



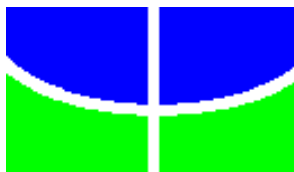
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**PARÂMETROS SANGUÍNEOS, DE CITOTOXICIDADE E DE BIODISTRIBUIÇÃO
DE Cr EM OVINOS SUPLEMENTADOS COM CrPic**

BRUNO STÉFANO LIMA DALLAGO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2011



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PARÂMETROS SANGUÍNEOS, DE CITOTOXICIDADE E DE BIODISTRIBUIÇÃO
DE Cr EM OVINOS SUPLEMENTADOS COM CrPic**

BRUNO STÉFANO LIMA DALLAGO

ORIENTADOR: HELDER LOUVANDINI

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 51D/2011

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2011**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PARÂMETROS SANGUÍNEOS, DE CITOTOXICIDADE E DE BIODISTRIBUIÇÃO
DE Cr EM OVINOS SUPLEMENTADOS COM CrPic**

BRUNO STÉFANO LIMA DALLAGO

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

Helder Louvandini, Prof. Dr. (Universidade de Brasília-UnB)
(ORIENTADOR)

Carolina Madeira Lucci, Prof. Dr. (Universidade de Brasília-UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

Cristiano Barros de Melo, Prof. Dr. (Universidade de Brasília-UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

Cesar Henrique Espirito Candal Poli,
Prof. Dr. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS)
(EXAMINADOR EXTERNO)

Luiz Alberto Oliveira Ribeiro,
Prof. Dr. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA, 09 de DEZEMBRO de 2011.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DALLAGO, B. S. L. **Parâmetros Sanguíneos, de Citotoxicidade e de Biodistribuição de Cr em Ovinos Suplementados com CrPic.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 118p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dallago, Bruno Stéfano Lima. **Parâmetros Sanguíneos, de Citotoxicidade e de Biodistribuição de Cr em Ovinos Suplementados com CrPic.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011. 118p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

1. Glicose sérica. 2. Bioacumulação. 3. Leucograma
4. Nutrição. 5. Histopatologia. I. Louvandini, H. II. Título.

“Senhor, dê-me serenidade para aceitar aquilo que não posso mudar, coragem para mudar aquilo que posso mudar e sabedoria para discernir entre um e outro.”

(Reinhold Niebuhr)

**Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e à
minha amada esposa: esteios da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Obrigado Deus, por me conceder saúde e vontade para prosseguir, curiosidade para procurar, perseverança para acreditar, persistência para resistir, discernimento para escolher e paciência para raciocinar. Agradeço por guiar meus passos, me direcionando ao objetivo proposto: tornar-me doutor!

Agradecimentos especiais ao prof. Dr. Helder Louvandini pelo privilégio de ser seu orientado. Agradeço por me ensinar os segredos da pesquisa e da ciência. Por abrir inúmeras portas e me ajudar a ser uma pessoa melhor.

À querida professora Dra. Connie que com sua vontade de fazer o melhor nos entusiasma! Com o seu excelente trabalho é capaz de desobstruir os entraves da vida acadêmica e científica. Pelas oportunidades oferecidas, ética, profissionalismo e pela confiança em meu trabalho.

Ao professor Dr. Márcio Martins Pimentel, exemplo em toda a sua forma de honradez, conduta e iniciativa. Sua postura como líder e desbravador em muito me inspirou. Por viabilizar em tudo as análises quantitativas de Cr, meu muito obrigado.

Especial agradecimento à M.Sc. Bárbara Alcântara Ferreira Lima. Seu conhecimento técnico, paciência, presteza e celeridade são qualidades incomensuráveis. Obrigado pelo esforço do trabalho ininterrupto de dias, tanto em Brasília quanto em Porto Alegre.

Obrigado aos meus estagiários: Denise Caldeira, Edgard Franco, Aline Campeche, Tiago Paim e Bárbara Borges pela amizade, empenho e zelo com o experimento e com o Centro de Manejo de Ovinos.

Aos funcionários do CMO que se comprometeram com o sucesso do projeto: senhores Antônio Fernandes e Vilmar Padinho.

Às colegas do Hospital Veterinário: Marta Vasconcelos, Tatiana Guerrero, Laís Greco Silva e Roberta Rendy; Vanessa Mustafa, Erika de Queiroz e Cristiane Vinhaes. Também agradeço pela ajuda com as análises bioquímicas à Thaís Sermoud Borges.

Às fontes financiadoras desta pesquisa: Universidade de Brasília – UnB, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CPAC e Ministério da Educação – MEC. Em adição, agradeço ao Programa de Cooperação CAPES/PROCAD Novas Fronteiras 2007 por possibilitar minha estada em Belo Horizonte.

Àqueles que desejam e sempre desejaram o meu bem: meus tios, tias, primos, primas e à família Vasconcelos Braz pelo apoio e incentivo em todas as horas. Aos colegas de UnB, da Faculdade de Veterinária, do Hospital Veterinário, do laboratório de Nanopartículas, do Instituto de Química e do Instituto de Biologia. Vocês fazem parte desta vitória!

Aos meus padrinhos João Bosco Júnior e Patrícia Cunha por se disponibilizarem a ajudar em todos os momentos necessários, pelas críticas construtivas aos capítulos desta tese e também pelos momentos de descontração que me fortaleceram psicologicamente.

Aos meus irmãos e suas amadas: Brenno e Alice, Renzo e Luana pelo carinho, amizade, amor e paciência, pois com vocês tenho a certeza de que o convívio diário é um eterno aprendizado.

À minha amada esposa e fiel companheira de todas as horas: Shélida. Seu afeto, companheirismo e atenção para comigo foram, são e serão sempre meus motivos de alegria maior! A você, minha musa inspiradora, meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio incondicional e compreensão sem limites.

Finalmente, imensos agradecimentos à dupla de heróis que são meus pais Claudio e Maricélia. Obrigado eternamente pelo esforço diário e incentivo para o meu crescimento como ser humano. Pelo abraço amigo e colo acolhedor nos momentos necessários, pelos conselhos e ensinamentos que usarei como preceitos por toda a minha vida.

A todos vocês, MUITO OBRIGADO!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	21
1.1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1.1. Justificativa	24
1.1.2. Objetivos	25
1.1.2.1. Objetivos específicos.....	25
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	26
1.2.1. Cenário da Ovinocultura Nacional e no Distrito Federal.....	26
1.2.2. História da Utilização do Cromo	26
1.2.3. Caracterização Física e Química do Cromo.....	27
1.2.4. Cromo no Ambiente.....	28
1.2.5. Cromo nos Sistemas Biológicos e Fontes de Cromo	29
1.2.6. Papel Biológico do Cromo.....	31
1.2.7. Possível Mecanismo de Ação do Cromo	33
1.2.8. Cromo como Suplemento Alimentar	34
1.2.9. Cromo, Estresse e Bem-estar Animal	37
1.2.10. Cromo e os Parâmetros Sanguíneos.....	39
1.2.10.1. Eritrograma.....	40
1.2.10.2. Leucograma	41
Neutrófilos	41
Linfócitos.....	42
Eosinófilos.....	42
Basófilos.....	43
Monócitos	43
Leucograma Inflamatório	43
Leucograma de Estresse	44
Leucocitose Fisiológica	44
1.2.10.3. Bioquímico Sérico	45
Glicose.....	45
Função Hepática	46
Triglicerídios, Colesterol e HDL.....	47
Perfil Renal.....	49
1.2.11. Absorção e Excreção do Cr.....	50

1.2.12. Bioacumulação Orgânica do Cr	52
1.2.13. Quantificação do Cromo	53
1.2.14. Toxicidade do Cromo	54
CAPÍTULO 2	57
2.1. Resumo	58
2.2. Abstract	59
2.3. Introdução	59
2.4. Material e Métodos	60
2.4.1. Local	60
2.4.2. Animais e Instalações	60
2.4.3. Manejo Alimentar, Adaptação e Tratamentos	61
2.4.4. Colheita, Processamento e Análise das Amostras	62
2.4.5. Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	64
2.5. Resultados	64
2.6. Discussão	68
2.7. Conclusão	71
2.8. Agradecimentos	71
2.9. Aprovação do Comitê de Ética	72
2.10. Referências	72
CAPÍTULO 3	75
3.1. Resumo	76
3.2. Abstract	77
3.3. Introdução	77
3.4. Material e Métodos	78
3.4.1. Local	78
3.4.2. Animais e Instalações	79
3.4.3. Manejo Alimentar, Adaptação e Tratamentos	79
3.4.4. Colheita de Sangue	80
3.4.5. Bioquímico sérico e Hematologia	81
3.4.6. Histopatologia	81
3.4.7. Determinação de Cr	82
3.4.8. Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	82
3.5. Resultados	83

3.5.1. Exame Clínico	83
3.5.2. Hemograma	83
3.5.3. Leucograma.....	87
3.5.4. Bioquímico Sérico.....	90
3.5.5. Histopatologia	93
3.6. Discussão	97
3.7. Conclusão.....	102
3.8. Agradecimentos	102
3.9. Aprovação do Comitê de Ética	102
3.10. Referências.....	103
CAPÍTULO 4	106
4.1. Considerações Finais	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

RESUMO

PARÂMETROS SANGUÍNEOS, DE CITOTOXICIDADE E DE BIODISTRIBUIÇÃO DE Cr EM OVINOS SUPLEMENTADOS COM CrPic. Bruno Stéfano Lima Dallago e Helder Louvandini, Professor Doutor, Brasília/DF. A biodistribuição e os efeitos da suplementação oral de picolinato de cromo (CrPic) sobre diversos parâmetros sanguíneos e sua possível toxicidade sobre fígado, rins, pulmões, coração e testículos foram investigados. Vinte e quatro cordeiros foram tratados com quatro diferentes concentrações de CrPic: placebo, 0,250, 0,375 e 0,500 mg de CrPic/animal/dia durante 84 dias. A dieta basal foi composta por feno de *Panicum maximum* cv Massai e concentrado. Sangue e soro sanguíneo foram colhidos quinzenalmente e análises de hemograma, leucograma, leucograma diferencial e testes bioquímicos séricos foram realizados. A urina foi colhida aproximadamente a cada 20 dias para avaliação da excreção renal de Cr. No dia 84 os animais foram eutanasiados e amostras teciduais de fígado, rim, pulmão, baço, coração, linfonodo, músculo esquelético, osso e testículo foram analisadas quanto às concentrações de Cr. Devido à importância toxicológica e à relação entre a suplementação e a concentração tecidual de Cr observada ($p < 0,05$), análises histopatológicas em fígado, rim, coração, pulmão e testículos foram feitas. Diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) foram observadas para volume globular (dia 84), hemoglobina (dia 84), proteínas plasmáticas totais (dia 56 e dia 84), monócitos (dia 56), eosinófilos (dia 56) e triglicerídios (dia 70). Não houve relação estatisticamente significativa entre a suplementação de Cr e os achados histopatológicos, embora alguns animais tratados com o elemento-traço tenham apresentado alterações morfológicas. Assim, a suplementação com Cr permanece sob suspeita quanto à sua ação fisiológica e tóxica, especialmente em ovinos.

Palavras-chave: Glicose sérica; Bioacumulação; Leucograma; Nutrição; Histopatologia.

ABSTRACT

BLOOD PARAMETERS, CITOTOXICITY AND BIODISTRIBUTION OF Cr IN CrPic-SUPPLEMENTED LAMBS. Bruno Stéfano Lima Dallago and Helder Louvandini, Professor Doctor, Brasília/DF. The biodistribution and effects of chromium picolinate (CrPic) oral supplementation on various blood parameters and their possible toxicity on liver, kidneys, lungs, heart and testis were investigated. Twenty-four lambs were treated with four different levels of CrPic: placebo, 0.250, 0.375 and 0.500 mg of CrPic/animal/day during 84 days. The base ration was *Panicum maximum* cv Massai hay and concentrate. Blood and serum were collected fortnightly and analysis of blood count, leukocyte count, differential leukocyte count and serum biochemistry tests were performed. Urine was collected about each 20 days to evaluate the renal excretion of Cr. On day 84 the animals were euthanized and tissue samples from liver, kidney, lung, spleen, heart, lymph node, skeletal muscle, bone and testis were analyzed for Cr concentrations. As its toxicological significance and relationship between supplementation and tissue concentrations of Cr observed ($p < 0.05$), histopathological analysis of liver, kidney, heart, lung and testis were made. Significant differences between treatments ($p < 0.05$) were observed for packed cell volume (day 84), hemoglobin (day 84), total plasma proteins (day 56 and day 84), monocytes (day 56), eosinophils (day 56) and triglycerides (day 70). There was no statistically significant relationship between Cr supplementation and histopathological findings, although some animals treated with the trace element have shown morphological changes. Thus, supplementation with Cr remains in doubt about its physiological action and toxicity, especially in sheep.

Key words: Serum glucose; Bioaccumulation; Leukogram; Nutrition; Histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Possível mecanismo de ação biológica do Cr	34
Figura 1.2. Estrutura química do picolinato de cromo (CrPic).	36
Figura 2.1. Concentração de Cr no coração de ovinos SI controle e após 84 dias de suplementação com CrPic.....	65
Figura 2.2. Concentração de Cr em testículo de ovinos SI controle e após 84 dias de suplementação com CrPic.....	66
Figura 2.3. Concentração de Cr em pulmão de ovinos SI controle e após 84 dias de suplementação com CrPic.....	66
Figura 2.4. Relação entre a concentração de Cr urinário em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic e o tempo.....	67
Figura 3.1. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre o volume globular de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 84° dia de experimento.	85
Figura 3.2. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a hemoglobina de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 84° dia de experimento.....	86
Figura 3.3. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre PPT de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 56° dia do experimento.....	86
Figura 3.4. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre PPT de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 84° dia do experimento.....	87
Figura 3.5. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a quantidade de monócitos de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 56° dia do experimento.....	89
Figura 3.6. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a quantidade de eosinófilos de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 56° dia do experimento.....	90
Figura 3.7. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a concentração de triglicéridios séricos de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 70° dia do experimento.	93
Figura 3.8. Fotomicrografia de pulmão de animal controle (A), suplementado com 0,250 mg de CrPic/dia (B), suplementado com 0,375 mg de CrPic/dia (C) e suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (D). O asterisco (*) denota a presença de tecido linfoide broncoassociado – BALT. Notar o espessamento dos septos alveolares em todos os tratamentos. Aumento de 20x (HE).....	94

- Figura 3.9. Fotomicrografia de fígado de animal controle (A), suplementado com 0,250 mg de CrPic/dia (B), suplementado com 0,375 mg de CrPic/dia (C) e suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (D). As setas (→) indicam a presença de infiltrado inflamatório linfocítico. Em (D) marcante vacuolização na região periportal de um (16%) animal suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia. Aumento de 20x (HE)..... 95
- Figura 3.10. Glomérulo de animal controle (A) e suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (B). A seta (→) indica o espessamento da cápsula de Bowman. Aumento de 40x (HE)..... 95
- Figura 3.11. Testículo de animal controle (A – aumento de 20x e B – aumento de 40x) e testículo de um animal (16%) suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (C – aumento de 20x e D – aumento de 40x). Observar a ausência de espermatogênese em túbulos seminíferos péricios em C e D. (HE)..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Sinais/Sintomas relacionados à deficiência de Cr e espécies envolvidas em cada processo	35
Tabela 2.1. Composição bromatológica dos alimentos fornecidos aos ovinos em g kg ⁻¹ de matéria seca.....	61
Tabela 2.2. Ingestão total de Cr (considerando os alimentos e a água) nos diferentes tratamentos.....	62
Tabela 2.3. Concentração de Cr (e respectivas regressões) aferida nos diferentes tecidos de ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.....	65
Tabela 2.4. Concentração de Cr urinário, desvio padrão e tipo de regressão aferidos nos diferentes tratamentos em relação ao tempo de suplementação.	67
Tabela 3.1. Composição bromatológica dos alimentos fornecidos aos ovinos em g kg ⁻¹ de matéria seca (MS).	80
Tabela 3.2. Ingestão total de Cr (considerando os alimentos e a água) nos diferentes tratamentos.....	80
Tabela 3.3. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre VG, HEM, Hb, VCM, CHCM, HCM e PPT em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.....	84
Tabela 3.4. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre o número de leucócitos, monócitos, linfócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.	88
Tabela 3.5. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre glicose sérica, colesterol, HDL e triglicerídios séricos em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.....	91
Tabela 3.6. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre AST, GGT, Uréia sérica (BUN) e Creatinina em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.....	92
Tabela 3.7. Resumo dos achados histopatológicos em ovinos SI controle e suplementados com CrPic de acordo com a suplementação dietética de Cr	97

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

%	Por cento
(FeCrO₂)₂	Cromita
[]	Concentração
[Cr(pic)₃]	Picolinato de cromo
®	Marca registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
⁵¹Cr	Cromo radioativo massa 51
⁵²Cr	Cromo massa 52
⁵³Cr	Cromo massa 53
AMPc	Adenosina mono-fosfato cíclica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato-aminotransferase
BALT	Tecido linfóide broncoassociado
BUN	Uréia sérica
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
COL	Colesterol sérico
CPAC	Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados
Cr	Cromo
Cr⁺²	Cromo bivalente
Cr⁺³	Cromo trivalente
Cr⁺⁶	Cromo hexavalente
Cr₂O₃	Óxido crômico

CrCl₃	Cloreto de cromo
CREAT	Creatinina sérica
CrPic	Picolinato de cromo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPM	Desvio padrão médio
E.U.A.	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EOS	Eosinófilos
Fe³⁺	Ferro férrico
fL	Fentolitro
g	Gramas
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamilpeptidase
GLI	Glicose sérica
GTF	Fator de tolerância à glicose
H₂O	Água
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Eosina-hematoxilina
HEM	Contagem total de eritrócitos
Hg	Mercúrio
HVET/UnB	Hospital Veterinário da Universidade de Brasília
i.m.	Via intramuscular

ICP-MS	Espectrometria de massa indutivamente acoplada
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica indutivamente acoplada
K₂Cr₂O₇	Dicromato de potássio
kg	Quilograma
km	Quilômetro
L	Litro
LCFA-CoA	Ácidos graxos de cadeia longa – coenzima A
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEU	Contagem total de leucócitos
LIN	Linfócitos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitros
MON	Monócitos
MS	Matéria seca
NADPH	Dinucleotídio de nicotinamina fosfato
ns	Não significativo
°C	Graus celsius
p	Nível de significância
p.o.	Via oral
PbCrO₄	Crocoíta
PCV	Packed cell volume
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico

ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
PPT	Proteínas plasmáticas totais
PROC GLM	Procedimento “Graus Médios de Liberdade”
PROC REG	Procedimento “Regressão”
R²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
SEG	Segmentados
SI	Santa Inês
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
TPP	Total plasma proteins
TRI	Triglicerídios séricos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	Unidades internacionais
UnB	Universidade de Brasília
US\$	Dólares americanos
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
β	Beta

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. INTRODUÇÃO

A produtividade animal está intimamente relacionada a quatro principais pilares do processo produtivo, quais sejam: genética, sanidade, manejo e nutrição do rebanho. Esses quatro componentes interagem entre si de modo a fornecer os elementos necessários à produção animal. Por exemplo, um animal com alto potencial genético para produção, mas que esteja sendo afetado por uma patologia, não será capaz de expressar toda a sua potencialidade genética. Do mesmo modo, um animal com abundância de alimentos, porém submetido a maus tratos ou ambiente inadequado, não será capaz de gerar produtos (leite, ovos, carne, etc.) com a qualidade ou quantidade em que o faria caso o manejo fosse adequado. Quando esses quatro fatores são completamente satisfeitos, a produção animal torna-se maximizada. Contudo, alcançar tal nível de excelência, na prática, é difícil, embora almejado. Na realidade, as restrições que se apresentam ao produtor (por exemplo, a existência de uma doença, ou a escassez de um nutriente na dieta) delimitam o nível de produção animal.

A capacidade que cada um desses componentes tem de modular o processo produtivo é alvo de constante pesquisa. Nesse sentido, diversos esforços têm sido ensejados, entre eles a pesquisa na área de nutrição animal, visando principalmente aumentar a eficiência produtiva. Dessa forma, a nutrição tem focado o aumento da eficiência alimentar e da produção animal modificando ou adicionando elementos às dietas, ou ainda, através da oferta de “novos” alimentos (subprodutos de indústria ou rejeitos humanos com potencial nutritivo) aos animais. No escopo do estudo da nutrição, a suplementação animal com diversos elementos nutritivos ainda apresenta objetos de estudos para novas descobertas e melhoras no processo digestivo.

Atualmente, a premissa de que “a nutrição é um determinante da resposta imunitária, do nível de estresse e do desempenho produtivo” é amplamente aceita. Nesse contexto, a importância da energia e da proteína dietética na expressão e manutenção dos processos metabólicos que se traduzem no maior ou menor grau de desempenho animal está bem estabelecida. Entretanto, o papel dos minerais e, em particular dos elementos-traço, ainda permanece obscuro apesar de diversos elementos, entre eles o cromo (Cr), serem apontados como capazes de influenciar os parâmetros de saúde, bem-estar e desempenho animal.

