

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

José Francisco Xavier da Rocha

**METABOLISMO DO EDETATO DE ZINCO EM CORDEIROS E SEU
EFEITO METAFILÁTICO EM VARIÁVEIS METABÓLICAS E
OXIDATIVAS DE OVELHAS NO PÓS-PARTO**

Santa Maria, RS.
2017

José Francisco Xavier da Rocha

**METABOLISMO DO EDETATO DE ZINCO EM CORDEIROS E SEU EFEITO
METAFILÁTICO EM VARIÁVEIS METABÓLICAS E OXIDATIVAS DE OVELHAS
NO PÓS-PARTO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marta Lizandra do Rego Leal

Santa Maria, RS.
2017

José Francisco Xavier da Rocha

**METABOLISMO DO EDETATO DE ZINCO EM CORDEIROS E SEU
EFEITO METAFILÁTICO EM VARIÁVEIS METABÓLICAS E
OXIDATIVAS DE OVELHAS NO PÓS-PARTO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 10 de março de 2017:

Marta Lizandra do Rego Leal, Dra. (UFSM - RS)
(Presidente/Orientador)

José Francisco Manta Bragança, Dr. (UNOESC - SC)

Emanuel Veiga de Camargo, Dr. (Instituto Federal Farroupilha - RS)

Alexandre Krause, Dr. (UFSM - RS)

Carlos Augusto Rigon Rossi, Dr. (UFSM - RS)

Santa Maria, RS.
2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Antonio e Lisia Helena, por todos os ensinamentos que me guiaram até este momento, por todo o amor incondicional a mim destinado;

Aos meus irmãos Ricardo e Otacílio, por terem sido fonte de inspiração profissional, pessoal e principalmente pelo amor que temos um pelo outro, estaremos sempre juntos;

À minha esposa Giovana, pelo companherismo, amor, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis que passamos.

À minha orientadora e amiga professora Marta, pelos ensinamentos, orientações de foro profissional e pessoal, sabendo exatamente o momento de afagar ou chamar a atenção, se hoje consegui conquistar algumas coisas em minha vida, você tem participação direta nisso, muito obrigado pela amizade e confiança em mim destinada;

Aos colegas de pós-graduação Adelina Rodrigues Aires, Felipe Pivotto, Andressa Schaffer, Valeska Casanova, Filipo Cogo Mendes e Sergio Cunha, pelos anos de convivência, de muita amizade, parceria, aprendizado e muitas risadas. Em especial para Simone Stefanello e Rafael Ebling pela amizade e auxílio incondicional na reta final do meu doutorado;

Aos meus colegas e direção da Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC pelo apoio nos momentos de dificuldade, e principalmente liberações para poder realizar este doutorado;

Aos estagiários e residentes antigos ou atuais da Clínica de Ruminantes da UFSM, pelos anos de convivência, amizade, ajuda e risadas. Podem contar comigo sempre que precisarem;

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da UFSM pela amizade construída durante este período;

Aos animais que tive contato durante a pós-graduação, sejam relacionados à pesquisa ou atendimento clínico, muito obrigado pelo conhecimento adquirido;

Aos demais professores do curso de Medicina Veterinária da UFSM, pela amizade, dicas e principalmente ensinamentos durante meu período na instituição;

À secretária do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Maria, pela amizade e orientações, seguidas de extrema competência.

Muito obrigado!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas.
Isso é perfeitamente aceitável,
elas são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)

RESUMO

METABOLISMO DO EDETATO DE ZINCO EM CORDEIROS E SEU EFEITO METAFILÁTICO SOBRE VARIÁVEIS METABÓLICAS E OXIDATIVAS DE OVELHAS NO PÓS-PARTO

AUTOR: José Francisco Xavier da Rocha
ORIENTADORA: Marta Lizandra do Rego Leal

A ovinocultura é uma atividade que nos últimos anos passou por uma série de mudanças relacionadas aos sistemas de produção, focando sua busca em manejos eficientes que proporcionem a lucratividade da criação. Dentre os principais entraves na atividade destacam-se os erros nos manejos sanitário e nutricional que são responsáveis diretos pela diminuição da produção, custos com tratamentos e perda de material genético por morte, principalmente de fetos e fêmeas no perirparto. Diante disso, os microminerais utilizados como nutracêuticos podem minimizar estas perdas. Com o objetivo de avaliar o metabolismo de uma nova fonte de zinco injetável, denominada edetato de zinco e seu efeito em parâmetros metabólicos e oxidativos em ovelhas no pós-parto, realizou-se dois estudos experimentais. No primeiro utilizou-se-se 6 cordeiros machos que foram alocados em gaiolas metabólicas individuais. Os animais passaram por um período de 10 dias de adaptação e, posteriormente, foram divididos em dois grupos experimentais. Três animais foram tratados com uma dose de 3mg/kg (2ml) de edetato de zinco por via subcutânea (SC), sendo considerado o grupo tratado (GT), e três receberam a mesma dose de solução de cloreto de sódio a 0,9% pela mesma via, sendo denominado grupo controle (GC). Os animais foram monitorados durante 30 dias para determinação da produção de fezes e de urina e da excreção de zinco. Durante os 7 primeiros dias foram realizadas coletas de amostras de sangue para determinação do zinco sérico. Após este período, as coletas foram realizadas em dias intercalados até 30 dias. Também foram coletadas amostras da água e do alimento para determinar a concentração de zinco na dieta. Ao final do estudo os animais foram submetidos à eutanásia com posterior coleta de 5 gramas dos seguintes tecidos: fígado, músculo (*Longissimus dorsi*), coração e rim, com a finalidade de determinar a concentração de zinco tecidual. Ao final concluiu-se que o edetato de zinco apresentou uma excreção urinária maior que a fecal, assim como foi a principal via de eliminação deste mineral. A aplicação do edetato de zinco não alterou as concentrações de zinco nos tecidos e no sangue dos animais, porém apresentou uma maior absorção e retenção aparentes deste mineral. No segundo estudo, que teve por objetivo avaliar o edetato de zinco sobre variáveis metabólicas e oxidativas em ovelhas no pós-parto imediato, utilizou-se 26 ovelhas da raça Texel, criadas extensivamente, com idade entre 3 e 4 anos, com prenhez confirmada através de ultrassonografia aos 45 dias de gestação e com média de escore corporal 3,0. Foram utilizadas somente ovelhas com gestação simples distribuídas em dois grupos experimentais: grupo tratado (GT; n= 13), animais que receberam 100mg de edetato de zinco SC (2ml) 15 dias antes da data prevista do parto e grupo controle (GC; n= 13), animais que receberam 2ml de cloreto de sódio a 0,9% no mesmo momento experimental. Foram coletadas amostras de sangue 15 dias antes da data prevista do parto e imediatamente após o parto para avaliação do efeito do edetato de zinco. Foram mensurados os teores de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1 (IGF-1), de frutossamina, de colesterol, de triglicerídeos, do índice de estresse oxidativo, sendo este obtido através da mensuração do total de antioxidantes e de oxidantes, e dos teores sanguíneos de zinco. Não houve diferença nos parâmetros metabólicos oxidativos entre os grupos experimentais ($P>0,05$), bem como nas concentrações de zinco sanguíneo ($P>0,05$). O edetato de zinco não tem ação sobre variáveis metabólicas e oxidativas no pós-parto de ovelhas com reduzido desafio metabólico.

Palavras-chave: metabolismo energético, perfil oxidativo, edetato de zinco, ovinos.

ABSTRACT

METABOLISM OF ZINC EDETATE IN LAMBS AND ITS EFFECT ON THE PARAMETERS METAPHYLACTIC METABOLIC AND SHEEP OF OXIDATIVE IN IMMEDIATE POSTPARTUM

AUTHOR: José Francisco Xavier da Rocha

ADVISOR: Marta Lizandra do Rego Leal

Sheep rearing is an activity that in the last years has undergone several changes related to the production systems, focusing its search in efficient managements that provide the creation profitability. Among the main obstacles in the activity, the errors in sanitary and nutritional management are directly responsible for the decrease in production, the costs with treatments and the loss of genetic material by death, mainly of fetuses and females in peripartum. There fore microminerals used as nutraceuticals can minimize these losses. In order to evaluate the metabolism of a new source of injectable zinc, called zinc edetate and its effect on metabolic and oxidative parameters in postpartum ewes, two experimental studies were performed. In the first one, six male lambs were used and housed in individual metabolic cages. The animals went through a period of 10 days of adaptation and later were divided into two experimental groups. Three animals received a dose of 3mg/kg (2ml) of zinc edetate subcutaneous (SC), being considered the treated group (GT), and other three animals received the same dose of 0.9% sodium chloride solution by the same route, being denominated control group (CG). After the adaptation period the animals were monitored for 30 days to determine the production of faeces and urine and the zinc excretion was measured. During the first 7 days, blood samples were collected for the determination of serum zinc. After this initial period, the blood collections were performed on interspersed days up to 30 days. Water and food samples were also collected to determine the diet concentration of zinc. At the end of the study, the animals were submitted to euthanasia, where 5 grams each of liver, muscle (*Longissimus dorsi*), heart and kidney were collected in order to determine the concentration of tissue zinc. At the end of the experiment, it was concluded that the zinc edetate presented a greater urinary excretion than the fecal one, as well as being the main route of elimination of this mineral. The use of zinc edetate did not alter the concentrations of this mineral in the tissues and blood of the animals, but presented a higher apparent absorption and retention of this mineral. In the second study, which aimed to evaluate zinc edetate on metabolic and oxidative variables in ewes in the immediate postpartum period, 26 Texel ewes, raised extensively, aged 3 to 4 years, with pregnancy confirmed by ultrasonography at 45 days of gestation, and with mean body score 3.0 were used. Only sheep with simple gestation distributed in two experimental groups were used in the study: the animals in the treated group (GT; n = 13) received 100mg of zinc edetate SC (2mL) 15 days before the expected delivery date and the group control (CG; = 13) received 2mL of 0.9% sodium chloride solution SC at the same date as GT. Blood samples were collected 15 days before the expected delivery date and immediately after delivery for evaluation of the effect of zinc edetate. The 20mL of blood sample was collected in a silicone tube without anticoagulant. The levels of insulin-like growth factor (IGF-1), fructosamine, cholesterol, triglycerides, and oxidative stress index were obtained by measuring the total antioxidants and oxidants, and the blood levels of zinc. There was no difference in oxidative metabolic parameters between the experimental groups ($P > 0.05$) as well as in blood zinc concentrations ($P > 0.05$). Zinc edetate had no action on metabolic and oxidative variables in the postpartum period of sheep with reduced metabolic challenge.

