

USO DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS EM OVINOS INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE COM COBRE¹

Wanderson Adriano Biscola Pereira²
Mário Roberto Hatayde³
Joice Lara Maia Faria²

RESUMO

Os ovinos possuem tendência a acumular cobre no organismo. Quando a capacidade de armazenagem hepática se esgota, o cobre é liberado para o sangue causando sinais clínicos da intoxicação. Para verificar as alterações presentes na morfologia eritrocitária durante as fases pré-hemolítica e hemolítica da intoxicação cúprica acumulativa, foram utilizados seis ovinos distribuídos aleatoriamente em dois grupos: G-1 (controle) e G-2 (experimentalmente intoxicados). Os três ovinos do G-2, além da dieta diária receberam 3mg de CuSO₄. 5H₂O/Kg PV, seguido de aumentos semanais de 3mg de CuSO₄. 5H₂O/ Kg PV na dose diária. Para realização da microscopia eletrônica de varredura foram colhidas amostras de sangue com EDTA antes (M0 – M3), durante (M4) e após (M5 e M6) a crise hemolítica. Durante a fase pré-hemolítica houve predomínio de discócitos. Nas fases hemolítica e pós-hemolítica houve redução no número de discócitos e predomínio de acantócitos, com o aparecimento de codócitos, keratócitos e corpúsculos de Heinz.

Palavras-chave: acantócitos, corpúsculos de Heinz, fase hemolítica, microscopia eletrônica de varredura, ovinos.

USING THE TECHNIQUE OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY FOR DETERMINATION OF ERYTHROCYTE ALTERATIONS IN SHEEP EXPERIMENTALLY POISONED WITH COPPER

ABSTRACT

Sheep have a tendency to accumulate copper in the body. When the liver storage capacity is exhausted, copper is released into the blood causing clinical signs of poisoning. Six lambs fed a basal diet were randomly assigned to 2 groups: G - 1 (control) and G-2 (experimentally intoxicated). The three sheep of the G-2, were drenched initially with 3 mg of CuSO₄. 5H₂O/ kg bw daily for a week. Every week an additional dose of 3mg CuSO₄. 5H₂O/ kg bw was included in the drench until signs of copper poisoning appeared. Before (M0 – M3), during (M4) and after (M5 and M6) to hemolytic crisis, blood samples were collected with EDTA, and prepared for observation in the scanning electron microscope. In the pre-hemolytic there was a predominance of discocytes. At hemolytic and post-hemolytic phases in turn decreased the number of discocytes and predominance of acanthocytes, with the emergence of codocytes, keratocytes and Heinz bodies.

Key words: acanthocytes, Heinz bodies, hemolytic phase, scanning electron microscopy, sheep.

¹ Apoio Financeiro FAPESP

² Prof. Dr., Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Uberaba (UNIUBE), MG. Autor para correspondência: Wanderson A. B. Pereira, endereço: Hospital Veterinário de Uberaba, Avenida Tutunas, 720, Bairro Tutunas, CEP:38061-500, Uberaba, MG. Tel/fax: (34)3319-8787, email: wabpereira@yahoo.com.br

³ Prof. Dr., Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal.

USO DE LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO PARA DETERMINACIÓN DE LAS ALTERACIONES ERITROCITÁRIAS EN OVINOS INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE CON COBRE

RESUMEN

Los ovinos poseen tendencia a acumular cobre en el organismo. Cuando la capacidad hepática de almacenar se agota, el cobre es liberado para la sangre causando los signos clínicos de la intoxicación. Para verificar las alteraciones presentes en la morfología eritrocitaria durante las fases pre-hemolítica y hemolítica de la intoxicación acumulativa por cobre, fueron utilizados seis ovinos distribuidos al azar en dos grupos: G-1 (control) y G-2 (experimentalmente intoxicados). Los tres ovinos del G-2, además de la dieta diaria recibieron 3mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{Kg PV}$, seguido de aumentos semanales de 3mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{Kg PV}$ en la dosis diaria. Para la realización de la microscopía electrónica de barrido fueron colectadas muestras de sangre con EDTA antes (M0 – M3), durante (M4) y después (M5 e M6) a la crisis hemolítica. Durante la fase pre-hemolítica hubo predominio de discócitos. En las fases hemolítica e post-hemolítica hubo reducción en el número de discócitos y predominio de acantócitos, con el surgimiento de codócitos, queratócitos y corpúsculos de Heinz.