Pouco se sabe sobre a atuação de elementos-traço no desempenho produtivo, reprodutivo e também nos níveis de estresse dos animais de produção, tanto no que se refere aos mecanismos de ação desses minerais quanto em relação ao resultado final de sua suplementação sobre o organismo animal. Pesquisas recentes nesse campo da nutrição tentam elucidar essas questões por meio da observação e análise dos resultados obtidos após a suplementação dietética de diversos elementos separadamente.

O picolinato de cromo (CrPic) é um mineral quelatado vendido como suplemento alimentar para humanos e animais. Embora não exista consenso quanto à essencialidade do Cr aos animais, diversos pesquisadores classificam este mineral como um elemento essencial por estar envolvido em vários processos metabólicos. A principal ação do CrPic envolve a potencialização da ação da insulina e assim, o metabolismo geral e outros processos corpóreos podem ser influenciados pela sua adição na dieta.

Contudo, a utilização desse mineral como suplemento alimentar envolve um aspecto muito importante relacionado à inocuidade de sua administração, pois o Cr é um metal pesado e possui potencial tóxico, podendo acarretar danos ao material genético e aos gametas, interferir sobre funções metabólicas essenciais ou formar compostos altamente reativos (Merrill et al., 2001; Hodgson et al., 2004; Klaassen, 2006; Stoecker, 2006) o que aumentaria o estresse oxidativo no organismo animal. Em adição, existe o risco do processo de bioacumulação, no qual as concentrações do metal tendem a se elevar exponencialmente à medida que os nutrientes vão percorrendo a cadeia alimentar.

Os produtores rurais ignoram esses riscos e muitos utilizam formulações de sal mineral suplementados com Cr na dieta animal. Grande parcela de culpa deve-se à indústria de suplementos alimentares que independentemente de respaldo científico, vem adicionando Cr ao sal mineral como se esse fosse um elemento infalível, que “melhora o desempenho e o sistema imunitário” ou como um “fator nutricional anti-estresse”. Porém, não há consenso na literatura científica quanto aos efeitos benéficos da suplementação com Cr.

1.1.1. Justificativa

Existem muitas questões a se desvendar para que os efeitos associados à utilização do Cr como suplemento animal sejam bem conhecidos e entendidos. Entre essas questões merecem destaque: a real função do Cr sobre o organismo animal, o mecanismo de ação do mineral, se existem e quais são os efeitos adversos associados à sua administração, se há ou não a ocorrência de bioacumulação do metal e, em caso positivo, qual seria o órgão de predileção? Quais são as doses recomendadas para a adição desse mineral à dieta e se a suplementação alimentar com Cr pode realmente auxiliar o desempenho aumentando a eficiência produtiva e reprodutiva.

Alguns pesquisadores têm revelado a importância de mais estudos em relação à utilização de Cr ao indicarem a possibilidade de efeitos tóxicos associados ao seu uso (Woski et al., 1999; Stearns et al., 2002; Subramanian et al., 2006). Dallago et al. (2011) verificaram que embora a suplementação de picolinato de cromo a ovinos não tenha provocado nenhuma diferença significativa sobre ganho em peso e no consumo alimentar, a adição do mineral à dieta interferiu negativamente sobre a população de protozoários ruminais agindo como um agente defaunante. Adicionalmente, estudo conduzido por Dallago (2008) indicou que a adição de Cr na dieta não causa qualquer melhora na resposta imunitária humoral, porém afetou negativamente a resposta imunitária celular, sendo um agente imunossupressor. Isso, por sua vez, demonstra que a suplementação alimentar com este mineral pode não ser benéfica, indo de encontro aos interesses da indústria de suplementos alimentares.

Portanto, definir a influência da suplementação de Cr sobre o metabolismo corpóreo e seus possíveis efeitos tóxicos auxiliará a esclarecer as vantagens, desvantagens e a real necessidade de proceder com a suplementação deste mineral na dieta dos animais de produção. Nesse sentido, a avaliação de vários parâmetros sanguíneos, bem como o estudo de moléculas séricas (hormônios, enzimas, perfil de leucócitos, entre outras) e a confirmação (ou não) da inocuidade e segurança da administração de CrPic, são imprescindíveis para esclarecer as dúvidas que pairam sobre o uso desse mineral como suplemento alimentar, especialmente para ruminantes.

1.1.2. Objetivos

O presente estudo teve por finalidade avaliar em ovinos os efeitos da suplementação dietética de cromo (Cr) em doses crescentes sob a forma de picolinato de cromo (CrPic) sobre alguns parâmetros sanguíneos como o hematócrito, glicemia, triglicerídios, enzimas hepáticas e renais, além de avaliar os possíveis efeitos citotóxicos associados ao mineral. Adicionalmente, este estudo visou mensurar a concentração de Cr em diversos tecidos animais após a suplementação com CrPic, procurando estabelecer possíveis órgãos de eleição para deposição e acúmulo desse mineral.

1.1.2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho visaram avaliar os efeitos das diferentes doses suplementares de CrPic a ovinos sobre:

- a) O hemograma completo;
- b) Leucograma;
- c) Perfil de enzimas hepáticas;
- d) Perfil de enzimas renais;
- e) A ocorrência de processos patológicos, em nível de microscopia óptica, no fígado, rim, pulmão, coração e testículo;
- f) A concentração do mineral em diversos tecidos, utilizando para aferição dessas concentrações, a espectrometria de massa indutivamente acoplada a argônio (ICP-MS);

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Cenário da Ovinocultura Nacional e no Distrito Federal

Embora a ovinocultura no Brasil seja uma atividade em expansão, apresentando crescimento de 12,6% do rebanho (de 14,3 para 16,1 milhões de indivíduos) no período de 2002 a 2007 (Anualpec, 2007), o país não é auto-suficiente em carne ovina e importa cerca de 80% da carne consumida. A carne nacional não tem qualidade para competir com a do mercado externo e nem é produzida em quantidade suficiente para isso. Mesmo com o aumento da produção nacional de carne ovina, ainda existe um déficit que, segundo as estimativas, tende a persistir, pois a demanda é superior à oferta, dando espaço para as importações (Souza, 2006). Deste modo, maior eficiência do setor visando suprir o mercado com carne em maior quantidade e qualidade pode reduzir a dependência da produção externa e incentivar o crescimento econômico nacional.

No centro-oeste do Brasil, região considerada favorável à criação de ovinos em virtude das condições climáticas e ambientais (Mariante et al., 2008), a ovinocultura se instalou inicialmente como atividade de subsistência, constituindo importante fonte de proteína na alimentação da população em áreas rurais. Contudo, a aplicação de tecnologia adequada nos diversos campos do conhecimento como nutrição, genética, reprodução e sanidade entre outros e a utilização de técnicas de manejo apropriadas auxiliam no desenvolvimento da ovinocultura como atividade econômica, despontando na região como principal atividade em diversas fazendas (Ondei, 2004).

1.2.2. História da Utilização do Cromo

O Cr foi descoberto na Rússia no ano de 1765 por P. S. Pallas, mas o elemento somente foi isolado em 1797 pelo químico francês Louis-Nicholas Vauquelin (1763-1829) (Arfsten, 1998) que separou o metal ao tratar a crocoíta (PbCrO_4), um minério advindo da Sibéria, com ácido clorídrico diluído. O óxido crômico (Cr_2O_3), resíduo dessa reação, quando foi aquecido na presença de carvão (agente redutor) produziu o metal Cr.

O termo “cromo” que deriva da palavra grega *chroma* e significa “cor” foi sugerido a Vaulquelin por Antoine Fourcroy para denominar o novo elemento devido às várias cores de seus compostos (Asimov, 1980). Um ano após a descoberta de Vaulquelin, o químico alemão Tassaert encontrou o Cr em um novo minério chamado de cromita, cuja fórmula molecular é $(\text{FeCrO}_2)_2$ (Webelements[®], 2008).

Em 1820, o dicromato de potássio já era utilizado como pigmento em produtos da indústria têxtil e desde 1879 o minério cromita era rotineiramente utilizado na fabricação de refratários de altas temperaturas (Arfsten, 1998). No início do século XX, o Cr tornou-se um importante ingrediente das ligas metálicas resistentes à corrosão, sendo utilizado largamente com essa finalidade até os dias atuais (Ensminger et al., 1990).

A indicação do Cr como nutriente alimentar somente foi suscitada em 1959, após a descoberta dos cientistas W. Mertz e K. Schwartz de que sais de Cr corrigiam o metabolismo anormal de açúcares em ratos alimentados com dietas baseadas no consumo de leveduras (Ensminger et al., 1990). Posteriormente, diversos experimentos indicaram os aspectos positivos da utilização de Cr na alimentação (Jeejeebhoy et al. 1977; Abraham et. al. 1982a,b; Anderson, 1987), de modo que até hoje esse mineral é utilizado como suplemento dietético por humanos, em especial por atletas, no intuito de controlar o apetite, perder peso, “melhorar” a composição corporal – aumentando a proporção de músculos – reduzir o colesterol e prevenir o diabetes (Vincent, 2004). Entretanto, existem dúvidas sobre a eficiência e inocuidade do Cr como suplemento alimentar. Nas últimas décadas inúmeros experimentos tentaram elucidar as conseqüências da utilização de Cr na alimentação, mas apenas resultados controversos têm sido alcançados.

1.2.3. Caracterização Física e Química do Cromo

O Cr é um metal de transição pertencente à família 6B da tabela periódica. Possui número atômico 24 e massa molecular de 51,996. Apresenta-se sólido à temperatura ambiente e possui coloração variando do cinza ao vermelho. O Cr elementar apresenta as seguintes características: temperatura de fusão de 1900 °C, enquanto o ponto de ebulição é 2672 °C; possui densidade relativa ($\text{H}_2\text{O}=1$) a 20 °C de 7,2 e é insolúvel em água (Silva e Pedrozo, 2001). Ocorre na natureza em diversos estados de oxidação, variando do Cr^{-2} a Cr^{+6}

(Pechova e Pavlata, 2007). Porém, os estados de oxidação mais comuns do Cr são as formas tri e hexavalente (Cr^{+3} e Cr^{+6} , respectivamente), que são mais estáveis.

1.2.4. Cromo no Ambiente

Embora não seja objeto direto deste estudo, a presença de Cr no ambiente, independente de sua forma, pode interferir em maior ou menor grau sobre a quantidade de Cr disponível e até mesmo na quantidade absorvida pelos animais de produção. Desta maneira, é importante que os pesquisadores envolvidos no estudo do Cr estejam a par da ocorrência e comportamento do metal no ambiente como um todo.

A distribuição ambiental de compostos contendo Cr depende do potencial de redox, do pH, da presença de substâncias oxidantes e redutoras, da cinética das reações de redução, da formação de complexos de Cr^{+3} ou da formação de sais insolúveis de Cr^{+3} , além da concentração total de Cr presente no sistema. Esta última variável depende, em sua maior parte, da ação do ser humano, isto é, regiões industrializadas apresentam teores de Cr no ambiente muito maiores que locais que sofrem pouca interferência do homem.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) o Cr^{+3} é a forma predominante nos solos e isto deve-se ao fato de que o Cr^{+6} é facilmente reduzido a Cr^{+3} pela matéria orgânica. Entretanto, a ocorrência do mineral no solo, muitas vezes, é resultado da ação antropogênica. Por exemplo, solos próximos a depósitos de lixo no Brasil apresentaram concentrações de Cr aumentadas de 1,5 a 3 vezes em relação a solos de referência (Heitzmann, 1999).

Na água, a concentração desse mineral varia de acordo com a presença de indústrias ou da natureza dos solos (WHO, 2003), mas normalmente a concentração de Cr não ultrapassa 2 ppb em meio aquoso (ATSDR, 2000). De uma maneira geral, o Cr^{+6} possui mobilidade relativamente alta em relação ao Cr^{+3} uma vez que esta forma é menos solúvel que aquela. No ar, tanto as formas tri e hexavalentes são encontradas, principalmente sob a forma de aerossóis e podem ser removidas através da chuva, sendo depositadas no solo (WHO, 2003).

1.2.5. Cromo nos Sistemas Biológicos e Fontes de Cromo

O Cr adentra os sistemas biológicos, em menor escala, através da inalação de partículas contendo o mineral, bem como, em maior escala, via oral pela ingestão de água e alimentos contendo Cr. Alguns autores consideram também a possibilidade de absorção através da pele quando há contato direto com o mineral (ATSDR, 2000). Em adição, o fenômeno da bioacumulação é uma via poderosa de introdução do Cr nos sistemas: organismos integrantes da camada primária da cadeia alimentar, ao serem utilizados como fonte de nutrientes pelas demais camadas, “carreiam” o mineral para os demais níveis tróficos. Assim, a entrada de Cr nos níveis primários da cadeia alimentar é o principal fator regulador da quantidade de Cr nos sistemas biológicos, em locais não poluídos ou que recebem pouca interferência do ser humano, por exemplo, na exploração pecuária extensiva.

O Cr é muito mais abundante nos solos, que nos vegetais. Puls (1994) estudando solos canadenses verificou valores de 1 a 25 mg de Cr/kg de matéria seca de solo, enquanto dados provenientes de solos britânicos sugerem uma abundância maior do elemento com valores entre 10 a 121 mg de Cr/kg de matéria seca de solo (Archer e Hodgson, 1987). Em vegetais, os estudos realizados normalmente utilizam meios enriquecidos com Cr ou ocorrem em áreas contaminadas com o metal e visam, em sua maioria, averiguar a capacidade das plantas em remover o Cr do solo, uma técnica conhecida por “fitorremediação”. Pouca atenção é dada às espécies de plantas bem conhecidas ou com potencial agrônomico, mas diversas análises realizadas por McDowell et al. (1977) procuraram definir a concentração de muitos minerais (porém não o Cr) nas forrageiras tropicais. Essas análises verificaram a grande incidência de níveis deficientes ou marginais de minerais nas forragens. De qualquer modo, as quantidades de Cr aferidas em outros estudos com alguns vegetais como o repolho e a couve-flor ficam em torno de 1,6 a 2,0 mg de Cr/kg de matéria seca vegetal nos brotos (Zayed et al., 1998).

Essa discrepância entre os teores de Cr no solo e nos vegetais deve-se provavelmente à relativa insolubilidade e inércia do Cr^{+3} , de modo que apenas o Cr^{+6} fica disponível para as plantas (Olson et al., 1977b). Assim, pouco Cr é absorvido pelos vegetais, pois a maior parte do Cr no solo está na forma trivalente. Contudo, o pH do solo é um importante fator modulador da capacidade de absorção de Cr pelas plantas. Olson et al. (1977a) utilizando Cr radioativo (^{51}Cr) verificaram que a absorção de Cr^{+3} e Cr^{+6} pelos vegetais ocorre de maneira inversa e que esta ação é dependente do pH: enquanto o Cr^{+3} é

absorvido com maior intensidade em pH mais afastado da neutralidade (tanto ácido como alcalino), o Cr^{+6} tem pico de absorção em pH próximo de 6, diminuindo a intensidade de absorção quando se distancia desse valor. Deste modo, em solos ácidos como o do cerrado é de se esperar maiores teores de Cr nas forragens quando comparadas com forrageiras de outros locais. Porém esta diferença não tende a ter muitos efeitos uma vez que a maior parte do Cr absorvido pelas plantas se acumula na raiz (Olson et al., 1977a) e os animais alimentam-se principalmente das folhas.

Os alimentos, em contraste aos solos, apresentam, em média, apenas 0,01 a 4,2 mg de Cr/kg de matéria seca, sendo que os cereais são relativamente mais pobres que as leguminosas (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Entretanto, além do Cr advindo dos alimentos, quantidades adicionais deste mineral provenientes do solo são ingeridas acidentalmente por animais em pastejo (Underwood e Suttle, 1999), o que pode interferir sobremaneira na quantidade de Cr disponível no trato gastrointestinal. Apenas para dimensionar a importância do solo como fonte direta de minerais dietéticos a animais em regime de pastejo, a ingestão acidental de solo por ruminantes pode chegar a 20% da matéria seca de sua dieta. Dados da Nova Zelândia sugerem uma ingestão anual de solo de aproximadamente 75 kg para ovelhas e 600 kg para vacas de leite (Healy, 1974 *apud* McDowell, 1999). Esse tipo de ingestão é favorecido quando os solos têm uma estrutura fraca e drenagem pobre, além de elevada taxa de lotação (McDowell, 1999). Contudo, o consumo de solo não deve ser encarado como benéfico uma vez que a absorção de diversos minerais pode ficar prejudicada devido a interferências. Por exemplo, Rosa (1980) verificou que a inclusão de 10% de solo à dieta de ovinos reduziu significativamente a absorção de fósforo.

Nos alimentos, quantidades em torno de 40 a 60 μg de Cr/kg de matéria seca em um composto de tremoço, cevada e feno oferecido a ovelhas na Austrália foram encontradas por Gardner et al. (1998), enquanto que Olsen et al. (1996) mensuraram 2,6 μg de Cr/kg de matéria seca em uma dieta composta de milho e alfafa. Contudo, a forma na qual o Cr está presente na dieta pode ser mais importante que a quantidade do mineral. Anderson et al. (1996a) determinaram a biodisponibilidade do Cr proveniente de diferentes fontes pela incorporação do mineral em diversos tecidos de ratos. Nesse estudo, demonstrou-se que a incorporação de Cr nos tecidos é altamente dependente da forma administrada, sendo que as maiores taxas de incorporação ocorreram sob as formas de cromo-ácido dinicotínico, picolinato de cromo (CrPic), acetato de cromo, sulfato cromo-potássico e complexos de cromo/glicina. Em contraste, o cloreto de cromo foi avaliado como uma fonte pobre nesse mineral em vista da sua baixa biodisponibilidade.

Formas de Cr no estado hexavalente são mais solúveis que o Cr^{+3} e quando administradas diretamente no intestino são absorvidas 3 a 5 vezes melhor que a forma trivalente (Anderson, 1987). Por outro lado, quando a administração é oral, acredita-se que o Cr^{+6} é reduzido a Cr^{+3} antes de alcançar o sítio de absorção no intestino delgado, prejudicando sua absorção (Doisy et al., 1976).

De um modo geral, sabe-se que as formas orgânicas de Cr podem ser absorvidas com uma eficiência de 20 a 30 vezes maior que as formas inorgânicas (Starich e Blincoe, 1983). Provavelmente as razões para a baixa disponibilidade das fontes inorgânicas de Cr^{+3} estejam relacionadas à formação de óxido de Cr insolúvel, que se liga a agentes quelantes naturais no rúmen ou à interferência de formas iônicas de outros elementos (zinco, ferro e vanadium) (Borel e Anderson, 1984). Outros fatores que podem contribuir para esta baixa disponibilidade das fontes inorgânicas de Cr^{+3} são a ausência de conversão, ou a conversão muito lenta do Cr inorgânico em Cr bioativo (Ranthotra e Gelroth, 1986) ou quantidades insatisfatórias de ácido nicotínico (Urberg e Gemel, 1987) que está relacionado a formas de utilização de Cr, como o fator de tolerância à glicose (GTF). Os complexos orgânicos de Cr são conhecidos por sua alta disponibilidade biológica: experimentos com ratos sugerem que 10 a 25 % do Cr presente na levedura de cerveja é absorvido (Underwood, 1977) enquanto apenas 0,55 ($\pm 0,28$) % do Cr presente no cloreto de cromo (CrCl_3) foi absorvido por ratos (Nielsen et al., 2009). Outras fontes naturais de Cr são o chocolate, a pimenta e algumas carnes (Toepfer et al., 1973).

1.2.6. Papel Biológico do Cromo

Desde que Schwarz e Mertz (1959) demonstraram aumento na tolerância à glicose (capacidade de entrada da glicose nas células) em ratos após a suplementação de Cr trivalente, diversos estudos foram realizados com a finalidade de estabelecer o papel do cromo sobre o metabolismo, imunidade e sobre os parâmetros produtivos. No entanto, com exceção de sua influência sobre o metabolismo da glicose e atuação junto à insulina, o papel do Cr sobre outros aspectos tem apresentado resultados controversos.

Tezuka et al. (1991) demonstraram que o Cr possui propriedades antioxidantes *in vivo* (por ser encontrado principalmente na forma trivalente quando no organismo animal) e é importante na ativação de algumas enzimas e na manutenção da estabilidade de proteínas e

ácidos nucleicos (Borel e Anderson, 1984). A suplementação de Cr em humanos melhorou a tolerância à glicose em pacientes com diabetes tipo II, diminuiu os níveis de LDL séricos e reduziu o teor de gordura corporal (McCarty, 1993). Em adição, McCarty (1994) levantou a hipótese de que a suplementação de Cr a longo prazo reverteria a tendência que o cérebro apresenta em resistir à ação da insulina com o aumento da idade, melhorando a função hipotalâmica e da glândula pituitária, além de atuar sobre a homeostase da glicose, o que inclui o controle do apetite, do metabolismo intermediário e da termorregulação.

Por outro lado, estudo mais recente não verificou qualquer efeito benéfico da utilização de Cr dietético (Vincent, 2003) e outras pesquisas apontaram o Cr como sendo responsável por danos ao organismo. Como exemplo, Stearns et al. (1995) afirmaram que o picolinato de Cr causa danos aos cromossomos e Hepburn e Vincent (2003) relataram danos oxidativos ao DNA *in vivo*. Ademais, Stearns et al. (2002) observaram danos às mitocôndrias e ocorrência de apoptose, além de classificarem o metal como substância mutagênica.

