

PROTEINOGRAMA SÉRICO DE OVINOS INTOXICADOS POR COBRE

Wanderson Adriano Biscola Pereira¹, Joice Lara Maia Faria², Paulo César da Silva³,
Mário Roberto Hatayde⁴; José Jurandir Fagliari⁴

¹Médico Veterinário. Doutor. Professor do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba – UNIUBE, CEP:38055-460, Uberaba-MG, Brasil.

E-mail:wabpereira@yahoo.com.br (autor correspondente)

²Médica Veterinária. Mestre. Professora do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

³Biólogo. Doutor. Bolsista de Apoio Técnico a Pesquisa do CNPq –nível 1A. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – *Campus* de Jaboticabal.

⁴Médico Veterinário. Doutor. Professor do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – *Campus* de Jaboticabal.

PALAVRAS – CHAVE: Ceruloplasmina, eletroforese de proteínas, transferrina.

ABSTRACT

SERUM PROTEINOGRAM IN COPPER-POISONED SHEEP

Sheep have a tendency to accumulate copper in the body. When the liver storage capacity is exhausted, there is a sudden release of the accumulated copper into the blood causing clinical signs of poisoning. This study investigates the changes in serum proteins during pre-hemolytic and hemolytic phases of chronic copper poisoning. A total of 6 lambs were randomly divided into two groups: control group (Group 1); and experimental group (Group 2). In addition to the daily diet, animals from the second group received 3mg of CuSO₄ 5H₂O/Kg LW per day during the first week, after which it was increased at weekly intervals. Blood biochemical components were assessed at various times: M0, M1, M2, M3, M4, M5 and M6. Serum analysis revealed reduction of ceruloplasmin levels, whereas transferrin levels, the 35,000 Da protein, and IgG light chains increased in M2.

KEYWORDS: ceruloplasmin; protein electrophoresis; transferrin

INTRODUÇÃO

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

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

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

Após qualquer injúria tecidual, o organismo animal desenvolve uma reação complexa e inespecífica conhecida como resposta de fase aguda. A origem desta resposta pode ser atribuída a causas infecciosas, imunológicas, neoplásicas, traumáticas, ou outras e o seu propósito é restaurar a homeostase e remover a causa do desequilíbrio. A resposta de fase aguda é muito rápida, e por esse motivo as proteínas de fase aguda podem ser consideradas marcadores precoces de qualquer processo patológico ou doença. Além disso, essas proteínas podem ser muito úteis na detecção antecipada de enfermidades subclínicas ou de alterações no estado de saúde do animal, além de servirem como importantes ferramentas no manejo do paciente e monitorização do tratamento (CERÓN et al., 2005).

Baseado nestes aspectos este estudo objetivou identificar o perfil de proteínas séricas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), verificando o comportamento das proteínas de fase aguda e de outras frações protéicas em ovinos intoxicados experimentalmente por cobre.

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (G-1 e G-2), sendo: G-1: três ovinos que receberam apenas a dieta mencionada (controle) e G-2: três ovinos que receberam a dieta de G-1 + 3mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (VETEC) / Kg PV/ dia, em solução aquosa 5%, por via oral, com auxílio de uma seringa, na primeira semana, seguido de aumentos semanais de 3mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / Kg PV na dose diária, seguindo as recomendações de Soares (2004) até o aparecimento de hemoglobinúria macroscópica.

Para a obtenção do soro sanguíneo para realização do proteinograma sérico, foram colhidas amostras de sangue nos momentos: M0 – Momento basal; M1 – \pm 30 dias anteriores à crise hemolítica; M2 – \pm 15 dias anteriores à crise hemolítica; M3 – \pm 7 dias anteriores à crise hemolítica; M4 – Dia da crise hemolítica; M5 – 24 horas após a crise hemolítica; M6 – 48 horas após crise hemolítica.

Os teores de proteína total (método do Biureto) foram obtidos com utilização de conjuntos de reagentes comerciais (Labtest); as leituras foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático LABQUEST em comprimento de onda adequado. Para o fracionamento das proteínas, utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por LAEMMLI (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 min em solução de azul de coomassie e, em seguida, colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro

computadorizado (Shimadzu CS 9301 - Tokio, Japan). Como referência, utilizou-se solução marcadora (Sigma - Saint Louis, EUA) com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 dáltons (Da), além de proteínas purificadas - albumina, IgG, haptoglobina, α_1 -antitripsina e transferrina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de eletroforese SDS-PAGE permitiu a identificação de diferentes frações protéicas com pesos moleculares que variaram de 22.000 a 260.000 daltons (Da) em seis ovinos.