Palabras-clave: acantócitos, corpúsculos de Heinz, fase hemolítica, microscopía electrónica de barrido, ovinos.

INTRODUÇÃO

Os tecidos animais, além das moléculas orgânicas também possuem moléculas inorgânicas que ocupam cerca de 2 a 5% do peso total do animal. Entre estes elementos, os minerais possuem funções essenciais tanto na estrutura de tecidos e biomoléculas, como no próprio metabolismo, participando como co-fatores enzimáticos, ativadores hormonais, e como responsáveis pela pressão osmótica e pelo equilíbrio ácido-básico (1).

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 (2-5).

Após a ingestão, o cobre é absorvido principalmente no intestino delgado e seu transporte pela mucosa intestinal é controlado por uma metaloproteína chamada metalotioneína. Quanto maior sua concentração, menor a absorção de cobre (6). Após a passagem pela mucosa intestinal o cobre liga-se à albumina e é transportado via circulação porto-hepática ao fígado para ser incorporado à ceruloplasmina e posteriormente atingir a circulação sistêmica, distribuindo-se para todo organismo (4).

A deficiência e a toxicidade do cobre em ruminantes ocorrem frequentemente em muitas partes do mundo (7). O desenvolvimento da deficiência ou do excesso de cobre depende tanto da concentração deste elemento na dieta como das concentrações dos antagonistas que interferem com a absorção e a subsequente utilização para os processos metabólicos (8).

Entre as espécies de animais, os ovinos são os mais sujeitos a apresentarem tanto quadros de deficiência quanto de intoxicação pelo cobre (8,9). A intoxicação cúprica deve-se à menor capacidade de conjugação entre o cobre e a metalotioneína, diminuindo a excreção deste elemento no organismo, pela via biliar, permitindo seu acúmulo no fígado (10).

A intoxicação cúprica pode ser dividida em duas formas: intoxicação aguda, decorrente da ingestão abrupta de grandes quantidades de cobre, em um curto espaço de tempo; e

intoxicação cúprica acumulativa, onde o depósito de cobre hepático é progressivo, podendo durar de meses a anos, até o desencadeamento da fase hemolítica (11).

A intoxicação crônica por cobre pode ser dividida em três fases distintas: a pré-hemolítica, a hemolítica e a pós-hemolítica. Durante a fase pré-hemolítica, ocorre o acúmulo de cobre no fígado, sem aparecimento de sinais clínicos. O cobre se acumula inicialmente nos hepatócitos periféricos às células da veia central e posteriormente em outras áreas do fígado. Durante o acúmulo, os hepatócitos aumentam consideravelmente seu número de lisossomos, organela na qual também se acumula o cobre. Atingindo o limiar máximo de acúmulo de cobre nos hepatócitos, ocorre a morte celular difusa, promovendo a liberação maciça de cobre e de lisozimas com grande poder de destruição. O cobre livre se desloca para a corrente circulatória, onde após entrar nas hemácias oxida a glutatona, substância responsável pela integridade destas células, culminando com a hemólise, cerca de 24 horas após (9).

O mecanismo da hemólise promovida pela intoxicação cúprica não está bem elucidado. Os efeitos citotóxicos ocorrem devido à interação do cobre com uma série de compostos presentes nas membranas dos eritrócitos, gerando neste processo a formação de agentes oxidantes. Além disso, a inibição de enzimas importantes para os eritrócitos como a glutatona redutase e a piruvato quinase leva ao aumento na formação de metahemoglobina. A ação direta dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio no interior das hemácias culmina na formação dos corpúsculos de Heinz (12,13).

Conhecendo-se a importância da intoxicação cúprica acumulativa para a espécie ovina e sabendo-se que cobre durante a fase hemolítica da intoxicação afeta diretamente a membrana eritrocitária, procurou-se com este trabalho evidenciar as anormalidades morfológicas dos eritrócitos ovinos pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

- G-1: três ovinos que receberam apenas a dieta mencionada acima (controle);
- 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 (10) até o aparecimento de hemoglobinúria macroscópica.