Contudo, essas variações de resposta ao cromo suplementar podem ter ocorrido em função da falta de uniformidade entre os estudos em diversos fatores: nos níveis corpóreos iniciais de Cr dos animais, na quantidade de Cr disponível na dieta basal, na forma com a qual o cromo foi suplementado e no tipo ou grau de estresse aos quais os animais foram submetidos no período próximo ou durante o experimento.

Mesmo com a polêmica em torno do papel desempenhado pelo Cr dietético no metabolismo, no desempenho produtivo e atlético, na imunidade, nos parâmetros reprodutivos e no tratamento de certas doenças, e apesar da inocuidade desse micro-mineral ser questionada de maneira contundente por muitos experimentos, no comércio de suplementos alimentares, as vendas de produtos contendo Cr ficam atrás somente da comercialização de suplementos contendo cálcio e são estimadas em US\$ 500.000.000,00 por ano apenas nos E.U.A. (Mirasol, 2000). No campo da nutrição animal, o comércio de produtos contendo Cr para suplementação alimentar está em franca expansão. Há no mercado diversos produtos cujo principal apelo publicitário é o aumento de rendimento dos animais, diminuição do cortisol plasmático, diminuição da liberação de ácido lático além da melhora do *status* imunitário.

Alguns experimentos visando avaliar a influência da suplementação de Cr sobre os parâmetros produtivos foram realizados principalmente com bovinos, ovinos e suínos (Page et al., 1993; Swanson et al., 2000; Mostafa-Tehrani et al., 2006;). Contudo os resultados mostraram-se variáveis, mesmo se comparados intra-espécies. Isso pode estar relacionado à hipótese levantada por alguns pesquisadores envolvidos no estudo do Cr que apontam a

presença de fator estressante (longas viagens, exercícios prolongados e restrição alimentar entre outros agentes estressores) como componente essencial para a ocorrência de resultados benéficos associados à suplementação do mineral (Chang e Mowat, 1992; Moonsie-Shageer e Mowat, 1993; Kegley et al., 1997).

Durante o estresse, o cortisol tem efeitos antagônicos à insulina, evitando a entrada de glicose nos músculos e tecido adiposo, economizando o carboidrato com a finalidade de utilizá-lo em tecidos que possuam maior demanda como o cérebro ou o fígado. Como o Cr hipoteticamente aumenta a atividade da insulina, internalizando a glicose e contrapondo-se a um dos efeitos do cortisol, pode-se postular hipótese de ação “antiestresse” para este mineral (Burton et al., 1993). Contudo, não há confirmação de que o Cr atue diretamente sobre o cortisol.

A literatura abordando os efeitos tóxicos do picolinato de cromo é escassa. No entanto, a possibilidade de danos hepáticos causados pela ingestão do mineral a médio e longo prazo foi suscitada recentemente por Dallago et al. (2008) ao constatarem depósitos elétrondensos em nível ultraestrutural em hepatócitos de animais suplementados com o mineral, o que, segundo os autores, provavelmente deveria estar associado à presença, no fígado, de uma molécula conhecida por cromodulina que, por sua vez, contém Cr em sua composição. Ademais, o fígado é o primeiro órgão perfundido por substâncias estranhas absorvidas oralmente, o que explicaria um efeito tóxico direto do Cr ingerido nesse órgão. Contudo, outros órgãos podem ser alvos de efeitos tóxicos associados à suplementação de Cr.

De maneira mais contundente, Levina e Lay (2008) teorizaram o mecanismo de ação tóxica do Cr e apontaram dois fatores como sendo cruciais para o desenvolvimento de toxicidade do metal: a natureza da molécula ligante - por exemplo, o picolinato - e as condições de suplementação (quantidade e duração do tratamento). Não obstante, esses pesquisadores descreveram os principais efeitos tóxicos do CrPic, dentre eles efeito carcinogênico, e foram amplamente apoiados por estudo (Stearns et al., 2002) que analisou em nível ultraestrutural os danos às células de ratos tratadas com este composto.

1.2.7. Possível Mecanismo de Ação do Cromo

Vincent (2000) propôs um mecanismo de ação do Cr sobre a regulação da glicemia no organismo animal (Figura 1.1) que é descrito de forma sucinta a seguir. O

receptor de insulina em sua forma inativa é convertido em sua forma ativa pela ligação com a insulina e consequente ativação de um mecanismo de fosforilação que permite a internalização da glicose. Esse mecanismo de fosforilação cria a sinalização celular necessária à entrada de Cr na célula. Por sua vez, o mineral irá se ligar à apocromodulina, uma pró-enzima existente nas células sensíveis à insulina que é convertida em cromodulina quando na presença de Cr. A cromodulina então se liga ao receptor de insulina que irá aumentar ainda mais a atividade fosforilativa e, assim potencializar a entrada de glicose na célula. Quando a concentração de insulina diminui, a cromodulina é excretada, levando consigo quatro moléculas de Cr.

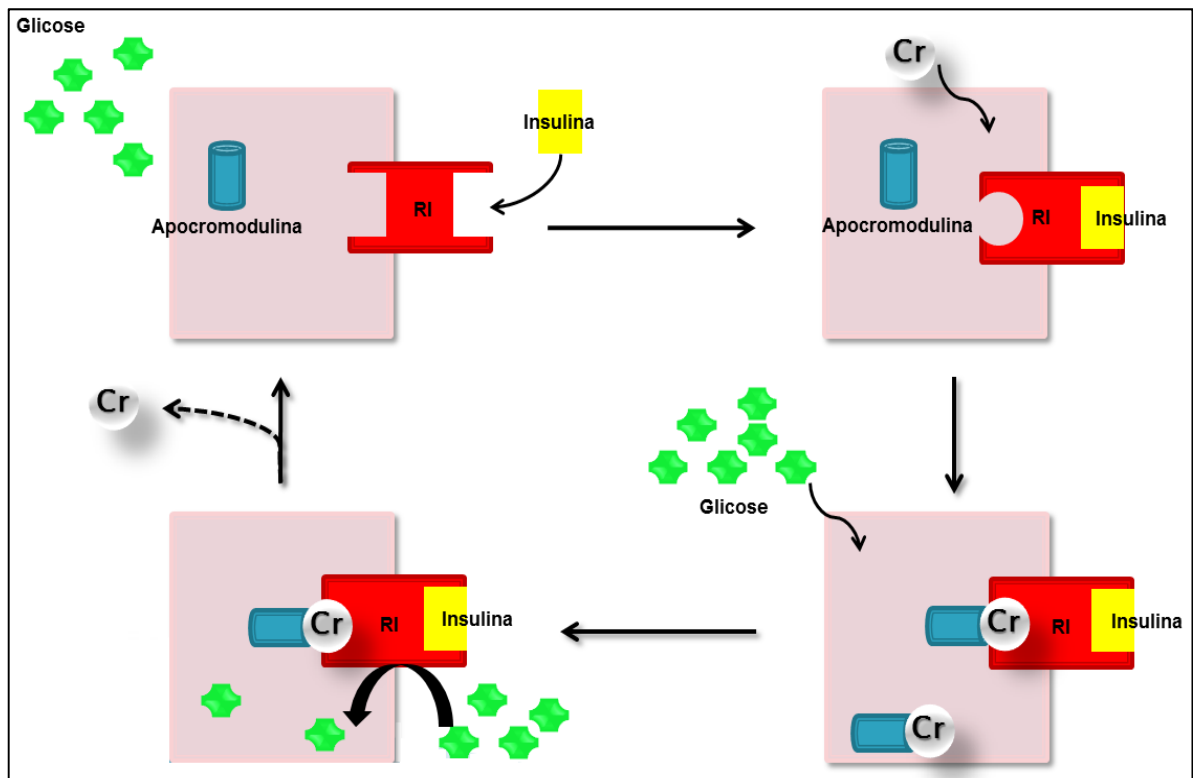


Figura 1.1. Possível mecanismo de ação biológica do Cr. **RI** – receptor de insulina.
Fonte: Vincent (2000), com modificações.

1.2.8. Cromo como Suplemento Alimentar

Embora seja relativamente rara, a deficiência de Cr provavelmente está relacionada a sintomas similares àqueles da diabetes, pois na ausência de Cr a atividade da

insulina fica prejudicada. Esses sintomas podem incluir diminuição da tolerância à glicose, crescimento prejudicado, diminuição da fertilidade, elevação da concentração de insulina sérica, glicosúria, elevação das concentrações de colesterol e triacilgliceróis no sangue, distúrbios cerebrais, neuropatia periférica e trombose (Borel e Anderson, 1984). A Tabela 1.1 resume os principais achados clínicos relacionados à deficiência de Cr e as espécies que foram envolvidas nas respectivas alterações. Contudo, confirmar o estado de deficiência de Cr é extremamente difícil e embora diversos estudos tenham utilizado técnicas de tolerância à glicose para mensurar a resposta ao Cr suplementar, este procedimento não é prático quando realizado com um grande número de animais amostrados (Anderson, 1987).

Tabela 1.1. Sinais/Sintomas relacionados à deficiência de Cr e espécies envolvidas em cada processo.

Sinal/Sintoma	Espécies
Intolerância à glicose	Humano, rato, mico-de-cheiro, porquinho-da-índia
Hiperinsulinemia	Humano, rato, suíno
Glicosúria	Humano, rato
Hiperglicemia pós-prandial	Humano, rato, camundongo
Crescimento prejudicado	Humano, rato, camundongo, peru
Hipoglicemia	Humano
Níveis séricos aumentados de colesterol	Humano, rato, camundongo, bovino, porco
Níveis séricos aumentados de triglicerídios	Humano, rato, camundongo, bovino, porco
Aterosclerose	Coelho, rato, camundongo
Neuropatia	Humano
Encefalopatia	Humano
Lesões de córnea	Rato, mico-de-cheiro
Glaucoma	Humano
Diminuição da fertilidade	Rato
Diminuição da quantidade de espermatozóides	Rato
Diminuição da longevidade	Rato, camundongo
Diminuição do número de receptores para insulina	Humano
Aumento da gordura corporal	Humano, suíno
Aumento da morbidade	Bovino

Fonte: Anderson (1994), com adaptações.

O Cr talvez seja o metal de transição mais controverso em termos de função biológica. O Cr⁺⁶ sabidamente é um carcinógeno e uma das principais substâncias nocivas relacionadas à medicina do trabalho. Assim como os compostos tetra e pentavalentes, que são

altamente reativos, o Cr^{+6} representa diversos riscos à saúde humana e animal (Levina e Lay, 2005) de modo que sua utilização como suplemento alimentar apresenta muitas contraindicações. Já o Cr trivalente vem, há tempos, sendo questionado quanto à inocuidade de sua utilização para este fim, bem como não existem provas cabais de seus benefícios. Entretanto é amplamente utilizado como suplemento alimentar por humanos e mais recentemente foi introduzido na nutrição animal.

Ultimamente, os estudos realizados com Cr^{+3} em humanos têm visado o uso desse mineral como um possível nutracêutico para o tratamento de diabetes do tipo II, enquanto em nutrição animal os estudos têm procurado melhorar a produtividade e a imunidade dos animais. As doses recomendadas a humanos nesses estudos, variam de 0,2 a 1,0 mg de Cr/dia por 1 a 10 meses (Stearns, 2007). Isto representa 6 a 40 vezes mais que a dose total diária recomendada pela ANVISA (2005) de 35 μg de Cr/dia. Especificamente em nutrição de ruminantes, o consumo de Cr tem sido feito sem controle, em misturas minerais disponibilizadas *ad libitum* aos animais. Muitos compostos de Cr trivalente têm sido utilizados na pesquisa envolvendo a suplementação alimentar deste mineral, entre eles o propionato de cromo (Vincent e Davis, 2001), o L-histidinato de cromo (Anderson et al., 2001), o nicotinato de cromo e o mais utilizado: picolinato de cromo (CrPic).

O CrPic, também conhecido por tripicolinato de cromo ou cromo tripicolinato, possui fórmula $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$, onde o termo picolinato representa o 2-piridinacarboxilato (Figura 1.2).

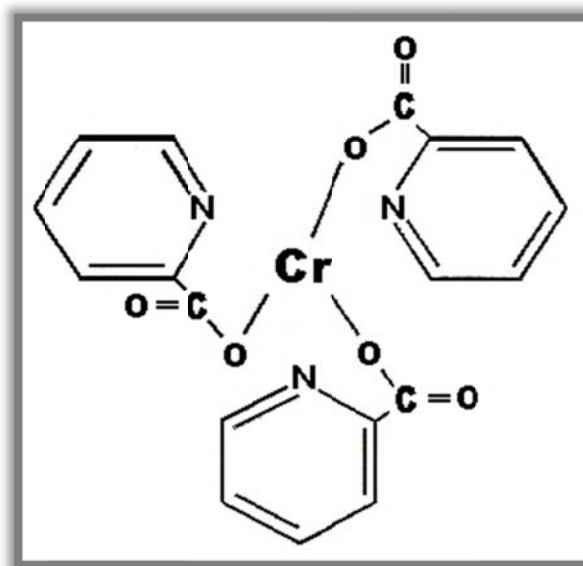


Figura 1.2. Estrutura química do picolinato de cromo (CrPic).
Fonte: Aboul-Enein et al. (2005).

Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas por ano utilizam suplementos contendo CrPic (Komorowski e Juturu, 2004). Entretanto, a comercialização de produtos contendo essa substância iniciou-se antes da aprovação do “Ato de Educação e Sanidade de Suplementos Alimentares” (“*Dietary Supplement Health and Education Act*”) em 1994. Assim, os suplementos utilizando esta molécula prescindem dos rigorosos testes utilizados para a aprovação de vendas de suplementos que são compulsórios a todos os produtos disponíveis aos consumidores após a aprovação do ato.

No Brasil, a legislação referente à suplementação alimentar para humanos é responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e está disponível nas Portarias SVS/MS 27 a 43, 222 e 223 de 1998. Para a suplementação na dieta de animais, a responsabilidade passa a ser do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa N° 152, de 11 de Outubro de 2004 que, por sua vez, não faz qualquer referência específica à utilização de Cr na alimentação de animais, quer seja de produção como de companhia.

A suplementação de Cr sob a forma de picolinato demonstrou ser mais eficiente em termos de absorção quando comparada a outras formas ou a compostos inorgânicos (Anderson et al., 1996b; DiSilvestro e Dy, 2007). Em adição, o CrPic foi a forma de suplementação eleita por todas as pesquisas financiadas pelo “*National Institutes of Health*” para estudos clínicos com Cr (Komorowski e Juturu, 2004).

O CrPic é estável em soluções aquosas e em fluidos gástricos sintéticos, além de ser internalizado intacto pelas células (Hepburn e Vincent, 2003). Em ratos, a concentração de CrPic na urina e no fígado tem pico em, no máximo, 2 horas após a aplicação intravenosa do composto (Hepburn e Vincent, 2003).

1.2.9. Cromo, Estresse e Bem-estar Animal

O estresse é um conjunto de eventos fisiológicos e comportamentais normalmente com forte conteúdo emocional. Constitui um fenômeno inevitável na vida animal, uma vez que qualquer evento que altere a homeostase é capaz de iniciar uma resposta de estresse (Schulkin, 2003).

Na presença de um estressor, ocorre liberação de neurotransmissores que interagem com seus respectivos receptores. Essa sinalização gera impulsos que são analisados e processados pelo sistema nervoso central que, por sua vez, encaminha a mensagem aos órgãos efetores gerando a resposta ao estressor. Tanto a experiência prévia quanto fatores genéticos envolvidos na formação do temperamento do animal interagem através de forma complexa e determinam o tipo e a intensidade da resposta ao agente estressor (Grandin, 1997). Assim, a resposta ao estresse consiste em um conjunto de ações comportamentais, neurais, fisiológicas e endócrinas que ajudam na adaptação do organismo às situações alteradas e no reestabelecimento da homeostase ou no estabelecimento de um novo nível homeostático (Stewart, 2006).

O estresse é indubitavelmente um importante fator na produção animal. Animais estressados, ou sob estresse são mais susceptíveis a doenças e têm produtividade diminuída além de fornecerem produtos de pior qualidade. Contudo, a mensuração e comparação do nível de estresse ou do nível de bem-estar animal é um grande desafio à ciência por possuir elementos subjetivos em suas análises, necessitarem do acompanhamento de diversos parâmetros simultaneamente, além de apresentarem dificuldades inerentes às técnicas de quantificação de estresse e bem-estar (Gonyou et al., 1986).

Deste modo, inúmeros parâmetros são apontados como sendo indicadores do nível de estresse e bem-estar nos animais: a produção animal; a presença de patologias e as circunstâncias envolvidas na ocorrência destas e, também, o comportamento animal e a quantificação de eventos fisiológicos que culminam com a liberação de substâncias reguladoras do metabolismo, da imunidade e da reprodução (ex. cortisol) (Broom, 1991). Contudo, esses fatores isoladamente não são capazes de predizer o nível de estresse e bem-estar animal.

Independentemente disso, pesquisas envolvendo a suplementação de Cr levantam a hipótese de que esse mineral é capaz de modular o nível de estresse físico e psicológico. Prova disso é que os níveis de Cr corpóreo podem ser influenciados por diversos fatores estressantes. Por exemplo, elevado consumo de glicose, exercícios, traumas e doenças podem induzir uma deficiência de Cr visto que causam um aumento no metabolismo da glicose o que, por sua vez, leva à mobilização de Cr, sua utilização pela cromodulina e, em última instância, sua irreversível excreção via urinária (Anderson, 1988).

1.2.10. Cromo e os Parâmetros Sanguíneos

O sangue tem por função precípua a irrigação dos tecidos corporais. Contudo, o transporte de nutrientes e oxigênio e o recolhimento de excretas e dióxido de carbono não são seus únicos encargos. O aporte de hormônios e substâncias reguladoras, a manutenção da homeostase (por tamponamento químico, coagulação e termorregulação) e a proteção do organismo pelo transporte de fatores humorais e celulares que compõem o sistema imunitário, também são ações exclusivamente realizadas por esse tecido.

As funções vitais desempenhadas pelo sangue, bem como a alta capacidade de proliferação e a susceptibilidade à intoxicação, fazem do tecido hematopoiético e sanguíneo órgãos-alvo de especial interesse aos possíveis agentes tóxicos. De acordo com Klaassen (2001), o sangue, o fígado e os rins figuram entre os órgãos de maior importância na avaliação toxicológica de populações expostas a elementos potencialmente tóxicos, como o Cr.

O transporte de oxigênio pelo corpo, a manutenção da integridade vascular e o provisionamento de elementos efetores da resposta imunitária imprescindíveis à manutenção da vida e higiene corpórea necessitam de um meio com grande capacidade proliferativa e regenerativa. Assim, o sangue é um tecido apropriado a desempenhar essas funções, mesmo sob condições adversas (Klaassen, 2001). Por essas características o sangue é particularmente sensível a agentes antimetabólicos e a efeitos secundários de substâncias capazes de afetar o suprimento de nutrientes, a excreção de toxinas e metabólitos e a produção de fatores vitais para a manutenção da homeostase.

De modo semelhante, o estudo e acompanhamento das células brancas do sangue possuem inestimável valor para a detecção e interpretação de alterações toxicológicas, inflamatórias e emocionais. Como será descrito mais adiante, a quantidade e a proporção das subpopulações de leucócitos refletem alterações sofridas pelo organismo que podem ser correlacionadas a causas específicas.

Portanto, uma vez que o Cr possui ação sobre a glicemia modificando parâmetros relacionados ao metabolismo energético e, visto que isso invariavelmente interfere sobre qualquer processo metabólico, alterações de qualquer natureza terão muitas chances de serem detectadas pelo exame sanguíneo. Assim, o acompanhamento e controle da função hematopoiética bem como dos elementos carregados pelo sangue fornecem informações

imprescindíveis à correta interpretação do papel desempenhado por esse mineral no organismo.

1.2.10.1. Eritrograma

Os eritrócitos são produzidos na medula óssea em resposta à eritropoetina que, por sua vez, é produzida nos rins. Essas células possuem hemoglobina, uma molécula que é responsável efetivamente pelo transporte corpóreo de oxigênio e gás carbônico além de conferir a coloração avermelhada do sangue. A avaliação completa da série vermelha deve incluir mensuração do volume globular (hematócrito), contagem de hemácias, determinação da hemoglobina (Hb), do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

O hematócrito permite estimar o volume de sangue ocupado pelas hemácias em relação ao sangue total. Desse modo, esse exame fornece informações valiosas para a análise dos parâmetros sanguíneos como um todo (Polizopoulou, 2010). Em adição, o hematócrito, quando aliado a outros dados como, por exemplo, a contagem de eritrócitos, permite estabelecer com precisão as causas de uma anemia (Jones e Allison, 2007) facilitando o diagnóstico e a planejamento do plano terapêutico.