Keywords: energetic metabolism, oxidative profile, zinc edetate, ovine.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Tabela 1 – Concentration (mg/g) of zinc in the heart, liver kidney and muscle
(*Longissimus dorsi*), in different experimental groups.....30

MANUSCRITO II

Tabela 1 – Valores médios e erro padrão de parâmetros metabólicos e
oxidativo de ovelhas no pós-parto imediato.....35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de defesa antioxidante enzimático.....16

MANUSCRITO I

Figura 1 - Zinc concentration in blood of sheep treated with 3 mg zinc edetate kg^{-1} weight live (Treated group) and not treated (Control group). Each column represents the average and the lines represent the standard error for each experimental point. Blood concentrations of Zinc were analyzed by two-way ANOVA.....28

Figura 2 - Zinc concentration accumulated in days experimental in urine (A) and feces (B) of sheep treated with 3 mg zinc Edetate kg^{-1} weight live (Treated group) and not treated (Control group). Accumulated concentrations of zinc in the feces and urine were analyzed by area under curve, following T test, with significance of 95%.....29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	METABOLISMO DO ZINCO.....	12
2.2	PRÉ E PÓS PARTO DE OVELHAS, METABOLISMO ENERGÉTICO E ZINCO.....	13
2.3	ZINCO E METABOLISMO OXIDATIVO.....	15
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	17
4	MANUSCRITO I – METABOLISM OF ZINC EDETATE IN LAMBS.....	18
5	MANUSCRITO II – EFEITO METAFILATICO DO ZINCO INJETÁVEL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E OXIDATIVOS DE OVELHAS NO PÓS-PARTO IMEDIATO.....	31
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade que nos últimos anos passou por uma série de mudanças de paradigmas culturais, focando sua busca em manejos eficientes que proporcionem a lucratividade da criação. Um dos motivos que comprova esta situação é a evolução do rebanho ovino brasileiro, o qual no ano de 2010 perfazia um total de 16,8 milhões de cabeças, tendo um crescimento médio de 18,41 milhões de animais no ano de 2015. O Rio Grande do Sul é responsável por 21,5% do rebanho nacional, tornando-se o estado com maior número de animais (IBGE, 2016).

O desenvolvimento da cadeia com foco na produção de carne é diretamente relacionado com o manejo nutricional dos animais nas propriedades, sendo de vital importância que as exigências energéticas, proteicas e minerais estejam de acordo com os teores recomendados para a espécie, respeitando sua idade e aptidão (ALBUQUERQUE et al., 2005). Visando o aumento da produtividade nos criatórios de pequenos ruminantes, a nutrição é uma das áreas de estudo mais importantes a ser desenvolvida, pois é a base necessária para que a sanidade e a reprodução possam obter sucesso (CEPEA, 2012). Apesar de todas as ferramentas de manejos criadas visando uma melhora na produção e criação de cordeiros, a ovinocultura brasileira, ainda apresenta problemas relacionados à economia, escala e baixo consumo interno, fatores que a impede de competir com o mercado externo (RIBEIRO, 2002).

Com relação à nutrição de ovinos, um dos pontos estudados é a ação dos microminerais sobre a produção e saúde desta espécie. A adição destes elementos em dietas está diretamente relacionada a algumas funções orgânicas como a melhora da imunidade e do desenvolvimento produtivo e reprodutivo de rebanhos (LAMB et al., 2008). No entanto, é imprescindível conhecer a ação dos diferentes microminerais no organismo dos animais, desde seu metabolismo, modo de excreção e sítios de absorção. A absorção de microminerais pelo organismo pode ser comprometida por uma série de fatores como o estado orgânico do animal, idade, dieta e fonte mineral ofertada (MORAIS, 2001). Por esses motivos, o conhecimento do metabolismo e requerimento dos micro e macro elementos é de grande importância para melhorar a eficiência dos mesmos pelo organismo dos ruminantes (O'DELL, 1984).

Dentre os principais problemas relacionados à criação de ovinos podemos citar à mortalidade perinatal de cordeiros (MPC) e os distúrbios metabólicos, sendo ambos relacionados à condição corporal das mães (RIBEIRO et al., 2011). O crescimento fetal em ovinos é basicamente influenciado pela interação entre a nutrição da mãe e o tamanho da placenta. Baseado nesta informação deve-se dar maior atenção ao aporte nutricional das ovelhas

durante o período pré-parto, mais precisamente no terço final de gestação, sendo este o momento de maior necessidade metabólica da ovelha, pois visa principalmente o crescimento fetal e a manutenção do cordeiro após o parto (RIBEIRO et al., 2010).

No final da gestação ou até mesmo após o parto, a fêmea ovina apresenta-se em balanço energético negativo (BEN) e, conseqüentemente, ocorre um aumento nas concentrações de corpos cetônicos, principalmente o β - hidroxibutirato (BHB). O aumento exacerbado dos teores de BHB pode causar alteração no metabolismo da fêmea, bem como está relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). O aumento das ERO e ERN pode causar estresse oxidativo, que influencia negativamente a resposta imune dos animais à doenças (KHALED, 2011).

Para minimizar as perdas relacionadas a este período, a utilização de manejos nutricionais como o uso de nutracêuticos e o controle da condição corporal dos animais, tem se mostrado como alternativas eficazes para os problemas comuns ao pré e pós-parto de animais ruminantes (AIRES, et al., 2016). O fornecimento de microminerais, principalmente os relacionados à resposta imune, energética, hematopoiética e ao metabolismo oxidativo (ferro, cobre, zinco e selênio), podem ser utilizados como ferramentas para minimizar os efeitos do chamado período de transição (WILDE, 2006). Na espécie ovina, o principal transtorno metabólico que ocorre no período pré-parto é a toxemia da gestação. Esta enfermidade está diretamente relacionada ao metabolismo da glicose e causa aumento nos teores de corpos cetônicos da fêmea, ocasionando a morte dos fetos e da mãe (RADOSTITS et al., 2007).

Na hipercetonemia há diminuição dos valores séricos de zinco, principalmente por este mineral estar relacionado com o metabolismo da glicose (KARIMI, et al, 2015). Esta informação mostra a possibilidade da utilização de zinco no pré-parto de ovelhas, visando atenuar os problemas relacionados ao metabolismo energético desta espécie, uma vez que este mineral participa do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METABOLISMO DO ZINCO

O zinco (Zn) é um micromineral traço encontrado em pequenas concentrações no organismo dos seres vivos. Possui baixa toxicidade, sendo necessário o fornecimento em doses mais elevadas quando se busca um efeito metafilático. Este elemento tem ação em diversos

momentos fisiológicos como o crescimento e a gestação, além de estar interligado ao metabolismo energético e ao metabolismo oxidativo (HAMBIDGE et al., 2008).

A absorção deste micromineral, após sua ingestão, ocorre principalmente no intestino delgado. Nos seres vivos o Zn após absorvido, em torno de 55%, vai para a circulação sanguínea, ligando-se a albumina, sendo esta responsável por carrear este mineral para ser depositado no fígado, porém, 20 – 30% deste elemento mantém-se presente no plasma sendo levado aos demais locais de absorção (ANDRADE et al., 2005).

Existem divergências quanto ao parâmetro indicado para analisar a real concentração deste mineral no organismo, sendo os valores deste elemento no sangue a forma mais utilizada para avaliar as concentrações de zinco. Para a melhor avaliação dos teores sanguíneos de zinco recomenda-se correlacionar os valores deste mineral no sangue com aqueles detectados em tecidos específicos como fígado, rins, músculo e coração e, quando possível, com enzimas dependentes de Zn como as metalotioneínas (HAMBIDGE et al., 2010).

Os valores sanguíneos de zinco sofrem variações principalmente em situações de estresse ou em doenças infecciosas (COUSINS, 1996). De acordo com a literatura os teores séricos de Zn considerados como normais para pequenos ruminantes variam de 12 a 18 $\mu\text{mol/L}$ e 12,3 a 18,5 $\mu\text{mol/L}$, sendo o valor médio de 11,0 $\mu\text{mol/L}$ considerado como limite marginal para casos de deficiência deste mineral (SANZ LORENZO et al., 1996).

Em animais ruminantes, o fígado é o órgão que apresenta maior concentração de zinco, sendo um dos tecidos de eleição para se realizar estudos de acúmulo deste elemento (SUTTLE, 2010). A excreção do zinco se dá em grande parte pelas fezes e uma pequena fração é eliminada pela urina (MERTZ, 1996). A recomendação segundo o NRC (2001) é de 20 mg Zn/kg de matéria seca para ovinos, porém este valor pode variar de acordo com a categoria animal, como por exemplo, animais para engorda; estado fisiológico, animais em lactação ou período reprodutivo. Além disso, o zinco quando fornecido de forma excedente, tende a ser estocado em órgãos específicos, principalmente o fígado (PAL et al., 2010).

O Zn é considerado o micro mineral mais abundante no meio intracelular (PECHOVA et al., 2006; SUTTLE, 20010). As principais fontes de Zn usadas na nutrição animal são o óxido de zinco (ZnO) e o sulfato de zinco (ZnSO_4). No entanto, elas apresentam baixa biodisponibilidade. Para aumentar a disponibilidade do zinco uma alternativa que vem sendo utilizada é a associação deste elemento com algumas substâncias orgânicas como aminoácidos, proteínas e polissacarídeos (SPEARS, 1996).

A maioria dos estudos existentes foi realizada utilizando-se zinco ligado a aminoácidos e de forma oral, pois são poucas as fontes deste mineral para uso injetável em ruminantes. No

entanto, em estudo com outros elementos, sabe-se que a via de administração também pode influenciar na absorção e utilização dos minerais em ovinos, visto que a utilização destes, de forma oral, pode sofrer a interferência de microrganismos ruminais diminuindo a metabolização e, conseqüentemente, a absorção (ROCHA et al., 2013).

