amostra pontual, obtida num intervalo de três horas após a colocação das bolsas plásticas na região prepucial. Posteriormente a urina foi alocada em coletor de urina e acondicionada em caixa isotérmica com gelo reciclável e conduzido ao laboratório para posterior análise.

3.6. EXAMES LABORATORIAIS

3.6.1. COLETA DE SANGUE

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular, em tubos siliconizados vacutainer[®], sem anticoagulante, para obtenção de soro, e com anticoagulante (EDTA), para obtenção de sangue total e plasma.

As amostras de sangue sem anticoagulante foram mantidas à temperatura ambiente, enquanto que as demais com anticoagulante foram homogeneizadas, prontamente refrigeradas e conduzidas ao laboratório para posterior processamento. Todos esses tubos foram submetidos à centrifugação, por período de 15 minutos a 500 G. As alíquotas de soro e plasma foram, posteriormente, condicionadas em tubos tipo Eppendorfes[®] e armazenadas à temperatura de -20°C .

Amostras de 2 mL de sangue, para a realização de provas hemogasométricas, foram obtidas utilizando-se seringas com capacidade para 3 ml, contendo heparina sódica como anticoagulante. Após colheita do sangue, as seringas foram devidamente obliteradas com a utilização de borracha látex evitando a entrada de ar na seringa, e acondicionadas em caixa térmica, tipo isopor, contendo água gelada e gelo reciclável, até que fossem conduzidas ao laboratório para imediata análise.

3.6.2. COLETA DE FÍGADO

Amostras de fígado foram obtidas dos animais do grupo controle imediatamente após o óbito, e do grupo TTM decorridos 30 dias da crise hemolítica, após sacrifício por meio de aplicação de medicação pré-anestésica utilizando o cloridrato de acepromazina e seguida de indução anestesia com tiopental sódico. As amostras de fígado e rins foram coletadas e determinação de Cu, sendo conservados em recipientes contendo solução de formol a 10%.

3.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1. DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA

A concentração da hemoglobina sanguínea foi quantificada empregando-se reativo comercial de cianometahemoglobina, segundo método descrito por Birgel (1982).

3.7.2. ANÁLISE HEMOGASOMÉTRICA

As variáveis hemogasométricas foram quantificadas em analisador automático de pH e gases sanguíneos (AVL), onde foram obtidos: pH, pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2), pressão parcial de oxigênio (PO_2), com cálculo automático para o bicarbonato padrão no sangue (HCO_3), além de saturação de oxigênio (sO_2), concentração total de CO_2 déficit ou excesso de base (ABE) conforme método descrito por Clark (1956) e Severinghaus e Bradley (1958). Após a introdução da alíquota de sangue no hemogasômetro, foram corrigidos os valores da hemoglobina e da temperatura para aqueles animais avaliados, pois os valores padrão destes assumidos pelo aparelho são os referentes à espécie humana.

3.7.3. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DO COBRE

Foi determinado por método colorimétrico, utilizando-se kit comercial Merck® (nº 3319), após desproteinização da amostra com adição de batocuproína sulfonada, como reagente específico para o cobre.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro digital, marca Micronal® - modelo B34211, em comprimento de onda de 480 nm.

3.7.4. ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (MALONDIALDEÍDO)

Foi determinada pelo método do ácido tiobarbitúrico, descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). O referido método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico, em meio aquecido, quando este é submetido ao posterior resfriamento e mensurado em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 532 nm.

3.7.5. ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Tal metabólito foi determinado por método colorimétrico, descrito por Beutler et al. (1963), As leituras foram feitas em espectrofotômetro digital, marca Micronal® - modelo B34211, em comprimento de onda de 412 nm.

Como esta técnica fornece resultado em densidade óptica o mesmo foi transformado em mg/ mL de sangue, realizando-se o seguinte cálculo:

$$\text{GSH (mg/ mL)} = (\text{OD1} - \text{OD2}) \times 31040/\text{VG}$$

Onde,

OD1 = Densidade óptica inicial

OD2 = Densidade óptica final

VG = Volume globular da amostra

3.7.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLICOSE-6-FOSFATODESIDROGENASE (G-6-PD)

Foi determinada por método enzimático, descrito por Beutler et al., (1979), utilizando-se kit comercial Randox[®] (E.C.-1.1.1.49) e processada em analisador bioquímico automático marca AMS[®], modelo Lysis. Antes da leitura foi realizado processamento manual das amostras da seguinte fórmula: uma alíquota de 400 µL de sangue total foi adicionada a 4000µL de solução salina a 0,9%. Em seguida foi centrifugada a 250G por período de cinco minutos, quando o sobrenadante era desprezado e nova solução salina era adicionada às hemácias, repetidos três vezes este processo. Após as lavagens, a papa de hemácias foi adicionada a 1000 µL de água purificada, para obtenção de hemolisado, homogeneizada e condicionada a temperatura de -20°C, por período de 10 min. Nova centrifugação foi realizada à 500G, por período de 10 min. O sobrenadante foi acondicionado em tubos eppendorf e, estes últimos armazenados em freezer a -70°C.

Para calcular a atividade desta enzima em UI/g de hemoglobina, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{G-6-PD UI/g Hb} = \frac{\text{mU/eritrócitos por mL} \times 100}{\text{Hb (g/dL)}}$$

Onde,

100 = Fator de conversão da atividade por 100 mL

Hb (g/dL) = Concentração de hemoglobina da amostra

3.7.7. HABILIDADE DE REDUÇÃO FÉRRICA PLASMÁTICA (HRFP)

Foi determinada pelo método colorimétrico, descrito por Benzie e Strain (1996), o qual descreve a HRFP, a baixo pH, reduzindo o complexo tripiridiltiazina férrica (Fe^{III} – TPTZ) à forma ferrosa (Fe^{II}), formando um azul intenso, com possibilidade de leitura em absorvância de 593nm.

3.7.8. DETERMINAÇÃO DO COBRE NO FÍGADO, CONCENTRADO E FENO

O cobre foi determinado por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivo (CPOS). Para tal fim, os fragmentos de fígado foram previamente preparados por meio de secagem em estufa a 103 °C, por 24 horas e, em seguida, submetidos à digestão úmida com ácido nítrico e perclórico (4:1 v/v), para posterior análise (Krug et al, 1977). As referidas análises foram realizadas no Centro de Layseres e Aplicações (CLA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) do Estado de São Paulo.

3.7.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados, na formatação das tabelas, valores de médias, medianas, desvio-padrão e percentis de P_{25} e P_{75} como medidas de tendência central, considerando-se que as apresentações das estatísticas nas tabelas são aquelas definidas de acordo com o tipo de distribuição (normal ou transformado).

Os parâmetros foram testados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados, que não atenderem a estas premissas, foram submetidos à transformação com base logarítmica ($\text{Log } x+1$) ou pela raiz quadrada [$\text{RQ } (x+1/2)$], segundo recomendações de Sampaio (1998).

Os dados com perfil de normalidade e transformados foram submetidos à análise de variância (Teste F) utilizando-se o procedimento GLM do SAS (SAS, 2000), que separou como causa de variação efeitos de tratamentos e tempos. Caso existisse significância no teste F as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Duncan (SAMPALIO, 1998).

Realizaram-se, também, análises de regressão ajustadas em função do tempo de coleta (com o perfil expresso pela equação de regressão) e seus respectivos coeficientes de correlação para verificar a relação entre pares de variáveis.

A significância obtida na regressão foi avaliada por meio do Teste F (LITTLE e HILLS, 1978), ficando estabelecido que exista uma correlação de alta intensidade entre as variáveis quando $r > 0,60$; média intensidade quando $0,30 < r < 0,60$; e de baixa

intensidade quando $r < 0,30$, sendo o nível de significância obtido para todas as correlações de $p < 0,05$.

Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2000). Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (P) de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. MODELO DE INDUÇÃO

Na tabela 1 observam-se as doses acumuladas de cobre e total de dias necessários para a ocorrência da intoxicação cúprica nos ovinos da raça Santa Inês.

O modelo de indução mostrou-se eficiente, considerando-se que as correções semanais das doses de sulfato de cobre foram necessárias para o efetivo aparecimento do quadro de intoxicação.

Os animais manifestaram nítida diferenciação na atitude e comportamento, que variou de apatia a intenso estado de sonolência, com cabeça e orelhas penduladas, decúbito inicial esternal que evoluía para o lateral, além de oligodipsia, modificação do aspecto organoléptico da matéria fecal (hipercólicas), com coloração escura e presença de muco.

A coloração da conjuntiva ocular apresentou amarelada no início da crise hemolítica, e que estas se tornavam esbranquiçadas no decorrer de 10 a 12 dias, sendo que ao término do experimento se tornavam normocoradas. Os vasos episclerais nos primeiros dois ou três dias estavam fortemente injetados, apresentando-se em seguida menos injetado, o qual se normalizava ao término do experimento.

Todos os cordeiros não tratados sucumbiram dentro de cinco dias. Dos cinco cordeiros tratados com TTM quatro sobreviveram até o final do experimento, sendo que um deles sucumbiu no início do 3º dia, após uma evolução clínica semelhante ao descrito no grupo controle. Os ovinos que sobreviveram apresentaram nítida melhora do quadro clínico no início do 4º dia, passando a ingerir inicialmente feno e água e após alguns dias ração. Contudo, a completa normalização de todas as funções orgânicas foi gradativa no decorrer da primeira quinzena. Era digna de nota a modificação na consistência das fezes, que deixava de ser diarréica ou amolecida ao redor do 3º ou 4º dia voltando a apresentar o formato de síbala ao redor do 7º dia de evolução.

Tabela 1 – Identificação, dose acumulada de cobre (g) e total de dias necessários para ocorrência da intoxicação dos ovinos dos grupos controle e TTM

CONTROLE			TTM		
Animais	Dose Acumulada de Cu (g) ⁽¹⁾	Dias	Animais	Dose Acumulada de Cu (g)	Dias
A	15,3	30	F	17,5	33
B	15,0	31	G	29,4	57
C	16,0	30	H	66,5	89
D	15,0	30	I	26,6	55
E	50,3	77	J	77,0	96
15,3 ^a (15,0;50,3)			29,4 ^a (17,5;77,0)		

Nota: (1) Valores de medianas e limites inferior e superior das doses de cobre entre grupos controle e tratados com TTM ($p > 0,06$).

4.2. COBRE SÉRICO

Maiores valores de cobre sérico foram encontrados no grupo controle em relação ao tratado com TTM apenas no momento M3 ($P < 0,04$). Dentro do grupo controle detectaram-se maiores valores teores de cobre no M3, seguido do M2 o qual foi superior ao M0 e M1; no grupo TTM maiores concentrações de cobre foram verificadas no M2 e M3, seguida do M1 e M4, os quais foram superiores a M0 e M5 ($P < 0,03$) (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2 – Valores de medianas e limites inferior e superior do cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Momentos					
	M0 ⁽¹⁾	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽³⁾	M3 ⁽⁴⁾	M4 ⁽⁵⁾	M5 ⁽⁶⁾
Controle	15,2 ^{cA} (13;20)	22,0 ^{bA} (8;43)	64,2 ^{aA} (18;108)	70,7 ^{aA} (51;119)		
TTM ⁽⁷⁾	15,8 ^{cA} (15;17)	24,9 ^{bA} (12; 29)	52,7 ^{aA} (19;93)	41,0 ^{aB} (30;61)	27,0 ^b (16;30)	15,6 ^c (14;18)

Nota: Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos
 (1) M0 – Momento basal; (2) M1 – 15 dias anterior a crise hemolítica (CH); (3) M2 – Sete dias anterior a CH; (4) M3 – Crise Hemolítica; (5) M4 – 120 horas após a crise hemolítica; (6) M5 – 30 dias após a crise hemolítica; (7) TTM – Tetratiomolibdato de amônio.

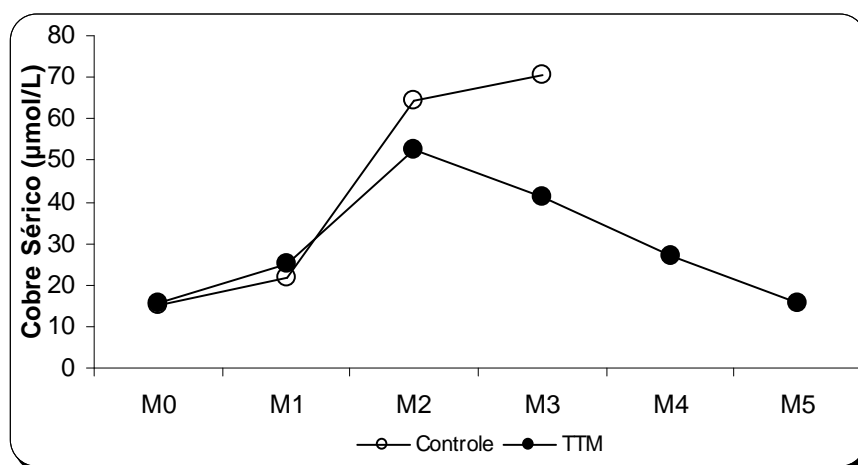


Gráfico 1 – Valores de mediana da concentração sérica de cobre ($\mu\text{mol/L}$) dos ovinos dos grupos controle e TTM, nas diferentes fases da intoxicação cúprica cumulativa

4.3. COBRE HEPÁTICO

Os teores de cobre no fígado ($P < 0,04$) foram maiores nos ovinos do grupo controle que no tratado com TTM (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores individuais de cobre no tecido hepático dos ovinos induzidos à intoxicação cúprica cumulativa, tratados ou não com TTM

Fígado	Animais	Cobre (ppm/MS)
Controle⁽¹⁾	1	1.395,2
	2	3.017,8
	3	2.911,0
	$X \pm s$	^a 2543,0 \pm 732,0
TTM⁽²⁾	4	481,4
	5	556,6
	$X \pm s$	^b 519,0 \pm 53,7

Nota: Determinações feitas (1) após o óbito e (2) 30 dias após a detecção da hemoglobinúria. Letras distintas na mesma coluna são diferentes ao nível de 5%.

Os dados referentes aos parâmetros clínicos, hemogasométricos e do metabolismo oxidativo encontram-se descritos, seguidos de suas respectivas tabelas e gráficos demonstrativos dos respectivos perfis.

4.4. PARÂMETROS CLÍNICOS

4.4.1. FREQUÊNCIA CARDIACA

Tabela 4 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da frequência cardíaca (bpm) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	89,6	77,4	84,0	108,8	114,0	118,0	104,0	92,0					0,0007
	±3,44	±3,32	±5,37	±7,10	±6,83	±10,0							
	bcd	d	cd	abc	ab	a	abc	bcd					
TTM	87,2	72,8	74,0	108,0	110,8	117,75	122,0	116,0	104,0	68,0	76,0		0,0001
	±4,33	±3,44	±3,58	±11,45	±4,45	±9,37	±7,74	±8,48	±8,16	±4,89	±2,89		
	bc	c	c	a	a	a	a	a	ab	c	c		
<i>P</i>	0,5671	0,3845	0,1596	0,9541	0,6978	0,9878	0,3751	0,2952					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Verificou-se efeito de grupos ($P < 0,05$), porém não de momentos nas diferentes fases da intoxicação cúprica ($P > 0,05$) para a variável frequência cardíaca (FC). Maiores médias foram registradas no momento da crise hemolítica (CH) e nos três primeiros dias subseqüentes ($P < 0,0007$), em relação aos momentos correspondentes a fase pré-hemolítica para os animais do grupo controle. No 4d D do último dia de sobrevivência dos animais neste grupo, a FC teve valor médio pouco superior ao momento 30d A. Já em relação aos animais do grupo tratado com TTM, maiores médias também foram identificadas na CH e do primeiro ao quinto dias pós-crise hemolítica ($P < 0,0001$), comparando-se com os demais momentos da fase pré-hemolítica e 15 e 30 dias após a CH. Já aos 15 e 30 dias da CH, os valores apresentaram-se análogos aos do momento inicial (30 dA) (Tabela 4; Gráfico 2).