A contagem de eritrócitos (HEM) é o número absoluto de eritrócitos por μL de sangue. Vale ressaltar que os ruminantes e, em especial, os ovinos e caprinos, possuem eritrócitos relativamente pequenos quando comparados às outras espécies e, portanto, podem gerar erros nos exames realizados em contadores automáticos que não estiverem calibrados para essas espécies. Isso por que hemácias pequenas podem ser confundidas com plaquetas pelo equipamento, levando a interpretações errôneas de que existe anemia por quantidade reduzida de eritrócitos (Jones e Allison, 2007).

Os índices VCM, HCM e CHCM fornecem, respectivamente, informações relativas ao tamanho médio das hemácias, ao conteúdo médio de hemoglobina celular e à concentração média de hemoglobina nos eritrócitos (Polizopoulou, 2010). O VCM pode ser calculado, mas a maioria dos instrumentos de hematologia fazem a mensuração desse valor diretamente, informando a média. Quando o VCM está reduzido em relação aos valores de referência, temos uma microcitose. Valores aumentados representam macrocitose e VCM dentro da normalidade chama-se normocitose (Lepherd et al., 2009).

O valor de Hb representa a capacidade de carreamento de oxigênio pelas células vermelhas. É expresso por gramas de Hb por cem mL de sangue e está intimamente relacionado aos índices HCM e CHCM. O HCM, por sua vez, representa o peso médio da hemoglobina nos eritrócitos, enquanto o CHCM dá a porcentagem média do volume que a Hb ocupa na célula (Swenson e Reece, 1996). De um modo geral, o CHCM é considerado como um índice mais útil na mensuração celular de hemoglobina. Em termos descritivos, o CHCM pode ser normocrômico, hipocrômico ou hiperocrômico para concentrações normais, baixas e altas de Hb nas células, respectivamente (Jones e Allison, 2007).

A análise morfológica das células vermelhas também possui grande valor diagnóstico. Anormalidades morfológicas dos eritrócitos detectadas pelo esfregaço sanguíneo podem ser úteis na determinação da causa de uma anemia ou indicar um processo patológico específico em diversos casos. Entretanto, discorrer sobre os diversos padrões morfológicos e as inúmeras alterações na morfologia dos eritrócitos foge ao escopo deste trabalho. Contudo, de uma forma geral, a morfologia normal dos eritrócitos de ruminantes é descrita da seguinte maneira: são células discóides e não-nucleadas com o centro menos pálido que aquele visto em outras espécies que possuem hemácias relativamente grandes como o ser humano e os cães (Taylor, 2000; Jones e Allison, 2007).

1.2.10.2. Leucograma

O leucograma é o exame sanguíneo que tem por finalidade avaliar e quantificar os leucócitos que, por sua vez, são classificados em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e em células mononucleares (linfócitos e monócitos). Essa distinção entre os tipos celulares possui especial importância no leucograma, uma vez que reduções ou elevações na quantidade individual de determinados tipos celulares podem ocorrer simultaneamente de modo a não afetar a contagem total de leucócitos sanguíneos (LEU) (Lepherd et al., 2009), dando a falsa impressão de normalidade.

Neutrófilos

Os neutrófilos exercem sua função ao migrarem até o tecido lesado para promover a fagocitose de material estranho, bactérias e outras substâncias que agem como

antígenos. É o tipo celular da série branca predominante em jovens ruminantes. Porém, com o avançar da idade, os linfócitos ocupam esse posto, tornando a proporção neutrófilos/linfócitos normalmente em 1:2 nos animais adultos (Morris, 2002).

Neutrofilia (elevação na quantidade proporcional de neutrófilos) é causada primariamente pela presença de inflamação leve a moderada ou durante o processo de recuperação de uma inflamação mais severa. Contudo, existem três principais padrões de leucograma envolvidos na neutrofilia e que serão abordados posteriormente neste texto: leucograma inflamatório (relacionado a processos inflamatórios), leucograma de estresse (relacionado a episódios de elevação na carga alostática por elevação no nível de estresse) e leucocitose fisiológica. Em contrapartida, episódios de neutropenia (redução na quantidade proporcional de neutrófilos) são causados por doenças inflamatórias agudas e severas, que causam consumo tecidual excessivo dessas células que, por sua vez, acabam por migrar do sangue para o tecido inflamado (Taylor, 2000; Jones e Allison, 2007).

Linfócitos

Os linfócitos consistem em populações celulares distintas quanto às suas funções e a seus produtos protéicos, mas que são indistintas morfologicamente. São classificados em linfócitos B ou linfócitos T de modo que os linfócitos B são aqueles responsáveis pela síntese de anticorpos, enquanto os linfócitos T regulam a função imune ou promovem citotoxicidade (Abbas e Lichtman, 2005).

A linfocitose (quadro em que o número de linfócitos está além do normal) com origem patológica é incomum em ruminantes, mas pode estar associada a condições crônicas tais como infecções virais persistentes ou doenças auto-imunes. Por outro lado, a linfopenia, caracterizada pela redução na quantidade de linfócitos, pode ser vista em condições de estresse agudo ou subagudo ou após a administração de corticosteróides, além de estar presente em infecções virais e bacterianas agudas, endotoxemia ou infecções por BVDV (Vírus da Diarréia Viral Bovina) (Taylor, 2000; Jones e Allison, 2007).

Eosinófilos

Os eosinófilos têm por função integrarem a resposta imunitária, especialmente no que tange a parasitas e alérgenos, liberando o conteúdo de seus grânulos que, por sua vez, exercem atividade citotóxica a uma variedade de helmintos, protozoários, fungos e bactérias.

De acordo com Jones e Allison (2007), a eosinofilia pode ser resultado de migração parasitária, pneumonia intersticial atípica ou por formação de auto-anticorpos a proteínas do leite. A eosinopenia dificilmente é identificada, pois os intervalos de confiança para o número de eosinófilos em condições fisiológicas normais nos ruminantes incluem o zero.

Basófilos

Em ruminantes hígidos, os basófilos são encontrados normalmente em pequenas quantidades, porém, em situações onde existam processos alérgicos ou inflamatórios, a basofilia comumente é detectada. A função desse tipo celular é liberar mediadores inflamatórios tais como a histamina e a heparina, modulando a resposta imunitária (Lepherd et al., 2009).

Monócitos

Os monócitos integram a resposta imunitária ao deixarem a corrente sanguínea e migrarem às regiões teciduais inflamadas num processo conhecido por diapedese. Nesse contexto, os monócitos sofrem um processo de ativação celular e passam a ser chamados de macrófagos, células especializadas em fagocitar organismos infecciosos e debris celulares. Em princípio, a quantidade de monócitos é pouco variável em ruminantes, sendo um indicador pouco sensível a processos infecciosos e estressantes. Contudo, elevações no número de monócitos circulantes acompanham casos de inflamações crônicas, necrose tecidual, hemólise e determinados tipos de estresse. Já quadros de redução na contagem de monócitos foram associados a endotoxicemia e viremia (Taylor, 2000; Lepherd et al., 2009).

Leucograma Inflamatório

Doenças inflamatórias são comuns em ruminantes e é importante diferenciar as mudanças que ocorrem no leucograma entre os diversos estágios do processo inflamatório. A ausência de estoques de neutrófilos segmentados nos animais adultos resultam em uma neutropenia inicial por 24 a 48 horas, diminuindo ainda mais a relação neutrófilos/linfócitos. Desvio à esquerda (caracterizado pelo aparecimento de grandes quantidades de neutrófilos imaturos) tipicamente está presente nas primeiras 24 horas de uma inflamação aguda e, adicionalmente, esse desvio pode ser regenerativo ou degenerativo, indicando o prognóstico

do quadro. Quando o desvio é degenerativo, o prognóstico é ruim e indica que a medula óssea não está funcionando adequadamente para suprir a necessidade de células para a defesa do organismo. Nesses casos, as formas imaturas de neutrófilos se sobrepõem em número aos neutrófilos segmentados com concomitante neutropenia.

No caso de desvio regenerativo à esquerda, o prognóstico é bom, e a medula óssea está respondendo adequadamente ao estímulo inflamatório (Jones e Allison, 2007).

Leucograma de Estresse

O leucograma de um animal estressado é caracterizado pela contagem diferencial de leucócitos onde os resultados são compatíveis com aqueles encontrados após a administração de glicocorticóides ou a uma descarga esteroidal endógena.

Assim, a neutrofilia é causada pela elevação da liberação de células maduras na corrente sanguínea por parte da medula óssea, e também pela redução na capacidade de diapedese dessas células, fazendo com que elas permaneçam no interior da corrente sanguínea (Taylor, 2000).

Tipicamente, leve neutrofilia associada a linfopenia e eosinopenia estão presentes, contudo, sem desvio à esquerda.

A contagem total de leucócitos pode permanecer normal ou até mesmo apresentar-se levemente diminuída visto que em ruminantes o tipo celular predominante de leucócitos é o linfócito. Desse modo, a linfopenia acaba por ser mascarada pela concomitante neutrofilia (Jones e Allison, 2007).

Leucocitose Fisiológica

O leucograma em resposta à excitação fisiológica resulta da liberação de adrenalina durante a excitação ou exercício. Um aumento na pressão sanguínea e a contração esplênica liberam grandes quantidades de células marginadas (aquelas células que embora estivessem no interior dos vasos sanguíneos, não são células circulantes por permanecerem ligadas às paredes dos vasos), causando leve leucocitose, neutrofilia (células maduras) e linfocitose transitórias (Lepherd et al., 2009).

1.2.10.3. Bioquímico Sérico

A análise do perfil bioquímico sérico é uma ferramenta diagnóstica valiosa que tem papel fundamental na avaliação dos efeitos da suplementação de Cr dietético. A utilização dos dados provenientes da análise bioquímica sérica, quando em conjunto com o histórico, exame físico e outros testes laboratoriais (ex. hemograma, leucograma e urinálise) pode ser imprescindível para confirmar suspeitas clínicas e determinar a presença, o local e o grau da lesão.

Muitos testes bioquímicos em ovinos carecem de intervalos de referência bem estabelecidos na literatura, especialmente para ovinos Santa Inês. Em adição, o estado metabólico, a idade e o sexo, entre outros motivos, provavelmente exercem influência sobre os resultados de exames bioquímicos, de modo que valores de referência confiáveis para essa raça são raros. Nesse sentido, Russell e Roussel (2007) comentaram da importância de resultados previamente relatados que, mesmo não se assemelhando em tudo à categoria dos animais que se está trabalhando, servem como parâmetros quando na ausência de índices de referência.

Glicose

Diferentemente daquilo que ocorre em monogástricos, a concentração de glicose sérica em ruminantes não sofre influência direta da alimentação. A absorção desse carboidrato não ocorre de forma direta nesses animais: como o rúmen está posicionado menos aboral que o abomaso e o intestino delgado, as bactérias e outros microrganismos ruminais é que se utilizam diretamente dos carboidratos ingeridos via dieta. De fato, são os produtos da fermentação ruminal ou os substratos que tenham escapado da ação dessa microbiota que são utilizados efetivamente pelo ruminante. Assim, como o aporte de nutrientes depende do metabolismo ruminal e visto que a taxa de fermentação não sofre grandes flutuações no decorrer do dia, o aporte de nutrientes e, portanto, de glicose para o hospedeiro também não sofre flutuações significativas.

Independentemente disso, de acordo com Kaneko et al. (2008), visto que a glicose é um elemento central no metabolismo corpóreo, existe a necessidade de avaliação desse parâmetro em praticamente todas as condições patológicas. Em adição, a literatura consultada indica de maneira enfática que o Cr exerce influência sobre o metabolismo da

glicose. Dessa forma, mesmo que a glicemia em ruminantes não sofra variações significativas, é importante o acompanhamento desse parâmetro, pois uma das alterações esperadas após a suplementação dietética desse mineral seria justamente sobre a glicemia.

Segundo Russell e Roussel (2007) existem duas condições de anormalidade para a glicose sérica: a hiperglicemia e hipoglicemia. A primeira condição, em que há um aumento na concentração de glicose sérica, ocorre muitas vezes em virtude de um episódio estressante mediado por glicocorticóides endógenos e pela adrenalina que aumentam a taxa de gliconeogênese. Nesses casos é comum a ocorrência concomitante de glicosúria. A hipoglicemia, quadro em que a concentração de glicose no sangue está reduzida, comumente acompanha episódios de cetose e pode ser observada principalmente em casos de toxemia da prenhez, em que há pronunciada cetose metabólica (Russell e Roussel, 2007).

Função Hepática

O fígado possui papel essencial no metabolismo de nutrientes, incluindo a manutenção e o controle da glicemia, a detoxificação e excreção de metabólitos, na síntese das proteínas plasmáticas, na secreção biliar e na absorção de vitaminas e lipídios (Tennant, 2008). É de se esperar que qualquer substância estranha ou tóxica que adentre o organismo via oral exerça algum efeito primariamente sobre o fígado. Isso se deve à localização anatômica do órgão – pois recebe os ramos da veia porta que, por sua vez, transporta os produtos absorvidos do intestino – bem como à sua função detoxificante.

Em termos de testes bioquímicos séricos para avaliação hepática, destaque deve ser dado às enzimas de extravasamento, visto que sua concentração sérica é um indicador sensível de dano hepatocelular. O citosol do hepatócito contém alta atividade de uma série de enzimas tais como a aspartato-aminotransferase (AST), glutamato desidrogenase (GDH) e gama-glutamilpeptidase (GGT). Em casos de dano hepatocelular, essas enzimas extravasam dos hepatócitos, elevando sua concentração sérica (Russel e Roussel, 2007). Elevações marcantes na concentração sérica dessas enzimas estão associadas a injúrias agudas e severas de uma pequena proporção de células ou lesões menos severas, mas que tenham atingido uma grande proporção de células. Os indicadores mais sensíveis de afecção são as enzimas citosólicas solúveis. Por outro lado, as enzimas localizadas nas mitocôndrias são liberadas na circulação sistêmica quando injúrias hepatocelulares mais severas ocorrem (Johnson, 2004), indicando que o dano ao hepatócito foi mais profundo.

Nas doenças hepáticas crônicas a atividade sérica dessas enzimas pode estar dentro da normalidade ou abaixo dos valores de referência, pois poucos hepatócitos podem estar sendo lesados ou o parênquima hepático pode estar significativamente reduzido. Conseqüentemente, essas enzimas são indicadores mais sensíveis a processos agudos tais como hepatite infecciosa ou presença de substâncias tóxicas (Russel e Roussel, 2007).

A AST possui alta atividade no fígado, porém também é encontrada sob a forma de isoenzimas nos rins, pâncreas e eritrócitos. Para determinar o tecido que sofreu a injúria e que é responsável pela liberação dessa enzima, é necessário a avaliação concomitante de outras enzimas específicas do fígado como, por exemplo a GGT (Tennant, 2008).

A produção aumentada de GGT está associada à colestase e, embora a GGT seja encontrada em diversos tecidos, é considerada como sendo uma enzima específica do fígado (Russel e Roussel, 2007).

Triglicerídios, Colesterol e HDL

Os lipídios desempenham uma série de funções no organismo animal. Essas biomoléculas estão envolvidas em processos que variam desde a estocagem energética até a síntese de hormônios e constituintes da membrana plasmática (Bruss, 2008). Dentre essas biomoléculas, aquelas que recebem maior destaque devido às suas funções e importância orgânica são os triglicerídios e o colesterol e seus derivados.

Os triglicerídios são ésteres do glicerol que contém três cadeias de ácidos graxos e basicamente têm por função estocar energia (Lehninger, 2005). Embora virtualmente todas as células animais sejam capazes de sintetizar triglicerídios, o fígado, o tecido adiposo, a glândula mamária e o intestino delgado o fazem com maior intensidade. Os precursores dos triglicerídios são os LCFA-CoA (ácidos graxos de cadeia longa – coenzima A) que podem ter origem local ou plasmática. Situações onde há elevação da concentração sérica de ácidos graxos de cadeia longa, como o jejum e o diabetes, suprimem a síntese de novos LCFA-CoA. Por outro lado, situações em que há promoção da síntese desses ácidos graxos, como uma refeição rica em carboidratos, levam a uma inibição concomitante na lipólise do tecido adiposo e os níveis de ácidos graxos de cadeia longa não estarão elevados. Isso devido à apreensão desses ácidos graxos de cadeia longa para a síntese de triacilgliceróis (Bruss, 2008).

A regulação da síntese dos triglicerídios não é completamente entendida, de modo que ocorre de diferentes maneiras entre os tecidos. Contudo, sabe-se que se esse processo de síntese de triglicérides ocorre em uma célula adiposa, o triglicerídio permanecerá

nessa célula, sendo estocado sob a forma de gotícula lipídica. Se a síntese ocorrer no fígado, normalmente será exportado para o tecido adiposo sob a forma de VLDL (*very low density lipoprotein*). Porém se a capacidade de exportação for ultrapassada, os triglicerídios ficarão acumulados no fígado causando degeneração gordurosa. Já os triglicerídios produzidos pela glândula mamária normalmente são secretados junto ao leite.

No fígado, a enzima limitante desse processo parece ser uma fosfohidrolase que possui estágios de menor ou maior ativação dependendo de sua localização (citosol ou retículo endoplasmático, respectivamente). O AMPc intracelular está aumentado quando há elevações no glucagon sérico ou em episódios de reduções na concentração de insulina plasmática e também parece desempenhar ação controladora na síntese de triglicerídios, inibindo a ligação entre a fosfohidrolase e o retículo endoplasmático e, assim, a síntese desses compostos é reduzida. De maneira oposta, a presença de LCFA-CoA estimula essa ligação (Brindley, 1991), elevando a síntese de triglicérides. O papel do LCFA-CoA na promoção da síntese de triacilglicerol é importante e parece explicar como a síntese lipídica e a esteatose hepática podem ocorrer em indivíduos em jejum, quando as mudanças hormonais parecem inibir a síntese de triglicerídios (Bruss, 2008).

Diversos estudos sugerem que o Cr é necessário para o metabolismo normal de lipídios. De acordo com Lefavi et al. (1993) e Anderson (1995), a suplementação com este elemento-traço reduz as concentrações totais de colesterol, aumentando a proporção de HDL e diminuindo a proporção de LDL e triacilgliceróis. Contudo, Anderson (1987) observou que os efeitos da suplementação de Cr em humanos nem sempre é consistente.

Independentemente disso, Lefavi et al. (1993) afirmaram que os efeitos deste mineral sobre o metabolismo lipídico são independentes dos efeitos sobre o metabolismo da glicose. Entretanto, esse conceito é, no mínimo, passível de críticas, sobretudo pelo fato de que o metabolismo lipídico depende, ao menos em parte, do metabolismo de carboidratos. Em adição, o simples fato de que o Cr possa ser um agente hepatotóxico já seria o suficiente para suscitar dúvidas quanto à ação do Cr sobre o metabolismo lipídico-energético uma vez que o fígado apresenta papel central na regulação dos processos metabólicos de lipídios e carboidratos.

Não obstante, o catabolismo dos triglicerídios abrange, necessariamente, a formação de lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) e o transporte dessas substâncias pelo sangue. Nesse sentido, a quantificação dessas moléculas no organismo animal pode auxiliar o entendimento e detecção de alterações no metabolismo energético e lipídico. Além disso, o

tipo e proporção de lipoproteínas na circulação também fornecem informações relativas ao funcionamento hepático e do pâncreas.

Perfil Renal

Os rins são responsáveis por excretar compostos nitrogenados altamente tóxicos, regular o volume de líquido corpóreo, realizar o controle ácido-base do organismo, além de produzir importantes hormônios como a renina e a eritropoetina. Essas são apenas algumas das funções imprescindíveis desempenhadas por esse órgão. Assim, a integridade funcional dos rins é vital para a homeostase corporal e qualquer interrupção em algum desses processos pode ser o suficiente para desencadear profundos efeitos no metabolismo geral do organismo (Schnellmann, 2001). Afortunadamente, os rins possuem vários mecanismos de detoxificação, considerável reserva funcional e apreciável capacidade regenerativa. No entanto, o tipo e intensidade da injúria aos rins pode se sobrepor à essas características de modo que uma insuficiência renal acaba por se instalar.

Insuficiência renal aguda não é um processo tão comum em ruminantes quanto o é em cães e gatos (Braun et al., 2010). Contudo o primeiro sinal de que um animal está sofrendo insuficiência renal é a azotemia, quando metabólitos nitrogenados acabam por acumular no sangue. Em um rim hígido, os metabólitos nitrogenados (em especial a uréia e a creatinina) são livremente filtrados pelos glomérulos e, no caso da uréia, a reabsorção tubular ocorre a uma taxa que depende inversamente ao fluxo urinário. Já em relação à creatinina, muito pouco é reabsorvida nos túbulos renais, sendo excretado quase que totalmente na urina (Russel e Roussel, 2007).

A uréia é produto da detoxificação da amônia pelo metabolismo protéico no fígado e, portanto, sua concentração sofre influências da dieta e do funcionamento hepático. Por outro lado, a concentração de creatinina é minimamente afetada pela dieta ou catabolismo protéico, mas pode ser alterada pelo grau de massa muscular (Russel e Roussel, 2007). Em contrapartida, a concentração plasmática de creatinina não é um indicador precoce de insuficiência renal, mas por ocasião de um dano renal relevante, é um parâmetro a se considerar (Braun et al., 2010).