Dentre as frações protéicas identificadas ficou evidente que a proteína com peso molecular de 122.000 Da (ceruloplasmina) apresentou redução de seus teores séricos nos ovinos do G2 durante os momentos M1 a M4, quando comparados aos valores basais, e no M5 (24 horas após a crise hemolítica) sua atividade aumentou 37%. FLORIS et al. (2000) descrevem que em pacientes humanos que apresentam desordens, como a doença de Wilson (intoxicação crônica por cobre) apresentam teores circulantes de ceruloplasmina reduzidos ou indetectáveis. O aumento de ceruloplasmina observado no M5 ocorre pelo fato da ceruloplasmina ser uma proteína de fase aguda e responder ao processo inflamatório desencadeado pela hemólise. GUTTERIDGE et al. (1980) relatam que esta proteína atua como um importante antioxidante, inibindo processos de peroxidação lipídica de forma muito mais potente que a superóxido dismutase e a catalase. Assim durante a crise hemolítica a ceruloplasmina executa um papel de proteção celular contra radicais livres corroborando com o trabalho de SOARES (2004) que encontrou a presença de maior atividade antioxidante durante o auge da crise hemolítica.

As proteínas com peso molecular de 83.000 Da (transferrina), 35.000 Da e 27.000 Da (IgG de cadeia leve) também sofreram aumentos que antecederam a crise hemolítica.

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, cujos teores séricos tendem a diminuir na presença de condição inflamatória (KANEKO, 1997). Entretanto neste estudo essa proteína apresentou-se com atividade elevada nos ovinos do G-2 nos momentos M1 a M6 da intoxicação cúprica acumulativa, tendo seu aumento máximo no M2, quando atingiu 326% quando comparado ao M0. O aumento da transferrina no M2 coincidiu com o momento em que ocorreu a maior redução sérica da ceruloplasmina nos ovinos do G-2. No M4 a transferrina apresentou um aumento de 76% nos ovinos do G-2. O aumento dos teores séricos de transferrina pode estar associado à lesão hepática (KANEKO, 1997) relacionada com o acúmulo de cobre.

A IgG de cadeia leve aumentou em 22% no M2. Este aumento pode estar relacionado tanto às lesões hepáticas quanto à anemia hemolítica presente (KANEKO, 1997). A proteína de 35.000 Da apresentou-se elevada durante os momentos M1 a M6 da intoxicação cúprica acumulativa, apresentando uma elevação de 328% em sua atividade no M2.

Os teores séricos de proteína total mantiveram-se semelhantes entre os ovinos do G-1 e G-2 durante todas as fases da intoxicação crônica por cobre.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os teores séricos de ceruloplasmina apresentaram-se diminuídos e os teores de transferrina, proteína de 35.000 Da e IgG de cadeia leve apresentaram-se aumentados 15 dias antes da crise hemolítica, devido ao dano hepático provocado pelo acúmulo de cobre.

REFERÊNCIAS

BRADBERRY, S. Copper. **Medicine**, v. 35, n. 11, p. 608, 2007.

CERÓN, L.L.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n.2, p. 85-99, 2005.

FLORIS, G.; MEDDA, R.; PADIGLIA, A.; MUSCI, G. The physiopatological significance of ceruloplasmin/ a posible therapeutic approach. **Bio. Pharm.**, v. 60, p. 1735 – 1741, 2000.

GUTTERIDGE, J. M. C.; RICHMOND, R.; HALLIWELL, B. Oxygen free-radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein caeruloplasmin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 112, n. 2, p. 269-271, 1980.

KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997, cap. 5, p. 117 - 138.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, London, v. 227, p. 680- 685, 1970.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992. 524p.

ORTOLANI, E. L. Intoxicações e doenças metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica, urolitíase e toxemia da prenhez. In: SOBRINHO, A. G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. I. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de Ovinos**. Jaboticabal: Funep, 1996. p. 241 – 258.

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

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

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

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3.ed. Wallingford: Cabi Publishing, 2001. 614 p.

ZHANG, Y.; LI, B.; CHEN, C.; GAO, Z. Hepatic distribution of iron, copper, zinc and cadmium-containing proteins in normal and iron overload. **Biometals**. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/j2r36602217kt481/>> Acesso em: setembro de 2008