2.2 PRÉ E PÓS-PARTO DE OVELHAS, METABOLISMO ENERGÉTICO E ZINCO

Um dos períodos mais importantes na criação de ruminantes é o período de transição. Este se refere a uma etapa específica da vida reprodutiva da fêmea que consiste entre o final da gestação e o início da lactação e é caracterizado por uma série de mudanças de origem anatômica, fisiológica, hormonal e metabólica (CARDOSO, 2011). A falta de cuidados durante este período interfere diretamente na vida produtiva da fêmea e está relacionada ao seu estado nutricional, podendo acarretar problemas de origens sanitárias e, principalmente, metabólicas (RADOSTITS et al., 2007).

Na espécie ovina a demanda de nutrientes aumenta durante o período gestacional, principalmente nas últimas seis semanas, quando o feto se desenvolve alcançando aproximadamente 70% do seu crescimento. Também há necessidade do organismo de carrear nutrientes para o desenvolvimento do tecido mamário (RUSSEL, 1991), sendo que o déficit energético durante este período, associado a escores corporais altos ou baixos e gestações múltiplas podem desencadear, no pré-parto da ovelha, um quadro de acetonemia ou também denominado toxemia da gestação (CARDOSO, 2011; ABDUL-AZIZ & AL-MUJALLI, 2008).

Durante este período específico, o adequado monitoramento do rebanho visa promover atendimento de demandas, com o objetivo de diminuir a incidência de distúrbios de origens metabólicas, sendo estas de grande importância para animais de produção. Algumas ferramentas podem ser utilizadas para se identificar problemas relacionados à nutrição e sanidade. Dentro destas uma das principais alternativas existentes, é a avaliação do perfil metabólico e nutricional, o qual poderá indicar a presença ou não de situações de risco, identificando animais que possam apresentar síndromes ou doenças (PEIXOTO & OSÓRIO, 2007).

Em animais ruminantes, a avaliação do status energético pode ser determinada por uma série de informações tanto laboratoriais como visuais. Os resultados obtidos no lipidograma (colesterol, triglicerídeos e β -hidroxibutirato), juntamente com parâmetros glicêmicos (glicose e frutossamina), assim como a avaliação da condição corporal dos animais, podem ser úteis na identificação e prevenção de doenças (FERNANDES, 2012). É comum em ovelhas,

principalmente as que se encontram com condição de escore corporal muito baixo, ou elevado, estarem mais predispostas a distúrbios de origem metabólica (ORTOLANI, 1994).

Em momentos de deficiência energética como no pré-parto ocorre um aumento nos teores plasmáticos de ácidos graxos livres em decorrência da mobilização de gorduras dos tecidos. Entre os hormônios que atuam sobre metabolismo lipídico e energético pode-se citar o do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), insulina e hormônios tireoidianos. Em situações referentes à mobilização lipídica, estes hormônios (GH, IGF-1 e insulina), atuam em sinergismo para antagonizar o efeito dos hormônios lipolíticos, esterificando ácidos graxos, aumentando os teores de glicose celular (CORREA et al., 2010).

O zinco é um mineral que atua positivamente neste metabolismo, pois está relacionado com a insulina e sua sensibilidade, aumentando a ligação deste hormônio com seus receptores no pâncreas e outros órgãos. Este efeito na ligação entre insulina e seus receptores auxilia a entrada da glicose para o interior da célula (MARREIRO et al., 2005). Além de atuar estimulando o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1 (IGF-1).

Nos seres vivos, o IGF-1 atua diminuindo a degradação proteica em estados catabólicos. Ele atua como mediador do hormônio do crescimento (GH) promovendo o desenvolvimento corporal através da diferenciação celular de condroblastos, fibroblastos e mioblastos (GOMES & TIRAPEGUI, 1998). Além disso, inúmeras metaloenzimas envolvidas nas sínteses de DNA e RNA são dependentes de zinco na regulação hormonal deste eixo (SENA & PEDROSA, 2005).

No metabolismo dos carboidratos o zinco estimula também a produção de hormônios tireoideanos, aumentando a conversão de triiodotironina (T3) a tiroxina (T4), os quais são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento dos seres vivos (NORBERGER et al., 2001). A concentração de Zn está diretamente associada aos teores destes hormônios e, principalmente, as suas ações no organismo (MAXWELL & VOLPE, 2007).

Dentro deste contexto, a utilização de alternativas nutricionais neste período da vida deste animal pode apresentar bons resultados, visando minimizar o problema relacionado ao metabolismo energético. Entre as possibilidades de fornecimento, o zinco, por apresentar ação direta sobre os hormônios tireoidianos e principalmente por estar relacionado à resistência insulínica (MARREIRO et al., 2004) torna-se uma opção.

2.3 ZINCO E METABOLISMO OXIDATIVO

A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN) é parte integrante do metabolismo orgânico e ocorre em diversas condições fisiológicas. As ERO e ERN participam de várias funções biológicas, como na fagocitose, na produção de energia, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes (ANDRÉ et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2007). Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, as ERO e ERN o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. No entanto, seu excesso pode causar estresse oxidativo com consequente prejuízo ao organismo como peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, alterações nos carboidratos e no DNA (ANDRÉ et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2007). Dessa forma, encontram-se relacionados com várias enfermidades, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral. O estresse oxidativo (EO) resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (CHIHUAULAF et al., 2002, ANDRÉ et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2007).

Para combater os efeitos relacionados ao EO, o organismo possui um complexo sistema denominado de antioxidante dividido em enzimático (Figura 1) e não enzimático, sendo compostos no primeiro principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), estas atuam em conjunto, sendo as primeiras linhas de defesa do organismo frente ao EO. Em relação ao sistema Antioxidante não enzimático, fazem parte do mesmo uma série de vitaminas como a A, C e E além de proteínas e compostos carotenoides, sendo que estas normalmente são fornecidas de forma exógena ao organismo (CHIHUAULAF et al., 2002, ANDRÉ et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2007).

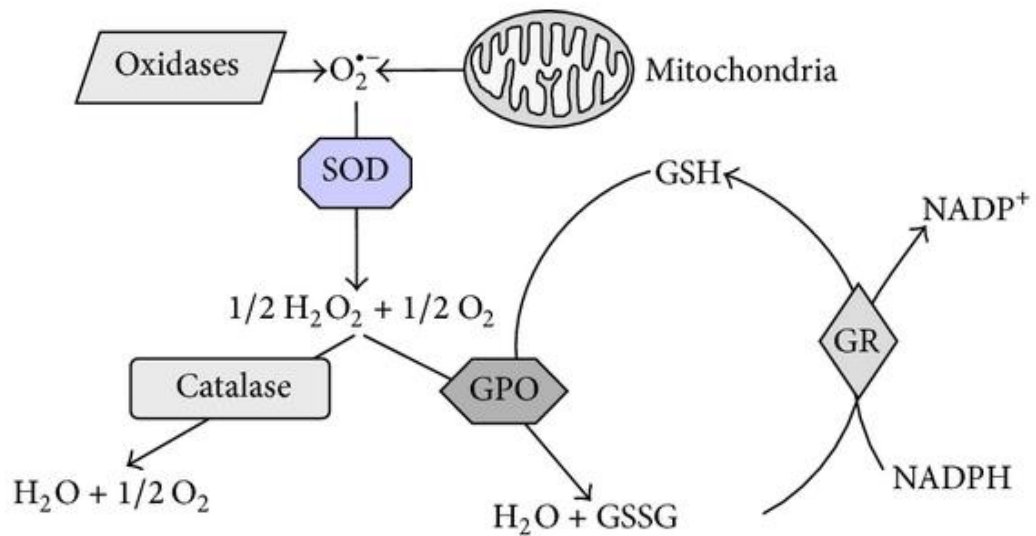


Figura 1 – Mecanismo de defesa antioxidante enzimático (KOCH et al., 2014).

Durante a gestação dos animais domésticos também podem ocorrer mudanças no metabolismo oxidativo decorrente de alteração de substâncias no organismo que fazem parte dos sistemas oxidante e antioxidantes. Este é um período específico na vida do animal que está diretamente relacionado a mudanças nos mecanismos endócrinos, nutricionais, energético e oxidativo. Tais mudanças estão atreladas a exigências de manutenção da mãe e do (s) feto (s), podendo se prolongar até o pós-parto de ruminantes (STEFANON et al., 2005).

Em ovelhas, o estresse oxidativo possui relação direta com a nutrição e com o número de fetos envolvidos na gestação (MUTINATI et al., 2013). O estresse oxidativo pode ocorrer com maior frequência no miométrio de ovelhas até 140 dias de gestação (MASSMAN et al., 1999) e pode interferir diretamente na gestação, aumentando a apoptose de blastocistos (PIERCE et al., 1991).

No terço final da gestação ou até mesmo após o parto, a fêmea ovina entra em um processo de balanço energético negativo (BEN), caso este processo não seja atenuado às enfermidades decorrentes da demanda energética desta fêmea pode causar morte de mãe e fetos, além de uma maior produção de ERO e ERN que pode agravar o estado de saúde da fêmea (KHALED, 2011).

Dentre as substâncias que podem auxiliar a defesa do organismo contra o EO, as mais utilizadas são os microminerais, pois vários atuam como cofatores de enzimas do sistema antioxidante enzimático, como por exemplo, o zinco que está presente na enzima superóxido dismutase (SOD) sendo considerada uma das primeiras linhas de defesa do organismo frente

ao EO (RIEGEL, 2002). Este mineral quando utilizado apresentou bons resultados em ovinos, diminuindo o índice de EO nestes animais. (PIVOTO et al., 2015). Sabendo-se que o zinco atua no sistema antioxidante e no metabolismo energético, esta tese tem como objetivo avaliar uma nova fonte de zinco injetável, bem como sua ação em variáveis metabólicas e oxidativas de ovelhas no pós-parto.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois artigos científicos (Manuscritos I e II). Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos artigos.

4 MANUSCRITO I

Artigo submetido à avaliação no periódico Semina – Ciências Agrárias. Universidade Estadual de Londrina (UEL).