A uréia e a creatinina séricas são utilizadas para estimar a filtração glomerular. Porém, em ruminantes, a uréia é reciclada pela microbiota ruminal num processo que reduz a utilidade desse parâmetro para determinação de doença renal. Por outro lado, embora a creatinina possa estar abaixo ou acima do intervalo de referência em animais com pouca ou

muita massa muscular respectivamente, a influência de fatores externos sobre esse parâmetro é menor (Russel e Roussel, 2007).

Ainda segundo Russel e Roussel (2007), dentre as principais causas de falha renal aguda figuram hipóxia, isquemia, infecção ou inflamação e ação de toxinas. Para esta última, vários autores enfatizam a participação de diversos metais pesados tais como o cobre e o mercúrio, porém não há referência direta ao Cr. Já Schnellmann (2001) foi categórico quanto à capacidade nefrotóxica do Cr, mas não faz alusão específica ao estado de oxidação do metal que é capaz de causar esse efeito.

1.2.11. Absorção e Excreção do Cr

Poucas informações sobre o metabolismo do Cr em animais de produção estão disponíveis, provavelmente devido à importância dada a este elemento como marcador externo de consumo e digestibilidade. Compostos contendo Cr, por exemplo o óxido crômico (Cr_2O_3), têm sido utilizados como marcadores externos por serem inertes e, portanto, não reagirem com o organismo: quando administrados oralmente em doses conhecidas, quase a totalidade do Cr é excretada nas fezes, fornecendo informações referentes ao consumo alimentar, à digestibilidade de matéria orgânica e à absorção de outros minerais e nutrientes. Em adição, o Cr possui certa afinidade por partículas fibrosas, o que pode facilitar o estudo de digestibilidade de fibras.

Avanços na dinâmica e cinética do Cr em mamíferos têm ocorrido especialmente em estudos com ratos e pela utilização de Cr radioativo, em especial o ^{51}Cr . Nesses estudos, algumas informações prévias foram confirmadas, enquanto outras foram rejeitadas. Por exemplo, Hepburn e Vincent (2003) e Nielsen et al. (2009) ratificaram a informação de que o Cr é absorvido primariamente no intestino delgado. Contudo, a premissa defendida por Anderson (1987) de que a eficiência de absorção é inversamente proporcional à ingestão alimentar foi rebatida por Nielsen et al. (2009) que não verificaram variabilidade na absorção intestinal de ^{51}Cr após a administração oral de diferentes quantidades de CrCl_3 . Por outro lado, nesse estudo a forma química com a qual o ^{51}Cr foi administrado mostrou grande importância nos parâmetros de absorção, biodisponibilidade e excreção. Esses pesquisadores ressaltaram que a absorção intestinal de Cr é muito maior quando o elemento é administrado sob a forma de CrPic que sob a forma de CrCl_3 . Mas a maior parte do ^{51}Cr fornecido como

CrPic é excretado via urina em 24 horas, comprometendo, em parte, a eficiência de utilização desse mineral pelo organismo.

Acredita-se que uma vez absorvido, o Cr circule no plasma associado à β -globulina numa concentração de aproximadamente 0,01 a 0,3 $\mu\text{g/L}$ (Anderson, 1987), sendo que valores inferiores podem ser encontrados em animais com infecção (Borel e Anderson, 1984). Por outro lado, Kerger et al. (1996) defendem que após a absorção do metal, parte do Cr ingerido circula pelo organismo animal ao ligar-se às células vermelhas do sangue interagindo com a hemoglobina e parte circula através do plasma sangüíneo. As quantidades de Cr em cada via de transporte dependeriam diretamente da forma com a qual o Cr se apresenta inicialmente (Cr^{+3} ou Cr^{+6}) e se sob a forma inorgânica ou orgânica.

Outra vertente, sustentada por Vincent (2000), defende que os mecanismos de absorção do Cr contam com a ação de uma proteína específica carreadora de ferro férrico e que essa proteína seja potencialmente a transferrina, embora isso não tenha sido demonstrado *in vivo*. Nesse mesmo artigo, Vincent (2000) relatou que alguns trabalhos abordando os efeitos da insulina sobre o transporte de ferro e a interrelação entre a hemocromatose, a sobrecarga hepática de ferro e o diabetes sugerem que a transferrina é o principal agente transportador de Cr no organismo. Desse modo, esse pesquisador postulou um mecanismo de transporte entre a luz do intestino até a efetiva incorporação do Cr na molécula de cromodulina onde os sítios livres de carregamento de ferro (normalmente a transferrina transporta dois íons férricos, mas comporta até quatro) são ocupados por duas moléculas de Cr. Assim, elevações nas concentrações de insulina resultam em maior transporte de transferrina, incluindo a porção que está carregando o Cr, o que, por sua vez, culmina com o transporte desse mineral do sangue aos tecidos sensíveis à insulina e, em última análise, à cromodulina. Nos diabéticos onde as concentrações de Cr são menores e as perdas urinárias são mais elevadas, esse sistema de transporte deve exceder o nível normal de operação na tentativa de suprir a demanda pelo mineral. Nisso, o fígado acaba por receber uma sobrecarga de ferro, explicando por que pacientes com diabetes podem apresentar episódios de elevação nas concentrações de ferro hepático.

Após sua administração, o Cr plasmático é totalmente depurado pelos rins em poucos dias. Entretanto, o Cr presente no restante do organismo demora a ser excretado podendo apresentar meia-vida de até 83 dias (Borel e Anderson, 1984). Alguns tecidos como os ossos e o epidídimo possuem a capacidade de reter o mineral mais que outros tecidos como o coração, os pulmões, pâncreas e o cérebro (NRC, 1997). A quantidade de Cr plasmático não apresenta alta correlação com os níveis dos estoques corporais desse mineral. Portanto, a

concentração plasmática de Cr não é um bom indicador da situação metabólica do mineral. Em adição, a concentração total de Cr no organismo diminui com o aumento da idade. Isto é reflexo da diminuição da incorporação do mineral nos tecidos, apesar da causa para tal acontecimento ser desconhecida (NRC, 1997).

Não obstante, o Cr é excretado principalmente pela urina, mas pequenas quantidades podem ser perdidas pela transpiração e bile. A taxa de excreção em humanos é próxima de 0,22 µg/dia (Borel e Anderson, 1984), nível considerado normal quando se trata de indivíduos que consomem diariamente Cr em quantidades típicas (62-85 µg/dia). Entretanto, após situações de estresse, trauma ou exercício, a quantidade de Cr excretada na urina pode aumentar. Anderson (1988), verificou que, em adultos, exercício intenso resultou em um aumento de cinco vezes na quantidade de Cr excretada na urina em 2 horas após o esforço e a quantidade total de Cr excretado na urina durante o dia do exercício foi duas vezes maior que a quantidade excretada no dia subsequente. Resultados semelhantes foram descritos por Engel et al. (2002), ao utilizarem como modelo atletas maratonistas. Deste modo, a mensuração de Cr na urina ou a taxa de excreção de Cr não são bons parâmetros para definir o estado metabólico do mineral.

1.2.12. Bioacumulação Orgânica do Cr

Partindo do princípio de que o objetivo da produção animal é gerar produtos que posteriormente serão utilizados pelos seres humanos, qualquer adição de substâncias estranhas a esses animais ou à sua dieta oferece potencial risco à saúde humana. Nesse sentido, os fenômenos da bioacumulação e biomagnificação são potenciais perigos que devem ser considerados por ocasião da suplementação dietética com algum metal pesado.

A bioacumulação refere-se à deposição de determinada substância em um sítio específico dentro do organismo, aumentando sua quantidade em um determinado indivíduo. Já a biomagnificação leva em conta o fato de que substâncias capazes de se bioacumular aumentam a sua concentração à medida que se avança na cadeia alimentar. Assim, a exemplo do que ocorre com o mercúrio (Hg), a introdução de Cr na cadeia alimentar também pode gerar um processo de biomagnificação.

Numa análise preliminar, a suplementação mineral do Cr aos ovinos não teria chances de gerar um processo de biomagnificação considerável, uma vez que nessa relação

entre o produto (carne ovina, por exemplo) e o consumidor final (ser humano), o mineral iria se deslocar apenas em um nível trófico. Por outro lado, devemos nos lembrar que boa parte dos componentes não comestíveis da carcaça ovina é destinada à alimentação animal sob a forma de farinha de vísceras. Embora no Brasil seja proibida a utilização desse tipo de farinha na alimentação de ruminantes, em outros países ou para outras espécies como frangos, essa não é a realidade. Assim, se confirmado o caráter de bioacumulação do Cr, um quadro de biomagnificação desse mineral pode ser hipotetizado.

Na literatura consultada é comum encontrar referências à acumulação de Cr no fígado, rim, baço, ossos e músculo (Sahin et al., 2005; Zha et al., 2007; Nielsen et al., 2009; Yoshida et al., 2010). Contudo, nenhum desses trabalhos, com exceção daquele conduzido por Nielsen et al. (2009) que estudaram também o tecido adiposo e o cérebro, há uma análise aprofundada de outros órgãos. Outro fator importante é que esses estudos foram realizados em sistemas-teste como ratos e codornas. Para ruminantes não há relatos referentes à bioacumulação do mineral. Com isso existe uma possibilidade de que a farmacocinética do CrPic possa ser diferente nesses animais em virtude da existência da câmara fermentativa e ação da microbiota ruminal, podendo haver bioacumulação em outros tecidos ou até mesmo não ocorrendo esse processo.

1.2.13. Quantificação do Cromo

O estudo envolvendo a atuação dos microminerais apresenta dificuldade intrínseca à característica principal desses elementos e que é o motivo de sua classificação como “micro”: a quantidade em que se encontram no organismo. De fato, grande parcela dos trabalhos científicos envolvendo a suplementação dietética de Cr para animais não foi capaz de determinar o consumo basal desse mineral. Dessa forma a análise dos resultados desses experimentos certamente foi prejudicada e talvez essa lacuna (em associação à dificuldade de se determinar o estresse) seja um dos motivos das controvérsias em torno desse mineral. Isso é especialmente relevante se a hipótese descrita por Dallago et al. (2011) ocorrer. Esses pesquisadores afirmaram que para a ação do Cr suplementar ser notada, é necessário a ocorrência de um fator estressante que aumente a demanda celular por glicose. Dessa maneira o Cr corporal será utilizado para aumentar a tolerância a glicose e, em seguida, será excretado via urina, diminuindo as reservas corporais desse metal. Essa perda pode ser compensada pelo

Cr suplementar ou, se o animal não for suplementado, a internalização da glicose pelas células ficará prejudicada. Entretanto, se a quantidade de Cr ofertada na dieta basal não for suficientemente baixa, o organismo estará adequadamente suprido por esse mineral implicando o aumento da excreção do Cr sem qualquer prejuízo para as funções orgânicas.

Visto que as concentrações corpóreas dos microminerais são ínfimas, métodos muito precisos e sensíveis são necessários para a avaliação desses elementos com acurácia. Até bem pouco tempo, a metodologia preconizada para determinação de Cr em amostras orgânicas e inorgânicas era a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (Mattos et al., 2007). Contudo, o advento e a disponibilização de tecnologias mais acuradas, qual seja, a espectrometria de massa indutivamente acoplada (ICP-MS), está sendo mais utilizada para esse fim (Mullick et al., 2008). Entretanto, a utilização de ICP-MS para a mensuração de metais em concentrações-traço e concentrações ultra-traço é relativamente nova e há certa hesitação em aceitar essa metodologia, embora existam inúmeras vantagens em sua utilização (Becker e Jakubowski, 2009). De fato, o ICP-MS oferece uma análise multielementos muito sensível que pode ser utilizada para análises qualitativas e quantitativas, mesmo em amostras complexas, se mostrando uma ferramenta imprescindível nos estudos do Cr. Por outro lado, a utilização dessa tecnologia requer cuidados especiais de limpeza e prevenção de contaminação, como por exemplo, o controle do fluxo de ar dentro do laboratório. Contudo, os cuidados em relação a análise e manipulação de microelementos já foi suscitado por Mertz (1993) que relatou a necessidade de rigoroso controle contra a contaminação das amostras durante a preparação de padrões analíticos e mensuração das concentrações de Cr no soro: o procedimento deve ser realizado em salas especialmente limpas e em obediência às regras de controle de qualidade.

1.2.14. Toxicidade do Cromo

Os sais de Cr são fortes agentes oxidantes (recebem elétrons) que, além de serem empregados em corantes e pinturas devido às suas cores variadas e propriedades mordentes (mantém a durabilidade da cor), são utilizados na metalurgia para aumentar a resistência à corrosão e dar um acabamento brilhante aos materiais. A toxicidade do Cr está primariamente relacionada à exposição aos compostos hexavalentes (Cr^{+6}) que, de acordo com Soudani et al. (2011), possui mecanismo de toxicidade pela geração de radicais livres.

A intoxicação por Cr é caracterizada por modificações anatomopatológicas nos pulmões, rins e fígado (Pechova e Pavlata, 2007). Após a inalação de Cr, os pulmões apresentam hiperemia e erosão enquanto a mucosa respiratória sofre alterações inflamatórias. Há necrose tubular com modificação intersticial significativa e posterior insuficiência renal, mas sem prejuízo ao glomérulo (Pechova e Pavlata, 2007). Em animais de experimentação, a exposição a $K_2Cr_2O_7$ (composto contendo Cr em estado hexavalente) causou danos teciduais agudos, incluindo necrose tubular e hepatotoxicidade com morte celular do parênquima, além de lesões testiculares (Bagchi et al., 2002b; Pedraza-Chaverri et al., 2005). Esses resultados aumentaram o rol de órgãos possivelmente afetados pelo mineral e suscitaram uma perspectiva mais avassaladora: a de que os gametas possam ser lesionados.

Por outro lado, a maioria dos pesquisadores acredita que o potencial tóxico do Cr trivalente e seus compostos seja bem menos pronunciado, embora exista um consenso de que esses compostos também exerçam efeitos tóxicos sobre o organismo. Contudo, essa hipótese apenas foi suscitada em meados da década de 90 por Stearns et al. (1995) que observaram efeito clastogênico (quebra de DNA) do CrPic sobre as células de ovário de hamster. A partir disso, muitos experimentos investigaram os possíveis efeitos tóxicos do Cr^{3+} , mas os resultados se mostraram dúbios (Bi et al., 2008).

Kato et al. (1998) suplementaram 10 mulheres obesas com 400 μ g de CrPic/dia durante 8 semanas e concluíram que o suplemento não induz danos oxidativos. Contudo, com a suplementação nessa dose e por tão pouco tempo, não é de se esperar qualquer alteração orgânica. Em alguns estudos (Jain e Lim, 2006; Hininger et al., 2007) foram observados inclusive efeito de proteção antioxidante do CrPic. Pechova e Pavlata (2007) afirmaram que um dos mais importantes mecanismos de proteção contra o Cr^{6+} no estômago e pulmões é justamente a sua redução para Cr^{3+} por um mecanismo dependente de NADPH. Em contrapartida, existem relatos de efeitos deletérios da suplementação de CrPic, incluindo perda de peso, anemia, trombocitopenia (Cerulli et al., 1998), rabdomiólise (Martin e Fuller, 1998), modificações agudas e de curta duração na capacidade cognitiva e motora (Huszonek, 1993) e redução na atividade de enzimas antioxidantes (Mahboob et al., 2002), além de danos oxidativos ao DNA (Bagchi et al., 2002a; Hepburn e Vincent, 2003). Ademais, o CrPic é suspeito de causar insuficiência renal e disfunção hepática (Cerulli et al., 1998) em humanos.

Stearns et al. (2002) relataram que em 48 horas de exposição a 0,44 mg de Cr/mL ocorreu mais de 54% de mortalidade em cultura de células de ovário de hamster. Em nível ultraestrutural, esses pesquisadores observaram que 83% das células analisadas

demonstraram tumefação e degradação de cristas mitocondriais, além de 37% de células apoptóticas.

Kelley et al. (2001) observaram que extratos microssomais de hepatócitos podem modificar as ligações químicas do picolinato, liberando o Cr da molécula de CrPic. Consequentemente o metal liberado pode se acumular nas células. Essa informação, somada ao relato feito por Nielsen et al. (2009) de que apenas parte do ^{51}Cr advindo do CrPic fica retido no corpo, corrobora com a idéia de que é necessário a passagem do Cr pelo fígado para sua efetiva utilização pelo organismo. Isso, por sua vez, explicaria a ocorrência de efeitos hepatotóxicos, ao menos em parte.

Portanto não há provas cabais de que o CrPic seja um agente tóxico, mas menos expressivas ainda são as evidências de que essa seja uma substância segura ou saudável. Em adição, a maior parte dos estudos realizados *in vivo* tiveram como sistemas-teste o ser humano, ratos ou camundongos e pouca informação está disponível para outras espécies. Outra lacuna no conhecimento sobre a suplementação de Cr se dá em relação ao efeito a longo prazo do mineral. Isso é especialmente importante no caso da suplementação em matrizes, cujo ciclo produtivo perdura por vários anos.

CAPÍTULO 2

ACÚMULO TECIDUAL E EXCREÇÃO URINÁRIA DE Cr EM OVINOS SUPLEMENTADOS COM CrPic

Acúmulo Tecidual e Excreção Urinária de Cr em Ovinos Suplementados com CrPic

Dallago, B.S.L.^{1*}; Lima, B.A.F.²; Mustafa, V.¹; McManus, C.³; Paim, T.P.⁴; Campeche, A.⁴;
Gomes, E.⁴; Louvandini, H.⁴

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária/UnB, Campus Darcy Ribeiro, ICC-Sul, Brasília/DF, Brazil. CEP 70910-900. E-mail: dallago@unb.br, vanessamustafa@yahoo.com.br;

²Laboratório de Geocronologia/UnB, Rede GEOCHRONOS, Campus Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brazil. CEP 70910-900. E-mail: barbara_alcantara@yahoo.com.br;

³Departamento de Zootecnia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 7712, Porto Alegre/RS, Brazil. CEP 91540-000. E-mail: concepta.mcmanus@ufrgs.br;

⁴Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Av. Centenário, nº 303, Caixa Postal 96, Piracicaba/SP, Brazil. CEP 13400-970. E-mail: louvandini@cena.usp.br;

*Autor para correspondências: dallago@unb.br

2.1. Resumo

As concentrações de Cr em fígado, rim, baço, coração, linfonodo, músculo esquelético, osso, testículo e urina foram mensuradas para verificar a biodistribuição e bioacumulação de Cr após suplementação oral com CrPic. Vinte e quatro cordeiros inteiros da raça Santa Inês foram tratados com quatro diferentes concentrações de CrPic: placebo, 0,250, 0,375 e 0,500 mg de CrPic/animal/dia durante 84 dias. A dieta basal foi composta por feno de *Panicum maximum* cv Massai e concentrado. As concentrações de Cr foram mensuradas por ICP-MS utilizando o ⁵²Cr como massa colhida. Houve relação linear positiva entre a dose administrada e o acúmulo do mineral no coração, pulmão e testículo. A excreção urinária de Cr ocorreu de forma tempo e dose-dependente, de modo que quanto mais tempo ou quanto mais Cr dietético fornecido, maior a excreção do mineral. Assim, há risco da ocorrência de um processo de bioacumulação e biomagnificação para o Cr ofertado sob a forma de CrPic.

Palavras-chave: ICP-MS; Biodistribuição; Bioacumulação; Suplemento Mineral; Santa Inês.

2.2. Abstract

Chromium concentrations in liver, kidney, spleen, heart, lymph node, skeletal muscle, bone, testis and urine were measured to trace the biodistribution and bioaccumulation of Cr after oral supplementation with CrPic. Twenty-four Santa Inês lambs were treated with four different concentrations of CrPic: placebo, 0.250, 0.375 and 0.500 mg of CrPic/animal/day for 84 days. The basal diet consisted of *Panicum maximum* cv Massai hay and concentrate. Cr concentrations were measured by ICP-MS using ^{52}Cr as collected mass. There was a positive linear relationship between dose administered and the accumulation of mineral in the heart, lung and testis. Urinary excretion of chromium occurred in a time and dose-dependent manner, so the longer or more dietary Cr provided, the greater excretion of the mineral. Thus, there is a risk of bioaccumulation and biomagnification due to Cr offered in the CrPic form.

Key words: ICP-MS; Biodistribution; Bioaccumulation; Mineral Supplement; Santa Inês.

2.3. Introdução

O Cr, em sua forma trivalente (Cr^{+3}), é considerado um nutriente essencial por estar envolvido na regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Nielsen et al., 2009). A principal ação biológica do Cr envolve a potencialização da ação da insulina (Sreejayan et al., 2008) e, assim, o metabolismo geral e outros processos corpóreos podem ser influenciados pela sua adição na dieta.

Normalmente a suplementação de Cr na alimentação de humanos e animais é feita pela adição de um composto quelatado conhecido por picolinato de cromo (CrPic) (Komorowski e Juturu, 2004). Contudo, por ser um metal pesado e, portanto, possuir potencial de se acumular nos tecidos biológicos, existe o risco de ocorrer o processo de bioacumulação e biomagnificação, no qual as concentrações do metal tendem a se elevar exponencialmente à medida que os nutrientes vão percorrendo a cadeia alimentar.