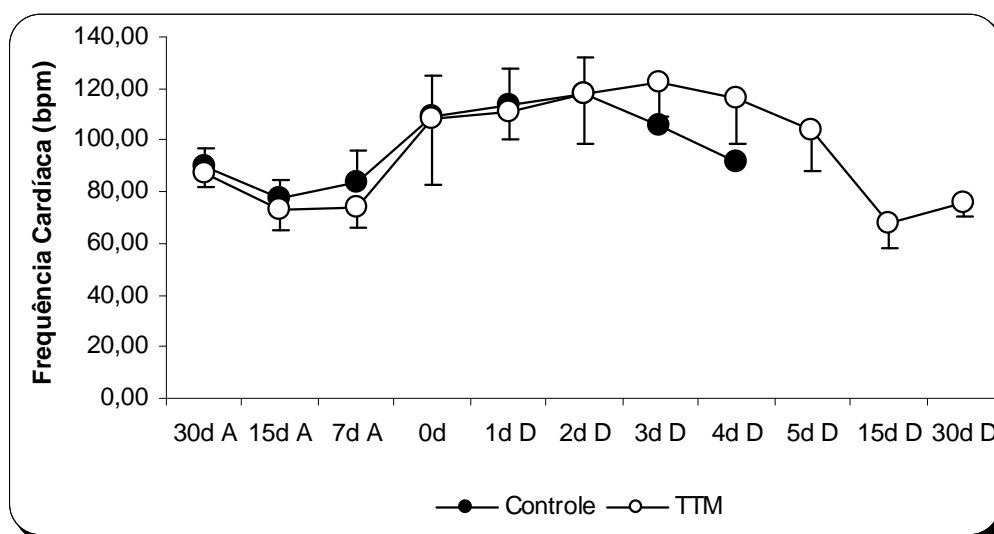


Gráfico 2 - Valores médios e desvios-padrão da frequência cardíaca (bpm) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.4.2. FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA

Tabela 5 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da frequência respiratória (mrp) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica							
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D	
Controle	16,0 ±1,78	16,8 ±0,8	16,0 ±0,01	15,6 ±1,6	15,0 ±4,51	16,0 ±0,0	16,0	20,0				0,8705
TTM	17,6 ±0,97 ab	19,4 ±0,8 a	17,6 ±0,97 ab	14,0 ±1,6 bc	13,6 ±1,60 c	14,0 ±2,0 bc	13,0 ±1,0 c	14,0 ±1,15 bc	14,0 ±1,15 bc	16,0 ±0,0 abc	16,0 ±0,0 abc	0,0052
<i>P</i>	0,4554	0,0667	0,1411	0,1151	0,3694	0,5415	0,2722	0,1027				

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise dos dados da frequência respiratória (FR), não foi identificado efeito de momentos para o grupo controle ($P>0,8705$), nas diferentes fases da intoxicação cúprica, porém identificou-se efeito entre os momentos para o grupo TTM ($P<0,0052$). Maiores médias da FR foram registradas para esse último grupo nos momentos que antecederam a CH, seguido de menores médias do primeiro ao quinto dias após a CH, retornando aos valores basais dos 15 aos 30 dias após o início do tratamento com TTM (Tabela 5; Gráfico 3).

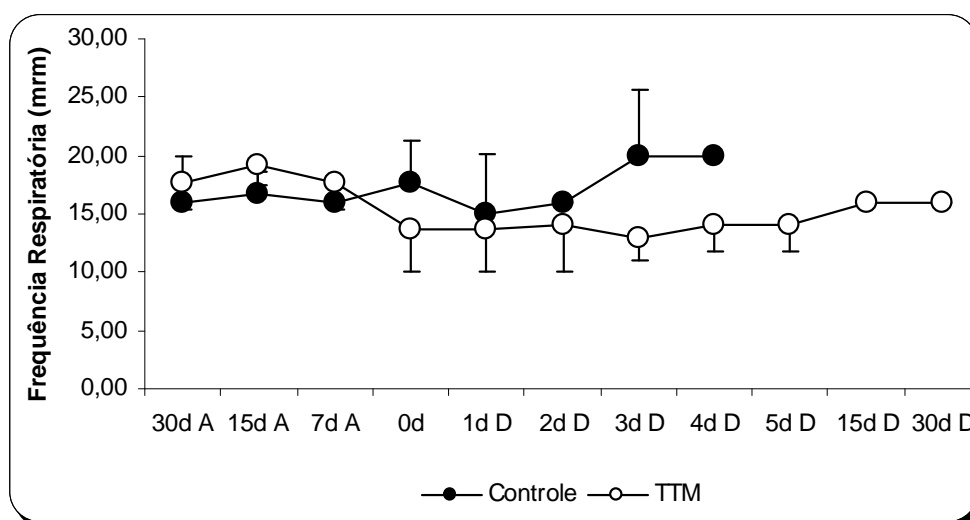


Gráfico 3 - Valores médios e desvios-padrão da frequência respiratória (mrm) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.4.3. TEMPERATURA RETAL

Tabela 6 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da temperatura retal (°C) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	38,56	38,68	39,32	39,34	39,80	38,85	38,40	38,5					0,5767
	±0,17	±0,10	±0,36	±0,30	±0,10	±0,35							
TTM	38,36	38,22	38,38	39,22	39,38	38,53	39,10	38,83	38,75	38,38	38,90		0,0833
	±0,18	±0,19	±0,11	±0,23	±0,19	±0,67	±0,31	±0,10	±0,25	±0,23	±0,55		
<i>P</i>	0,4492	0,0592	0,0672	0,7599	0,2637	0,7676	0,2951	0,2533					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise da temperatura retal, verificou-se que não houve diferenças para o conjunto de médias dos respectivos fatores grupos ($P>0,05$) e momentos ($P>0,05$), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa (Tabela 6; Gráfico 4).

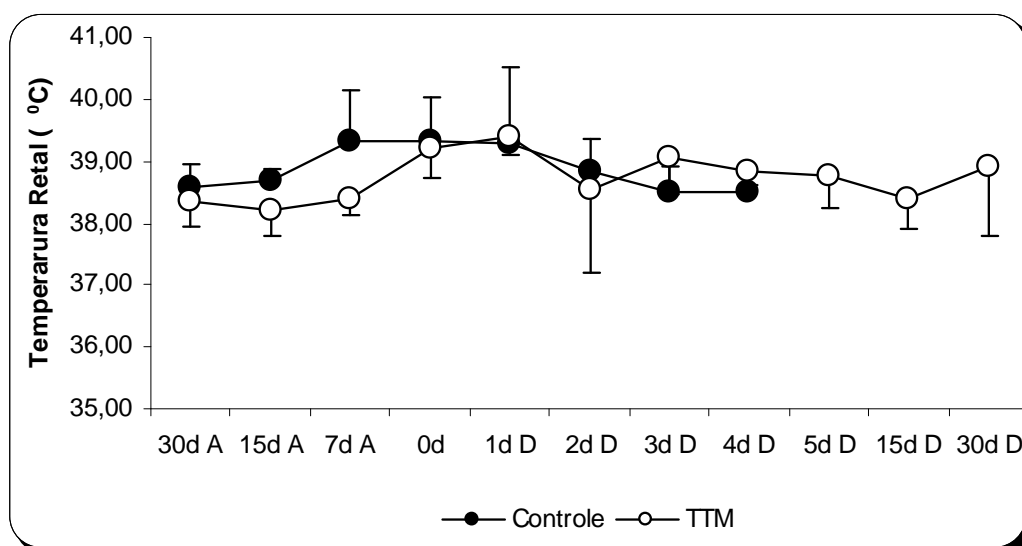


Gráfico 4 - Valores médios e desvios-padrão da temperatura retal (°C) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.4.4. MOTILIDADE RUMINAL

Tabela 7 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da motilidade ruminal (3 min) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	3,4 ±0,24 a	3,2 ±0,45 a	1,8 ±0,64 ab	0,5 ±0,27 b	0,25 ±0,25 b	0,5 ±0,0 b	0,5 b	0,5 b	0,5 b				0,0001
TTM	3,6 ±0,51 a	3,0 ±0,01 a	2,0 ±0,61 b	0,4 ±0,19 c	0,0 ±0,0 c	0,0 ±0,0 c	0,38 ±0,23 c	0,63 ±0,13 c	0,75 ±0,14 c	3,0 ±0,35 a	3,38 ±0,37 a		0,0001
<i>P</i>	0,7328	0,1411	0,8276	0,7707	0,2924	0,0001	0,8304	0,6850					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Verifica-se, que para a motilidade ruminal (MR), houve efeito entre os grupos e momentos. Considerando o grupo controle, maiores médias foram registradas na fase que antecedeu a crise hemolítica e menores valores médios foram registradas no momento da CH e nos dias subseqüentes ($P < 0,0001$). Percebe-se, ainda neste grupo, que na fase pré-hemolítica as médias 15 e sete dias antes do episódio da CH foram menores.

Com relação ao grupo TTM, maiores médias foram registradas nos 30 e 15 dias, seguido de sete dias a CH. Neste momento e do primeiro ao quinto dias após a CH, esses valores médios foram inferiores aos momentos da fase pré-hemolítica ($P < 0,0001$). Já aos 15 e 30 dias após a CH, os valores médios da motilidade ruminal apresentaram-se análogos aos valores basais.

Considerando o efeito de momentos entre os grupos, apenas no segundo dia após a CH foi identificada diferença significativa entre as médias da MR ($P < 0,0001$), quando o grupo controle evidenciou MR maior que o grupo TTM (Tabela 7; Gráfico 5).

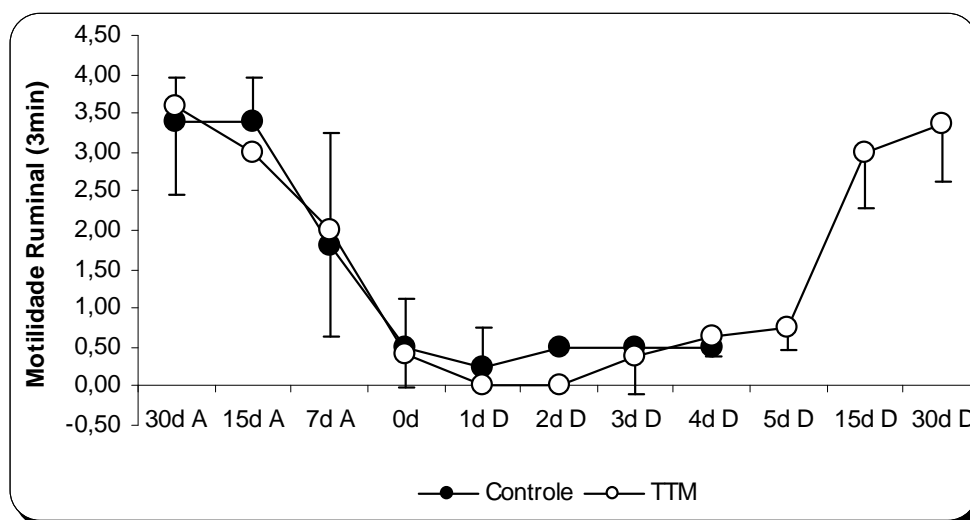


Gráfico 5 - Valores médios e desvios-padrão da motilidade ruminal (3 min) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.4.5. PESO VIVO

Tabela 8 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) do peso vivo (Kg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	38,98	38,06	37,60	37,18	36,55	36,60	36,00	36,50					0,0067
	±0,67	±0,28	±0,11	±0,23	±0,53	±0,60							
	a	ab	abc	abc	bc	bc	c	bc					
TTM	38,46	37,72	37,40	37,04	36,60	36,35	36,35	36,25	35,63	35,48	34,88		0,0499
	±0,12	±0,79	±0,59	±0,59	±0,63	±0,36	±0,37	±2,39	±2,11	±2,05	±2,38		
	a	a	a	ab	b	b	b	bc	c	c	c		
<i>P</i>	0,7000	0,6924	0,7517	0,8328	0,9018	0,7222	0,7063	0,09874					

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Não se verificou efeito de grupos ($P>0,05$), porém houve efeito de momentos nas diferentes fases da intoxicação cúprica ($P<0,05$) para o peso vivo (PV) dos animais. No grupo de animais controle, verificou-se que maiores médias do peso vivo foram observadas nas fases pré-hemolítica e na CH em relação aos dias da fase pós-hemolítica ($P=0,0067$).

Quanto aos animais do grupo tratado com TTM, maiores médias também foram identificadas nas fases pré-hemolítica e na CH, seguido de diminuição do referido peso vivo na primeira semana após a CH até os 15 e 30 dias após o tratamento com TTM ($P=0,0499$) (Tabela 8; Gráfico 6).

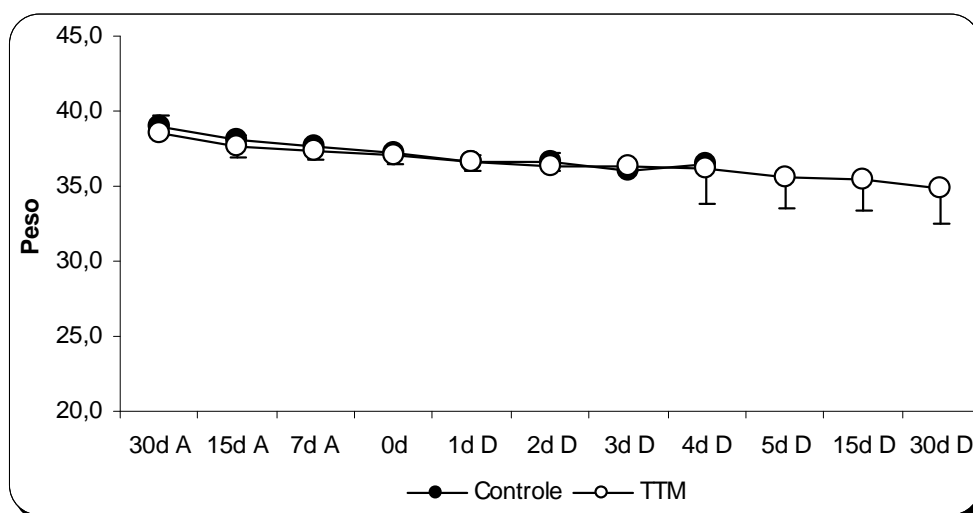


Gráfico 6 - Valores médios e desvios-padrão do peso vivo (Kg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.4.6. VOLUME URINÁRIO

Tabela 9 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) do volume urinário (mL/3h) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica		Pós-Hemolítica							
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	170,0 ±30,0 a	120 ±20,0 ab	120 ±20,0 Aab	64 ±20,0 ab	30 ±34,0 b	30 ±0,0 b	30 ±0,0 b	40 b					0,0115
TTM	78,0 ±33,0 ab	92 ±31,0 ab	58 ±17,15 Bab	48 ±13,15 b	38 ±4,90 b	115 ±49,07 ab	115 ±49,10 ab	160 ±40,0 a	87,5 ±12,5 ab	125 ±25,0 ab	72,5 ±42,5 ab		0,0504
<i>P</i>	0,0743	0,4717	0,0464	0,6725	0,1930	0,3125	0,4950	0,2722					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Com relação ao volume urinário (VUr), verificou-se efeito de grupos e de momento. Com base nos dados do grupo controle, foram encontrados maiores médias de VUr na fase pré-hemolítica, seguida da Che período pós-hemolítico ($P=0,0115$). Quanto aos animais do grupo tratado com TTM, maiores médias também foram registrados nas fases pré-hemolítica e na CH e menores valores médios na CH e no primeiro dia após a CH, sendo que estes valores elevaram-se com o passar dos dias, apresentando-se análogos ao momento basal ($P=0,0504$) (Tabela 9; Gráfico 7).

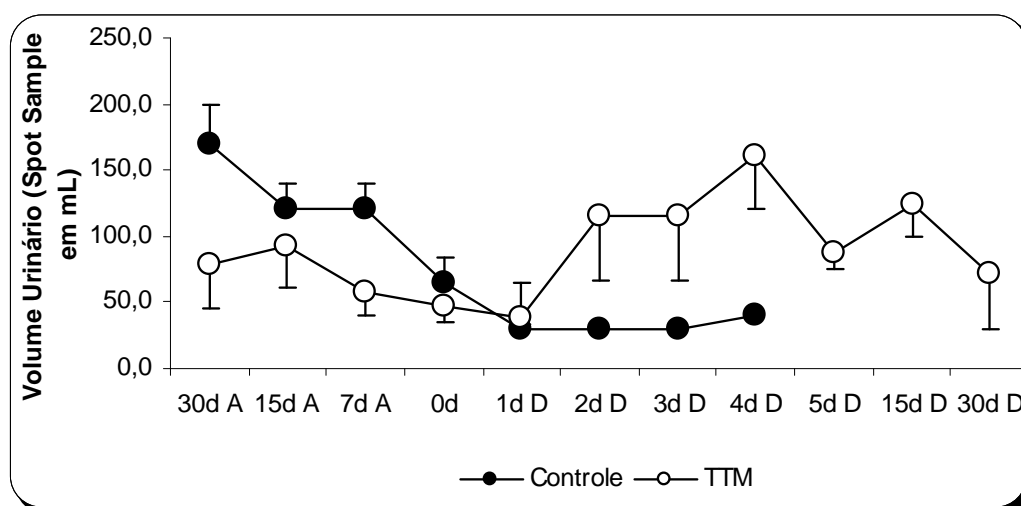


Gráfico 7 - Valores médios e desvios-padrão do volume urinário (mL/3h) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.5. PARÂMETROS HEMOGASOMÉTRICOS

4.5.1. Ph SANGUÍNEO

Tabela 10 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) do pH sanguíneo de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica			Pós-Hemolítica						
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	7,36 ±0,09	7,36 ±0,05	7,38 ±0,03	7,39 ±0,05	7,41 ±0,06	7,43 ±0,07	7,40 ±0,01	7,35					0,8676
TTM	7,42 ±0,06	7,36 ±0,13	7,40 ±0,03	7,41 ±0,06	7,41 ±0,11	7,43 ±0,05	7,44 ±0,05	7,43 ±0,05	7,43 ±0,03	7,44 ±0,01	7,47 ±0,06		0,4605
<i>P</i>	0,1151	1,000	0,8669	0,6505	0,5389	0,5415	0,4950						

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobínúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise dos dados do pH sanguíneo, não foram identificadas diferenças para o conjunto de médias dos respectivos fatores: grupos ($P>0,05$) e momentos ($P>0,05$), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa (Tabela 10; Gráfico 8).