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura foram colhidas amostras de sangue com anticoagulante (EDTA) 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 a crise hemolítica.

Após a colheita, 100 µl de sangue foram colocados em glutaraldeído a 1,5% em tampão fosfato 0,1M, com pH 7,4. Após a fixação por uma hora à temperatura de 4°C, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato (0,1M e pH 7,4), desidratadas em uma série ascendente de acetona (25 a 100%), permanecendo 15 minutos em cada solução e com duas passagens na acetona absoluta. Posteriormente, as células foram novamente suspensas com 100 µl de acetona absoluta; duas gotas desta suspensão foram colocadas sobre lamínula de vidro, e secas rapidamente por evaporação. As lamínulas foram cobertas com uma fina camada de ouro de 15nm (Metalizador DESK II – DENTON VACCUM) e examinadas no microscópio eletrônico de varredura (JSM5410 - JEOL) em uma angulação de 33 a 45 graus negativos e voltagem de 15 kV, sendo os melhores campos fotografados.

RESULTADOS

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

Durante a fase pré-hemolítica da intoxicação cúprica (M0 – M3) verificou-se que 85% das hemácias visualizadas por microscopia eletrônica de varredura apresentavam-se com o padrão normal, também denominado discóide (Figura 1). Entretanto nos momentos M2 e M3 desta fase, o padrão morfológico dos eritrócitos começou a se alterar e outros formatos de hemácias, como macrócitos (Figura 2A e 2B), quinzócitos (Figura 2C) e dacriócitos (Figura 2D) passaram a ser visualizados em maiores proporções. No momento em que foi desencadeada a crise hemolítica evidenciou-se alterações marcantes e persistentes na morfologia das hemácias dos ovinos do grupo G-2 (Figura 3 e 4).

Durante a crise hemolítica (M4 – M6) destacou-se a presença de acantócitos (Figura 3A, 3B e 3C), que são eritrócitos espiculados, com grandes projeções em sua superfície; estomatócitos, codócitos e ceratócitos, além de corpúsculos de Heinz.

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

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

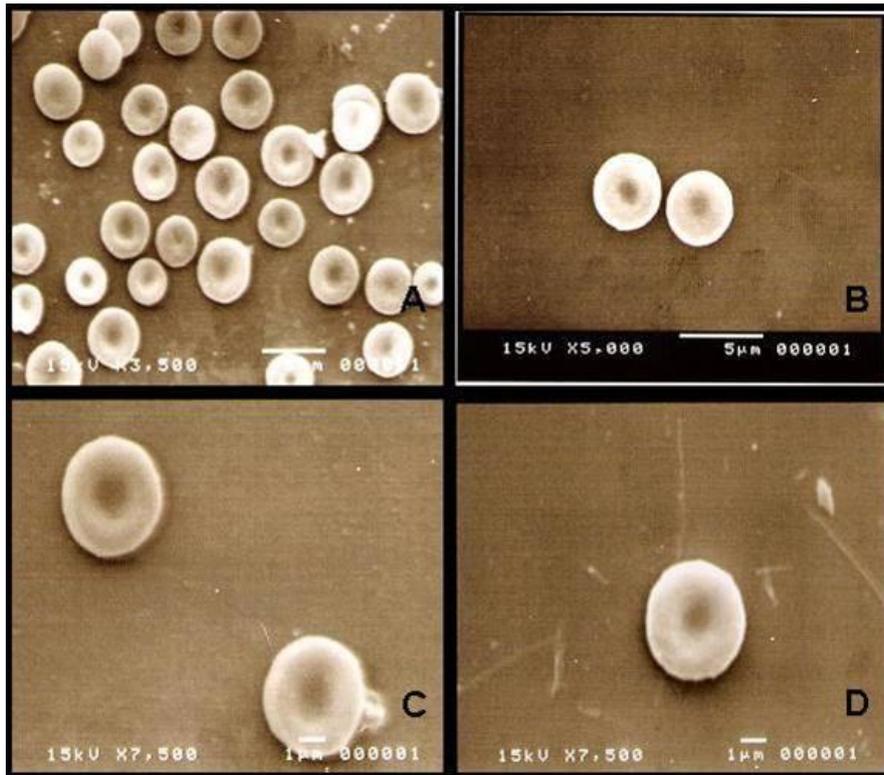


Figura 1. Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase pré - hemolítica (M0 – M3) da intoxicação cúprica acumulativa. A, B, C e D - Aspecto normal das hemácias (discócitos) de ovinos nos momentos M0 e M1 da intoxicação cúprica acumulativa em diferentes aumentos.