Não obstante, a utilização do Cr como suplemento alimentar é eivado de dúvidas quanto ao resultado de sua adição na dieta, mecanismo de ação e inocuidade. Desse

modo, informações referentes à biodisponibilidade, biodistribuição e bioacumulação das moléculas de Cr no organismo podem ajudar a elucidar as dúvidas quanto a suplementação desse elemento-traço na dieta. Uma das principais lacunas observadas no Programa Nacional de Toxicologia (NTP, 2008) se refere justamente à biodistribuição e concentração total de Cr nos tecidos.

Este trabalho tem por objetivo avaliar a biodistribuição tecidual e excreção urinária de Cr em ovinos suplementados com doses crescentes de CrPic na dieta.

2.4. Material e Métodos

2.4.1. Local

Este experimento foi desenvolvido no Centro de Manejo de Ovinos da Fazenda Água Limpa de propriedade da Universidade de Brasília – UnB e localizada no Núcleo Rural Vargem Bonita a aproximadamente 25 km do centro de Brasília - DF.

2.4.2. Animais e Instalações

Foram utilizados 24 cordeiros machos inteiros da raça Santa Inês pertencentes ao rebanho da Fazenda Água Limpa – FAL/UnB. Os animais possuíam peso vivo médio inicial de $22,89 \pm 2,23$ kg e idade aproximada de três meses e 15 dias. Antes do início do experimento, todos os animais foram tratados com cloridrato de Levamisol p.o. (Fort Dodge Ripercol-L[®]) na dose recomendada pelo fabricante e receberam injeção i.m. de ferro (Tortuga Ferrodex[®]) e vitaminas A, D e E (Pfizer A-D-E[®]) nas doses recomendadas pelos fabricantes além de serem submetidos a exame clínico, exame coprológico e mensuração do hematócrito a fim de evitar que animais doentes ou com parasitas gastrintestinais iniciassem o experimento.

Os ovinos foram alocados em baias individuais medindo 1,40 x 2,10 metros, protegidas das intempéries climáticas. No interior de cada uma das baias havia um cocho para

água, um para o volumoso e outro para o concentrado e a baía era recoberta com cama para evitar o contato direto dos animais com o solo.

2.4.3. Manejo Alimentar, Adaptação e Tratamentos

Com base no peso vivo os 24 cordeiros foram distribuídos em quatro tratamentos contendo seis animais. Os cordeiros eram alimentados duas vezes ao dia da seguinte maneira: pela manhã recebiam todo o concentrado composto de 85% de farinha de mandioca, 11,5% de sal mineral e 3,5% de uréia e metade do volumoso constituído de feno de *Panicum maximum* cv Massai sendo que a outra metade foi fornecida no período da tarde, respeitando-se sobre de 10% (*ad libitum*). As análises bromatológicas dos alimentos utilizados foram feitas de acordo com Silva e Queiroz (2006) e encontram-se na Tabela 2.1. Para essas análises, foram tomadas várias amostras, as quais foram misturadas obtendo-se uma amostra composta.

Tabela 2.1. Composição bromatológica dos alimentos fornecidos aos ovinos em g kg⁻¹ de matéria seca.

Constituintes	Concentrado	Feno de <i>Panicum maximum</i> cv. Massai
Matéria seca (g/kg)	904,1	873,6
Fibra em Detergente Neutro (g/kg MS)	68,0	721,2
Fibra em Detergente Ácido (g/kg MS)	32,4	408,5
Proteína (g/kg MS)	104,4	63,3
Extrato etéreo (g/kg MS)	7,4	24,3
Matéria mineral (g/kg MS)	105,4	67,3
Fósforo (g/kg MS)	6,1	1,0
Cromo (ppm)	0,025	0,0145

Com o desenvolvimento dos ovinos a quantidade inicial de 300g de concentrado/animal/dia foi aumentada para 400g de concentrado/animal/dia, a partir do 42º dia de experimentação. A água foi consumida *ad libitum*.

Os animais permaneceram confinados durante todo o experimento (99 dias) e passaram por um período inicial de duas semanas para adaptação às novas condições.

Acompanhamento clínico foi realizado duas vezes durante o experimento e envolveu auscultação pulmonar e de vias aéreas superiores, auscultação cardíaca, aferição da temperatura e avaliação de mucosas.

A suplementação de Cr foi feita pela ingestão diária individual pela manhã de cápsulas com concentrações crescentes de picolinato de cromo (CrPic) nas seguintes quantidades: placebo; 0,250 mg de Cr; 0,375 mg de Cr e 0,500 mg de Cr. As doses fornecidas procuraram mimetizar o procedimento da indústria de suplementos minerais que, em geral, utiliza formulações contendo 12 mg de Cr/kg de sal mineral com um consumo diário médio esperado de 20g de sal/animal/dia, fornecendo, em média, um total de 0,240 mg de Cr/animal/dia. Em adição, experimentos anteriores (Page et al., 1993; Mostafa-Tehrani et al., 2006) demonstraram que incrementos na suplementação de cromo além de 0,6 mg de Cr/kg da dieta não são indicados justificando a manipulação do mineral em concentrações entre 0,250 a 0,500 mg de Cr/dia.

A Tabela 2.2 apresenta a concentração total de Cr ingerida por esses animais levando-se em consideração tanto a dieta quanto a ingestão de água (Dallago et al., 2011).

Tabela 2.2. Ingestão total de Cr (considerando os alimentos e a água) nos diferentes tratamentos.

	Tratamento			
	Placebo	0,250 (mg de Cr/dia)	0,375 (mg de Cr/dia)	0,500 (mg de Cr/dia)
Ingestão de Cr (mg/kg de Matéria Seca)	0,025	0,296	0,399	0,702

Fonte: Dallago et al., 2011.

2.4.4. Colheita, Processamento e Análise das Amostras

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e amostras de fígado, rim, baço, linfonodo (mesentérico), músculo esquelético (músculo intercostal), músculo cardíaco, osso (12^a costela), pulmão e testículo foram colhidas e congeladas a -18 °C. Posteriormente essas amostras foram descongeladas e incineradas em mufla a 450 °C. Em seguida foram submetidas a digestão clorídrica conforme descrito por Silva e Queiroz (2006) utilizando como meio de ressuspensão água nanopure.

A urina foi colhida em intervalos de aproximadamente 20 dias e armazenada a -18 °C para posterior análise. Para a etapa de digestão química foi utilizado ácido sulfúrico. Como esse substrato é líquido, prescindiu da etapa de digestão clorídrica e foi inserida diretamente no ICP-MS. Os valores obtidos apenas foram convertidos para a concentração absoluta de Cr.

A seleção dos órgãos avaliados ocorreu em virtude da importância como produto final da produção animal (músculo), em seu uso na cadeia de biomagnificação (possível utilização na farinha de vísceras), na possibilidade de serem potenciais órgãos-alvo para acumulação do mineral (órgãos filtrantes ou partícipes do sistema fagocítico mononuclear), por exercerem funções centrais no funcionamento do organismo como um todo ou por desempenharem função de coordenação no metabolismo corpóreo, além do testículo que está diretamente relacionado à reprodução sendo, portanto, de suma importância na perpetuação da espécie. A urina foi colhida e analisada quanto à concentração de Cr por ser o principal meio de excreção desse mineral (Nielsen et al., 2009).

Uma vez solubilizadas, as amostras foram analisadas em espectrômetro de massa indutivamente acoplado a gás de argônio modelo Neptune[®] (Finnigan C.O.[®]) pertencente ao Laboratório de Geocronologia-UFRGS/Rede GEOCHRONOS. As configurações do equipamento foram as seguintes:

-Cup configuration: C-Cr52-Faraday (V);

-Inlet System:

.Cool Gas: 15,00;

.Aux Gas: 0,70;

.Sample Gas: 0,952;

.X-pos: 0,730;

.Y-pos: 0,970;

.Z-pos: -0,970;

Os padrões utilizados foram o TUNE[®] e a curva de calibração ajustada com pontos a 0, 10, 25 e 50 ppb de Cr (TraceCERT[®] - Sigma Aldrich[®]). A massa atômica colhida pelo espectrômetro foi 52. Para essas análises, a curva de calibração foi aferida, em média, a

cada cinco amostras e os valores obtidos foram sendo ajustados a cada equação de curva gerada.

A concentração absoluta de Cr (todos os isótopos do mineral) foi obtida levando-se em consideração a concentração na natureza do isótopo ^{52}Cr que, segundo Bievre e Barnes (1985), é 83,789%. A concentração final foi calculada com base na matéria seca (MS) e foi obtida por uma média entre os valores das duplicatas de uma mesma amostra.

2.4.5. Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro níveis crescentes de Cr suplementar (0; 0,250; 0,375 e 0,500 mg/dia) e seis repetições cada.

A análise dos dados foi feita através do Statistical Analysis System (SAS, 1999) usando os procedimentos PROC GLM e PROC REG (para as regressões polinomiais pertinentes), ambos com nível de significância a 5%.

Para os dados de urina, que foram mensurados mais de uma vez no decorrer do experimento, uma análise de variância com medidas repetidas no tempo foi realizada. As médias foram comparadas utilizando-se um ajuste de comparação múltipla para o teste Tukey ($p < 0,05$).

Os parâmetros com alto coeficiente de variação foram normalizados pela transformação logarítmica ou radicial.

2.5. Resultados

O resultado dos exames clínicos apresentaram-se dentro dos parâmetros normais. Deste modo, nenhum cordeiro apresentou sinais de doença durante o período experimental.

Diferenças significativas entre os tratamentos foram observadas para coração, pulmão e testículo (Tabela 2.3). Contudo, o comportamento de deposição foi diferente entre esses tecidos: para o músculo cardíaco e o testículo, a concentração de Cr ocorreu de maneira

linear, de modo que quanto maior a suplementação com o CrPic, maior a concentração de Cr no tecido (Figuras 2.1 e 2.2).

No pulmão, a resposta à suplementação com CrPic demonstrou ser quadrática de forma que diminutas elevações na concentração de Cr suplementar representam elevação considerável na concentração de Cr tecidual (Figura 2.3).

Tabela 2.3. Concentração de Cr (e respectivas regressões) aferida nos diferentes tecidos de ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.

Órgãos	Tratamentos (mg de CrPic/dia)				Desvio Padrão	Regressão	
	0,000	0,250	0,375	0,500		Linear	Quadrática
Fígado (ppm)	1,62	1,71	1,74	1,36	0,17	ns ¹	ns
Rim (ppm)	2,96	3,05	3,57	2,64	0,39	ns	ns
Baço (ppm)	1,61	1,92	1,62	1,93	0,18	ns	ns
Coração (ppm)	1,75	2,00	2,01	2,14	0,16	0,0162	ns
Linfonodo (ppm)	6,01	7,23	6,41	5,68	0,67	ns	ns
Músculo (ppm)	3,04	4,33	3,55	3,60	0,53	ns	ns
Osso (ppm)	10,92	11,73	10,65	12,18	0,71	ns	ns
Pulmão (ppm)	1,41	1,61	1,67	2,08	0,28	ns	0,0049
Testículo (ppm)	3,30	3,60	4,65	4,21	0,61	0,04	ns

¹ns = não significativo (p = 0,05).

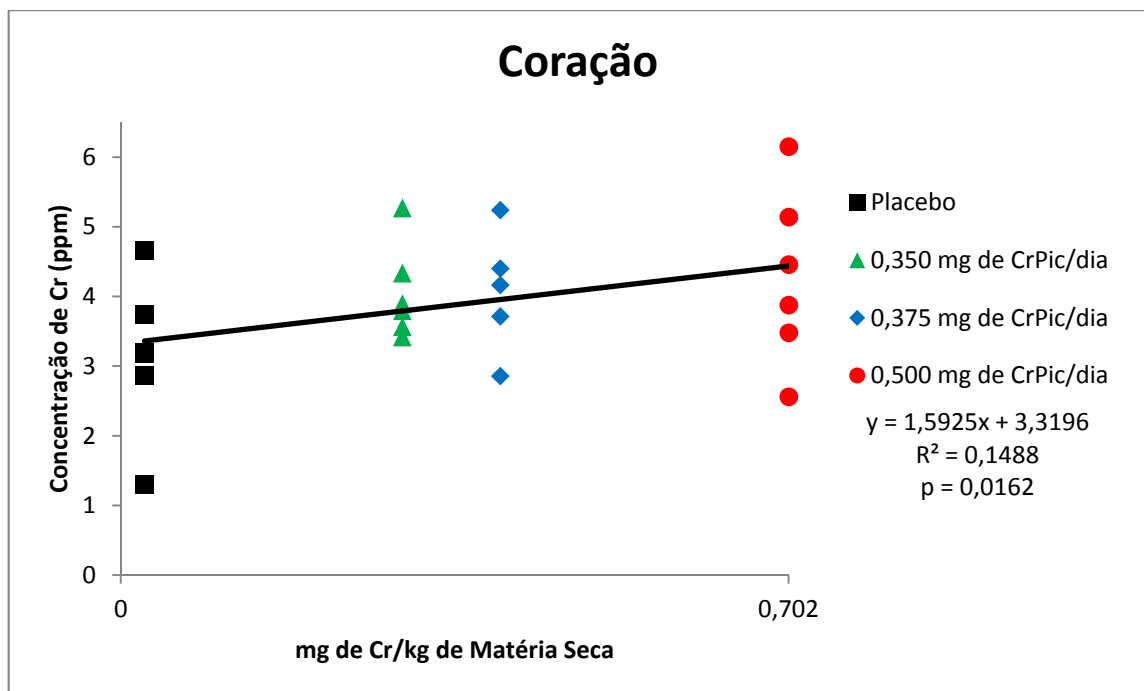


Figura 2.1. Concentração de Cr no coração de ovinos SI controle e após 84 dias de suplementação com CrPic.

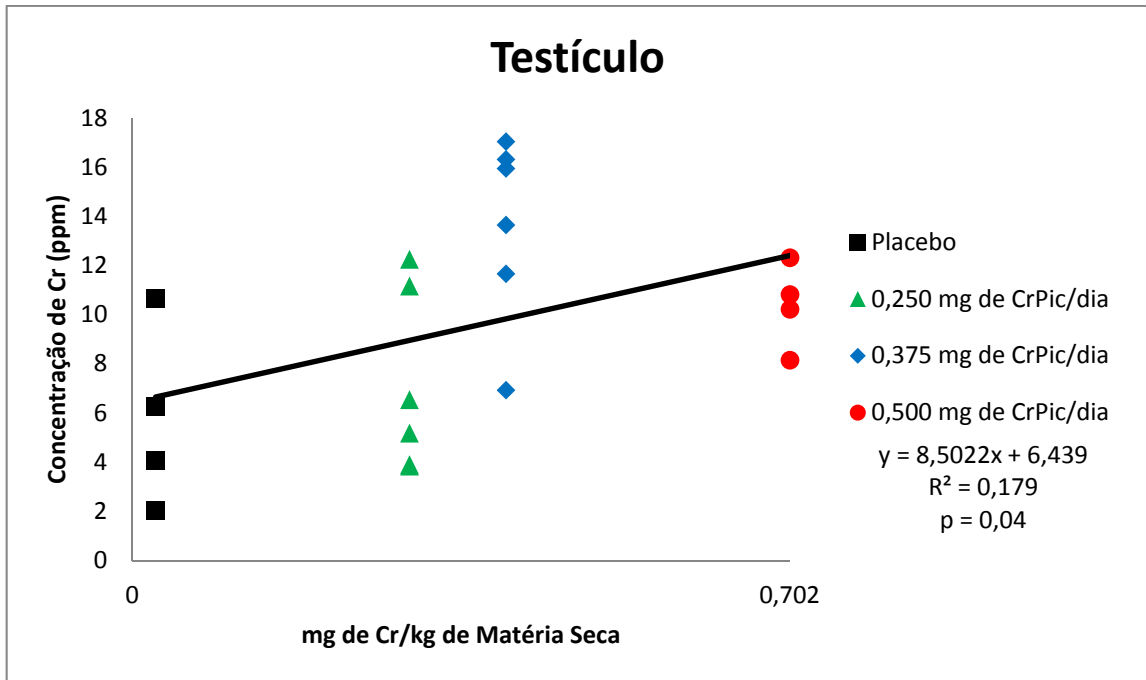


Figura 2.2. Concentração de Cr em testículo de ovinos SI controle e após 84 dias de suplementação com CrPic.

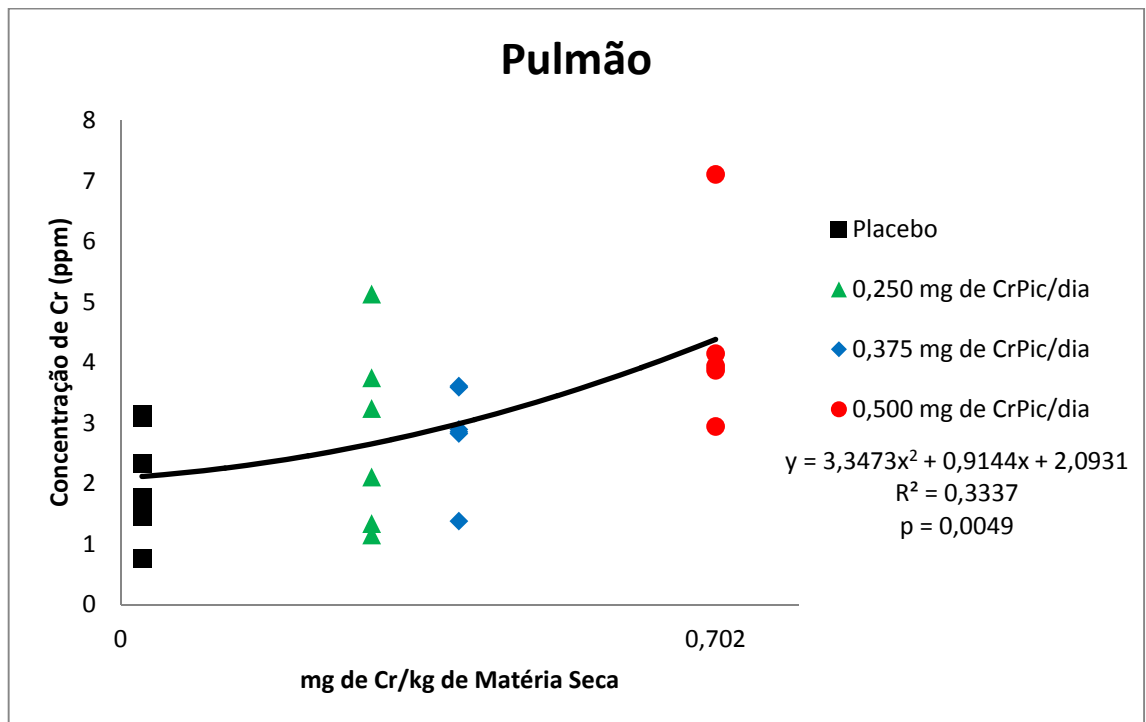


Figura 2.3. Concentração de Cr em pulmão de ovinos SI controle e após 84 dias de suplementação com CrPic.

Com exceção do dia inicial do experimento (Dia 0), quando os animais ainda não haviam recebido o Cr suplementar, todos os demais dias analisados apresentaram

diferenças significativas para a excreção de Cr via urina, com concentrações mais elevadas quanto maior a dose de CrPic suplementada. Adicionalmente, houve uma interação entre dose de CrPic suplementar e o tempo ($p=0,0009$) e também um efeito quadrático positivo do tempo ($p<0,0001$) (Figura 2.4).

Tabela 2.4. Concentração de Cr urinário, desvio padrão e tipo de regressão aferidos nos diferentes tratamentos em relação ao tempo de suplementação.

Dias de Experimentação	Tratamentos (mg de CrPic/dia)				Desvio Padrão	Regressão	
	0,000	0,250	0,375	0,500		Linear	Quadrática
0	3,51	3,90	3,61	3,09	0,34	ns ¹	ns
21	1,77 ^a	2,53 ^{ab}	2,76 ^b	2,85 ^b	0,49	0,002	ns
43	2,72 ^a	2,63 ^{ab}	3,46 ^{ac}	4,69 ^d	0,95	ns	< 0,0001
63	4,15 ^a	4,78 ^{ab}	4,91 ^{ab}	5,76 ^b	0,66	0,004	ns
84	5,66 ^a	6,60 ^b	6,75 ^{bc}	7,40 ^c	0,72	0,0001	ns

¹ns = não significativo;

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste F.