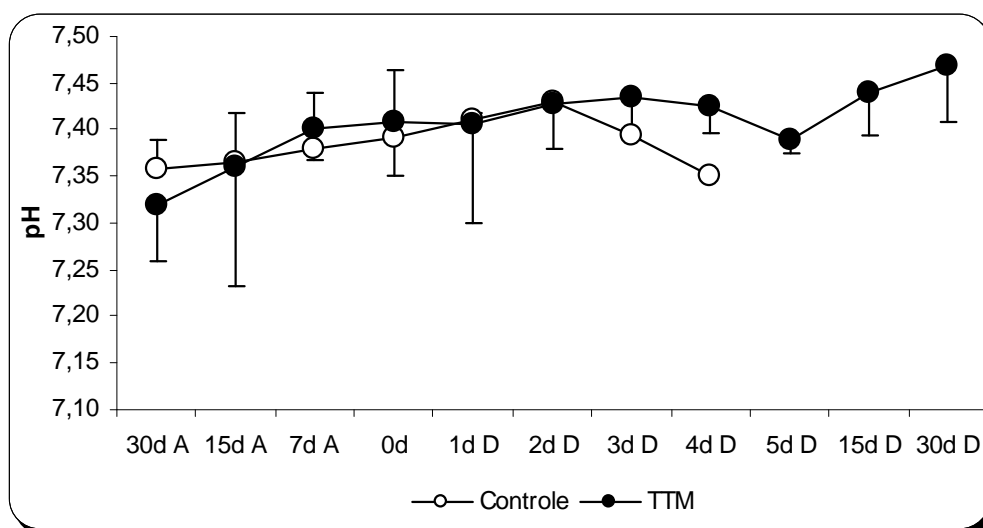


Gráfico 8 - Valores médios e desvios-padrão do pH sanguíneo de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.5.2. PRESSÃO PARCIAL DE GÁS CARBÔNICO SANGUÍNEO

Tabela 11 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da pressão parcial de gás carbônico (PCO₂) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	45,94 ±7,01	44,76 ±3,57	45,32 ±7,12	46,12 ±4,60	42,73 ±3,66	41,05 ±4,03	40,85 ±3,46	48,10					0,6442
TTM	43,46 ±8,01	45,74 ±8,77	38,78 ±6,39	47,50 ±5,73	43,50 ±7,07	43,45 ±8,13	39,97 ±7,22	41,88 ±3,00	40,95 ±7,13	42,70 ±6,34	38,90 ±8,45		0,6512
<i>P</i>	0,3740	0,5040	0,1653	0,2198	0,8494	0,7245	0,8838	0,1610					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise dos dados da pressão parcial de dióxido de carbono sanguíneo, não foram identificadas diferenças entre os tratamentos e entre os grupos ($P>0,05$), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa (Tabela 11; Gráfico 9).

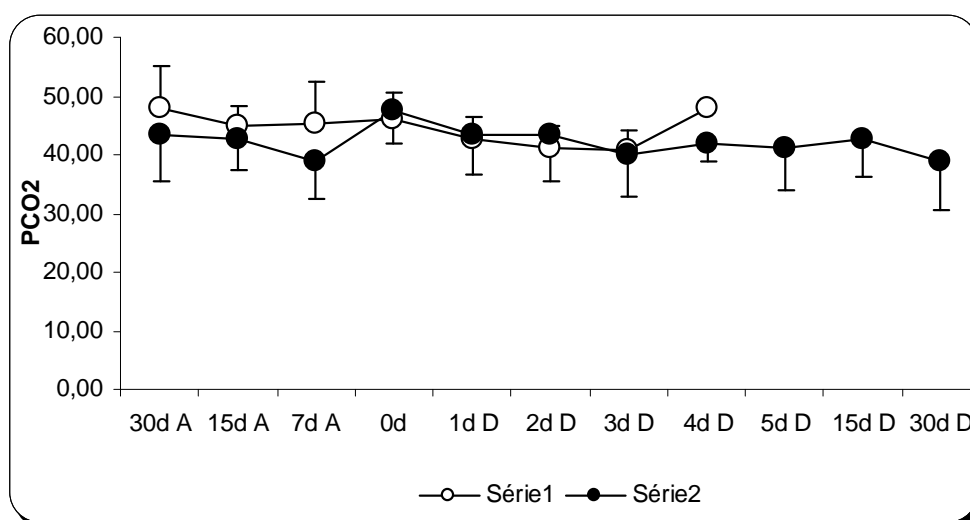


Gráfico 9 - Valores médios e desvios-padrão da pressão parcial de gás carbônico (PCO_2) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

45.3. PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO SANGUÍNEO

Tabela 12 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da pressão parcial de oxigênio (PO₂) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	40,02 ±4,35	38,82 ±3,00	38,80 ±9,51	30,70 ±10,66	26,05 ±4,31	32,35 ±3,04	31,60 ±2,86	30,40					0,1186
					A								
TTM	37,34 ±1,19 b	35,18 ±4,59 bc	36,30 ±5,55 bc	30,30 ±5,06 bcd	28,18 ±6,07 cd	24,88 ±0,87 Bd	28,27 ±2,99 cd	29,15 ±3,47 bcd	29,15 ±4,66 bcd	45,80 ±3,04 a	37,18 ±2,08 b	0,0001	
<i>P</i>	0,2210	0,1765	0,6256	0,9415	0,5740	0,0068	0,6094	0,7687					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise dos dados referentes à pressão parcial de oxigênio sanguíneo, registrou-se efeito de grupos e momentos. Com relação ao grupo controle, nenhuma variação foi observada nos diferentes momentos ($P=0,1186$), porém no grupo de animais tratados com TTM, maior média ($P=0,0001$) foi observada 15 dias após a CH, seguida de 30 dias após e semelhantes aos momentos da fase pré-hemolítica (30dA, 15dA, 7dA). Os menores valores médios foram registrados da CH até o quinto dia (Tabela 12; Gráfico 10).

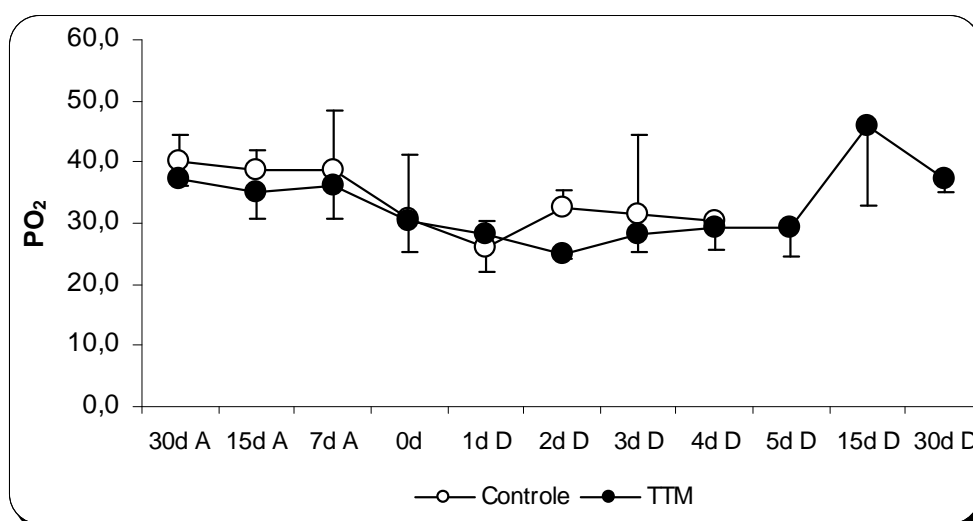


Gráfico 10 - Valores médios e desvios-padrão da pressão parcial de oxigênio (PO₂) sanguíneo (mmHg) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.5.4. CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO SANGUÍNEO

Tabela 13 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da concentração de bicarbonato (HCO₃) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	25,60 ±3,13	24,50 ±2,00	27,18 ±5,45	26,22 ±5,37	26,68 ±4,76	30,25 ±11,10	22,40 ±5,65	25,90					0,8343
TTM	27,16 ±2,10	26,54 ±1,69	23,66 ±3,15	29,18 ±2,98	27,42 ±8,90	27,40 ±5,80	26,60 ±5,06	27,40 ±2,97	25,05 ±4,70	28,63 ±2,50	26,58 ±3,74		0,8407
<i>P</i>	0,2823	0,1198	0,2454	0,3132	0,8852	0,6830	0,4053	0,6821					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise dos dados da concentração sanguínea de bicarbonato, não foram identificadas diferenças para as médias entre os grupos e entre os momentos ($P>0,05$), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa (Tabela 13; Gráfico 11).

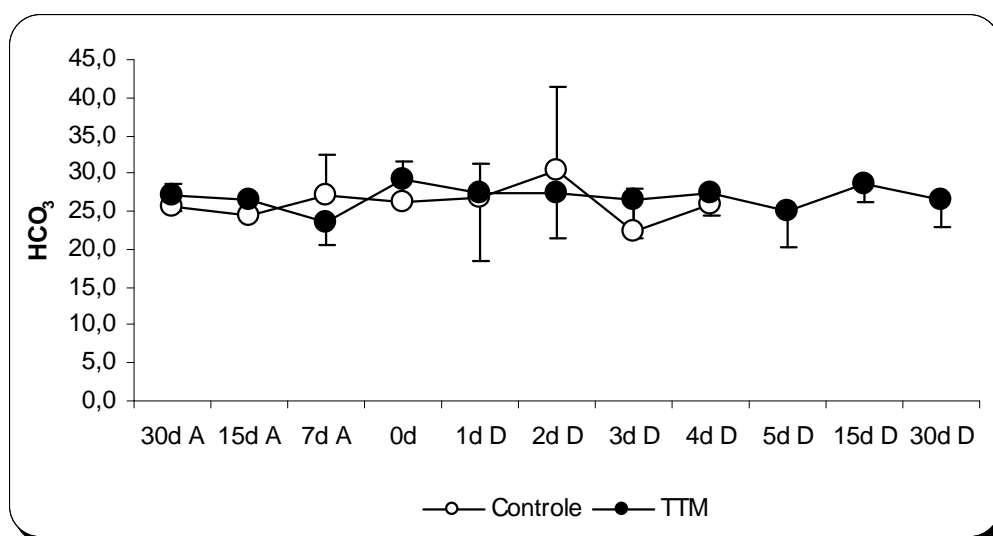


Gráfico 11 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de bicarbonato (HCO_3^-) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.5.5. TOTAL DE DIÓXIDO DE CARBONO SANGUÍNEO

Tabela 14 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) do total de dióxido de carbono (tCO₂) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	53,32 ±4,28 a	52,38 ±6,69 a	28,28 ±5,04 b	27,52 ±5,49 b	27,93 ±4,84 b	28,40 ±6,78 b	23,65 ±5,72 b	27,40 b					0,0010
TTM	35,50 ±6,07	35,38 ±7,73	24,92 ±3,14	30,62 ±3,06	30,76 ±6,95	29,15 ±5,61	28,27 ±4,72	28,43 ±3,26	29,92 ±4,36	30,15 ±2,47	27,55 ±3,77		0,7006
<i>P</i>	0,1010	0,1572	0,2415	0,3025	0,5133	0,8909	0,3454	0,7967					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobínúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Com relação à concentração total de dióxido de carbono no sangue, verificou-se que não houve efeito de grupos, porém verificou-se efeito de momentos. Neste contexto, diferenças foram identificadas nos animais do grupo controle ($P=0,0010$). Maiores concentrações totais de dióxido de carbono foram observados aos 30 e 15 dias anteriores à CH e menores nos momentos subseqüentes (Tabela 14; Gráfico 12).

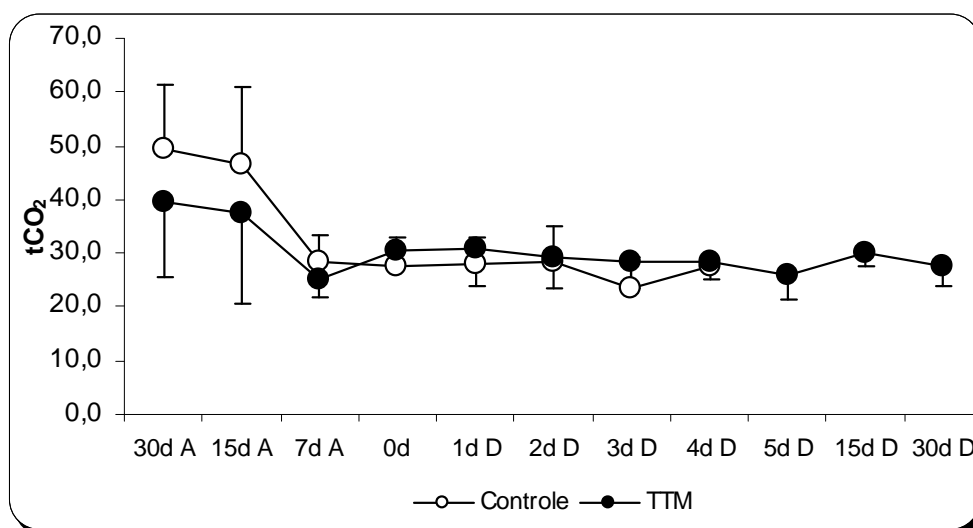


Gráfico 12 - Valores médios e desvios-padrão do total de dióxido de carbono (tCO_2) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.5.6. EXCESSO OU DÉFICIT DE BASE SANGUÍNEO

Tabela 15 – Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) do excesso ou déficit de base (ABE) sanguíneo (mEq/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	3,00	1,26	1,36	3,04	1,70	0,55	-3,05	-0,40					0,9027
TTM	2,14	1,40	1,38	3,10	2,10	2,10	1,25	3,28	1,65	4,63	2,80		0,8789
<i>P</i>	0,5345	0,7897	0,4964	0,3763	0,9409	0,7854	0,4548	0,3054					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobínúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise dos dados do excesso ou déficit de base no sangue, não foram identificadas diferenças significativas para o conjunto de médias entre os grupos e momentos ($P>0,05$), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa (Tabela 15; Gráfico 13).

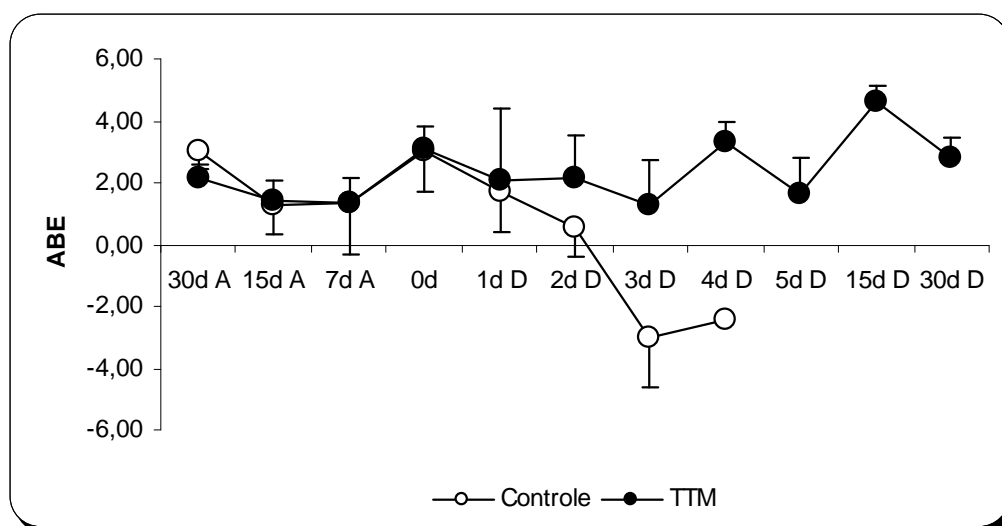


Gráfico 13 – Valores médios e desvios-padrão do excesso ou déficit de base (ABE) sanguíneo (mEq/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.5.7. SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO SANGUÍNEO

Tabela 16 - Valores médios, desvios-padrão e níveis de significância (*P*) da saturação de oxigênio (sO₂) sanguíneo (mMol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											<i>P</i>	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica	Pós-Hemolítica								
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	67,34 ±3,15	73,50 ±14,60	64,58 ±7,17	51,40 ±23,65	47,73 ±9,68	64,70 ±0,28	53,20 ±21,07	54,10					0,1450
						A							
TTM	71,18 ±4,22	61,84 ±17,91	63,94 ±9,77	57,08 ±9,74	51,00 ±13,86	46,50 ±1,83	53,33 ±4,81	55,52 ±5,23	64,25 ±13,94	68,23 ±21,91	71,85 ±4,12		0,0845
						B							
<i>P</i>	0,1422	0,2920	0,9089	0,6329	0,7022	0,0002	0,9904	0,8232					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobínúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Na análise dos dados da saturação de oxigênio sanguíneo de ovinos intoxicados pelo cobre e tratados ou não com TTM, não foram identificadas diferenças significativas para o conjunto de médias entre momentos ($P>0,05$), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa; porém considerando o fator grupos, maiores médias foram identificadas no grupo controle em relação ao grupo TTM ($P=0,0002$) no segundo dia após a CH (Tabela 16; Gráfico 14).