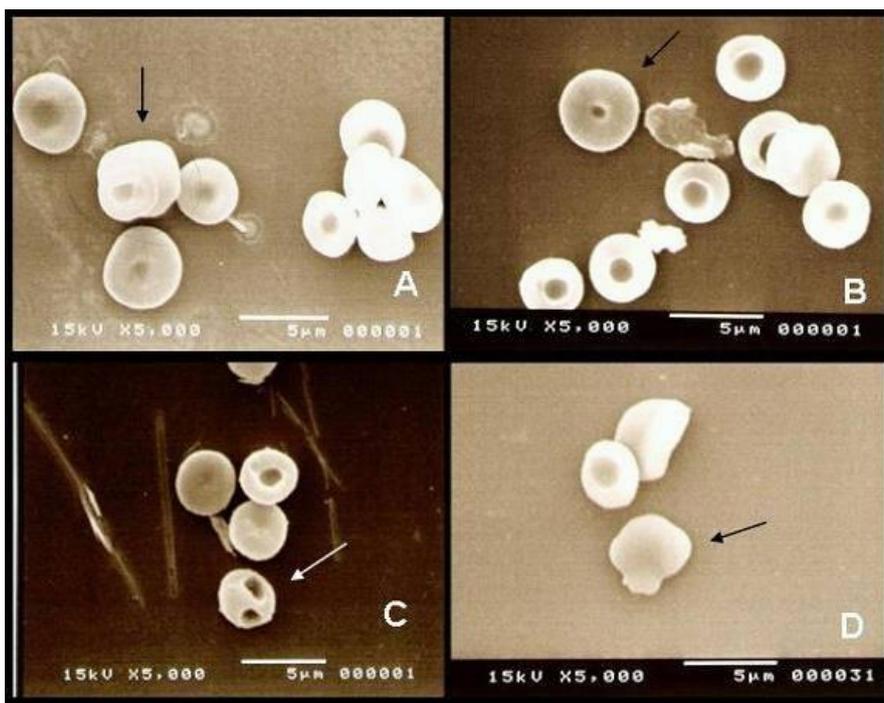


Figura 2. Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase pré-hemolítica (M0 – M3) da intoxicação cúprica acumulativa. Principais alterações morfológicas vistas nas hemácias entre os momentos M2 e M3 da intoxicação cúprica acumulativa: A, B – Macrócito; C – Quinizócito; D – Dacriócito.



Figura 3. Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase hemolítica (M4 – M6) da intoxicação cúprica acumulativa. M4: A - Perda da homogeneidade morfológica das hemácias que apresentam-se em diferentes formas: macrócitos (↔), acantócitos (↗), e codócitos (↘); B - Presença de estomatócitos (→). M5: C - Presença de acantócitos (↗) e corpúsculo de Heinz (→). M6: D - Alterações marcantes no padrão celular e presença de acantócitos (↗) e corpúsculo de Heinz (→).