METABOLISM AND EXCRETION OF ZINC EDETATE IN LAMBS

José Francisco Xavier Rocha^a Marta Lizandra do Rêgo Leal

^a Department of Clinic of Large Animals, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Department of Veterinary Medicine University of West of Santa Catarina, SC, Brazil

*e-mail: jose.rocha@unoesc.edu.br

METABOLISM AND EXCRETION OF ZINC EDETATE IN LAMBS

The objective of this study was to evaluate the metabolism and excretion of an injectable zinc source. Six lambs in metabolic cages were divided into two experimental groups: a treated group (TG) composed of three animals that received a single dose of 3 mg/kg of zinc edetate subcutaneously (SC), and a control group (CG) that received SC the same dose of saline solution (0.9%) during 30 consecutive days. In this period the production of feces and urine was measured to determine zinc excretion. In the first seven days blood samples were collected for determination of zinc serum levels. After this period, the blood samples were collected at interspersed days. At the end of the 30 days the animals underwent euthanasia, being collected five grams of the following organs: liver, muscle, heart and kidney, for determination of the tissue zinc concentration. Was also evaluated the apparent absorption and retention of this element in the two experimental groups. The results showed divergence between the zinc edetate concentration in the blood of the TG related to not treated, and that the time between the treatments is directly related to the sum of the serum concentration of the mineral at the end of the experiment ($F(8,69) = 1.28; p = 0.042$) e ($F(2,92) = 36; p = 0.0005$). The serum zinc values were numerically higher on days zero, 1, 4, 5 and 7 and lowers in other moments. The TG presented higher zinc values on urinary excretion than the CG ($p = 0.049$) in addition to a greater apparent absorption and retention of this mineral in the body. There was no difference in the concentrations of zinc in the feces and in the organs. With these results we can conclude that the treatment with zinc edetate alters the serum concentration of this mineral, being almost completely excreted by urine and the animals that have been treated with injectable zinc presents higher apparent absorption and retention.

Keywords: metabolism, mineral, sheep, zinc, Edetate.

INTRODUCTION

Zinc (Zn) is a trace element found in small concentrations in living organisms, thus requiring dietary supplementation. It plays an important role in various physiological processes, mainly in oxidative and energy metabolisms (HAMBIDGE et al., 2008). This trace mineral exerts structural function and is a cofactor of a large number of enzymes, being considered the most abundant element in the intracellular medium (PECHOVA et al., 2006). Moreover, Zn has direct participation in the metabolism of carbohydrates, proteins and nucleic acids (NRC, 2001),

acting together with thyroid hormones (T3 e T4), fundamental to the growth and development of life, being the same produced by thyroid. This gland plays in the production of thyroxin (T4), which is caused in large part by deionization to triiodothyronine (T3).

The levels of these hormones and their effects in the body are directly related to the serum Zn levels (MAXWELL; VOLPE, 2007). This trace element is also related to insulin, once it increases the sensitivity of insulin receptors in the pancreas and other organs, improving the entry of glucose into the cell, optimizing the energy metabolism (MARREIRO et al., 2004). Zn is present in the enzyme superoxide dismutase (Cu-ZnSOD) that acts as antioxidant (RIEGEL, 2002). This mineral also plays an important role in the immune response, by being involved in the synthesis of DNA and RNA and also in replication and cell proliferation related to immune system (SPEARS; WEISS, 2008).

In living being Zn absorption after its ingestion occurs mainly in small intestine (MERTZ, 1996), being absorbed into the bloodstream by binding to albumin and amino acids (around 55%), and the rest is deposited in body tissues (ANDRADE et al., 2005). Once absorbed and bound to albumin, which is the protein responsible for transporting, much is deposited in the liver, leaving 20-30% of Zn free in the plasma, which are distributed in the remaining sites of absorption (ACOSTA; VALCARCEL, 2004).

In ruminants, the liver has higher Zn levels, thus this tissue is preferred for accumulation studies (FICK, 1976). The mechanism of excretion of this element when ingested orally occurs in the feces, and a small fraction is eliminated through urine (MERTZ, 1996). According to the NRC (2001) the recommended dietary Zn levels for sheep are set as 20 mg / kg DM, but these values may vary according to the animal and physiological state.

The main sources of Zn in animal nutrition are zinc oxide (ZnO) and zinc sulfate (ZnSO₄), which presents low bioavailability (VILELA et al., 2011). Thus, an alternative to improve the absorption of certain minerals is their association with some organic compounds such as amino acids, proteins, and polysaccharides (SPEARS, 1996). There are few injectable sources of Zn available for use in ruminants, being this the first study using Zn connected to Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) via SC in lambs.

Most existing studies were performed using the Zn orally, bound to amino acids. However, it is known that the administration route can influence the absorption and utilization of minerals. With this we work with the hypothesis that the Zn administered subcutaneously presents metabolism and distribution different than when administered orally, but without the ruminal interference. The objective of this study was to evaluate the rates of absorption, excretion and tissue distribution of a new source of Zn injectable in lambs (zinc Edetate).

MATERIAL AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on use of animals at the Federal University of Santa Maria (UFSM) (094/2013). Six male lambs of breed Texel with 4 months of age and approximately 30 Kg live weight were used. These were separated into two groups: treated group (TG; n = 3) composed of animals that received 3mg zinc Edetate/kg live weight subcutaneously (SC) (DBS06730 equivalent) and control group (CG; n = 3) which received the same dose of saline solution (0.9%) SC.

The animals were allocated in individual metabolic cages located in the Hospital University Clinic of Ruminants. The lambs went through a 10-day period of adaptation, where food consumption was evaluated to determine the quantity to be supplied during the experiment. Was determined a proportion of food with 5% of leftovers in the bird feeder. The diet provided was the basis of guinea grass (*Panicum maximum*) containing 12% crude protein, and water *ad libitum*. After the adjustment period the animals were monitored for 30 straight days being measured daily production of feces and urine with subsequent collection of 100 grams of fecal material and 30 mL of urine for determination of Zn excretion (mg/g and mg/L). The rates of excretion of Zn in the feces and urine and the amount produced during the experimental period were evaluated daily. In the first seven days, blood samples were collected by jugular vein puncture in tubes containing heparin for determination of serum levels of Zn. Subsequently, the collections were made in days interspersed. Was collected a sample of the water and the food offered to animals to determine the concentration of dietary Zn. At the end of the experiment, the animals underwent euthanasia using 10 mg of acepromazine intravenously (IV), 1 g thiopental sodium IV and 100 mL of potassium chloride IV. Subsequently, were collected five grams of the following organs: liver, muscle (*Longissimus dorsi*), heart and kidney to determine the tissue concentration of Zn (mg/g). Absorption and apparent retention of zinc were performed by Ammerman, et al., (1995) equation [14]:

$$\text{Apparent absorption} = \frac{\text{Ingestion} - \text{fecal excretion}}{\text{Ingestion}} \times 100$$

$$\text{Apparent retention} = \frac{\text{Ingestion} - (\text{fecal excretion} + \text{urinary excretion})}{\text{Ingestion}} \times 100$$

The levels of Zn in blood, feces, urine and tissue, as well as diet and water provided were measured by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) in the spectrometer Perkin Elmer (Optima 4300 DV). Urine values below 0.1 mg/L were considered insignificant as excretion rate.

To assess concentrations of zinc in the feces and urine, was calculated the area under curve and, later, we used the T test for comparison between the groups. This analysis is the most suitable for measuring the excretion of chemicals, mainly because it evaluates the total mineral excreted during a given period. Blood concentrations of Zn were analyzed by two-way ANOVA with subsequent use of the T test. The results were expressed as means \pm standard deviations. The significance level was 5%. The statistical analyses were performed using the program Graph Pad Prism 5.

RESULTS

Dietary zinc concentrations

The content of Zn obtained in the diet (water and food) offered to animals was 0.05 mg/g as the animals consume on average 2 kg DM/day they took in a total of 100 mg daily of zinc from the diet.

Zinc concentrations in the blood, urine, feces, and tissues

The total concentration of Zn in blood was greater in the TG with respect to CG when used the two-way ANOVA ($F(8.69) = 1.28$; $p = 0.042$) and ($F(2.92) = 36.0$; $p = 0.0005$), (Figure 1). However, the treated group showed numerically superior levels of Zn on days zero, 1, 4, 5 and 7 and lower values in the remaining moments post-treatment.

The excretion of Zn in urine was higher in the treated group compared to the control ($P = 0.049$) with area under curve of the treated group of 25.4 ± 119.2 , and the control group of 50.69 ± 7.01 (Figure 2a). Numerically, larger concentrations of zinc were found in the feces of animals of the TG when compared to CG ($P > 0.05$); the area under curve in treated animals was 98.51 ± 12.5 and in the control group 78.38 ± 6.9 (Figure 2b). There was no statistical difference concerning the levels of Zn in liver, kidney, heart and muscle ($P > 0.05$) between the groups (Table1), however, were observed higher numeric values of deposition of Zn in liver tissue in the TG.

Absorption and apparent retention of zinc in the body and percentage of excretion

The treated group showed a larger total excretion of this element compared to the control group ($P < 0.05$). The animals treated with Zn excreted 21.47% of this mineral and the control group 13.2%. The apparent absorption of the treated group was 90.98% and the retention of 78.52%.

The animals in the control group showed, respectively, an index of 86.14% and 74.9% of apparent absorption and retention. In relation to rates and routes of excretion the treated group eliminated 26.32% of the mineral via urine and 19.02% by feces. The animals from control group excreted 5.91% of zinc from food via urine and 7.29% by feces.

DISCUSSION

The values of Zn from the food offered to the animals were similar to those referenced in the literature (NRC, 2001). In relation to the serum Zn levels, significant differences were observed for TG when compared to CG, and the treatment time was directly related to the mineral concentration in the blood. Similar results were observed by Vilela et al. (2011), when evaluated different organic and inorganic zinc sources in lambs orally, and have observed an increase in the concentrations of serum Zn, especially when it was used in the form of zinc oxide (VILELA et al., 2011). However, in this study, the animals were kept in stables and Zn levels were evaluated in only three experimental times and was not performed evaluation of fecal and urinary excretion, taking only into account the serum Zn as mineral bioavailability parameter. The work carried out by our research group, the collection was performed daily, in addition to being performed the evaluation of tissue parameters and excretion which makes it less prone to errors in mineral metabolism studies. And this is the first work to use a new source of Zn injectable which is connected to the tetra-acetic ethylenediamine acid.