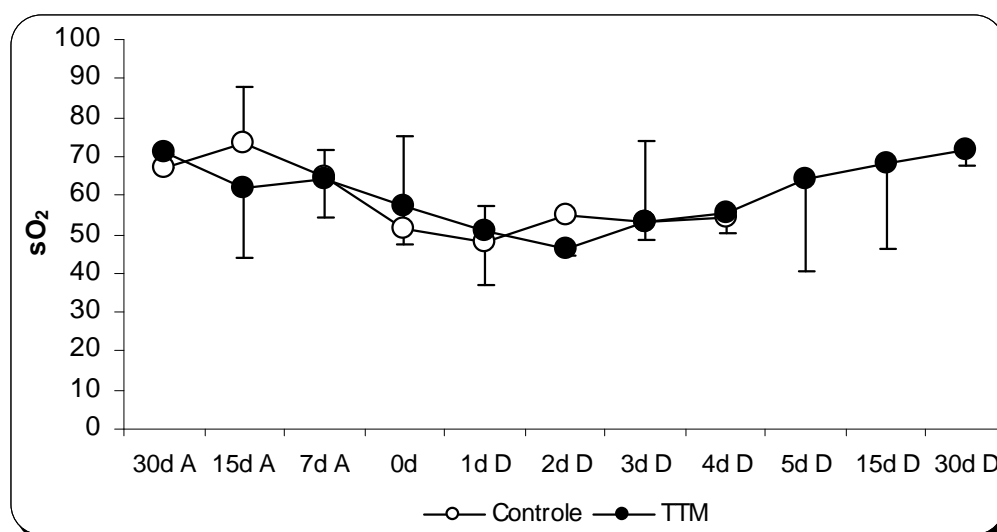


Gráfico 14 - Valores médios e desvios-padrão da saturação de oxigênio (sO₂) sanguíneo (mmol/L) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.6. METABOLISMO OXIDATIVO

4.6.1. CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE MALONDIALDEÍDO

Tabela 17 - Valores de medianas, percentis (P_{25} e P_{75}) e níveis de significância (P) da concentração sanguínea de malondialdeído (MDA) ($\mu\text{Mol/L}$) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											P	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica		Pós-Hemolítica							
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	0,23 0,11;0,47 d	0,43 0,41;0,45 d	0,56 0,50;0,61 d	1,04 0,80;1,12 cd	3,63 2,34;4,10 abA	2,38 2,34;4,10 bcA	2,43 1,52;3,23 bcA	5,19 5,19;6,18 aA					0,0001
TTM	0,26 0,10;0,30 d	0,47 0,46;0,50 cd	1,22 0,59;1,24 b	1,54 1,30;1,60 a	0,95 0,90;0,99 bB	0,89 0,85;1,0 bB	0,92 0,88;1,19 bB	0,85 0,78;1,10 bB	0,80 0,76;1,23 b	0,68 0,49;0,79 bc	0,64 0,49;0,84 bc		0,0001
P	0,5422	0,1570	0,1337	0,3364	0,0086	0,0379	0,0427	0,0034					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Verificou-se efeito significativo para os fatores grupos e momentos da concentração sérica de malondialdeído (MDA) de ovinos intoxicados pelo cobre e tratados ou não com TTM.

Menores teores séricos de MDA foram constatados nos animais do grupo controle, nos momentos correspondentes à fase pré-hemolítica. Já em relação ao momento da CH e os demais da fase pós-hemolítica, estes foram mais elevados, sendo que as maiores médias foram obtidas no primeiro e quarto dias desta última fase ($P < 0,0001$).

Quanto ao grupo TTM, menores teores de MDA também foram observados nos momentos correspondentes à fase pré-hemolítica, obtendo-se elevação desta variável no momento da CH, seguindo-se de menores médias na fase pós-hemolítica ($P < 0,0001$).

Comparando-se os grupos, dentro de cada momento, verifica-se que maiores teores de MDA foram obtidos do primeiro ao quarto dias para os animais do grupo controle, com nível de significância variando de 0,034 a 0,0427 (Tabela 17; Gráfico 15).

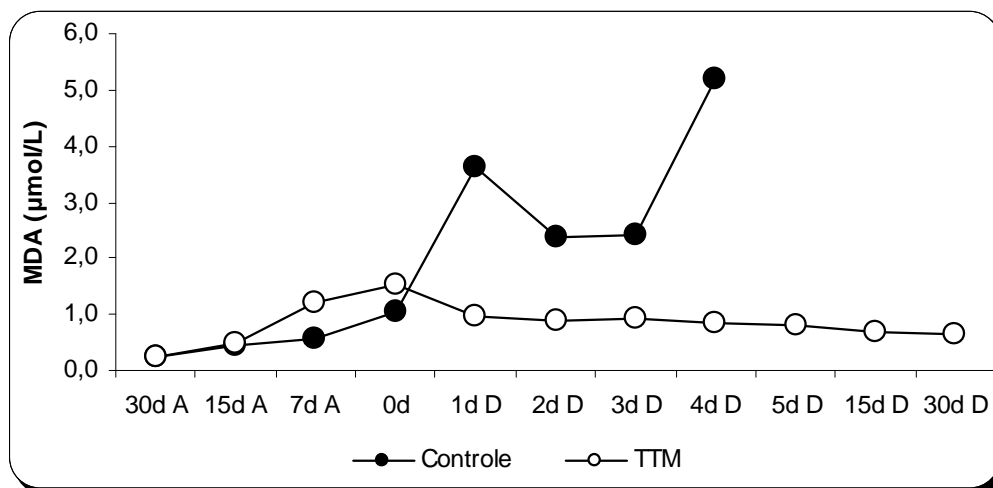


Gráfico 15 - Valores de medianas da concentração sanguínea de malondialdeído (MDA) ($\mu\text{Mol/L}$) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.6.2. CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NOS ERITRÓCITOS

Tabela 18 - Valores de medianas, percentis (P_{25} e P_{75}) e níveis de significância (P) da concentração da glutaciona (GSH) nos eritrócitos (mg de GSH/mL de sangue) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											P
	Pré-Hemolítica			Hemolítica		Pós-Hemolítica						
	30dA ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D	
Controle	60,10	73,58	87,15	32,59	47,83	70,89	65,54	27,77				0,0599
	55;92	70;109	48;96	28;35	25;81	59;89	65;98	28;114	B			
TTM	95,12	87,20	99,90	53,21	48,78	77,39	81,67	134,4	146,75	100,72	106,26	0,0001
	79;108	85;110	99;114	43;61	34;65	69;82	65;91	106;136	98;205	78;12	101;129	
P	0,1208	0,6141	0,1220	0,1876	0,9296	0,7073	0,0603	0,0352				

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Obteve-se efeito de grupos e momentos para os teores de glutathiona (GSH) nos ovinos intoxicados pelo cobre e tratados ou não com TTM. Com relação ao grupo controle, embora tais teores tenham sido menores no momento da CH, estes se mantiveram análogos aos momentos antes e após a CH ($P=0,0599$). Com relação ao grupo TTM, menores médias da GSH foram registradas no momento da CH e nos primeiros três primeiros dias pós tratamento, em relação aos momentos da fase pré-hemolítica ($P<0,0001$). As maiores médias foram obtidas no quarto e quinto dias do tratamento, semelhantes aos valores basais dos 15 aos 30 dias.

Analisando as medianas entre grupos dentro de cada momento, identificaram-se maiores concentrações de GSH no quarto dia após a CH, no grupo de animais tratados com TTM ($P=0,0352$) (Tabela 18; Gráfico 16).

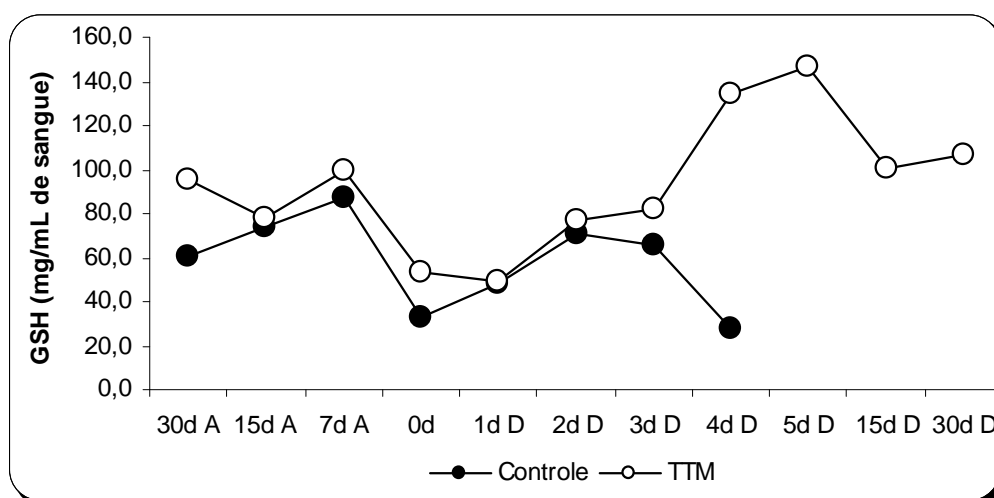


Gráfico 16 - Valores de medianas da concentração da glutathiona (GSH) nos eritrócitos (mg de GSH/mL de sangue) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.6.3. ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE

Tabela 19 - Valores de medianas, percentis (P_{25} e P_{75}) e níveis de significância (P) da atividade da glicose – 6 – fostato – desidrogenase (G-6-PD) no sangue (UI/g Hb) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											P	
	Pré-Hemolítica			Hemolítica			Pós-Hemolítica						
	30d A ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D		
Controle	0,63	0,70	0,85	1,72	2,07	2,84	2,99	3,44					0,0001
	0,6;0,71	0,7;0,7	0,8;1,0	0,9;4,0	1,8;3,0	4,7;3,0	2,8;3,2	3,4;3,2					
	c	c	c	b	aA	a	aA	a					
TTM	0,62	0,63	0,75	1,17	0,81	2,02	1,89	1,80	2,27	1,59	1,10		0,0001
	0,3;0,7	0,6;0,9	0,7;0,8	0,9;1,3	0,7;1,4	1,4;2,1	1,5;1,9	1,7;2,9	2,2;2,4	1,5;1,8	0,9;1,7		
	c	c	c	b	bB	a	aB	a	a	a	ab		
P	0,0804	0,3620	0,0635	0,17775	0,0132	0,1300	0,0220	0,8972					

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobínúria macroscópica. ³ Depois da CH.

A atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) teve efeito entre grupos e momentos. Maiores valores da atividade da enzima G6PD foram observadas nos momentos correspondentes à fase hemolítica e pós hemolítica em relação aos demais momentos nas fases pré-hemolítica ($P < 0,0001$). No grupo de animais tratados com TTM, menores valores médios obtidas nas fases pré-hemolítica e no momento da CH, enquanto que na fase pós-hemolítica, correspondente ao tratamento com TTM, maiores médias foram obtidas do segundo ao 30 dias ($P < 0,0001$).

Quanto ao contraste de médias entre grupos dentro de cada momento, maiores médias fora, registradas no primeiro e terceiro dias após a CH, para os animais do grupo controle em relação ao grupo TTM ($P = 0,0132$ e $P = 0,0220$, respectivamente) (Tabela 19; Gráfico 17).

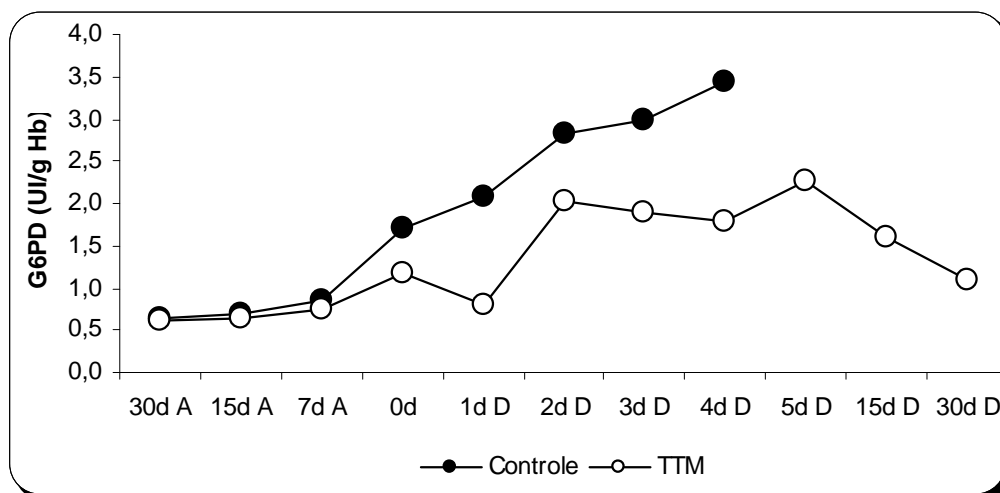


Gráfico 17 - Valores de medianas da atividade da glicose – 6 – fostato – desidrogenase (G-6-PD) no sangue (UI/g Hb) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.6.4. HABILIDADE DE REDUÇÃO FÉRRICA PLASMÁTICA

Tabela 20 - Valores de medianas, percentis (P_{25} e P_{75}) e níveis de significância (P) da habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) ($\mu\text{Mol/L}$) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Grupos	Fases da Intoxicação											P		
	Pré-Hemolítica			Hemolítica			Pós-Hemolítica							
	30dA ¹	15d A	7d A	CH ²	1d D ³	2d D	3d D	4d D	5d D	15d D	30d D			
Controle	581,60	567,60	595,60	2266,80	3270,30	1550,20	1424,20	699,60						
	576;644	544;583	590;810	2003;2537	2589;5344	732;4369	971;1877	699;930						0,0002
	c	c	c	b	a	bc	bc	c						
TTM	533,60	635,60	573,60	1804,80	2758,80	2612,40	1925,60	1370,80	1290,80	716,80	604,30			
	532;582	615;681	574;642	909;1970	2171;2830	1415;4676	1372;2828	761;2335	709;2128	589;792	588;626			0,0005
	d	cd	cd	ab	a	a	ab	bcd	bcd	cd	cd			
P	0,3946	0,1123	0,2722	0,2409	0,1912	0,4693	0,4707							

Letras minúsculas distintas nas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os momentos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. ¹ Antes da CH. ² CH – Crise Hemolítica – Hemoglobinúria macroscópica. ³ Depois da CH.

Não foram registradas diferenças do método que avalia a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) nos ovinos intoxicados e tratados ou não com TTM. Já em relação aos momentos, dentro de cada grupo, verificou-se efeito significativo, considerando-se as fases da intoxicação cúprica.

No grupo controle maior HRFP foi registrado no primeiro dia após a CH em relação ao momento da CH e no segundo e terceiro dias após a CH. Os menores valores de mediana foram registrados na fase pré-hemolítica e no quarto dia após a CH ($P=0,0002$).

Com relação ao grupo TTM, maiores valores foram observados no momento da CH, seguido do primeiro ao terceiro dias da fase pós-hemolítica. Verificando-se, ainda, que estes os valores decresceram com o tempo, e que aos 30 dias após início do tratamento estes valores estiveram próximos aos valores registrados na fase pré-hemolítica ($P=0,0005$) (Tabela 20; Gráfico 18).