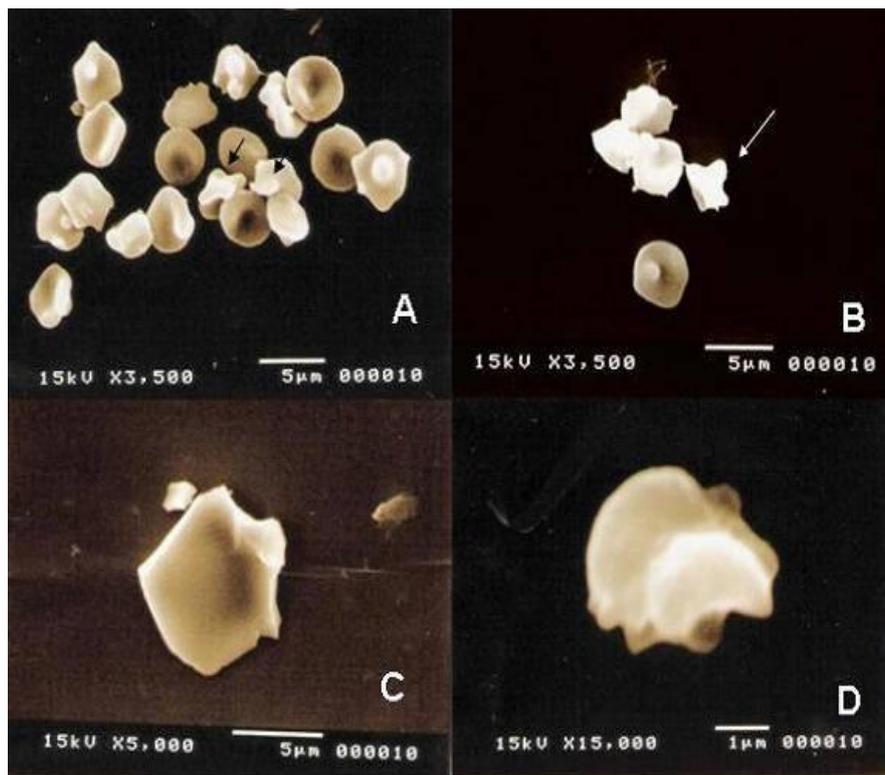


Figura 4. Eletromicrografia de hemácias de ovinos durante a fase hemolítica (M4 – M6) da intoxicação cúprica acumulativa. M6: A - Alterações marcantes no padrão celular; B – queratócitos; C - Presença de cristais de hemoglobina depositados na membrana de um eritrócito; D - Corpúsculo de Heinz.

DISCUSSÃO

A intoxicação crônica por cobre em ovinos apresenta fases pré-hemolítica e hemolítica, sendo que durante a fase pré-hemolítica, sem que haja informações relevantes no histórico dos animais, o diagnóstico clínico é extremamente difícil (9,10,14).

Para desencadeamento da fase hemolítica, o protocolo experimental proposto (14) e utilizado neste trabalho apresentou grande eficácia. Entretanto, a quantidade total de sulfato de cobre fornecida aos animais do G-2, foi elevada quando comparada aos resultados encontrados por outros autores (10,14), que utilizaram animais ½ sangue Suffolk x ½ sangue Crioulo (14) e ovinos da raça Santa Inês (10), enquanto no presente estudo os animais eram sem raça definida. Algumas raças de ovinos como a Suffolk e a Texel são mais susceptíveis à intoxicação do que a Scottish Blackface, a Merino e a Welch, e a predisposição tem relação direta com uma maior capacidade de absorver o cobre dietético e posteriormente retê-lo no fígado (9).

Após a saturação hepática e a liberação de cobre no plasma, ocorrem danos expressivos nas membranas dos eritrócitos, culminando com um quadro de anemia hemolítica, promovendo uma redução de 60% dos valores iniciais de eritrócitos (9).

Em relação à morfologia eritrocitária pode-se verificar que durante os momentos M0 a M3 houve predomínio de hemácias com padrão discóide e cerca de 15% na forma de macrócitos, quinizócitos e dacriócitos. A presença de dacriócitos se deve a alterações no citoesqueleto protéico das hemácias devido a eventos deformantes (12,13). Estas alterações são observadas principalmente nas anemias associadas com a presença de corpúsculos de Heinz, talassemias e mielofibrose. Os macrócitos representam eritrócitos morfologicamente normais possuindo volume corpuscular médio acima do normal, enquanto os quinizócitos compreendem uma faixa central de hemoglobina e dois espaços livres na superfície das hemácias, criando um aspecto de uma célula tricôncava. Apesar deste tipo de células estarem associadas a quadros de anemia em humanos e cães (13), no presente estudo o raro encontro deste tipo celular tanto no G-1 quanto no G-2 sugere que alterações morfológicas podem estar presentes devido ao metabolismo e constante renovação eritrocitária.