The group treated with zinc edetate presented during the study different serum mineral peaks, especially in the fourth experimental period, but was observed a numerical decrease in the blood values of this element during the course of the experiment. This result may be related to the hypothesis that much of this element is bonded to Zn-dependent enzymes, such as metallothionein (HAMBIDGE et al., 2010). Besides that, in rodents, it was identified a great relationship on the decrease of serum Zn stress-related (NOBILI et al., 1997), what might have

occurred in our research, where the animals were allocated in metabolic cages, which may have generated a mild degree of stress and caused mobilization of Zn in other sites of absorption.

The data obtained for the excretion of Zn in urine showed that the treated group showed a better metabolism compared to the control group. The zinc Edetate used in injectable form not only presented an early mineral excretion through urine, but also presented an inversion in the mechanisms of excretion, since Zn when ingested orally by mammals presents as the main source of excretion the feces, being a small portion excreted by urine (ANDRADE et al., 2005).

The results obtained by our research group showed that animals treated with zinc Edetate presented a greater elimination through urine, and not by the feces. From this result, you can add the hypothesis that the Zn used in injectable form avoids the influence of rumen in this mineral. In research using organic chrome orally in lambs, Rocha et al. (2013) studied oral administration of organic chrome to lambs, and found low absorption of this element, which was basically excreted by feces (ROCHA et al., 2013). These researchers attributed the low absorption to the interference of the rumen microorganisms on metabolism and absorption of this element. In a study to compare the efficacy of iron in anemic lambs, Rocha et al. (2007) observed a better action of this mineral in its injectable form when compared to the oral formulations (ROCHA et al., 2007).

The animals in the TG presented numerically greater excretion of zinc by feces, however there was no statistical difference. This greater excretion by the treated group, even though it used an injectable form, can be explained by the deposition of Zn in the intestinal villi, as well as in other tissues, where increments the organic immune response against several agents (STRNADOVA et al., 2011).

There was no increased zinc deposition in liver, renal, muscle, and coronary tissue. However, the hypothesis of the deposition of this element in other tissues not assessed in this experiment cannot be disregarded. In studies using lambs supplemented orally with Zn bound to amino acids, Kinal and Slupczynska (2011) did not find differences in Zn levels in kidney, liver, and pancreas as compared to the untreated group.

In this study was possible to obtain important data related to absorption and apparent retention of zinc edetate. The results were higher than those observed in studies with bioavailability in lambs using organic and inorganic zinc sources administrated orally (VILELA et al., 2011). In goats, Sayed et al. used organic Zn for supplementation of diets, and observed lower rates of absorption and apparent retention when compared to the results obtained in this

study (SAYED et al., 2013), evidencing that Zn edetate in the injectable form can provide better absorption and apparent retention in lambs.

CONCLUSIONS

It can be concluded that treatment with zinc edetate alters the serum concentrations of this mineral. In this formulation the zinc is basically eliminated through urine. Lambs treated with injectable zinc edetate present greater apparent absorption and retention.

REFERENCES

ACOSTA, R., VALCARCEL, P. El Zinc: La chispa de la vida. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 76, n. 4, dec. 2004.

AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J. **Bioavailability of nutrients for animals (amino acids, minerals and vitamins)**. Academic Press: San Diego, New York, Boston, London, 1995.

ANDRADE, E., ALVES, S., TAKASE, I. Evaluation of the use of medicinal grass as nutritional supplement of iron, copper and zinc. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 591-596, 2005.

FICK, K.R. **Methods of mineral analysis for plant and animal tissues**. 2. ed. Gainesville: University of Florida, 1976.

HAMBIDGE, K. M.; MILLER, L. V.; WESTCOTT, J. E.; KREBS, N. F. Dietary references intake for zinc may require adjustments for phytate intake based upon model predictions. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2363-2366, 2008.

HAMBIDGE, M. K.; MILLER, L. V.; WESTCOTT, J. E.; SHENG, X.; KREBS, N. F. Zinc bioavailability and homeostasis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 5, p. 1478-1483, mar. 2010.

KINAL, S.; SLUPCZYNSKA, M. The bioavailability of different chemical forms of zinc in fattening lambs. **Archiv fur Tierzucht**, v.54, n. 4, p. 391-398,2011.

MARREIRO, D.; GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A.; LERARIO, A. C.; HALPERN, A.; COZZOLINO, S. M. F. Role of zinc in insulin resistance. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 2, p. 234-239, apr. 2004.

MAXWELL, C.; VOLPE, S. L. Effect of zinc supplementation on thyroid hormone function: A case study of two college females. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 51, n. 2, p. 188-194, may 2007.

MERTZ, W. **Trace elements in human and nutrition**. 5. ed. Academic: New York, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of sheep**. 6. ed. National Academy Press: Washington, 2001.

NOBILI, F.; VIGNOLINI, F.; FIGUS, E.; MENGHERI, E. Treatment of rats with dexamethasone or thyroxine reverses zinc deficiency induced intestinal damage. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 9, p. 1807-1813, sep. 1997.

PECHOVA, A.; PAVLATA, L.; LOKAJOVA, E. Zinc supplementation and somatic cell count in milk of dairy cows. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, p. 355-361, 2006.

RIEGEL, R. E. **Radicais livres: bioquímica**. 3. ed. UNISINOS: São Leopoldo, 2002.

ROCHA, J. F.; RODRIGUES AIRES, A.; GONÇALVES NUNES, M. A.; MORAES FLORES, E. M.; KOZLOSKI, G. V.; CASTAGNA DE VARGAS, A.; D'AVILA FARIAS, L.; DA SILVA CECIM, M.; DO REGO LEAL, M. L. Metabolism, intake, and digestibility of lambs supplemented with organic chromium. **Biological Trace Element Research**, v. 156, n. 1-3, p. 130-133, dec. 2013.

ROCHA, R. X.; BONDAN, C.; MARINHO, R.; ANJOS LOPES, S. T.; CECIM, M. Dextran iron in anemic lambs: effects on reticulocytosis and free radical production. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1344-1348, 2007.

SAYED, A. N.; GAZIA, N. A.; ABD-ELLAH, A. M.; ABDEL-RAHEEM, S. M. Effect of high energy and high protein diets on zinc and copper metabolism in goats. **International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 30-37, 2013.

SPEARS, J.W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science Technology**, v. 58, p. 151-163, 1996.

SPEARS, J.W.; WEISS, W.P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **Veterinary Journal**, v.176, p. 70-76,2008.

STRNADOVA, P.; SVOBODOVA, V.; PAVLATA, L.; MISUROVA, L.; DVORAK, R. Effect of inorganic and organic zinc supplementation on coccidial infections in goat kids. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, p. 131-137, 2011.

VILELA, F. G.; ZANETTI, M. A.; SARAN NETTO, A.; FREITAS JUNIOR, J. E.; YOSHIKAWA, C. Y. C. Biodisponibilidade de fontes orgânicas e inorgânicas de zinco em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 448-455, apr. 2011.

Figure 1. Zinc concentration in blood of sheep treated with 3 mg zinc edetate kg^{-1} weight live (Treated group) and not treated (Control group). Each column represents the average and the lines represent the standard error for each experimental point. Blood concentrations of Zinc were analyzed by two-way ANOVA

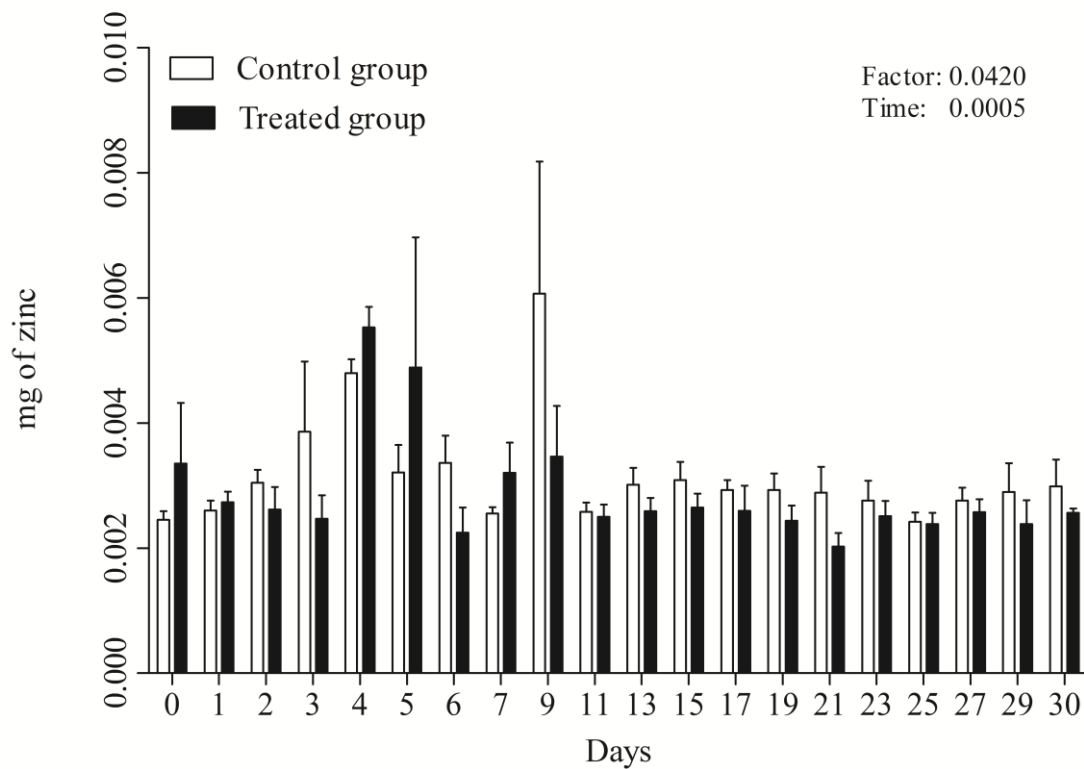


Figure 2. Zinc concentration accumulated in days experimental in urine (A) and feces (B) of sheep treated with 3 mg zinc Edetate kg^{-1} weight live (Treated group) and not treated (Control group). Accumulated concentrations of zinc in the feces and urine were analyzed by area under curve, following T test, with significance of 95%