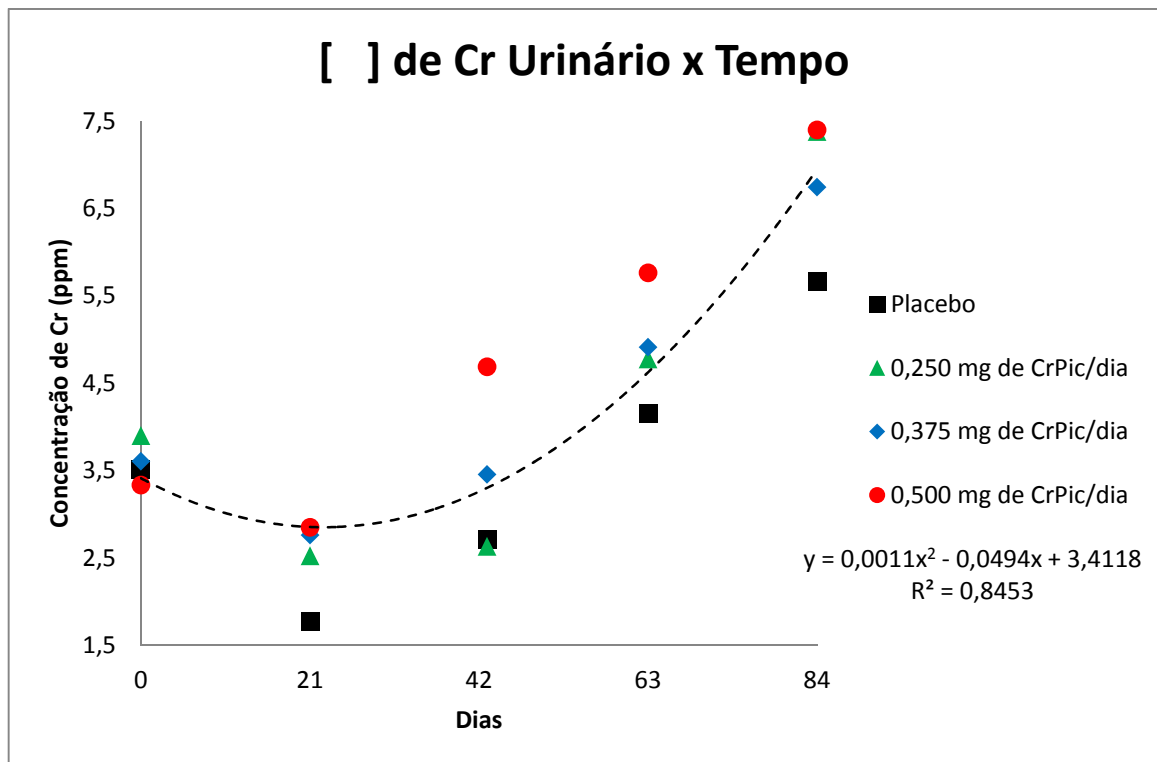


Figura 2.4. Relação entre a concentração de Cr urinário em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic e o tempo.

2.6. Discussão

Poucas informações sobre o metabolismo do Cr em animais de produção estão disponíveis, provavelmente devido à importância dada a este elemento como marcador externo de consumo e digestibilidade e, também pela dificuldade intrínseca de manipulação e mensuração de elementos-traço. De fato, com exceção de um trabalho conduzido por Uyanik et al. (2005) com codornas, ao que temos notícia, este é o único estudo de análise quantitativa de Cr em tecidos de animais de produção.

Avanços na dinâmica e cinética do Cr em mamíferos têm ocorrido especialmente em estudos com ratos e pela utilização de Cr radioativo, em especial o ^{51}Cr . Esses estudos confirmaram algumas teorias postuladas anteriormente em relação ao Cr, enquanto outras foram rejeitadas. Por exemplo, Hepburn e Vincent (2003) e Nielsen et al. (2009) ratificaram a informação de que o Cr é absorvido primariamente no intestino delgado. Contudo, a premissa defendida por Anderson (1987) de que a eficiência de absorção é inversamente proporcional à ingestão alimentar foi rebatida por Nielsen et al. (2009) que não verificaram variabilidade na absorção intestinal de ^{51}Cr após a administração oral de diferentes quantidades de CrCl_3 . Por outro lado, nesse estudo a forma química com a qual o ^{51}Cr foi administrado mostrou grande importância nos parâmetros de absorção, biodisponibilidade e excreção. Esses pesquisadores ressaltaram que a absorção intestinal de Cr é muito maior quando o elemento é administrado sob a forma de CrPic que sob a forma de CrCl_3 . Entretanto, a maior parte do ^{51}Cr fornecido como CrPic é excretado via urina em 24 horas, comprometendo, em parte, a eficiência de utilização desse mineral pelo organismo (Nielsen et al., 2009).

Tradicionalmente o Cr tem sido determinado em amostras biológicas por técnicas de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (Nicholson et al., 1999), análise de ativação neutrônica (Lagerwaard et al., 1995) ou espectrometria de emissão óptica indutivamente acoplada (ICP-OES; Witmer et al., 1989). Contudo, a espectrometria de massa indutivamente acoplada (ICP-MS) tem se tornado a técnica mais indicada para essas análises, por possuir baixos limites de detecção e capacidade para análise de multi-elementos (Hung et al., 2007). Porém, ainda é uma técnica muito restrita devido ao custo do equipamento e necessidade de infra-estrutura especial, além de mão-de-obra altamente especializada.

Embora Levine et al. (2010) tenham estabelecido e validado protocolo para mensuração de Cr por ICP-MS em tecido renal de ratos analisando o ^{53}Cr , as concentrações de Cr mensuradas no tecido renal neste experimento utilizando o ^{52}Cr (2,54 a 3,57 ppm) são semelhantes às concentrações aferidas por aqueles pesquisadores (entre 0,50 e 5,00 ppm). Isso demonstra que a técnica utilizada aqui tem validade, especialmente pelos baixos índices de desvio padrão. Contudo essa discussão foge do escopo deste experimento.

Havia a expectativa de que o Cr iria se acumular no fígado, em virtude desse órgão ser o primeiro tecido perfundido com substâncias estranhas absorvidas oralmente, pela extensa literatura abordando os efeitos hepatotóxicos desse mineral (Cerulli et al., 1998; Bagchi et al., 2002) e, principalmente pelo mecanismo de transporte de Cr na corrente sanguínea descrito por Sun et al. (2000) e Vincent (2000), que indicaram a transferrina como sendo a molécula carreadora do metal. Como a transferrina possui elevada atividade no fígado, era de se esperar que as concentrações de Cr também o fossem. Contudo o acúmulo do metal nesse tecido não ocorreu neste experimento. Resultado semelhante foi obtido por Sahin et al. (2001) que por sua vez não verificaram alterações nas concentrações de Cr no fígado de coelhos após a suplementação oral com cloreto de Cr. Por outro lado, Uyanik et al. (2005) e Zha et al. (2007) utilizando respectivamente codornas suplementadas com cloreto de Cr e ratos suplementados com CrPic observaram elevações na concentração de Cr em tecido hepático de acordo com a concentração de Cr suplementar na dieta. Esses resultados inconsistentes entre os estudos podem ser explicados por diferenças entre a metodologia e o material utilizados, além da concentração de Cr na dieta basal e espécie animal empregada em cada experimento diferirem. Assim, a análise em conjunto desses resultados reforçam a necessidade de mais estudos nesse sentido.

Em adição, Dallago et al. (2008) relataram a presença em nível ultra-estrutural de material elétron-denso no tecido hepático dos mesmos animais utilizados aqui e suscitaram a possibilidade de que se tratava de depósitos de Cr, especialmente pela associação observada entre a dose de CrPic fornecida e a quantidade de depósitos elétron-densos visualizados. Essa associação mostrou-se descabida após a avaliação por ICP-MS relatada aqui. Entretanto, há a possibilidade de que esses depósitos eletron-densos sejam basicamente formados por Fe^{3+} visto que existe uma relação entre a hemocromatose, sobrecarga hepática de ferro, insulina, transferrina e o Cr. Essa relação é descrita por Vincent (2000).

A ausência de relação entre a quantidade de Cr suplementar e a concentração de Cr nos rins, num primeiro momento parece incabível pelo fato da excreção do mineral ser primordialmente urinária. Porém é plausível, uma vez que o tempo de circulação desse metal

no organismo é curto (menor que 1 dia), sendo rapidamente excretado (Nielsen et al., 2009) e de modo que não tende a se acumular. As concentrações de Cr urinário mensuradas neste experimento corroboram com essa hipótese: o excesso de Cr absorvido foi excretado, por isso a relação direta entre a dose de Cr suplementar e a concentração de Cr urinário. Entretanto, essa premissa só é válida para as moléculas de Cr que adentraram os rins. Aquelas que foram apreendidas no *pool* de armazenamento do organismo ou que foram captadas por órgãos que tenham maior avidéz em relação ao mineral, acabaram por ser sequestradas até que sua utilização fosse necessária.

Visto que o CrPic é uma molécula estranha ao organismo, a hipótese de que o sistema fagocítico-mononuclear apreenderia o mineral era possível. Porém, as concentrações de Cr nos linfonodos e baço refutam essa hipótese, talvez por existir um limite na incorporação do mineral nesses tecidos ou simplesmente pelo fato de que a quantidade de Cr nesses órgãos independe da dose ingerida de Cr. Dessa forma é possível excluir a possibilidade de que os prejuízos ao sistema imunitário descritos por Dallago (2008) ocorreram pelo acúmulo do mineral no tecido linfóide. Contudo, o fato de que a concentração de Cr nos linfonodos esteve cerca de cinco vezes maior que nos outros tecidos moles revelou que embora não seja um sítio de acúmulo do mineral, o linfonodo é um local natural de reserva corpórea de Cr.

A preocupação com a possibilidade de o Cr originário do CrPic poder se bioacumular e biomagnificar é procedente. De fato, o coração, os pulmões e os testículos apresentaram concentrações de Cr dependendo da dose suplementar de CrPic. Contudo, o consumo de carne proveniente de animais suplementados com o mineral é seguro do ponto de vista toxicológico uma vez que não apresentou resultados semelhantes. Em contrapartida, a utilização de miúdos na confecção de farinha de carne e ossos, a médio e longo prazo parece não ser tão inofensiva, pois tanto os ossos (que apresentaram as maiores concentrações de Cr), quanto os testículos, o coração e o pulmão são componentes dessas farinhas.

O osso, por sua vez, demonstrou ser um local de reserva de Cr no organismo. Embora a concentração desse mineral nesse substrato não tenha ocorrido de maneira dependente à quantidade de Cr fornecida na dieta, as concentrações de Cr mensuradas atestam ser o osso um depósito natural do mineral no organismo.

O acúmulo desse metal no coração talvez ocorra em virtude do alto grau de metabolismo desse músculo. Pela sua incessante atividade, o coração requisita grande aporte de glicose e, necessariamente o mecanismo de entrada desse substrato na célula cardíaca também deve funcionar com grande intensidade, requisitando o Cr em grandes quantidades.

Para os pulmões, o acúmulo do mineral pode ter ocorrido em função da capacidade de detoxificação intrínseca desse órgão. De acordo com Maxie (2007) os pulmões possuem seus próprios meios de oxidar substâncias nocivas complementarmente ao fígado. Essas reações de detoxificação normalmente transformam substâncias menos tóxicas em substâncias mais tóxicas, porém com menor tempo de meia-vida (Maxie, 2007). Talvez com a presença extra de Cr devido à suplementação os pulmões tenham aumentado a intensidade desse processo, elevando a concentração do elemento-traço neste órgão. Independentemente disso, esse mecanismo de detoxificação foi bem descrito por Levina e Lay (2008) e comprovadamente ocorre com o CrPic, onde a molécula de Cr^{3+} , acaba por se transformar em Cr^{2+} ou até mesmo em Cr^{6+} que são mais reativas. Por sua vez, o sistema respiratório é o principal alvo de toxicidade do Cr^{6+} com uma série de patologias associadas à exposição crônica ao mineral (EPA, 1998). Essas hipóteses explicariam complementarmente o fato de que estes animais apresentaram extenso tecido linfóide broncoassociado (BALT) e espessamento considerável do septo alveolar descritos no capítulo 3 desta tese.

2.7. Conclusão

A excreção urinária de Cr ocorre de forma quantidade-dependente, de modo que quanto mais Cr na dieta, maior a concentração de Cr na urina. O coração, os pulmões e os testículos são capazes de bioacumular Cr, enquanto o osso e o linfonodo podem ser depósitos naturais do mineral no organismo. Portanto, a utilização dietética de CrPic pode ter papel importante no processo de bioacumulação e biomagnificação do Cr na cadeia alimentar em que animais suplementados com o mineral estiverem inseridos.

2.8. Agradecimentos

Este experimento foi financiado pelo CNPq (INCT-IGSPB e Universal), FAP-DF, e FINATEC. Agradecimento especial ao prof. Dr. Márcio Martins Pimentel (UFRGS) por viabilizar o experimento e também oferecer apoio incondicional em nível técnico e estrutural.

2.9. Aprovação do Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal – CEUA/UnB, processo nº 033/2009.

2.10. Referências

- Anderson, R. A. (1987). Chromium. In: Mertz, E. Trace elements in human and animal nutrition. 1st edition. New York: Academic Press, p.225-244.
- Bagchi D.; Stohs, S.J.; Downs, B.W. et al. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. **Toxicology**, v. 180, p. 5–22.
- Bievre, P.; Barnes, I.L. (1985). Table of the isotopic composition of the elements as determined by mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 65, p. 211-230.
- Cerulli J.; Grabe, D.W.; Gauthier, I. et al.(1998). Chromium picolinate toxicity. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.32, p. 428.
- Dallago, B.S.L. (2008). Efeitos da suplementação de cromo (Cr) sobre o desempenho produtivo, a população de protozoários ruminais e a resposta imunitária em ovinos. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, Brasília, 2008.
- Dallago, B.S.L.; Braz, S.V.; McManus, C.M. et al. (2008). Morphological analysis of sheep liver by optical and transmission electron microscopy following oral supplementation with chromium picolinate. Simpósio de Microscopia no Cerrado. Documentos 265. EMBRAPA: Pirenópolis. p. 273-275.
- Dallago, B.S.L.; McManus, C.M.; Caldeira, D.F. et al. (2011). Performance and ruminal protozoa in lambs with chromium supplementation. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 253-256.
- EPA - U.S. Environmental Protection Agency. (1998). Toxicological review of trivalent chromium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- Hepburn, D.D.; Vincent, J.B. (2003). Tissue and subcellular distribution of chromium picolinate with time after entering the bloodstream. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.94, p. 86-93.

- Hung, C.L.H.; Lau, R.K.F.; Lam, J.C.W. et al. (2007). Risk assessment of trace elements in the stomach contents of Indo-Pacific humpback dolphins and finless porpoises in Hong Kong waters. **Chemosphere**, v. 66, p.1175-1182.
- Komorowski, J. K.; Juturu, V. (2004). Dietary Chromium Picolinate: Efficacy and Safety. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 17, p. 291-293.
- Largerwaard, A.; Woittiez, J.R.W.; Goeij, J.J.M. (1995). An independent accurate reference method for the determination of chromium in biological materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 351, p.786-789.
- Levina, A.; Lay, P.A. (2008). Chemical properties and toxicity of chromium(III) nutritional supplements. **Chemical Research in Toxicology**, v.21, p. 563-571.
- Levine, K.E.; Stout, M.D.; Ross, G.T. et al. (2010). Validation and application of a method for the determination of total chromium in rat tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p.883-891.
- Maxie, M.G. (2007). Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Saunders Elsevier, pp. 2340.
- Mostafa-Tehrani, A.; Ghorbani, G.; Zare-Shahneh, A. et al. (2006). Non-carcass components and wholesale cuts of Iranian fat-tailed lambs fed chromium nicotinate or chromium chloride. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 12-19.
- Nicholson, F.A.; Chambers, B.J.; Williams, J.R. et al. (1999). Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. **Bioresource Technology**, v.70, p.23-31.
- Nielsen, P.; Kottwitz, K.; Laschinsky, N. et al. (2009). Absorption, excretion and retention of ⁵¹Cr from labeled Cr-(III)-picolinate in rats. **Biometals**, v. 22, p. 289-295.
- NTP – National Toxicology Program. (2008). Toxicology and carcinogenesis studies of chromium picolinate monohydrate (CAS No 27882-76-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). NTP technical report 556, NIH Publication 08-5897.
- Page, T.G.; Southern, L.L.; Ward, T.L. et al. (1993). Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 656-662.
- Sahin, K.; Sahin, N.; Güler, T. (2001). The effect of supplemental dietary chromium on performance, some blood parameters and tissue chromium contents of rabbits. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 25, p. 217-221.
- SAS Institute. (1999). SAS statistical package for Windows v. 8.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Silva, D.J.; Queiroz, A.C. (2006). Determinação da Cinza ou Matéria Mineral. In: _____ *Análise de Alimentos – Métodos Químicos e Biológicos*. p. 77-86.

- Sreejayan, N.; Dong, F.; Kandadi, M.R. et al. (2008). Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice. **Obesity**, 16:1331-1337.
- Sun, Y.; Ramirez, J.; Woski, S.A. et al. (2000). The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, p.129-136.
- Uyanik, F.; Eren, M.; Güçlü, B.K. et al. (2005). Effects of dietary chromium supplementation on performance, carcass traits, serum metabolites, and tissue chromium levels of Japanese quails. **Biological Trace Element Research**, v. 103, p.187-197.
- Vincent, J.B. (2000). The biochemistry of chromium. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 715-718.
- Witmer, C.M.; Park, H.S.; Shupack, S.I. (1989). Mutagenicity and disposition of chromium. **Science of the Total Environment**, v. 86, p. 131-148.
- Zha, L.Y.; Wang, M.Q.; Xu, Z.R. et al. (2007). Efficacy of chromium(III) supplementation on growth, body composition, serum parameters, and tissue chromium in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 119, p. 42-50.

CAPÍTULO 3

**PARÂMETROS SANGUÍNEOS E TOXICIDADE DA SUPLEMENTAÇÃO
DIETÉTICA DE CrPic EM OVINOS**

Parâmetros Sanguíneos e Toxicidade da Suplementação Dietética de CrPic em Ovinos

Dallago, B.S.L.^{1*}; Marçola, T.G.²; McManus, C.³; Campeche, A.⁴; Gomes, E.⁴; Paim, T.P.⁴; Louvandini, H.⁴

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária/UnB, Campus Darcy Ribeiro, ICC-Sul, Brasília/DF, Brazil. CEP 70910-900. E-mail: dallago@unb.br;

²Laboratório de Patologia Clínica Veterinária/UnB, Campus Darcy Ribeiro, ICC-Sul, Brasília/DF, Brazil. CEP 70910-900. E-mail: tatigmarcola@hotmail.com;

³Departamento de Zootecnia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 7712, Porto Alegre/RS, Brazil. CEP 91540-000. E-mail: concepta.mcmanus@ufrgs.br;

⁴Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Av. Centenário, nº 303, Caixa Postal 96, Piracicaba/SP, Brazil. CEP 13400-970. E-mail: louvandini@cena.usp.br;

*Autor para correspondência: dallago@unb.br;

3.1. Resumo

Os efeitos da suplementação oral de picolinato de cromo (CrPic) sobre diversos parâmetros sanguíneos e sua possível toxicidade sobre fígado, rins, pulmões, coração e testículo foram investigados. Vinte e quatro cordeiros inteiros SI foram tratados com quatro diferentes concentrações de CrPic: placebo, 0,250, 0,375 e 0,500 mg de CrPic/animal/dia durante 84 dias. A dieta basal foi composta por feno de *Panicum maximum* cv Massai e concentrado. Sangue e soro sanguíneo foram colhidos quinzenalmente e análises de hemograma, leucograma e testes bioquímicos séricos foram realizados. No dia 84 os animais foram eutanasiados e análises histopatológicas em fígado, rim, coração, pulmão e testículos foram realizadas. Diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$) foram observadas para VG (dia 84), hemoglobina (dia 84), PPT (dia 56 e dia 84), monócitos (dia 56), eosinófilos (dia 56) e triglicerídios (dia 70). Não houve relação estatisticamente significativa entre a suplementação de Cr e os achados histopatológicos, embora animais tratados com o elemento-traço tenham apresentado alterações morfológicas em fígado, rim e testículo. Assim, a suplementação com Cr permanece sob suspeita quanto à sua ação fisiológica e tóxica em ovinos.

Palavras-chave: Hemograma; Leucograma; Bioquímica Sérica; Suplemento Mineral.

3.2. Abstract

The effects of oral supplementation of chromium picolinate (CrPic) on various blood parameters and their possible toxicity on liver, kidneys, lungs, heart and testis were investigated. Twenty-four Santa Inês lambs were treated with four different concentrations of CrPic: placebo, 0.250, 0.375 and 0.500 mg CrPic/animal/day for 84 days. The basal diet consisted of hay *Panicum maximum* cv Massai and concentrate. Blood and serum were collected fortnightly and analysis of blood count, leukocyte count, differential leukocyte count and serum biochemical tests were performed. On day 84 the animals were euthanized and histopathological analysis in liver, kidney, heart, lung and testis were made. Differences between treatments ($p < 0.05$) were observed for PCV (day 84), hemoglobin (day 84), TPP (day 56 and day 84), monocytes (day 56), eosinophils (day 56) and triglycerides (day 70). There was no statistically significant relationship between Cr supplementation and histopathological findings, although some animals treated with the trace element have shown morphological changes. Thus, supplementation with Cr remains in doubt as to its physiological action and toxicity in sheep.

Key words: Hemogram; Leukogram; Serum Biochemistry; Mineral Supplement.

3.3. Introdução

O picolinato de cromo (CrPic) é um composto quelatado utilizado como suplemento alimentar para humanos e animais. Acredita-se que seja um micromineral essencial por estar associado a vários processos metabólicos, sendo a potencialização da ação da insulina seu efeito mais pronunciado. Assim, o metabolismo geral e outros processos corpóreos podem ser influenciados pela sua adição na dieta (Anderson, 1987).