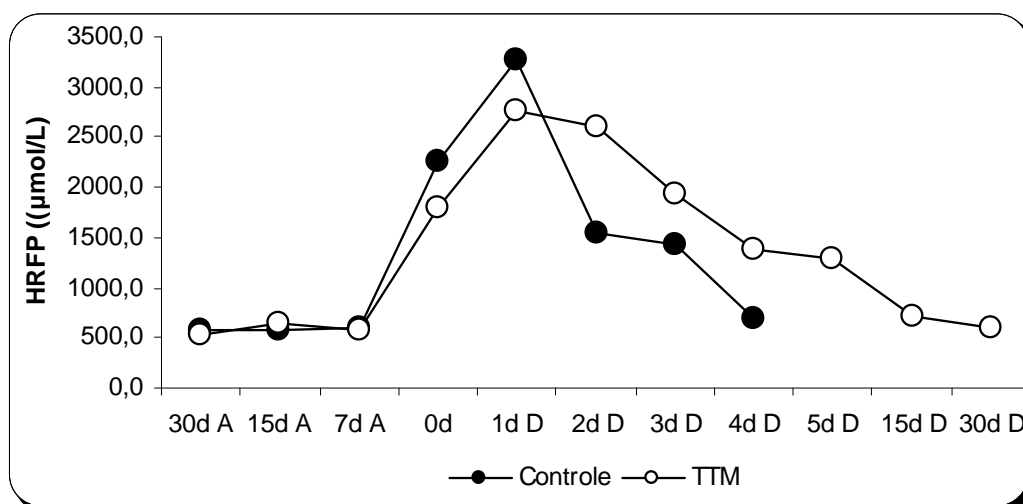


Gráfico 18 - Valores de medianas da habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) ($\mu\text{Mol/L}$) de ovinos dos grupos controle e tratados com tetratiomolibdato (TTM), nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

4.7. ANÁLISE DE RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

Correlação significativamente positiva ($P < 0,0001$; $r = 0,90$) foi observada para a concentração de HCO_3 (mMol/L) e ABE (mEq/L), ou seja, quanto maior for a concentração sanguínea de HCO_3 maior a concentração do ABE nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: $\text{HCO}_3 = 0,9287 \text{ ABE} - 23,046$ e demonstrada no gráfico 19.

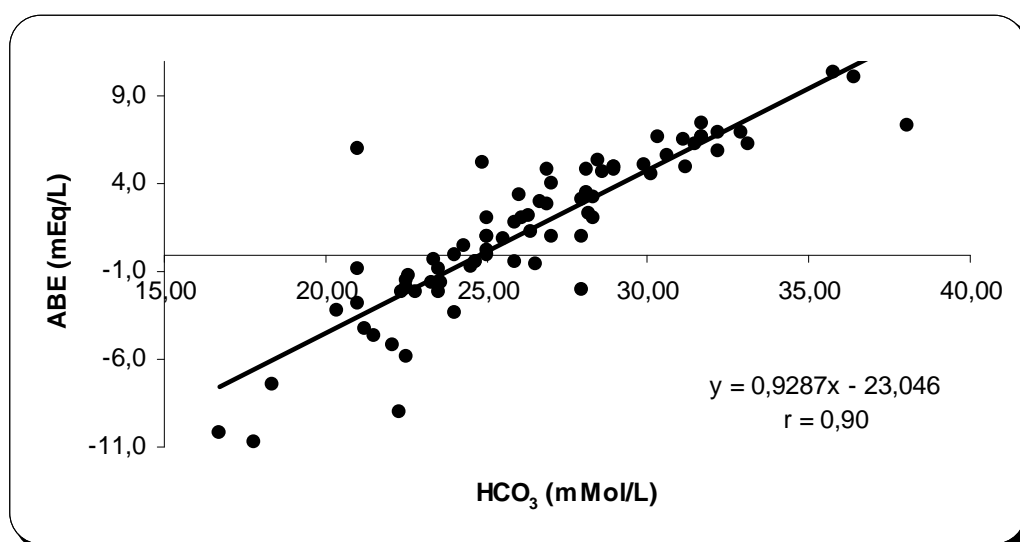


Gráfico 19 – Relação entre a concentração de HCO_3 (mMol/L) e ABE (mEq/L) sanguíneos em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Ocorreu uma correlação significativa ($P < 0,0001$; $r = 0,60$) para que quanto maior fosse a concentração de PCO_2 (mmHg) maior a concentração de tCO_2 (mMol/L) no sangue dos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: $\text{HCO}_3 = 0,766\text{tCO}_2 - 1,1506$ e demonstrada no Gráfico 20.

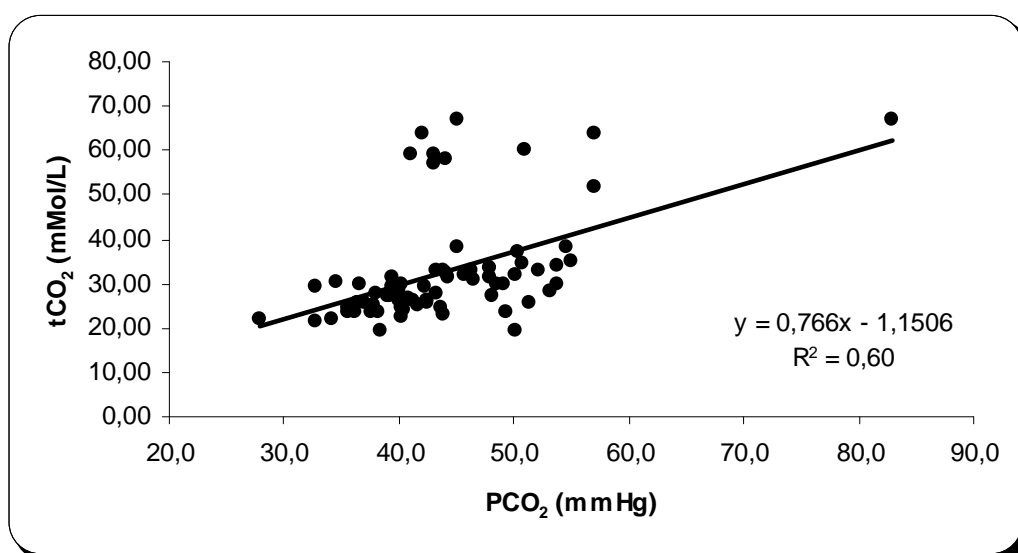


Gráfico 20 – Relação entre concentração de PCO_2 (mmHg) e tCO_2 (mMol/L) sanguíneos em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

A análise da relação entre a concentração de HCO_3 (mMol/L) e pH sanguíneos dos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM, nas diferentes fases da indução experimental mostrou uma relação positiva ($P < 0,0001$; $r = 0,52$), representada pela equação: $\text{HCO}_3 = 0,0089_{\text{pH}} + 7,1603$ e demonstrada no gráfico 21.

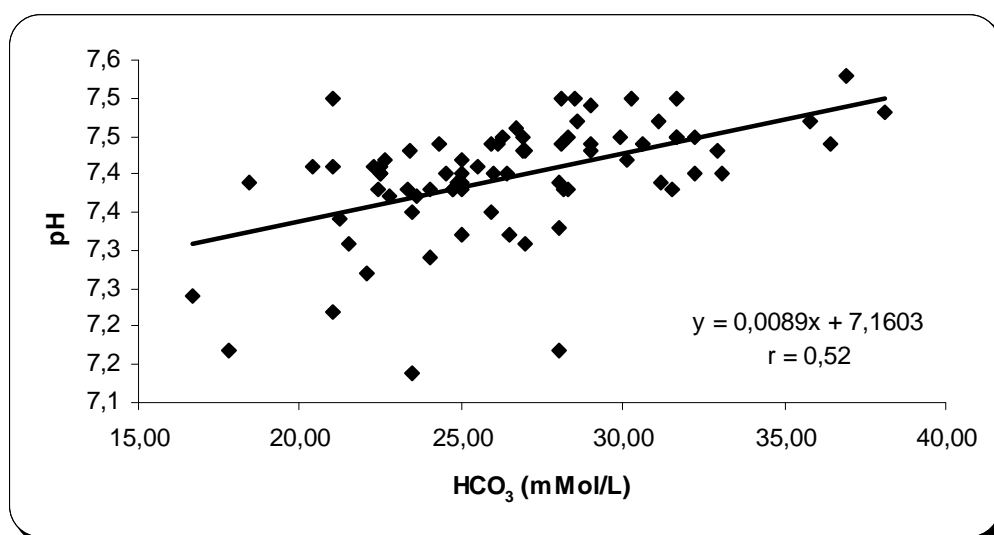


Gráfico 21 – Relação entre a concentração de HCO_3 (mMol/L) e pH sanguíneos em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Ocorreu uma correlação significativa ($P < 0,0001$; $r = 0,60$) para que quanto maior fosse a concentração do ABE (mEq/L) maior o pH sanguíneo nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: $\text{ABE} = 0,0097_{\text{pH}} + 7,3817$ e demonstrada no gráfico 22.

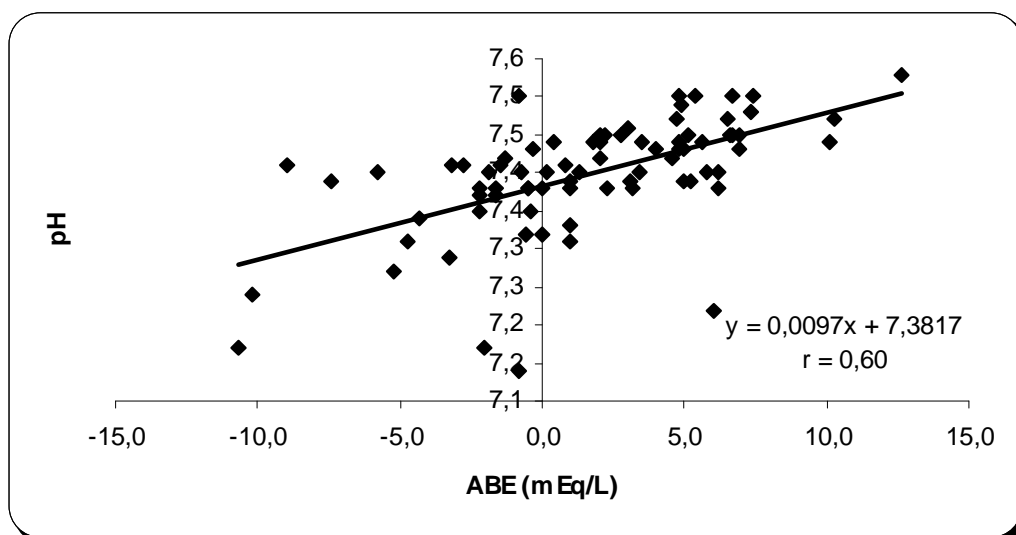


Gráfico 22 – Relação entre a concentração do ABE (mEq/L) e o pH sanguíneo em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Uma relação significativa e negativa ($P < 0,0004$; $r = -0,46$) foi observada entre a concentração de PCO_2 (mmHg) e o pH sanguíneo nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: $\text{PCO}_2 = 0,045_{\text{pH}} + 7,5954$ e demonstrada no gráfico 23.

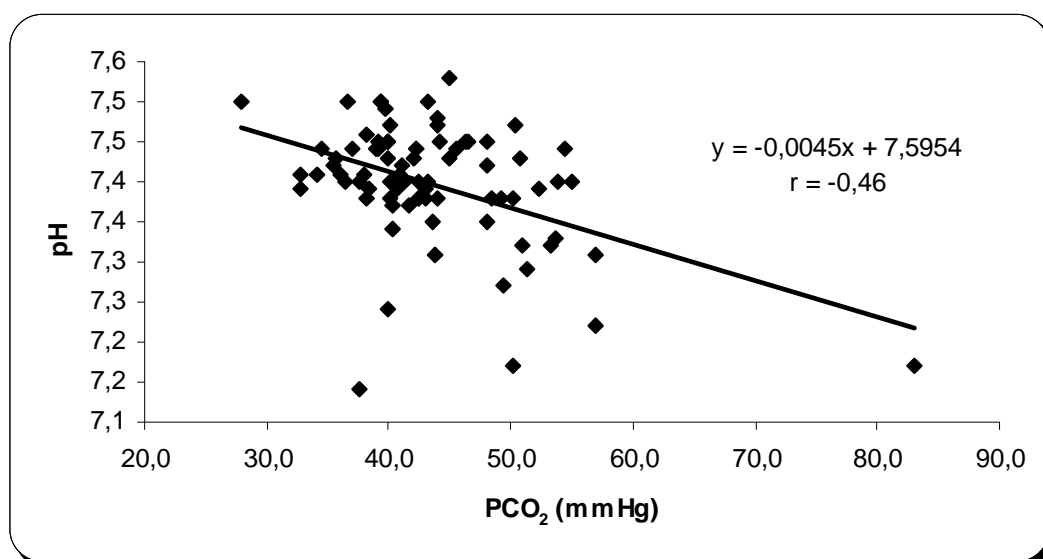


Gráfico 23 – Relação entre a PCO_2 (mmHg) e o pH sanguíneo em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

A análise de relação entre o teor sérico de malondialdeído ($\mu\text{Mol/L}$) e atividade da glicose-6 fosfato-desidrogenase (UI/g Hb) evidenciou uma alta relação positiva ($P < 0,0001$; $r = 0,60$) nos animais que foram intoxicados pelo cobre, tratados ou não com TTM, e esta relação está expressa pela equação: $\text{G6PD} = 0,4918_{\text{MDA}} + 0,8327$ e ilustrada no gráfico 24.

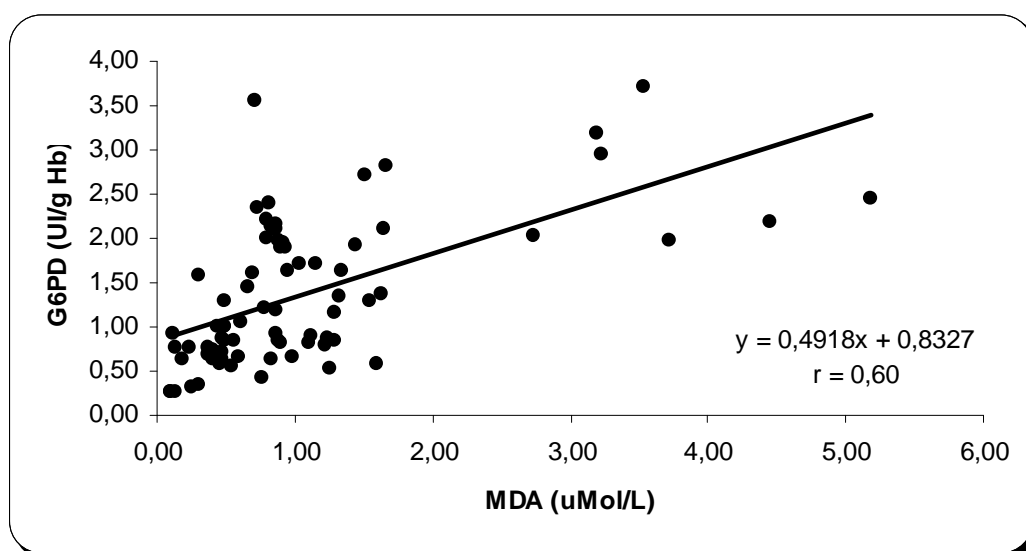


Gráfico 24 – Relação entre o MDA ($\mu\text{mol/L}$) e a G6PD (UI/g Hb) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

A análise de relação entre a concentração sérica de malondialdeído ($\mu\text{Mol/L}$) e do método que avalia a habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) evidenciou uma alta relação positiva ($P < 0,0001$; $r = 0,71$) nos animais que foram intoxicados pelo cobre, tratados ou não com TTM, e esta relação está expressa pela equação: $\text{HRFP} = -6,2861_{\text{MDA}}^2 + 986,44_{\text{MDA}} + 483,44$ e ilustrada no gráfico 25.

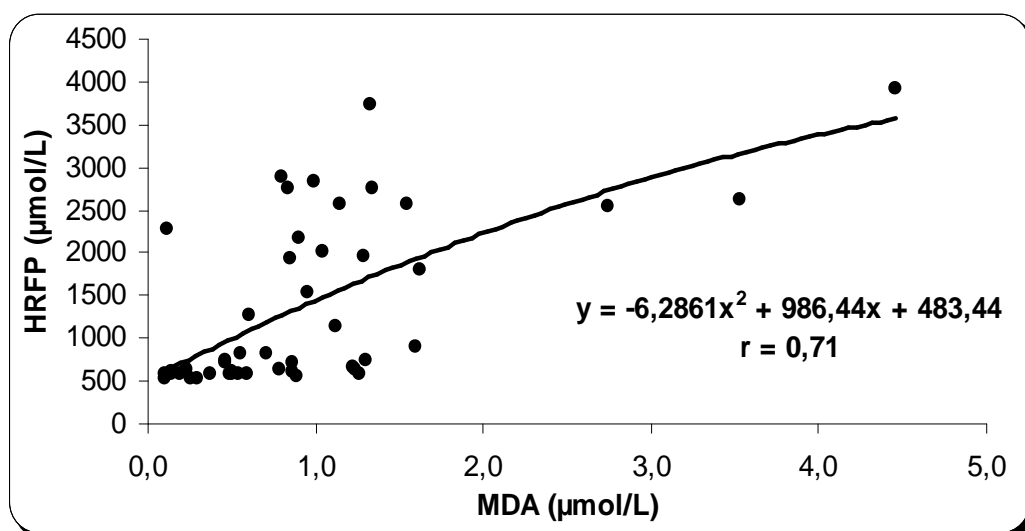


Gráfico 25 – Relação entre o MDA ($\mu\text{mol/L}$) e o método HRFP ($\mu\text{mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Ocorreu correlação significativa ($P < 0,0001$; $r = 0,70$) para que quanto maior fosse a concentração sérica do cobre ($\mu\text{Mol/L}$), maior o teor sérico de MDA ($\mu\text{Mol/L}$) nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: $\text{MDA} = 0,0227\text{Cu}_{\text{Sr}} + 0,1948$ e demonstrada no gráfico 26.