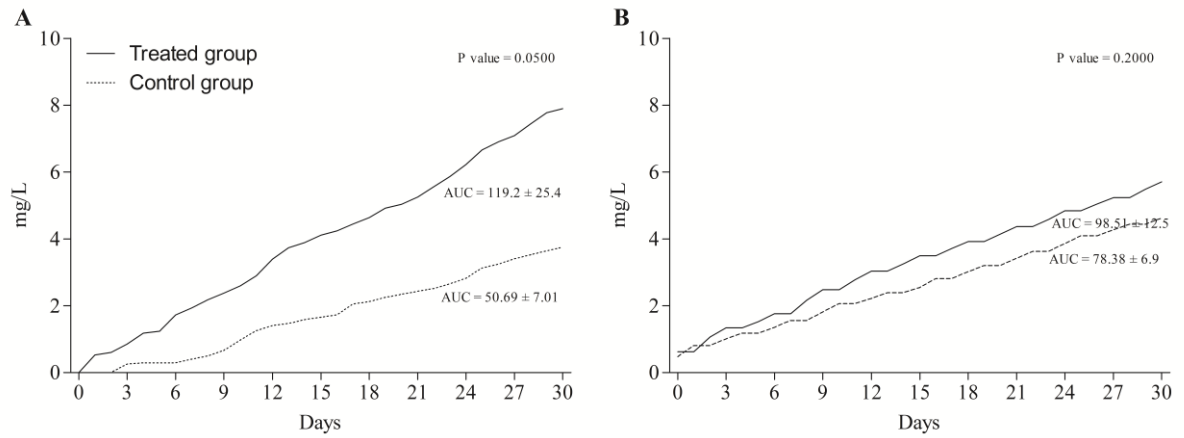


Table 1. Concentration (mg/g) of zinc in the heart, liver, kidney and muscle (*longissimus dorsi*), in different experimental groups. Data expressed as mean and standard deviation.

Tissue/Organ	Groups	Zn/mg/g
Heart	Treated	17,75^a ± 3,21
	Control	17,93^a ± 3,74
Kidney	Treated	132,23^a ± 15,06
	Control	132,83^a ± 14,46
<i>Longissimus dorsi</i>	Treated	18,96^a ± 4,00
	Control	20,30^a ± 0,43
Liver	Treated	78,86^a ± 21,00
	Control	61,65^a ± 11,26

5 MANUSCRITO II

Artigo aceito para publicação no periódico, Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMG.

Efeito metafilático do zinco injetável sobre parâmetros metabólicos e oxidativos de ovelhas no pós-parto imediato

Metaphylactic effect of injectable zinc on metabolic and oxidative parameters of sheep in the immediate postpartum

J.F.X Rocha^{1*}, A.R Aires², F.C Mendes¹, F.L Pivoto¹, C Amaral¹, V.D Torbitz³, R Moresco³, M.A Gonçalves⁴, E.M Flores⁴, R.S Sousa⁵, E.L Ortolani⁵, R.X Rocha⁶, M.L.R Leal¹

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Universidade Federal de Santa Maria - UFSM- Santa Maria, RS

²Curso de Medicina Veterinária Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC – São Miguel do Oeste, SC

³Programa de Pós-Graduação Farmácia Universidade Federal de Santa Maria - UFSM- Santa Maria, RS

⁴Programa de Pós-Graduação Química analítica Universidade Federal de Santa Maria - UFSM- Santa Maria, RS

⁵Universidade de São Paulo - USP - São Paulo, SP

⁶Médico veterinário, doutor em clínica médica pela Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS

* Autor para correspondência: jose.rocha@unoesc.edu.br

RESUMO

Com o objetivo de avaliar uma nova fonte de zinco orgânico injetável (edetato de zinco) sobre o perfil energético e oxidativo em ovelhas no pós-parto imediato, 26 animais da raça Texel previamente identificados e distribuídos em dois grupos experimentais foram utilizados: grupo tratado (GT; n=13): animais que receberam uma aplicação, por via subcutânea (SC) de 100mg de edetato de zinco (2mL) 15 dias antes da data prevista do parto, e grupo controle (GC; n=13): animais que receberam uma aplicação de 2 ml de solução fisiológica SC na mesma data que o GT. Amostras de sangue foram coletadas no dia do parto, para a determinação sérica da frutossamina, do colesterol e dos triglicérides, do fator de crescimento semelhante a insulina

tipo 1 (IGF-1), do índice de estresse oxidativo (IOS) e do zinco sanguíneo. Além destas variáveis ainda foi realizada a mensuração de zinco no alimento ofertado aos animais. Não houve diferença nos parâmetros metabólicos e no índice de estresse oxidativo entre os grupos experimentais ($P>0,05$), bem como nas concentrações de zinco sanguíneo ($P>0,05$). O edetato de zinco parenteral não altera o perfil energético e oxidativo de ovelhas no pós-parto imediato.

Palavras-chave: ovinos, metabolismo energético, perfil oxidativo, edetato de zinco.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate a new source of injectable organic zinc (zinc edetate) on the energy and oxidative profile in sheep during the immediate postpartum period. Twenty-six Texel breed animals were previously identified and divided into two experimental groups: the treated group (TG; $n= 13$) that comprised the animals that received a subcutaneous (SC) injection of 100 mg of zinc edetate (2 mL) fifteen days before the parturition expected date and the control group (CG; $n=13$) that comprised the animals that received 2mL of physiological solution at the same date of TG. Blood samples were collected on the parturition day for the assessment of serum fructosamine, cholesterol and triglycerides, insulin-like growth factor type 1 (IGF-1), the oxidative stress index (OSi) and the blood zinc concentration. In addition to these parameters, the measurement of zinc was made in food given to the animals. There was no difference in metabolic parameters and OSi between the experimental groups ($P>0.05$), as well as in blood zinc concentrations ($P>0.05$). The parenteral zinc edentate does not change the energy and oxidative profile in the immediate postpartum sheep.

Keywords: sheep, energy metabolism, oxidative profile, zinc edetate

O zinco (Zn) é um mineral amplamente utilizado na suplementação animal. Este elemento traço é encontrado em pequenas concentrações no organismo dos seres vivos e apresenta baixa toxicidade, podendo ser administrado na forma oral ou parenteral, quando se busca um efeito metafilático. Este micromineral tem como uma das suas principais funções a manutenção do metabolismo oxidativo, pois está presente na enzima superóxido dismutase (Cu-ZnSOD) que atua como uma das primeiras defesas do sistema antioxidante (Hambidge et al., 2010).

No metabolismo energético, as funções do zinco estão associadas à insulina, aumentando sua sensibilidade na ligação com seus receptores no pâncreas e outros órgãos, podendo incrementar a entrada da glicose para o interior da célula (Marreiro et al., 2004). Além disso, o zinco está relacionado ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1),

sendo que na espécie ovina este hormônio apresenta uma importante função durante o período gestacional, pois o mesmo atua no crescimento feto - placenta, além de realizar ações mitogênicas e metabólicas (Feng Dong et al., 2005).

A atenção ao metabolismo energético é imprescindível na espécie ovina principalmente no período do pré-parto. Neste momento, pode ocorrer uma série de problemas relacionados ao manejo nutricional dos animais, acarretando um declínio ou aumento na condição corporal das fêmeas gestantes (Ribeiro, 2002). No terço final da gestação, ou até mesmo após o parto, pode ocorrer o balanço energético negativo (BEN) em ovelhas e, conseqüentemente, aumento nas concentrações de corpos cetônicos, principalmente o β - hidroxibutirato (BHB), afetando diretamente o metabolismo da glicose destes animais, podendo causar desordens metabólicas severas (Khaled, 2011).

Tendo em vista que ovelhas em final de gestação e no pós-parto imediato são submetidas a um maior desafio metabólico e oxidativo, e que o zinco exerce importantes funções relacionadas a tais condições, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do zinco parenteral sobre o perfil energético e oxidativo de ovelhas no pós-parto imediato. Foram utilizadas 26 ovelhas da raça Texel, criadas extensivamente, com idade entre 3 e 4 anos, com prenhes confirmadas através de ultrassonografia aos 45 dias de gestação, e com média de condição corporal 3,0. Foram utilizadas somente ovelhas com gestação simples distribuídas em dois grupos experimentais: grupo tratado (GT; n=13), animais que receberam 100mg de edetato de zinco SC (2ml) 15 dias antes da data prevista do parto e grupo controle (GC; n=13), animais que receberam 2ml de solução fisiológica SC na mesma data que o GT. Os animais dos dois grupos foram avaliados clinicamente mediante realização de ausculta pulmonar e cardíaca, da mensuração da temperatura corporal e da visualização da coloração das mucosas aparentes. Nenhum animal apresentou alteração dos parâmetros fisiológicos ou clínicos durante todo o período experimental.

O zinco utilizado foi o edetato de zinco (50mg/ml-Biogenesis Bagó, Argentina). Essa fórmula permite a utilização do zinco puro ligado ao ácido etilenodiamino tetra-acético na forma injetável, evitando a interação de microminerais no rúmen/intestino, aumentando assim sua biodisponibilidade.

Foram coletadas amostras de sangue 15 dias antes da data prevista do parto para exclusão de problemas metabólicos prévios e imediatamente após o parto para avaliação do efeito do edetato de zinco. As coletas foram obtidas mediante punção da veia jugular externa, utilizando-se do sistema Vacutainer®. Foram coletados 20mL de sangue em tubo siliconado sem anticoagulante. Após a coleta o sangue foi centrifugado e o soro armazenado em tubos tipo

epENDORF e congelado em freezer -80°C até o momento das análises. Nas amostras de soro foram avaliados os valores de IGF-1, de frutossamina, de colesterol, de triglicérides e do índice de estresse oxidativo (OSi), sendo este obtido através da mensuração do total de antioxidantes.

Outra amostra foi coletada em tubos heparinizados para avaliação dos teores de zinco no sangue através da técnica de espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) em espectrômetro Perkin Elmer (Optima 4300 DV).

Dentre os parâmetros sanguíneos avaliados, o IGF-1 foi determinado por eletroquimioluminescência em equipamento Immulite 1 (Siemens, modelo 1000, São Paulo, SP, Brasil). Os parâmetros bioquímicos e o perfil oxidativo foram mensurados em aparelho automático bioquímico (Cobas Mira - Roche Diagnostics, Montclair, EUA). O índice de estresse oxidativo (OSI) foi realizado mediante determinação do total de antioxidantes (TAC) e total de oxidantes (TOS) (Erel, 2004) mediante fórmula: $[(TOS \mu\text{mol/L}) / (TAC \mu\text{mol Trolox equivalente/L}) \times 100]$.