Os mecanismos que promovem as alterações morfológicas nas membranas das hemácias e o mecanismo da hemólise promovida pela intoxicação cúprica não estão bem elucidados. Os efeitos citotóxicos ocorrem devido à interação do cobre com os grupos sulfidrilas das proteínas de membrana dos eritrócitos e da peroxidação lipídica das membranas, gerando neste processo a formação de agentes oxidantes. Além disso, a inibição de enzimas importantes para os glóbulos vermelhos como a glutatona redutase, 6-glicose-D-fosfato e a piruvato quinase ocasiona inibição do metabolismo oxidativo celular, permitindo que o cobre lesione a membrana eritrocitária, alterando sua morfologia e gerando um quadro hemolítico (12,13). Entretanto, pode-se afirmar baseado em outro estudo (10), que todas as lesões a membrana dos eritrócitos estão relacionadas a alterações no metabolismo oxidativo eritrocitário produzido pelo cobre.

O padrão eritrocitário nos momentos M4 a M6 foi marcado pela presença de acantócitos, que são eritrócitos espiculados com grandes projeções em sua superfície. A sua presença deve-se às alterações nos fosfolípidos de membrana dos eritrócitos, e geralmente estão associados à presença de doenças hepáticas difusas, e dietas com altos níveis de colesterol. Durante a crise hemolítica ocorre diminuição na quantidade de glutatona reduzida eritrocitária e aumento dos teores séricos de malonildialdeído, confirmando a presença de danos oxidativos nos eritrócitos e demais tecidos (10). Estomatócitos estão relacionados com a presença de doença hepática obstrutiva e associados a anemias crônicas em cães. Os codócitos, comumente chamados de células alvo (“target cells”) são eritrócitos com uma área central densa de hemoglobina, devido a alterações da membrana celular ou pelo decréscimo

dos níveis de hemoglobina celular ou ambas as causas. São encontrados nas anemias hipocrômicas e em doenças hepáticas que levam a colestase (13).

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

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que durante a fase pré-hemolítica da intoxicação não ocorrem alterações marcantes na morfologia eritrocitária, e que após a liberação de cobre os eritrócitos sofrem sérios danos em suas membranas permitindo predomínio de acantócitos como padrão celular durante esta fase.

REFERÊNCIAS

1. González FHD, Barcellos J, Patiño HO. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Gráfica UFRGS; 2000.
2. Mcdowell LR. Minerals in animal and human nutrition. San Diego: Academic Press; 1992.
3. Underwood EJ, Suttle NF. The Mineral nutrition of Livestock. 3rd ed. Wallingford: Cabi Publishing; 2001.
4. Bradberry S. Copper. *Medicine*. 2007;35:608-10.
5. Zhang Y, LI B, Chen C, Gao Z. Hepatic distribution of iron, copper, zinc and cadmium-containing proteins in normal and iron overload. *Biometals*. 2009;22:251-9.
6. Ortolani EL. Macro e microelementos. In: Spinosa HS, Gorniak SL, Bernadi MM. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.641-51.
7. Miltimore JE, Mason, JL. Cooper to molybdenun ratio and molybdenun and copper concentration in ruminan feeds. *Can J Anim Sci*. 1971;51:193-200.
8. Gooneratne SR, Buckley WT, Christensen DA. Rewiew of copper deficiency and metabolism in ruminats. *Can J Anim Sci*. 1989;69:819-45.
9. Ortolani EL. Intoxicações e doenças metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica, urolitíase e toxemia da prenhez. In: Sobrinho AG, Batista AMV, Siqueira ER, Ortolani EL, Susin I, Silva JIC, et al. *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: Funep; 1996. p.241-58.
10. Soares PC. Efeitos da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2004.
11. Ortolani EL, Machado CH, Sucupira MC. Assessment of some clinical and laboratory variables for early diagnosis of cumulative copper poisoning in sheep. *Vet Hum Toxicol*. 2003;45:289-93.

12. Jain NC. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
13. Inaba M. Red blood cell membrane defects. In: Feldman BF, Joseph GZ, Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Toronto: Lippincot Williams & Wilkins; 2000. p.1012-20.
14. Machado CH. Uso de tetratiomolibdato no tratamento de intoxicação cúprica experimental, em ovinos: avaliações clínica e toxicológica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1998.

Recebido em: 14/10/10

Aceito em: 10/03/11