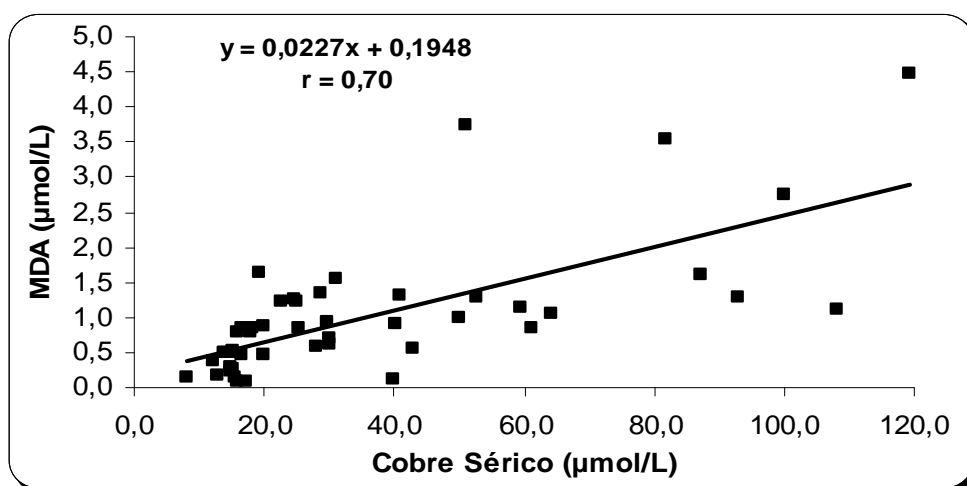


Gráfico 26 – Relação entre concentração sérica do cobre ($\mu\text{Mol/L}$) e da concentração de MDA ($\mu\text{Mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Ocorreu moderada relação negativa ($P < 0,05$; $r = -0,32$) entre o cobre sérico e a GSH, ou seja, quanto maior a concentração sérica do cobre ($\mu\text{Mol/L}$) menor a atividade da GSH (mg GSH/mL de sangue) nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: **$\text{CuSr} = 0,4103\text{GSH} + 93,293$** e demonstrada no gráfico 27.

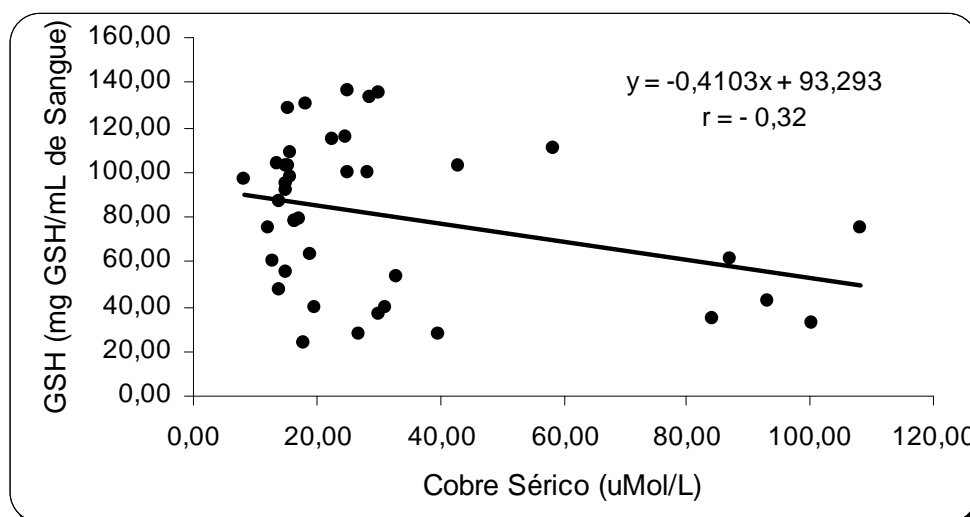


Gráfico 27 – Relação entre a concentração sérica do cobre ($\mu\text{Mol/L}$) e a atividade da GSH (mg GSH/mL de sangue) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

Ocorreu uma moderada correlação negativa, com efeito quadrático ($r = -0,50$), entre o teor sérico de cobre ($\mu\text{Mol/L}$) e a habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) nos ovinos que foram intoxicados com cobre, tratados ou não com TTM. A relação está representada pela equação de regressão: $\text{CuSr} = -0,2805_{\text{HRFP}}^2 + 42,697_{\text{HRFP}} + 182,61$ e demonstrada no gráfico 28.

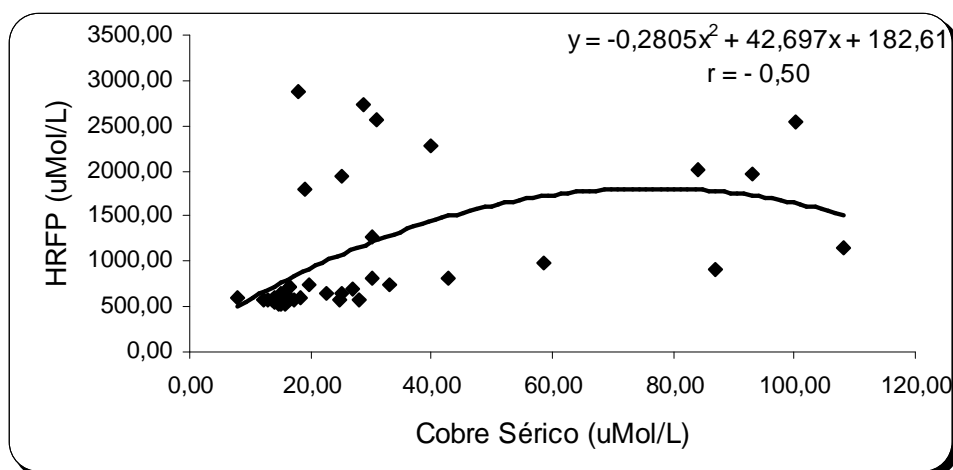


Gráfico 28 – Relação entre o teor sérico de cobre ($\mu\text{Mol/L}$) e a habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) em ovinos com ICC, tratados ou não com TTM, nas fases pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica da intoxicação cúprica cumulativa

5. DISCUSSÃO

5.1. ASPECTOS CLÍNICOS DA INTOXICAÇÃO CÚPRICA E TRATAMENTO

Com base nos dados referentes à dose acumulada de cobre necessária para a definição do quadro de intoxicação cúprica nos ovinos (Tabela 1), os teores séricos (Tabela 2; Gráfico 1) e hepáticos de cobre (Tabela 2), é possível considerar que o protocolo de indução da ICC foi eficiente, sendo possível a reprodução com as características clínicas que são frequentemente encontradas em situações naturais, pela ingestão e conseqüente acúmulo de cobre hepático ao longo do tempo. No campo sabe-se que a crise hemolítica é determinada pelo excesso de cobre hepático e pela liberação do cobre livre para a corrente circulatória desencadeando alterações de diferentes sistemas, culminando com a morte dos animais.

Como comprovado por Machado (1998) e Soares (2004), a administração de doses progressivas e corrigidas pelo peso vivo de sulfato de cobre permitiu a indução da ICC, principalmente pelo fato de se ter uma condição de previsibilidade para o aparecimento do quadro de crise hemolítica, diferentemente de outros modelos que são utilizados com uso de doses fixas e contínuas (GOONERATNE et al., 1981; SUTTLE, 1986; HUMPHRIES, 1988; LEMOS et al. 1997; UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; ANTONELLI, 2007).

Outros achados semelhantes aos de Machado (1998) foram em relação ao exame físico, considerando-se os sinais vitais registrados nas diferentes fases da intoxicação: fase pré-hemolítica, hemolítica e pós-hemolítica. Importante ressaltar que os animais apresentavam mudança de comportamento na semana que antecedia a crise hemolítica, e que era visível a mudança dos aspectos organoléptico da matéria fecal dos animais, quando estas se apresentavam de pastosas a diarréicas, aderidas a muco, de coloração enegrecida e com odor nauseabundo. Estes indicadores foram fortemente indicativos para o acompanhamento da evolução do quadro quando se esperava observar a hemoglobinúria macroscópica. Era marcante, também, a diminuição progressiva do apetite, em que os animais rejeitavam a oferta de concentrado e priorizavam o consumo do feno, por conseguinte, à medida que se aproximava da crise hemolítica, os animais rejeitavam também o feno e a água

oferecidos. O estado de hiporexia que evoluiu para anorexia pode ser explicada pelo conjunto de alterações orgânicas desencadeadas desde a hemólise intravascular e conseqüente alterações de outros sistemas, como o hepático (MACHADO, 1998), e o renal (SOARES, 2004).

O elevado teor de cobre sérico (Tabela 2; Gráfico 1), que teve seu auge na crise hemolítica, provocou uma seqüência de reações em cadeia que desencadearam intensas alterações e estas foram confirmadas no trabalho mais recentes a este pelo Antonelli (2007).

Quanto aos parâmetros físicos, evidencia-se que ocorreram modificações significativas nas diferentes fases da intoxicação, para a frequência cardíaca, frequência respiratória, motilidade ruminal, peso vivo e volume urinário.

O processo hemolítico é considerável quando animais são intoxicados pelo cobre, visto que estes podem perder de 50 a 75% de seus eritrócitos (Machado, 1998), advindo uma severa anemia (SOARES, 2004; ANTONELLI, 2007). Como mecanismo compensatório, o organismo tem a capacidade de prover maior resistência vascular periférica, permitindo efetivo volume circulatório na micro circulação, no intuito de manter o débito cardíaco e, como paralelo a isso, justifica-se o aumento da frequência cardíaca, permitindo a micro circulação projetar volume sanguíneo suficiente para diversos órgãos.

A bradipnéia observada de modo significativo nos animais do grupo TTM também foi identificada por Machado (1998), Lemos et al (1997) e Sarginson e Scott (1996). Machado (1998) ressalta que seria de se esperar a taquipnéia frente à condição de anemia do tipo hemolítica e taquicardia compensatória como visto nos animais, contudo este perfil pode ser melhor explicado pela insuficiência renal registrada (SOARES, 2004). Melhor análise desse perfil será feita com o conjunto das variáveis da hemogasometria, uma vez que se observou uma alcalose metabólica, pela retenção de bicarbonato e refletido na ABE sanguínea dos animais intoxicados pelo cobre.

Com relação à temperatura retal, foi possível registrar uma tendência ($P=0,0833$) para quadro de hipertermia da fase pré-hemolítica à crise hemolítica. Machado (1998) reporta que embora o quadro clínico no dia da hemoglobinúria macroscópica tenha sido semelhante nos ovinos dos vários grupos intoxicados, tratados com diferentes doses de

TTM, logo em seguida ao estabelecimento dos tratamentos ocorreram diferenças perceptíveis quanto à intensidade e a duração dos sinais clínicos. A tendência a hipertermia na crise hemolítica pode ser um dos fatores que justificasse a anorexia e a menor motilidade ruminal dos ovinos, além da uremia (SOARES, 2004) que por se pode causar desde hiporexia até anorexia (BLOOD e RADOSTITS, 1989; MACHADO, 1998). Uma hipertermia de intensidade moderada em ovinos intoxicados pelo cobre pode ser justificada pela presença de debris celulares oriundos da hemólise intravascular, os quais atuam como pirógenos que estimulam o centro termorregulador (BLOOD e RADOSTITS, 1989). Machado (1998) cita a relação existente entre a hipertermia com a hipomotilidade ruminal, visto que Veenendaal et al. (1980) estudaram o papel das prostaglandinas circulantes na gênese de pirógenos (endotoxinas), induzindo a estase ruminal em caprinos.

Os animais do grupo que recebeu o TTM mantiveram diminuídos os pesos vivos ao logo de 30 dias após o recebimento da primeira dose de TTM. Machado (1998) constatou que 29 dias após a crise hemolítica o grupo de animais que receberam TTM na dose 3,4 mg/kg/PV não apresentaram diferenças significativas do peso corporal em relação ao grupo controle e que sua vez foram maiores que o grupo que recebeu 1,7 mg/kg/PV, indicando que a dose de maior potencial quelante restabeleceu mais rapidamente o estado geral dos animais.

Já em relação ao volume urinário, este foi menor na crise hemolítica e para os animais do grupo controle esta diminuição foi constante até o óbito. Quanto aos demais do grupo TTM, percebe-se uma recuperação da diurese ao longo do tempo. Soares (2004) registrou marcantes alterações na hemodinâmica renal, as quais sempre precedem o aumento da concentração sérica de uréia e creatinina, registrando expressiva diminuição da taxa de filtração glomerular durante a crise hemolítica, denominada pela taxa de depuração endógena de creatinina. Como aqui analisado, a drástica redução dessa taxa definiu, conseqüentemente, a oligúria e anúria.

Como visto nos perfil de diferentes variáveis, no momento após a crise hemolítica, coincidindo com o recebimento do TTM, foi possível verificar uma evolução satisfatória da condição clínica dos animais, constatando-se que o uso de TTM na dose de 3,4mg/kg/PV foi suficiente para debelar o grau de injúria nos diferentes sistemas,

com controle efetivo do sistema cárdio-respiratório, temperatura corporal, recuperação do apetite, aumento da ingestão de alimentos, recuperação do aspecto das fezes e urina e estado de alerta. Ao contrário dos animais deste grupo, os animais que não receberam o TTM vieram a óbito rapidamente. Incontestável a eficiência do uso de TTM na intoxicação cúprica em ovinos, mesmo que em diferentes doses, como as que classicamente têm sido recomendadas (1,7 e 3,4 mg/kg/PV) (GOONERATNE et al., 1981; GOONERATNE e CHRISTENSEN, 1984; HUMPHRIES et al., 1986; KUMARATILAKE e HOWELL, 1989; SUTTLE, 1995; MACHADO, 1998; SOARES, 2004). Torna-se necessário averiguar a hipótese de que o uso de maiores doses deste produto seja capaz de oferecer melhor condição clínica aos animais imediatamente após a crise hemolítica, verificando se o potencial quelante deste produto pelo cobre favorece uma recuperação mais rápida e mais eficiente.

5.2. PERFIL HEMOGASOMÉTRICO

Com base no conjunto de dados avaliados, percebe-se que os animais manifestaram um perfil de discreta acidose respiratória e alcalose metabólica. As alterações hemogasométricas dos ovinos intoxicados pelo cobre foram semelhantes às observadas por Machado (1998) e Morgado et al. (2007), os quais também trabalharam com ovinos e identificaram tal perfil. Como visto nos resultados, efeitos de grupos e momentos foram identificados, sendo que a abordagem mais significativa foi identificada no momento da crise hemolítica.

O que chama a atenção em relação à intoxicação cúprica cumulativa em ovinos é o fato de nunca se ter avaliado os perfis respiratórios e metabólicos. O único registro de distúrbio ácido-básico, com características de acidose respiratória e alcalose metabólica foi registrada por Machado (1998) e Morgado et al. (2007), sendo este perfil notavelmente reproduzido neste experimento, com o mesmo perfil, tanto em ovinos da raça Ile-de-France como da Santa Inês.

Ao contrário do que se verificou nesse estudo, Quiroz-Rocha et al. (2000) e Ortolani (2003) reportam que a acidose metabólica é o problema mais freqüente de desequilíbrio ácido-básico em medicina veterinária, apresentando-se quando existe

uma perda de bicarbonato ou um aumento de ácidos orgânicos. Torna-se inédito e importante o respectivo perfil hemogasométrico encontrado na espécie ovina quando intoxicada pelo cobre, visto se tratar de uma das principais enfermidades nesta espécie, não só no Brasil, mas em todo o mundo.

No caso da acidose respiratória, como foi vista aqui, pode ser caracterizada pelo aumento da PCO_2 (hipercapnia), a qual é mais comumente associada à hipoventilação alveolar, o que está relacionada com o perfil clínico de baixa frequência respiratória e até mesmo disfunção renal.

O perfil de acidose respiratória foi acompanhado de alcalose metabólica (DiBARTOLA, 2007). Segundo este trabalho, os mecanismos de compensação de natureza renal e também respiratória, como esperados no distúrbio ácido-básico definido pela intoxicação cúprica, é de elevação da concentração do HCO_3 (alcalose metabólica) e aumento da pressão parcial de CO_2 (acidose respiratória).

O hipoventilação, verificada pela menor frequência respiratória (Tabela 5; Gráfico 3), pode ser explicada pelo fato de que a resposta respiratória à alcalose metabólica ser resultante da diminuição da concentração de H^+ que acompanha a alcalose metabólica, e esta estimula quimiorreceptores responsáveis pelo decréscimo da ventilação alveolar. A hipoventilação alveolar secundária ou de adaptação mantém o pH quando há aumento da concentração plasmática de HCO_3 (QUIROZ-ROCHA et al., 2000; DiBARTOLA, 2007).