Foram considerados para a análise estatística dois grupos experimentais (GT e GC) avaliando o efeito do edetato de zinco apenas no pós-parto. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste t a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com o aplicativo SAS, versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSM (047/2013).

As concentrações de zinco na dieta foram de 0,05mg/g e na água >0,1 mg/L. Não foi observado efeito da administração do zinco entre os grupos nas variáveis frutossamina, colesterol, triglicérides e IGF-1. ($P > 0,05$). Entretanto, o colesterol apresentou maiores valores numérico no GT em relação ao GC. Em relação aos valores relacionados ao índice de estresse oxidativo e concentrações de zinco no sangue não houve diferença no índice entre os grupos durante o período experimental ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios e erro padrão de parâmetros metabólicos e oxidativo de ovelhas no pós-parto imediato.

Variáveis	Tratamentos		Erro padrão	Valor de p
	Controle	Tratado		
Frutossamina ($\mu\text{mol/L}$)	255,36 ^a	253,04 ^a	15,24	0,91
Triglicérides (mg/dL)	26,15 ^a	26,90 ^a	1,87	0,81
Colesterol (mg/dL)	76,15 ^a	80,73 ^a	3,08	0,30
Zinco/sangue (μg)	2,51 ^a	2,43 ^a	0,06	0,40
OSI ($\mu\text{mol/Trolox equivalente/L}$)	65,00 ^a	65,40 ^a	10,64	0,32
IGF-1 (ng/mL)	173,13	164,53	16,13	0,71

Médias seguidas de letras distintas na linha denotam diferença entre grupos. Nível de significância de 5%.

Em pequenos ruminantes, especialmente próximo ao parto, observa-se uma maior incidência de distúrbios metabólicos que podem culminar em risco de vida para a ovelha e feto (Ribeiro, 2002). A ocorrência destas enfermidades no periparto de ovelhas está diretamente relacionada à tentativa desta fêmea de equilibrar a deficiência de energia mobilizando suas reservas corporais para compensar a baixa ingestão de alimento comum nesta época (Khaled, 2011). Esperava-se neste estudo que o zinco atuasse sobre o metabolismo energético já que ele está relacionado diretamente com a insulina e seus receptores.

No entanto, é importante ressaltar que as ovelhas utilizadas neste estudo provavelmente não passaram por desafio metabólico acentuado, visto que a condição corporal média dos animais era 3 (escala de 1 a 5; Russel et al., 1969), e que não houve aumento nos valores de triglicérides, descartando um quadro de mobilização lipídica nos animais experimentais. Outros parâmetros relacionados ao metabolismo energético como o IGF-1 e o colesterol também não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais.

Em estudo realizado com fêmeas caprinas, Rodrigues (2001) observou uma redução no consumo de matéria seca de até 16% no periparto destes animais. Dados estes não observados no presente estudo, pois não houve variação nos valores do colesterol sérico, o qual está relacionado com o consumo alimentar de ruminantes (Guretzky et al, 2006). Em relação à avaliação do edetato de zinco sob o índice de estresse oxidativo, Pivoto et al. (2015), observaram redução no estresse oxidativo em cordeiros infectados por parasitos gastrointestinais e suplementados com o edetato de zinco SC. Em situações de distúrbios metabólicos em ovelhas com expressiva mobilização lipídica, pode ocorrer aumento acentuado na produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e ao nitrogênio (ERN), com consequente exaustão do sistema antioxidante, e ocorrência de estresse oxidativo (EO). O estresse oxidativo pode causar danos aos carboidratos, proteínas e DNA (Khaled, 2011). Uma vez que não houve desafio metabólico e, portanto, não houve desequilíbrio entre o sistema oxidante/antioxidante, o zinco não foi utilizado como cofator para aumentar a atividade da superóxido dismutase que é a primeira barreira enzimática antioxidante do organismo.

A absorção do zinco após sua suplementação ocorre principalmente no intestino delgado. Nos seres vivos depois do zinco de ser absorvido, ele vai para a circulação sanguínea e cerca 55% deste mineral se liga a albumina e aminoácidos, sendo o resto estocado em diversos órgãos. Para avaliação da concentração deste mineral no organismo, recomenda-se correlacionar os valores sanguíneos com o que é encontrado em tecidos como fígado e, quando

possível, com enzimas dependentes de Zn como a metalotioneína (Hambidge et al., 2010). É provável que o zinco tenha se ligado a metalotioneína, uma vez que não houve demanda deste mineral no metabolismo energético e oxidativo.

Além disso, os teores de zinco na dieta foram em torno de 50mg/Kg, o que ultrapassou os valores recomendado pelo NRC, (2007) (30mg/kg). Embora o zinco na dieta e o administrado aos animais tenham sido de fontes distintas, e a absorção provavelmente realizada em quantidades diferentes, é provável que o zinco excedente possa ter sido estocado em órgãos específicos, principalmente o fígado (Pal et al., 2010). Conclui-se que o zinco injetável não influencia o perfil enérgico e o índice de estresse oxidativo no pós-parto de ovelhas com reduzido desafio metabólico.

REFERÊNCIAS

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem.*, v.37, p.112-119, 2004.

FENG DONG, F.; FORD, S.P.; FANG, C.X. et al. Maternal nutrient restriction during early to mid gestation up-regulates cardiac insulin-like growth factor (IGF) receptors associated with enlarged ventricular size in fetal sheep. *Growth Horm. IGF Res.*, v.15, p.291–299, 2005.

GURETZKY, N.A.J.; CARLSON, D.B.; GARRETT, J.E.; DRACKLEY, J.K. Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.188-200, 2006.

HAMBIDGE, M.K.; MILLER, L.V.; WESTCOTT, J.E. et al. Zinc bioavailability and homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.91, p.1478-1483, 2010.

AL-QUDAH, K.M. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Vet. Clin. Pathol.*, v.40-41, p.60–65, 2011.

MARREIRO, D.; GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A. et al. Participação do zinco na resistência à insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.48, p.234-239, 2004.

NUTRIENT requirements of sheep. 6.ed. Washington: National Academy Press, 2007.

PALL, D.T.; GOWDA, N.K.; PRASAD, C.S. et al. Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, v.24, p.89-94, 2010.

PIVOTO, F.L.; TORBITZ, V.D.; AIRES, A.R. et al. Oxidative stress by *Haemonchus contortus* in lambs: Influence of treatment with zinc edentate. *Res. Vet. Sci.*, v. 102, p.22-24, 2015.

RIBEIRO, L.A.O. *Perdas reprodutivas em ovinos no Rio Grande do Sul determinadas pelas condições nutricionais e de manejo no encarneamento e na gestação*. 2002. 106f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RODRIGUES, C.A.F. *Efeito do nível de energia líquida da dieta sobre o desempenho e perfil de ácidos graxos não esterificados de cabras leiteiras com diferentes condições corporais no período de transição*. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Ruminantes) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RUSSEL, A.J.F.; DONEY, J.M.; GUNN, R.G. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.*, v.72, p.451-454, 1969.

6 DISCUSSÃO

A utilização de microminerais é uma ferramenta utilizada nos últimos anos com o intuito de ofertar uma resposta suprafisiológica destes em diferentes funções no organismo de animais ruminantes (ROCHA et al., 2007; PIVOTO et al., 2015). Entretanto, a utilização de alguns microelementos na forma oral para ruminantes pode apresentar uma menor taxa de absorção, principalmente pela influência da microbiota ruminal frente à fonte utilizada na dieta (ROCHA et al., 2013; MORAIS et al., 2001).

Em relação aos dados obtidos no MANUCRITO I, observou-se que o zinco ligado ao ácido etilenodiamino tetra-acético por via injetável apresentou uma maior excreção através da urina comparada a excreção fecal, indicando uma maior metabolização renal deste elemento. Estes resultados mostram diferenças frente ao mecanismo de excreção conhecido deste elemento, já que em mamíferos, quando ingerido por via oral, apresenta grande eliminação fecal e uma pequena fração urinária (MERTZ, 1996). Apesar dos valores sanguíneos de zinco, não terem apresentado diferenças significativa, apenas picos séricos, este é um parâmetro que deve sempre ser avaliado juntamente com outras avaliações, entre elas a metalotioneína, pois esta é uma das principais enzimas dependentes deste mineral (HAMBIDGE et al., 2010).

O MANUCRITO I apresentou ainda um dado importante referente a utilização de uma nova fonte injetável de zinco em relação a absorção e retenção aparente deste micromineral. Os dados do grupo tratado foram superiores a estudo realizado em pequenos ruminantes, utilizando por via oral fontes de zinco orgânico ligado a aminoácidos. Sayed et al (2012) obtiveram valores inferiores de absorção e retenção aparente quando comparados aos resultados obtidos neste experimento. Estes dados podem levantar a hipótese que o zinco na sua forma injetável pode apresentar uma melhor utilização pelo organismo dos animais ruminantes.

Baseado nos dados avaliados no MANUCRITO I objetivou-se a realização do MANUCRITO II, com a utilização do edetato de zinco no pré-parto de ovelhas. Dentre as variáveis avaliadas neste estudo não foi identificado a ação do zinco no metabolismo energético e oxidativo de ovelhas no pós-parto imediato. Estes resultados podem estar diretamente relacionados a condição corporal das ovelhas utilizadas neste estudo, além de que as mesmas não apresentavam quadros de deficiência deste mineral (NRC, 2011).

Ainda neste contexto referente ao metabolismo energético, os valores obtidos de colesterol sérico mostram que não houve diminuição de consumo de ambos os grupos experimentais no MANUCRITO II, visto que este é um parâmetro utilizado como medidor de

ingesta em ruminantes, principalmente pela sua metabolização intestinal (GURETZKY et al, 2006).

Avaliando os dados dos MANUCRITOS I e II, identificou-se que apesar do edetato de zinco mostrar uma absorção aparente maior que em outros estudos utilizando o mesmo mineral, porém ligado a aminoácidos e de forma oral, ele não causou efeito algum em ovelhas no periparto. Pode-se presumir que o zinco quando administrado em animais sem desafio metabólico, carência mineral ou não submetidos a estresse podem não utilizar este mineral quando suplementado de forma aquém o necessário. Informação corroborada por Cousins, (1996) onde cita que os valores sanguíneos de zinco apresentam-se alterados, principalmente em situações de estresse ou doenças infecciosas. Além disso, o zinco quando fornecido de forma excedente, tende a ser estocado em órgãos específicos, principalmente o fígado (PAL et al., 2010).

Apesar dos resultados obtidos nos MANUCRITOS I e II, mais estudos referentes a ação do edetato de zinco, principalmente sobre sua ação no metabolismo da glicose são necessários, visto que é um mineral de baixo limiar tóxico podendo ser avaliado em doses mais elevadas e em animais com um maior desafio metabólico.

7 CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos nos MANUCRITOS I e II, conclui-se que o edetato de zinco, apesar de apresentar uma melhor absorção aparente comparada a outros estudos e uma maior excreção urinária, evitando a influência do rúmen em sua suplementação, não foi capaz de causar um efeito benéfico no pós-parto de ovelhas sem desafio metabólico.

8 REFERÊNCIAS

- ABDUL-AZIZ M. AL-MUJALLI. Incidence and clinical study ovine pregnancy toxemia in Al-Hassa region, Saudi Arabia. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, p. 210-212, 2008.
- ACOSTA, R.; VALCARCEL, P. El Zinc: La chispa de la vida. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 76, 2004.
- AIRES, A.R. et al. Efeito da suplementação com colina protegida sobre parâmetros bioquímicos, produção e reprodução de vacas leiteiras no periparto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 68, n.6, p. 1573-1580, dec. 2016.
- ALBUQUERQUE, F.H.M.A.R. et al. Exigências nutricionais e categorias de produção. In: CAMPOS, A.C.M. (Ed.). **Do campus para o campo: tecnologias para produção de ovinos e caprinos**. Fortaleza: Gráfica Nacional, 2005. p. 165-172.
- ANDRADE, E. et al. Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento de ferro, cobre e zinco. **Food Science and Technology**, v.5, p.591-596, 2005.
- ANDRÉ, L.B.S. E. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.
- CARDOSO, E.C. Índices produtivos e perfil metabólico de ovelhas Santa Inês no pós-parto no nordeste do Pará. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.18, p.114-120, 2011.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. PIB do agronegócio brasileiro: dados de 1994 a 2011. 2012. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em: 19 nov. 2016.
- CHIHUAULAF, R.H. et al. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinaria Mexico**, v.33, p.265-283, 2002.
- DONG, F. et al. Maternal nutrient restriction during early to mid gestation up-regulates cardiac insulin-like growth factor (IGF) receptors associated with enlarged ventricular size in fetal sheep. **Growth Hormone & IGF Research**, v.15, p.291-299, 2005.
- CONTRERAS, P.A. et al. **Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos**. Perfil Nutricional em Ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2000.p.23-30.
- CORREA, M.N. et al. **Transtornos metabólicos dos animais domésticos**. Transtorno do metabolismo dos lipídios. Pelotas: UFPEL. 2010. p.146-176.
- COUSINS, R.J. et al. Presente knowledge in nutrition. 7. ed. Washington, DC: International Life Science Institute Nutrition Foundation. 2003.

DUHLMEIER, R. et al. Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.289, n.1, p.187-197, 2005.

FERNANDES, S.R. et al. Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. **Bras Agrocência**, v.18, p.21-32, 2012.

GOMES, M.R., TIRAPEGUI, J. Relação entre o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e atividade física. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v.3, n.4, p.66-76, 1998.

GUI, Y. et al. Changes in adipokine expression during food deprivation in the mouse and the relationship to fasting-induced insulin resistance. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v.81, p.979-985, 2002.

GURETZKY, N.A.J. et al. Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. **Journal Dairy Science**, v.89, p.188-200, 2006.

HAMBIDGE, M.K. et al. Dietary references intake for zinc may require adjustment for phosphate intake based upon model predictions. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.2363-2366, 2008.

HAMBIDGE, M.K. et al. Zinc bioavailability and homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.1478-1483, 2010.

HAVEL, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, v.53, n.1, p.143- 151, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pecuária 2011 - Rebanho ovino**, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 19 nov. 2016.

KHALED, M.; AL-QUDAH. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40/41, p.60-65, 2011.

KUHLA, B. et al. Involvement of skeletal muscle protein, glycogen, and fat metabolism in the adaptation on early lactation of dairy cows. **Journal of Proteome Research**, v.10, n.9, p.4252-4262, 2011.

KWUN, I.S. et al. Marginal zinc deficiency in rats decreases leptin expression independently of food intake and corticotrophin-releasing hormone in relation to food intake. **British Journal of Nutrition**, v.98, p.485-489, 2007.

HOUSEKNECHT, K. L. et al. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. **Journal of Endocrinology**, v.164, p.51-57, 2000.

LAMB, G.C. et al. Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation, and embryo production in super ovulated Angus heifers. **Animal Reproduction Science**, v.106, n.3-4, p.221-231, 2008.

MANTZOROS, C. S. et al. Zinc may regulate serum leptin concentrations in humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v.17, p.270-275, 1998.

MARREIRO, D. et al. Participação do Zinco na resistência a insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.48, p.234-239, 2005.

MASSMAN, G. A.; ZHANG, J.; FIGUEROA, J. P. Functional and molecular characterization of nitric oxide synthase in the endometrium and myometrium of pregnant sheep during the last third of gestation. **American Journal of the Obstetrics and Gynecology**, v.181, p.116-125, 1999.

MAXWELL, C.; VOLPE, S.L. Effect of zinc supplementation on thyroid hormone function. A case study of two college females. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.51, p.188-194, 2007.

MERTZ, W. Trace elements in human and nutrition. 5. ed. New York: **Academic**, 1996. 1350 p.

MORAIS, S.S. Importância da suplementação mineral para bovinos de corte. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, p.26, 2001.

MUTINATI, M. et al. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. **Reproduction in domestic animals**, v.48, p.353-357, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of sheep**. 6. ed. Washington DC: National Academy Press, 2001.

NEGAR KARIMI, M. M. et al. Relationships between trace elements, oxidative stress and subclinical ketosis during transition period in dairy cows. **Iranian Journal of Veterinary Science and Technology**, v.7, n.2, p.46-56, 2015.

NORDBERGER, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology & medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

O'DELL, B.L. Bioavailability of trace elements. **Nutrition Review**, v.42, n.9, p.301-308, 1984.

ORTOLANI, E.L. Doenças carenciais e metabólicas em caprinos: Urolitíase e toxemia da gestação. In: ENCONTRO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 1994, Jaboticabal. **Anais**. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, p. 197, 1994.

PECHOVA, A.; PAVLATA, L.; LOKAJOVA, E. Zinc supplementation and somatic cell count in milk of dairy cows. **Acta Veterinaria Brno**, v.75, p.355-361, 2006.

PAL, D.T. et al. Effect of copper- and zinc- methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.24, p.89-94, 2010.

PEIXOTO, L.A.O.; OSÓRIO, M.T.M. Perfil metabólico proteico e energético na avaliação do desempenho reprodutivo em ruminantes. **Revista Brasileira de Agronegocio**, v.13, p.299-304, 2007.

PIERCE, G.B.; PARCHMENT, R. E.; LEWELLYN, A. L. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. **Differentiation**, v.46, p.181-186, 1991.

PIVOTO, F.L.et al.Oxidative stress by *Haemonchus contortus* in lambs: Influence of treatment with zinc edentate.**Research in Veterinary Science**,v.102, p.22-24, 2015.

RADOSTITS, O.M. et al. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**.10. ed. Edinburgh: WB Saunders, 2007. 2156 p.

RIBEIRO, L.A.O. **Perdas reprodutivas em ovinos no Rio Grande do Sul determinadas pelas condições nutricionais e de manejo no encarneamento e na gestação**. 2002. 106p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RIBEIRO, L.A.O.; BRITO, M.A.; MATTOS, R.C. Ewes shorn and unshorn during pregnancy in South Brazil: effects on body condition score and lamb birth weight. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, p.111-117, 2010.

RIBEIRO, L.A.O.; DREYER, C.T.; LEHUGEUR, C.M. Manejo da ovelha durante o encarneamento e a parição: novas técnicas para reduzir perdas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.171-174, abr./jun. 2011.

RIEGEL, R.E. **Radicais livres: bioquímica**. 3. ed. São Leopoldo: UNISINOS, 2002. 536 p.

ROCHA, R.X. et al. Dextran iron in anemic lambs: effects on reticulocytosis and free radical production. **Ciência Rural**, v.37, p.1344-1348, 2007.

ROCHA, J.F.X. et al. Metabolism, intake, and digestibility of lambs supplemented with organic chromium. **Biological Trace Element Research**, v.156, p.130-133, 2013.

ROOK, J.S. Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.16, p.293-317, 2000.

RUSSEL, A.J.F. Nutrition of pregnant ewe. In: IBID. (Ed.). **Sheep and Goat Practice**. London: Baillière Tindall, 1991. p.29-39.

SANZ LORENZO, M. C.; CASASNOVAS, A. F.; VERDE ARRIBAS, M. T. La deficiencia de zinc. In: FERNANDEZ, M.A.G. **Carencias Vitamínico-Minerales en el Ganado Ovino**. Madrid: Luzans Ediciones, 1996.p.25-36.

SASAKI, S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. **Animal Science Journal**, v.73, n.6, p.423-433, 2002.

SCHANAIDER, A. Radicais livres: vilões ainda em estudo. **Ciência Hoje**, v.27, n.158, p.60-62, 2000.

SENA, K.C.M.; PEDROSA, L.F.C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. **Revista de Nutrição**, v.18, n.2, p.251-259, 2005.

SPEARS, J.W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.58, p.151-163, 1996.

SPEARS, J.W.; WEISS, W.P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **Veterinary Journal**, v.176, p.70-76, 2008.

STEFANON, B.; SGORLON, S.; GABAI G. Usefulness of nutraceuticals in controlling oxidative stress in dairy cows around parturient. **Veterinary Research Communications**, v.29, p.387-390, 2005.

SUTTLE, N.F. **Mineral nutrition of livestock**. 4.ed. Oxfordshire: CABI, 2010. 587p.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N.F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3. ed. New York: CAB International, 1999. 614p.

VASCONELOS, S.M.L. E. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

WILDE, D. Influence of macro and micro minerals in the periparturient period on fertility in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.240-249, 2006.