Como ficou registrada, a menor frequência respiratória no momento em que se caracterizou a crise hemolítica, evidenciando uma condição de hipoventilação, foi significativamente menor neste momento em relação aos momentos da fase pré-hemolítica, e, segundo Martinelli (2006) e DiBartola (2007), esta resposta frente à alcalose metabólica geralmente parece ser menos acentuada do que aquela da acidose metabólica. Realmente, não foi identificada uma depleção forte desta frequência, a qual foi recuperada nos animais do grupo tratado com TTM, verificando-se mais uma vez a importância do uso do TTM, que tem grande poder quelante sobre o cobre livre circulante.

Como visto nos perfis da PCO_2 depois da CH, esta variável apresentou um perfil de recuperação, considerando-se os valores anteriores a CH. Conforme Almosny

(2003), em situações de acidose respiratória, os sistemas amortecedores respondem imediatamente, porém a resposta não é completa e duradoura. A causa precisa ser corrigida, senão a acidose persistirá. No caso do grupo tratado com TTM, este perfil foi longitudinalmente análogo ao momento basal, cuja ação de quelação do cobre permitiu uma evolução clínica satisfatória.

Outra consideração importante a fazer em relação ao perfil da acidose respiratória é que esta também é responsável pelo aumento da frequência cardíaca (Tabela 4; Gráfico 2), aumento da temperatura retal (Tabela 6; Gráfico 4) e vasodilatação periférica, sendo responsável por estímulo simpático (ALMOSNY, 2003; DiBARTOLA, 2007), e tal observação foi coincidente com achados clínicos observados nos animais desse estudo.

Com base nos dados, a alcalose metabólica encontrada foi, certamente, definida pela retenção de bicarbonato sanguíneo e refletida na ABE sanguínea, os quais se apresentaram em níveis elevados na crise hemolítica. Tal achado também foi discutido por Machado (1998) e mais recentemente por Morgado et al. (2007). Machado (1998) descreveu que na compensação da alcalose metabólica, detectado em ovinos intoxicados por cobre, o organismo diminui a frequência respiratória com o intuito de elevar a PCO_2 no sangue, e este perfil foi registrado nos experimentos com o mesmo modelo de indução a ICC, particularmente nos animais do grupo TTM, no momento da crise hemolítica.

Morgado et al. (2007) encontraram valores de HCO_3^- e ABE bem acima dos valores de normalidade citados por Ortolani (2003), quando avaliando os valores obtidos no momento inicial da indução experimental com os valores no momento da crise hemolítica, encontrou de 28,3 a 33,8 mMol/L do HCO_3^- sanguíneo e de 6,3 a 9,2 do ABE na crise hemolítica. Embora não tenha identificado diferenças significativas com os valores basais, estes estiveram bem acima dos valores de normalidade e com o mesmo perfil observado neste experimento, caracterizando-se, em ambos os estudos, um perfil de alcalose metabólica frente à ação lítica do cobre livre no sangue, associado ao estresse oxidativo eritrocitário, como descreveu Soares (2004). Morgado et al. (2007) ainda citam que o quadro hemolítico faz com que o animal não consiga regular o excesso de base através da reação com o CO_2 e, por conseguinte, ocorre elevação dos

teores de ABE para haver um tamponamento e evitar que se instale um quadro de alcalose, embora nessa situação metabólica tenha acontecido no momento da crise hemolítica, justificando um desequilíbrio ácido-básico a ser considerado na avaliação dos animais nessa condição clínica.

Neste experimento foi possível identificar uma significativa relação positiva entre estes dois parâmetros ($r=0,90$; $p < 0,0001$). Tais observações são de extrema importância na compreensão da fisiopatologia da intoxicação cúprica em ovinos, uma vez que estes são os trabalhos pioneiros sobre tal assunto.

Importante considerar, também, a relação existente entre as variáveis do perfil hemogasométrico, como visto com relação a HCO_3 com o ABE ($r = 0,90$), PCO_2 com a tCO_2 ($r = 0,60$) e, considerando o perfil do pH sanguíneo, as concentrações de HCO_3 ($r = 0,50$), ABE ($r = 0,60$) e PCO_2 ($r = -0,46$) definiram uma influência significativa no perfil deste parâmetro sanguíneo. Torna-se evidente que a intoxicação pelo cobre em ovinos define claramente alteração tanto respiratória quanto metabólica, particularmente no momento da crise hemolítica. Conforme descreve DiBartola (2007), não havendo depleção de volume ou disfunção renal, é extremamente difícil induzir um quadro de alcalose metabólica; ficando evidente que os animais com tal intoxicação apresentam significativas alterações da função renal, além da volemia, visto que neste caso ocorre significativa lise hemática e compromete sobremaneira a dinâmica circulatória, podendo estabelecer situação de choque hipovolêmico.

Em estados de insuficiência renal, como comprovado por Soares (2004), o qual identificou este tipo de distúrbio frente à avaliação de diferentes variáveis da função renal nos animais que fizeram parte deste mesmo estudo, reforça-se a teoria de Carlson (1989), que menor filtração de bicarbonato pelos glomérulos está acompanhada de aumento da reabsorção deste, elevando-se, por conseguinte, sua concentração no sangue, identificando-se um estado de alcalemia. O rim regula o metabolismo do bicarbonato de sódio, mantendo estável a sua concentração sérica (Martinelli, 2006). Assim sendo, a resposta fisiológica do organismo à alcalose metabólica é a de elevar a PCO_2 , de tal maneira que a cada 10 mEq/L de aumento de bicarbonato corresponda um aumento da PCO_2 de aproximadamente 6 mmHg. Neste

estudo foi possível obter uma relação moderada e positiva entre a PCO_2 com a concentração sanguínea de HCO_3 ($P=0,0014$; $r=0,40$).

A avaliação da análise associativa das concentrações de HCO_3 e ABE ($r=0,90$; $p < 0,0001$) (Gráfico 19) é possível enfatizar a importância do estado de insuficiência renal como a causa responsável pelo óbito. O aumento nas concentrações sanguíneas destes indicadores reflete a existência, no momento do óbito, uma tendência de acúmulo de tampões no sangue, a qual é decorrente da falha no sistema renal (MACHADO, 1998; ORTOLANI, 2003; SOARES, 2004). Como o ABE indica indiretamente a quantidade de tampões existentes dentro do sangue, a relação deste com o HCO_3 evidenciou que quanto mais positivos forem os valores da ABE mais tampões estão se acumulando no sistema, indicando um quadro de alcalose metabólica (ORTOLANI, 2003).

A função dos rins é manter a constância do meio interno. Para isto, ele excreta água, promove a troca de íons e mantém o organismo em equilíbrio. Os túbulos renais secretam íons H^+ na urina tubular, e para cada mol de ácido secretado, um mol de bicarbonato (base) aparece no sangue (ALMOSNY, 2003).

Com base nos fatores que influenciam a reabsorção renal de bicarbonato, DiBartola (2007), considera que a taxa de filtração glomerular e o volume do fluido extracelular sejam constantes e que a quantidade de HCO_3 reabsorvida pelos rins será equivalente àquela filtrada. Assim sendo, na situação de disfunção renal causada pela ICC, como observado por SOARES (2004), o HCO_3 pareceu ter concentração tubular mínima; de modo que a reabsorção renal de HCO_3 foi amplamente diferente da reabsorção do sódio. No estudo de Soares (2004), a ICC causou intensa redução na capacidade de reabsorção tubular, manifestada pela glicosúria, menor densidade urinária, maior excreção urinária de fósforo, sódio, potássio, cloro, cobre, ferro, além de maior atividade da enzima NAG na urina, a qual serviu de forte indicador bioquímico para caracterizar precocemente disfunção renal frente à consecutiva ingestão acumulada de cobre pelos ovinos. Tal estado gerou uremia, oligúria ou anúria e provocou a morte dos animais que não receberam tratamento com TTM.

Mais uma vez se confirma os dados aqui encontrados, pois DiBartola (2007) ressalta que a reabsorção renal de HCO_3 aumenta com a elevação da PCO_2 e diminui

com a redução dessa PCO_2 , além de que esse efeito pode ser mediado pela redução ou aumento do pH no interior das células dos túbulos renais e pela maior ou menor disponibilidade de H^+ para secreção.

Reportando sobre a resposta renal à alcalose metabólica, em animais saudáveis, os rins excretam rápida e efetivamente os álcalis. A alcalose metabólica persiste apenas quando a excreção renal de HCO_3 está prejudicada. Isto pode ocorrer quando ocorre redução da taxa de filtração glomerular (diminuição de HCO_3 no filtrado), taxa de administração alta de álcalis ou por estímulos para os rins reterem sódio, na presença de déficit relativo de cloro (DiBARTOLA, 2007). Segundo Almosny (2003), a verdadeira compensação que ocorre na alcalose metabólica é de origem renal, mediante a excreção de HCO_3 . Claramente percebe-se que os ovinos intoxicados pelo cobre têm relação entre a dinâmica renal e o perfil ácido básico.

5.3. METABOLISMO OXIDATIVO

O conjunto de indicadores da atividade oxidativa tanto eritrocitária quanto da lipoperoxidação revelou significativas alterações, particularmente quando feita análise estatística dos diferentes momentos, dentro de cada grupo, nas diferentes fases da intoxicação. É de se notar a importância da fase hemolítica na interpretação de tais perfis. Com relação à concentração de MDA, G6PD e HRFP, estas apresentaram aumento significativo, porém a GSH apresentou, neste momento, uma expressiva diminuição.

Com relação aos teores séricos de cobre, ao longo dos momentos, verifica-se que estes indicadores acompanharam o perfil do cobre, mostrando fortes evidências de um estado de estresse oxidativo. Pode-se perceber que a súbita elevação dos níveis séricos de cobre na crise hemolítica refletiu em um correspondente declínio da concentração de GSH e aumento dos outros indicadores. Conforme Martins-Mateo et al. (1990), concentrações de MDA, GSH e outras substâncias podem ser usadas como índices de danos de lipoperoxidação de membranas celulares, oriundos do estresse

oxidativo induzido por inúmeros fatores, como neste caso, o efeito do cobre excessivo no organismo.

A lipoperoxidação induzida pelo cobre foi inicialmente reportada por Hochstein et al. (1980), os quais postularam que o cobre aumenta a formação de radicais livres que levam a decomposição dos ácidos graxos nos fosfolipídios em membranas, causando dano oxidativo para o eritrócito.

O estresse oxidativo afeta a membrana eritrocitária por causa da lipoperoxidação pelas EROs. A concentração do MDA elevada e as atividades das enzimas modificadas é uma representação explícita da resposta celular frente ao ataque dos radicais livres, confirmado pela relação linear e positiva existente entre pares de variáveis, como visto com o MDA x G6PD ($r = 0,60$; $P < 0,0001$) e MDA x HRFP ($r = 0,71$; $P < 0,0001$) (Gráficos 24 e 25, respectivamente). Quanto maior foi a concentração sérica do MDA, maior as atividades destas enzimas indicadoras do metabolismo oxidativo.

Estudos têm demonstrado que a capacidade antioxidante dos eritrócitos está diminuída na ICC (SANSINANEIA et al., 1993). Essa menor capacidade está associada com o aumento da reatividade do ácido tiobarbitúrico (TBA) na lipoperoxidação induzida pelos peróxidos de hidrogênio.

Os teores crescentes de MDA na fase pré-hemolítica e os elevados na fase hemolítica confirmam a presença de danos oxidativos nos eritrócitos e demais tecidos, pois esta substância é o produto de final da oxidação pelos radicais livres de alguns lipídeos (LUDAT et al., 2000). Como escrito por Tsai et al. (1993), nos mamíferos as membranas são dotadas de grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados as quais estão sujeitas às injúrias peroxidativas. Tais oxidações das membranas lipídicas, determinam elevada permeabilidade das células, de modo que o efeito em cascata da lipoperoxidação é capaz de romper tanto membranas lisossomais quanto celulares (BREMNER, 1998; COSTA et al., 2004).

Interessante verificar que os teores de MDA foram significativamente inferiores nos primeiros dias após a crise hemolítica nos animais que foram tratados com TTM, indicando que este medicamento reduziu a reação em cascata da formação de radicais livres e esta reação foi coincidente com a diminuição nos teores séricos de cobre livre, marcadamente deletério ao organismo quando em excesso. Já em relação ao teor de

MDA nos animais do grupo controle, verificou-se que estes teores mantiveram-se maiores nos dias subseqüentes à crise hemolítica, caracterizando-se forte e persistente peroxidação nas membranas celulares dos eritrócitos.

Com tal caracterização da elevada lipoperoxidação frente à intoxicação pelo cobre observado neste trabalho, Suematsu et al. (1977) e Matsumura et al. (1982) reforçaram a idéia de que altos teores séricos de lipoperóxidos em pacientes com doença hepática podem ser um importante mecanismo que induz danos celulares em muitos tipos de degeneração tecidual e estão correlacionados com a severidade da enfermidade. De fato, existiu uma relação altamente positiva ($r = 0,70$; $p < 0,0001$) entre os teores séricos de cobre e a concentração de MDA (Gráfico 26), indicador seguro da lipoperoxidação e danos significativos do sistema renal, onde Soares (2004) constatou uma relação negativa entre o MDA e o taxa de depuração endógena de creatinina ($r = -0,60$; $p < 0,0001$). Em outras palavras, os radicais livres foram também agentes importantes no surgimento das lesões renais, abrandadas quando do uso de TTM. Outras relações do cobre foram identificadas, sendo este com a GSH ($r = -0,32$; $P < 0,05$), com a HRFP ($r = -0,50$; $P < 0,05$), estando estas relações representadas, respectivamente, nos Gráficos 27e 28. Com base nos perfis destas relações, é possível interpretar o benéfico efeito do TTM na quelação do cobre e recuperação dos animais.

Analisando a GSH, sua redução foi causada provavelmente pelo cobre livre que penetrou na hemácia e se ligou aos radicais sulfidrilas, presentes na membrana citoplasmática, formando grupos dissulfetos e, na seqüência, radicais livres, os quais promoveram danos celulares, propiciando fragilidade da membrana eritrocitária, ou seja, quanto mais velho for o eritrócito mais predispostos o mesmo estará à hemólise, enquanto que os jovens são muito resistentes (HOWELL et al., 1987). Thompson e Todd (1976) reportam que embora a elevação do cobre sanguíneo esteja associada com a crise hemolítica na ICC, a queda brusca na GSH não é, per se, devido exclusivamente à ação direta do cobre.

O baixo nível de GSH sanguíneo observado poderia refletir na produção reduzida de GSH devido à reduzida disponibilidade de NADPH ou depleção de GSH por enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo, como neste caso causado pela ICC (SANSINANEIA et al., 1996; SIEMS et al. 2000). A glutatona se oxida, podendo

novamente voltar à forma reduzida, sob catálise da enzima glutathiona redutase. Para o pleno funcionamento desta enzima é necessária a formação de NADPH, produzida no eritrócito pela enzima glicose-6-fosfatodesidrogenase. O NADPH é um importante substrato para a enzima GSH e, contudo, importante para a produção de GSH (BEUTLER, 1993). Está claro, contudo, que a via pentose-fosfato de eritrócitos de ovinos é adequado para manter uma satisfatória atividade da GSH e que este mecanismo é completamente operante durante a crise hemolítica (SOARES, 2004).

Não apenas a GSH eritrocitária é degradada, mas alterações oxidativas ocorrem na hemoglobina de eritrócitos de ovinos, evidenciado pela presença de metahemoglobina e corpúsculos de Heinz (ISHMAEL et al., 1972; SIVERTSEN, 1980; GRUNE et al., 2000). Tal perfil foi verificado por Machado (1998), identificando elevada atividade da metahemoglobina. Tanto McCay et al. (1981) quanto Graham et al. (1989), Sansinanea (1996) e Soares (2004) identificaram redução na atividade da GSH relacionado com situações de lipoperoxidação, e, neste caso, particularmente relacionada com a intoxicação pelo cobre.

Como se pode ver nos processos hemolíticos quando ocorre uso adequado de um quelante de cobre (TTM), identifica-se rápida recuperação dos níveis de glutathiona eritrocitária, consistente com um provável influxo de células vermelhas jovens (THOMPSON e TODD, 1976; SIEMS et al. 2000).

Parece que a liberação de cobre no sangue, na crise hemolítica, estava associada ao aumento do estado oxidativo. Thompson e Todd, (1976) reportam que este fato ocorreu, possivelmente, pela liberação do cobre e simultânea de outros componentes do fígado. No momento da crise hemolítica os teores de cobre no sangue elevaram-se e a atividade da GSH diminuiu.

Alguns dias antes da crise hemolítica os níveis de G6PD mantiveram-se nos limites análogos ao momento basal. Próximo à crise hemolítica, a atividade desta enzima aumentou progressivamente. O presente experimento comprovou que no 4^o dias para os animais do grupo controle e no 5^o dia para os do grupo TTM, apenas os eritrócitos jovens sobreviveram à crise hemolítica, já que a atividade da G6PD detectada era máxima (Tabela 15). O marcado aumento da atividade da G6PD deveu-se a população resistente e jovem de células vermelhas do sangue. Os reticulócitos

encontrados durante a crise hemolítica também indica rápido influxo de eritrócitos imaturos (ISHMAEL et al., 1972). Machado (1998) detectou um número máximo destas células exatamente no 5º e 6º dias pós-crise hemolítica. A alta atividade de G6PD confirma os idênticos resultados obtidos por Thompson e Todd (1976) e contrapõem os achados de Sansinanea et al. (1996), os quais publicaram que os eritrócitos de ovinos intoxicados pelo cobre exibem tanto uma diminuição da atividade da G6PD como aumento do estresse oxidativo devido ao elevado nível de cobre. Consideraram, ainda, que a baixa atividade da G6PD pode ser resultado das alterações na estrutura das proteínas das enzimas pela ação dos radicais livres. Verifica-se, portanto, a necessidade de avaliar mais pormenorizadamente o perfil oxidativo de ovinos intoxicados pelo cobre, visto que divergências de resultados foram identificadas. Com o desenvolvimento de novos modelos de indução da ICC poder-se-á concretizar o perfil da G6PD e melhor discuti-los.

Sansinanea et al. (1996) observou uma possível relação entre a redução da atividade da G6PD, reduzida disponibilidade de glicose e reduzido nível de GSH no eritrócito de ovinos intoxicados pelo cobre. Juntos, estes efeitos poderiam causar menor capacidade antioxidante dos eritrócitos e, portanto poder contribuir para o desenvolvimento da hemólise que é característica da ICC em ovinos.

Pela primeira vez também foi realizado um ensaio testando a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) (Tabela 20; Gráfico 18) em ovinos intoxicados por cobre. A HRFP indica a capacidade antioxidante presente no plasma (BENZIE e STRAIN, 1996). Maiores valores deste índice foram detectados durante o auge da crise hemolítica. A interpretação deste resultado indica que o organismo do animal intoxicado teve uma resposta compensatória frente a um enorme desafio oxidante por meio de uma significativa atividade antioxidante. Isto fica comprovado pela alta correlação positiva ($r=0,71$) entre o MDA e a HRFP (Gráfico 25). Um antigo ensaio estudou *in vitro* o grau de hemólise que o cobre provocava em hemácias suspensas em solução salina isotônica e em plasma.

Enquanto que 50 µg Cu/ 100 mL foram suficientes para provocar hemólise em hemácias suspensas em salina, quantidade muito superior foi necessária para o mesmo efeito em suspensão plasmática (HOWELL et al., 1987). Os autores atribuíram esta

proteção à presença de proteínas e aminoácidos plasmáticos que poderia se combinar com o cobre livre, tornando-o complexado e atóxico.

Considerando as análises dos perfis no grupo controle, identifica-se o persistente aumento da atividade enzimática da G6PD, MDA, HRFP e do próprio teor sérico de cobre, de modo que este aumento representa uma persistente produção de radicais livres no organismo.

6. CONCLUSÕES

1- O tratamento com o TTM promove a melhora gradual do quadro clínico, significativa melhora no perfil clínico e hemogasométrico em ovinos intoxicados pelo cobre.

2- A intoxicação cúprica provoca grande formação de radicais livres, ao quais provocaram aumento na lipoperoxidação e redução na quantidade de glutathione reduzida nos eritrócitos, estimulando a capacidade antioxidante do plasma; porém o uso de TTM diminui a concentração destes radicais, aumentando a formação de glutathione reduzida eritrocitária.

3- A intoxicação cúprica cumulativa em ovinos define distúrbio respiratório e metabólico, caracterizado por uma discreta elevação da concentração sanguínea do HCO_3 (alcalose metabólica) e aumento da pressão parcial de CO_2 (acidose respiratória) sanguínea.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil. Steril.**, v. 79, p. 829-843, 2003.
- ALFINITO, F.; CALABRO, V.; CAPPELLINI, M.; ROTOLI, B.; LUZZATO, L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and red cell membrane defects: additive or synergistic interaction in production chronic hemolytic anemia. **Br. J. Haematol.**, v. 87, p. 148-152, 1994.
- ALMOSNY, N. **Equilíbrio ácido-básico em medicina veterinária**. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. Anais de Patologia Veterinária da região Sul do Brasil. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 5-16p.
- ANTONELLI, A.C. **Avaliação do uso de sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica em ovinos**. 2007.122f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2007.
- BIESALSKY, H.K. Free radicals theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**, v.5, p.5-10, 2002.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITIS, O.M. **Veterinary Medicine**. 7 ed. London: Bailliere Tindal, 1989. p. 1264-1269: Diseases caused by physical agents.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BEUTLER, E. Study of Glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. **Am. J. Hematol.**, v. 42, p. 53, 1993.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v.61, n.5, p. 882-888, 1963.
- BEUTLER, E.; BLUME, K.G.; KAPLAN, J.C.; LOHR, G.W. International committee for standardization in hematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. **Br. J. Haematol.**, v. 43, p. 469-477, 1979.

- BIRGEL, E.H. Hematologia Clínica Veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia Clínica Veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-49.
- BREMNER, I. Manifestations of copper excess. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67 (suppl), p. 1069S-1073S, 1998.
- CARLSON, G.P. Fluid, electrolyte and acid-base balance. In: KANEKO, JJ. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1989. p. 543-575.
- CASTRO, M.B.; CHARDULO, L.A.L.; SZABÓ, M.P.J. Copper toxicosis in sgeep fed dairy cattle ration in São Paulo, Brazil. **Arq. Bra. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 1, p. 246-249, 2007.
- CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITTWER, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Vet. Méx.**, v. 33, n. 3, p. 265-283, 2002.
- CLARK, L.C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. **Transactions of the American Internal Organs**. V. 2, p. 41-48, 1956.
- COUSINS, R.J. Absortion, transport and hepatic metabolismo f copper and zinc with special reference to metallotionein and ceruloplasmina. **Physiological Reviews**, v. 65, p. 238-309, 1985.
- DiBARTOLA, S.P. **Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007. 664p.
- DIRKSEN, G.; GRUNDER, H.D.; STOBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldeyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.
- FONTEQUE, J.H. **Estress oxidativo e lipoperoxidação devido a anemia induzida por perda aguda de sangue em ovinos**. UNESP - Botucatu, 2005, 68p. (Doutorado Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. São Paulo.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. Anais do I simpósio de patologia clínica veterinária da região sul do Brasil. Porto Alegre: Gráfica da Universidade federal do Rio Grande do Sul. P.73-89, 2003.

GOONERATNE, S.R.; CHRISTENSEN, D.A. Increased copper excretion in bile after thiomolybdate administration. **Federal Proceedings**, v. 47, n. 16, p. 790-795, 1984.

GOONERATNE, S.R.; HOWELL, J.M.; KUMARATILAKE, J.S. Kidney function in copper toxicity in sheep. In: International symposium on trace element metabolism in man and animals, 4, 1981. **Anais...** Canberra, Austrália: Australian Academy of Science, 1981, p. 461-464.

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

GRAHAM, K.S.; CHANNA, R.C.; SCHOLZ, R.W.; Reduced glutathione effects on tocopherol concentration of rat liver microsomes undergoing NADPH dependent lipid peroxidation. **Lipids**, v. 24, p. 909-914, 1989.

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

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutr. Rev.**, v. 55, p. S44-S52, 1997.

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

HUMPHRIES, W.R.; MILLS, C.F.; GREIG, A.; ROBERTS, L.; INGLIS, D.; HALLIDAY, G.J. Use of ammonium tetrathiomolybdate in the treatment of copper poisoning in sheep. **Veterinary Record**, v. 119, n. 24, p. 596-598, 1986.

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

HOLOVSKÁ, K.; LENÁRTOVÁ, V.; PEDRAJAS, J.R.; PIENADO, J.; LÓPEZ-BAREA, J.; ROSIVAL, I.; LEGÁTH, J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and

glutathione reductase in sheep organs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 115B, 4, p. 451-456, 1996.

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

KUMA, K.S.; ROWSE, C.; HOCHSTEIN, P. Copper induced generation of superoxide in human red cell membrane. **Biochem. Biophys. Res. Comum.** V, 83, p. 587-592, 1983.

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

KRUB, F.J.; BERGAMIN, H.; ZAGATTO, E.A.G.; JORGENSEN, S.S. Digestion on nitric percloric acid. **Analyst**, v. 102, p. 503, 1977.

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

LEVRAUT J; LABIB Y; CHAVE S; PAYAN P.; RAUNCOLES; AIME M.; GRIMAUD D. Efecty of sodium bicarbonate on intracellular pH under different buffering conditions. **Kidney Int.** 1996 p. 1262-1267.

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

LUDAT, K.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T.; SIEMS, W.G.; RIEDEL, E.; HAMPL, H. Oxidations parameters in complete correction of renal anemia. **Clinical Nephrology**, v. 53, p. S30-S35, 2000.

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

MAIORKA, P.C.; MASSOCO, C.O.; ALMEIDA, S.D.B.; GORNIK, S.L.; DAGLI, M.L.D. Copper toxicosis in sheep: a case report. **Vet. Hum. Toxic.**, v. 40, n. 2, p. 99-100.

MARTIN-MATEO, M.C.; SANCHEZ-PORTUGAL, M.; IGLESIAS, S.; PAULA, A.; BUSTAMANTE, J. Oxidative stress in chronic renal failure, **Renal Failure**, v. 21, n. 2, p. 155-167, 1999.

- MARTINELLI, R. **Equilíbrio ácido-básico e hidroeletrólítico**. In: PENILDO, S. *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 70, p. 711-716.
- MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.
- MATSUMURA, T.; SUETMASU, T.; SATO, N.; KAMADA, T.; ABE, H. Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in man. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 132, p. 287-293, 1982.
- McCAY, P.B.; GIBSON, D.D.; HORNBROOK, K.R. Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation by a soluble heatlabile factor not glutathione peroxidase. **Fed. Proc.**, v. 40, p. 199-205, 1981.
- McGRATH, L.T.; DOUGLAS, A.F.; McCLEAN, E.; et al. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, n. 2, p. 179-188, 1995.
- MORGADO, A.A.; AUGUSTO, C.F.B.; SOUZA, F.N.; NUNES, G.R.; WEIGEL, R.A.; MORI, C.S.; SUCUPIRA, M.C.A. Avaliação da hemogasometria de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e/ou vitaminas antioxidantes. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 34, Santos. **Anais...** Santos: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 2007.
- ORTOLANI, E.L.; KNOX, D.; JACKSON, F.; COOP, N.F.; SUTTLE, N.F. Abomasal parasitism lowers liver Cu status and influences the Cu x Mo x S antagonism in lambs. **Trace Elements in Man and Animals**, v. 8, p. 331-332, 1993.
- ORTOLANI, E. L. Intoxicações metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica. In: SILVA SOBRINHO, A. G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. F. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de Ovinos**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. P. 241-246.
- ORTOLANI, E.L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. p. 555-565.
- ORTOLANI, E.L.; MACHADO, C.H.; SUCUPIRA, M.C.A. Assessment of some clinical and laboratory variables for early diagnosis of accumulative copper poisoning in sheep. **Vet. Human Toxicol**, v. 45, n. 6, p. 289-293, 2003.

- ORTOLANI, E.L. **Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes**. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. Anais do I simpósio de patologia clínica veterinária da região sul do Brasil. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande de Sul, 2003c. 17-29p.
- OSBALDISTON, G.W.; MOORE, W.R. Renal function tests in cattle. **JAVMA**, v. 159, n. 3, p. 292-301, 1971.
- PEREIRA, M.F.; SANTOS, N.V.M.; SOARES, P.C.; MAIA, F.C.L.; LIMA, A.M.A.; ALBUQUERQUE, C.A.F. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no estado de Pernambuco. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 9, 1999. **Anais...** Belo Horizonte: FEP – MVZ, 1999, p. 75.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.1737p.
- RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUEZ, N.C.; NARDIN, N.S. Intoxicação crônica pelo cobre em ovinos no Rio Grande do Sul: histopatologia e toxicologia. In: Congresso estadual de medicina veterinária, 9, 1985. **Anais...** Santa Maria: SOVERGS, 1985, p. 71-72.
- RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J.A.; GIESTA, S. et al. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, p. 51-54, 1989.
- RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J.A.; GIESTA, S.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, 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.
- RIET-CORREA, F.; TABOSA, I.M.; AZEVEDO, E.O.; MEDEIROS, R.M.T.; SIMÕES, S.V.D.; DANTAS, A.F.M.; ALVES, C.J.A.; NOBRE, V.M.T.; ATHAYDE, A.C.R.; GOMES, A.A.; LIMA, E.F. Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. **Revista de Educação Continuada do Centro de Saúde e Tecnologia Rural**, v. 1, n. 1, p. 1-115, 2003.
- RIVLIN, J. et al. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 518-522, 2004.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino em medicina veterinária e zootecnia, 1998, 221p.

- SANSINANEA, 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.
- SANSINANEA, A.S.; CERONE, S.I.; QUIROGA, M.; AUZA, N. Antioxidant capacity of erythrocytes from sheep chronically poisoned by copper. **Nutr. Res.** v. 13, 891-899, 1993.
- SANSINANEA, A.S.; CERONE, S.I.; STREITENBERGER, S.A.; GARCÍA, C.; AUZA, N. Efecto oxidativo de la sobrecarga hepática de cobre. **Apptla**, v. 48, p. 25-31, 1998.
- SANTOS, N.V.M.; MOTA, R.A.; SOARES, P.C.; PEREIRA, M.F.; TEIXEIRA, M.N. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação crônica por cobre em ovinos. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, 4, 1999. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1999, p. 153-154.
- SARGISON, N.D.; SCOTT, P.R.; PENNY, C.D.; PIRIE, R.S. Poliencephalomalacia associated with chronic copper poisoning in a Suffolk ram lamb. **Veterinary Record**, v. 135, n. 23, p. 556-557, 1994.
- SAS INSTITUT. **SAS User's Guide**: Statistical Analysis Systems Institute, Inc. Cary, 2000.
- SHARMA, R. K.; PASQUALOTTO, F. F.; NELSON, D. R. *et al.* The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 2801-2807, 1999.
- SEVERINGHAUS, J.M.; BRADLEY, A.F. Electrodes for PO₂ e PCO₂ determination. **Annals of Applied Physiology**, v. 13, p. 515-520, 1958.
- SIEMS, W.G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clinical Nephrology**, v. 53, p. S9-S17, 2000.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **Eur. L. Biochem.** v. 215, p. 213-219, 1993.
- SIVERTSEN T. Copper-induced GSH depletion and methaemoglobin formation in vitro in erythrocytes of some domestic animals and man. A comparative study. **Acta Pharmacol. et Toxicol.**, v. 46, p. 121-126, 1980.
- SOARES, P.C. **Efeito da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo em ovinos.**

- 2004.117f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2004.
- SOLI, N.E. Chronic copper poisoning in sheep. A review of the literature. **Nord. Vet. Med.**, v. 32, n. 2, p. 75-89, 1980.
- SUEMATSU, T.; KAMADA, Y.; KIKLUCHI, S.; YAGI, S. Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 79, p. 267-270, 1977.
- SUTTLE, N. F. The interaction between copper, molybdenum and sulphur in ruminant nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 11, n. 3, p. 121-140, 1991.
- TEMPLE, N.J. Antioxidants and disease: more question than answers. **Nutr. Res.**, v. 20, n. 3, p. 449-459, 2000.
- THOMPSON, R.H.; TODD, F.R. Role of pentose-phosphate pathway in haemolytic crisis of chronic copper toxicity of sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 20, n. 3, p. 257-360, 1976.
- TSAI, L.Y.; LEE, K.T.; TSAI, S.M.; LEE, S.C.; YU, H.S. Changes of lipid peroxide levels in blood and liver tissue of patients with obstructive jaundice. **Clinica Chimica Acta**, v. 215, p. 41-50, 1993.
- QUIROZ-ROCHA, G.F.; BOUDA, J.; OCHOA, L.N. **Determinação de transtornos ácido-básicos**. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BORGES, J.B.; CECIM, M. Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos. Porto Alegre: Gráfica da Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2000. 35-38p.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3. ed. Cabi Publishing: Wallingford, 1999. 614p.
- WRIGHT, J.R.; COLBY, H.D.; MILES, P.R. Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 206, p. 296-304, 1981.
- VAN METRE, D.C.; CALLAN, R.J. Selenium and vitamine E. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 17, n. 2, p. 373-402, 2001.
- VEENENDAAL, G.H.; WOUTERSEN, F.M.S.; DUIN, C.T.M.; MIERT, A.S.J.P.A.M. Role of circulating prostaglandins in the genesis of pyrogen (endotoxin) – induced ruminal stasis in conscious goat. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy**, v. 3, n. 1, p. 59-68, 1980.

YAGI, K. Lipid peroxides and human diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.45, p.337-351, 1987.