Contudo, a utilização desse mineral como suplemento alimentar carece de muitas informações, especialmente no que tange à inocuidade de sua administração, pois por se tratar de um metal pesado, o Cr possui potencial tóxico, podendo acarretar danos ao material genético e aos gametas, interferir sobre funções metabólicas essenciais ou formar compostos altamente reativos (Merrill et al., 2001; Hodgson et al., 2004; Klaassen, 2006;

Stoecker, 2006) o que aumentaria o estresse oxidativo no organismo animal. De fato, alguns pesquisadores têm revelado a importância de mais estudos em relação à utilização dietética de Cr ao indicarem a possibilidade de efeitos tóxicos associados ao seu uso (Woski et al., 1999; Stearns et al. 2002; Subramanian et al., 2006). Em adição, estudo complementar a este (descrito no segundo capítulo desta tese) indicou maiores concentrações de Cr na musculatura cardíaca, pulmões e testículos após a suplementação com o CrPic. Como esses tecidos têm potencial para entrar na cadeia alimentar de humanos ou são essenciais para a reprodução da espécie, se faz necessário pesquisar as consequências da presença de Cr sobre esses órgãos.

Os produtores rurais ignoram esses riscos e muitos utilizam formulações de sal mineral suplementados com Cr na dieta animal. Grande parcela de culpa deve-se à indústria de suplementos alimentares que independentemente de respaldo científico, vem adicionando Cr ao sal mineral como sendo um elemento infalível, que “melhora o desempenho produtivo e o sistema imunitário” ou como um “fator nutricional anti-estresse” (Vincent, 2004).

Portanto, definir a influência da suplementação de Cr sobre o metabolismo corpóreo e seus possíveis efeitos tóxicos auxiliará a esclarecer as vantagens, desvantagens e a real necessidade de proceder com a suplementação deste mineral na dieta dos animais de produção. Nesse sentido, a avaliação de vários parâmetros sanguíneos, bem como o estudo de moléculas séricas (glicose, enzimas, perfil de leucócitos, entre outras) e a confirmação (ou não) da inocuidade e segurança da administração de CrPic, são imprescindíveis para esclarecer as dúvidas que pairam sobre o uso desse mineral como suplemento alimentar.

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da suplementação dietética de doses crescentes de CrPic em ovinos sobre os parâmetros sanguíneos e a possível ação tóxica desse composto sobre órgãos-alvo previamente identificados como propensos ao acúmulo de Cr.

3.4. Material e Métodos

3.4.1. Local

Este experimento foi desenvolvido no Centro de Manejo de Ovinos da Fazenda Água Limpa de propriedade da Universidade de Brasília – UnB e localizada no Núcleo Rural Vargem Bonita a aproximadamente 25 km do centro de Brasília - DF.

3.4.2. Animais e Instalações

Foram utilizados 24 cordeiros machos inteiros da raça Santa Inês pertencentes ao rebanho da Fazenda Água Limpa – FAL/UnB. Os animais possuíam peso vivo médio inicial de $22,89 \pm 2,23$ kg e idade aproximada de três meses e 15 dias. Antes do início do experimento, todos os animais foram tratados com cloridrato de Levamisol p.o. (Fort Dodge Ripercol-L[®]) na dose recomendada pelo fabricante e receberam injeção i.m. de ferro (Tortuga Ferrodex[®]) e vitaminas A, D e E (Pfizer A-D-E[®]) nas doses recomendadas pelos fabricantes além de serem submetidos a exame clínico, exame coprológico e mensuração do hematócrito a fim de evitar que animais doentes ou com parasitas gastrintestinais iniciassem o experimento.

Os ovinos foram alocados em baias individuais medindo 1,40 x 2,10 metros, protegidas das intempéries climáticas. No interior de cada uma das baias havia um cocho para água, um para o volumoso e outro para o concentrado e a baia era recoberta com cama para evitar o contato direto dos animais com o chão.

3.4.3. Manejo Alimentar, Adaptação e Tratamentos

Com base no peso vivo os 24 cordeiros foram distribuídos em quatro tratamentos contendo seis animais. Os cordeiros eram alimentados duas vezes ao dia da seguinte maneira: pela manhã recebiam todo o concentrado composto de 85% de farinha de mandioca, 11,5% de sal mineral e 3,5% de uréia e metade do volumoso constituído de feno de *Panicum maximum* cv Massai sendo que a outra metade foi fornecida no período da tarde, respeitando-se sobre de 10% (*ad libitum*). As análises bromatológicas dos alimentos utilizados foram feitas de acordo com Silva e Queiroz (2006) e encontram-se na Tabela 3.1. Para estas análises, foram tomadas várias amostras, as quais foram misturadas obtendo-se uma amostra composta.

Com o desenvolvimento dos ovinos a quantidade inicial de 300g de concentrado/animal/dia foi aumentada para 400g de concentrado/animal/dia, a partir do 42º dia de experimentação. A água foi consumida *ad libitum*.

Tabela 3.1. Composição bromatológica dos alimentos fornecidos aos ovinos em g kg⁻¹ de matéria seca (MS).

Constituintes	Concentrado	Feno de <i>Panicum maximum</i> cv. Massai
Matéria seca (g/kg)	904,1	873,6
Fibra em Detergente Neutro (g/kg MS)	68,0	721,2
Fibra em Detergente Ácido (g/kg MS)	32,4	408,5
Proteína (g/kg MS)	104,4	63,3
Extrato etéreo (g/kg MS)	7,4	24,3
Matéria mineral (g/kg MS)	105,4	67,3
Fósforo (g/kg MS)	6,1	1,0
Cromo (ppm)	0,025	0,0145

Os animais permaneceram confinados durante todo o experimento (99 dias) e passaram por um período inicial de duas semanas para adaptação às novas condições. Acompanhamento clínico foi realizado duas vezes durante o experimento e envolveu auscultação pulmonar e de vias aéreas superiores, auscultação cardíaca, aferição da temperatura e avaliação de mucosas.

A suplementação de Cr foi feita pela ingestão diária individual pela manhã de cápsulas com concentrações crescentes de picolinato de cromo (CrPic) nas seguintes quantidades: placebo; 0,250 mg de Cr; 0,375 mg de Cr e 0,500 mg de Cr. A Tabela 3.2 apresenta a concentração total de Cr ingerida por esses animais levando-se em consideração tanto a dieta quanto a ingestão de água (Dallago et al., 2011).

Tabela 3.2. Ingestão total de Cr (considerando os alimentos e a água) nos diferentes tratamentos.

	Tratamento			
	Placebo	0,250 (mg de Cr/dia)	0,375 (mg de Cr/dia)	0,500 (mg de Cr/dia)
Ingestão de Cr (mg/kg de Matéria Seca)	0,025	0,296	0,399	0,702

Fonte: Dallago et al. (2011).

3.4.4. Colheita de Sangue

Amostras de sangue foram colhidas a cada duas semanas por punção jugular. Tubos vacuntainer[®] com e sem EDTA foram utilizados para colher o sangue. Em seguida,

foram prontamente resfriados em gelo e transportados ao laboratório para análise. O soro foi obtido a partir de sangue coagulado e centrifugado a 2000 rpm por 5 min. Em seguida, o soro foi congelado a -20 °C até o momento da análise.

3.4.5. Bioquímico sérico e Hematologia

O sangue colhido em EDTA foi utilizado para proceder com a mensuração de volume globular (VG), contagem de hemácias (HEM), hemoglobina (Hb) e contagem de leucócitos (LEU). Essas análises foram realizadas em contador automático (ABCvet - ABX[®]) no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – HVET/UnB. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por técnicos treinados do mesmo laboratório. O volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados.

Metabólitos séricos, incluindo glicose (GLI), colesterol (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídios (TRI), aspartato-aminotransferase (AST), gama-glutamilpeptidase (GGT), uréia (BUN) e creatinina (CREAT) foram mensurados por espectrofotometria utilizando “kits” comerciais específicos (LABTEST[®]). As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram mensuradas com o auxílio de um refratômetro.

3.4.6. Histopatologia

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e amostras de fígado, rins, pulmões, testículos e coração foram colhidas e fixadas em formol 10% tamponado até que o material fosse processado em série gradativa de soluções de etanol, parafinado e seccionado com cortes de espessura de 5 µm para a confecção de lâminas de histopatologia. Em seguida o material foi corado com eosina-hematoxilina (HE) e analisado em microscópio de luz. Três cortes de cada amostra foram avaliados quanto à presença e intensidade (+, ++ ou +++) de lesões compatíveis com intoxicação por metais pesados, ou qualquer outro tipo de lesão que pudesse inferir uma ação tóxica do Cr sobre o tecido.

Experimento complementar a este (segundo capítulo desta tese), utilizando os mesmos animais, indicou que esses órgãos possuíam a capacidade de armazenar maiores concentrações de Cr de acordo com elevação na dose suplementar do mineral, por isso a eleição desses tecidos para análise histopatológica.

3.4.7. Determinação de Cr

Todas as determinações de Cr realizadas neste experimento foram feitas por Espectrometria de emissão atômica indutivamente acoplada a plasma de argônio em espectrômetro de modelo Thermo Jarrell Ash IRIS/AP[®] - Laboratório de Química Analítica de Plantas/CPAC/EMBRAPA. Estas amostras foram incineradas em mufla a 450 °C e posteriormente submetidas a digestão clorídrica conforme descrito por Silva e Queiroz (2006). A água consumida pelos animais foi analisada do mesmo modo, com a ressalva de que por apresentar-se líquida não foi necessário realizar a digestão clorídrica.

3.4.8. Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro níveis crescentes de Cr suplementar (0; 0,250; 0,375 e 0,500 mg/dia) e seis repetições cada.

A análise dos dados foi feita através do Statistical Analysis System (SAS, 1999) usando os procedimentos PROC GLM e PROC REG (para as regressões polinomiais pertinentes), ambos com nível de significância a 5%. Para os dados mensurados mais de uma vez no decorrer do experimento, por exemplo, contagem total de hemácias, volume globular e leucócitos, uma análise de variância com medidas repetidas no tempo foi realizada. As médias foram comparadas utilizando-se um ajuste de comparação múltipla para o teste Tukey ($p < 0,05$). Os parâmetros com alto coeficiente de variação foram normalizados pela transformação logarítmica ou radicial.

Para as análises histopatológicas, foi utilizado o teste exato de Fischer com nível de significância a 5%.

3.5. Resultados

3.5.1. Exame Clínico

O resultado dos exames clínicos apresentaram-se dentro dos parâmetros normais. Deste modo, nenhum cordeiro apresentou sinais de doença durante o período experimental.

3.5.2. Hemograma

Tanto o volume globular (VG), quanto as proteínas plasmáticas totais (PPT), e a hemoglobina (Hb) apresentaram interação significativa entre o tempo e o tratamento (Tabela 3.3). Contudo, aos 83 dias de experimentação houve uma regressão linear positiva ($p=0,0082$) entre VG e o CrPic suplementar (Figura 3.1) e entre este e a Hb ($p=0,0024$) (Figura 3.2).

De maneira semelhante, houve um efeito quadrático positivo da suplementação de Cr sobre PPT ($p<0,0001$) nos dias 56 e 84 (Figuras 3.3 e 3.4). O tempo influenciou VG, Hb, CHCM ($p<0,0001$) e VCM ($p=0,0242$), porém a resposta desses parâmetros a essa fonte de variação não foi uniforme ou constante.

A contagem total de hemácias (HEM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e nem efeito do tempo, de modo que esses parâmetros não foram influenciados nem pelo Cr suplementar nem pelo tempo que os animais permaneceram no experimento.

Tabela 3.3. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre VG, HEM, Hb, VCM, CHCM, HCM e PPT em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.

Dia	Tratamento (mg de Cr/dia)				DPM ¹	Nível de Significância	Valor de referência* (média)
	Placebo	0,250	0,375	0,500			
	Volume Globular (%)						
0	32,5	33,8	32,7	32,8	2,72	ns ²	27-45
14	33,0	34,2	37,7	34,7	2,76	ns	(35)
28	33,2	33,3	36,8	34,5	4,01	ns	
42	31,5	31,7	33,8	30,7	2,44	ns	
56	31,1 ^{ab}	30,3 ^b	35,1 ^a	31,3 ^a	2,64	0,0249	
70	31,8	30,8	33,0	32,3	2,65	ns	
84	28,0 ^a	29,0 ^{ab}	31,6 ^b	31,5 ^{ab}	2,10	0,0210	
	Hemácias (x 10 ⁶ /μL)						
0	11,3	11,8	13,3	12,3	1,50	ns	9-15
14	13,2	12,9	11,6	12,2	2,28	ns	(12)
28	13,0	11,1	14,2	11,5	2,78	ns	
42	11,9	11,9	12,3	11,8	1,50	ns	
56	12,7	12,0	14,5	12,9	1,48	ns	
70	12,9	12,7	12,3	11,5	1,90	ns	
84	10,8	11,9	11,8	12,3	1,73	ns	
	Hemoglobina (g/100 mL)						
0	11,0	11,5	11,1	11,1	0,92	ns	9-15
14	11,2	11,6	12,8	11,7	0,94	ns	(11,5)
28	10,7 ^a	10,9 ^{ab}	12,3 ^b	11,2 ^{ab}	0,95	0,0322	
42	10,7	10,7	11,5	10,4	0,83	ns	
56	11,6 ^{ab}	11,4 ^a	13,1 ^b	11,5 ^a	0,93	0,0161	
70	11,9	11,8	12,5	12,3	1,04	ns	
84	8,3 ^a	8,8 ^{ab}	9,9 ^b	10,1 ^b	0,93	0,0114	
	VCM (fL)						
0	29,2	29,3	24,7	27,0	3,96	ns	28-40
14	25,3	27,1	33,4	30,0	5,70	ns	(34)
28	26,5	30,2	27,3	30,4	4,43	ns	
42	26,6	26,7	27,5	26,4	2,29	ns	
56	24,5	25,4	24,5	24,8	3,26	ns	
70	24,7	25,3	27,0	28,1	3,34	ns	
84	26,5	24,7	26,8	26,9	4,49	ns	
	CHCM (g/100 mL)						
0	34,0	34,0	34,0	34,0	-	ns	31-34
14	34,0	34,0	34,0	34,0	-	ns	(32,5)
28	32,6	32,8	34,2	33,0	4,10	ns	
42	34,0	34,0	34,0	34,0	-	ns	
56	37,3	38,1	37,6	36,8	2,68	ns	
70	37,5	38,4	38,0	38,5	3,08	ns	
84	29,8	30,4	31,4	32,2	2,68	ns	

	HCM (pg)						
0	9,9	10,0	8,4	9,2	1,35	ns	8-12 (10)
14	8,6	9,2	11,4	10,2	0,62	ns	
28	8,7	9,9	9,2	10,1	1,80	ns	
42	9,1	9,1	9,4	9,0	0,78	ns	
56	9,2	9,7	9,2	9,2	1,41	ns	
70	9,3	9,7	10,3	10,8	1,53	ns	
84	7,9	7,5	8,4	8,7	1,75	ns	
	PPT (g/100 mL)						
0	5,9	5,9	5,8	6,1	0,34	ns	6-7,5
14	6,5	6,4	6,1	6,6	0,30	ns	
28	6,5	6,5	6,3	6,7	0,29	ns	
42	6,1	5,9	6,0	6,2	0,32	ns	
56	6,0	6,1	6,1	6,5	0,38	ns	
70	6,4	6,3	6,2	6,5	0,33	ns	
84	6,0 ^a	5,8 ^a	6,0 ^a	6,8 ^b	0,28	<0,0001	

¹DPM = desvio padrão médio (n=6);

²ns = não significativo.

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste F.

*De acordo com Jain (1993).

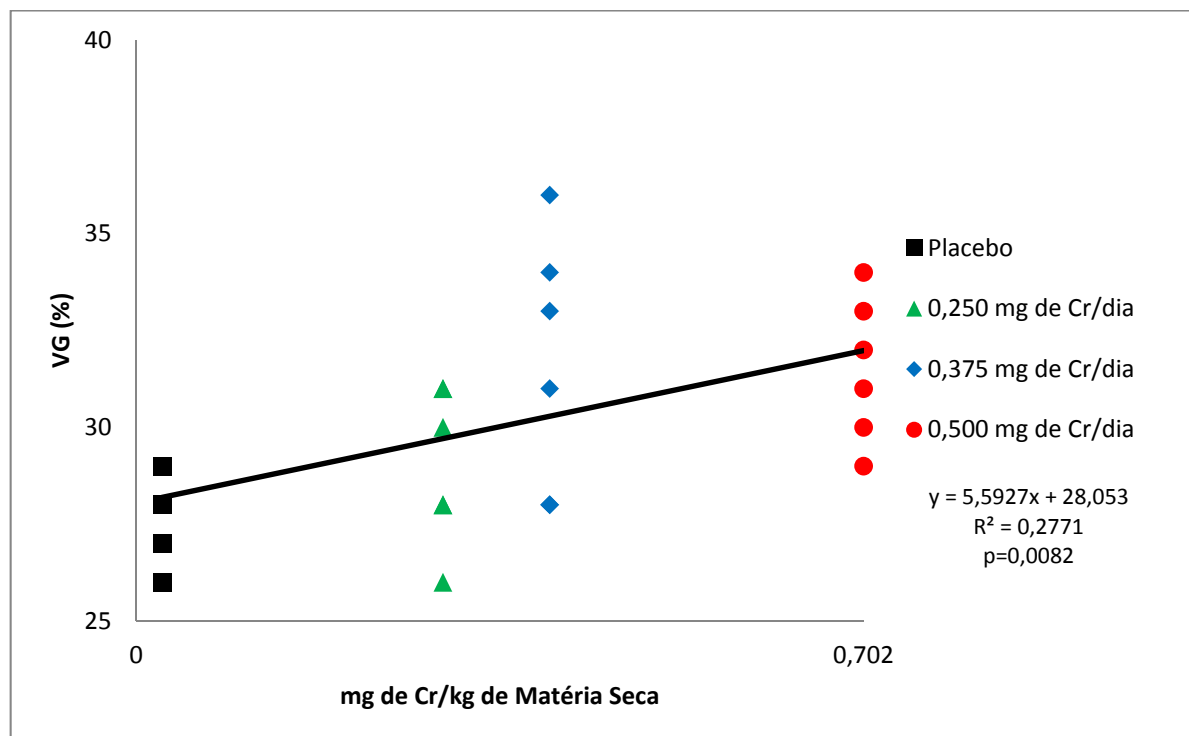


Figura 3.1. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre o volume globular de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 84º dia de experimento.

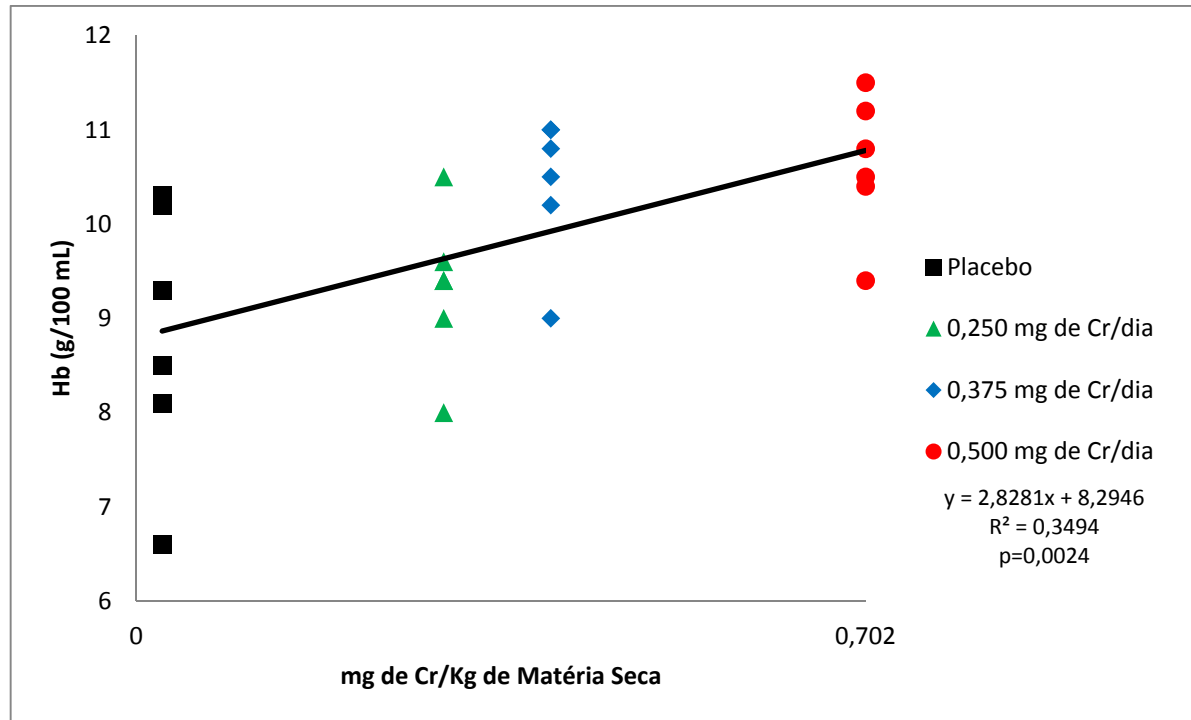


Figura 3.2. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a hemoglobina de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 84º dia de experimento.

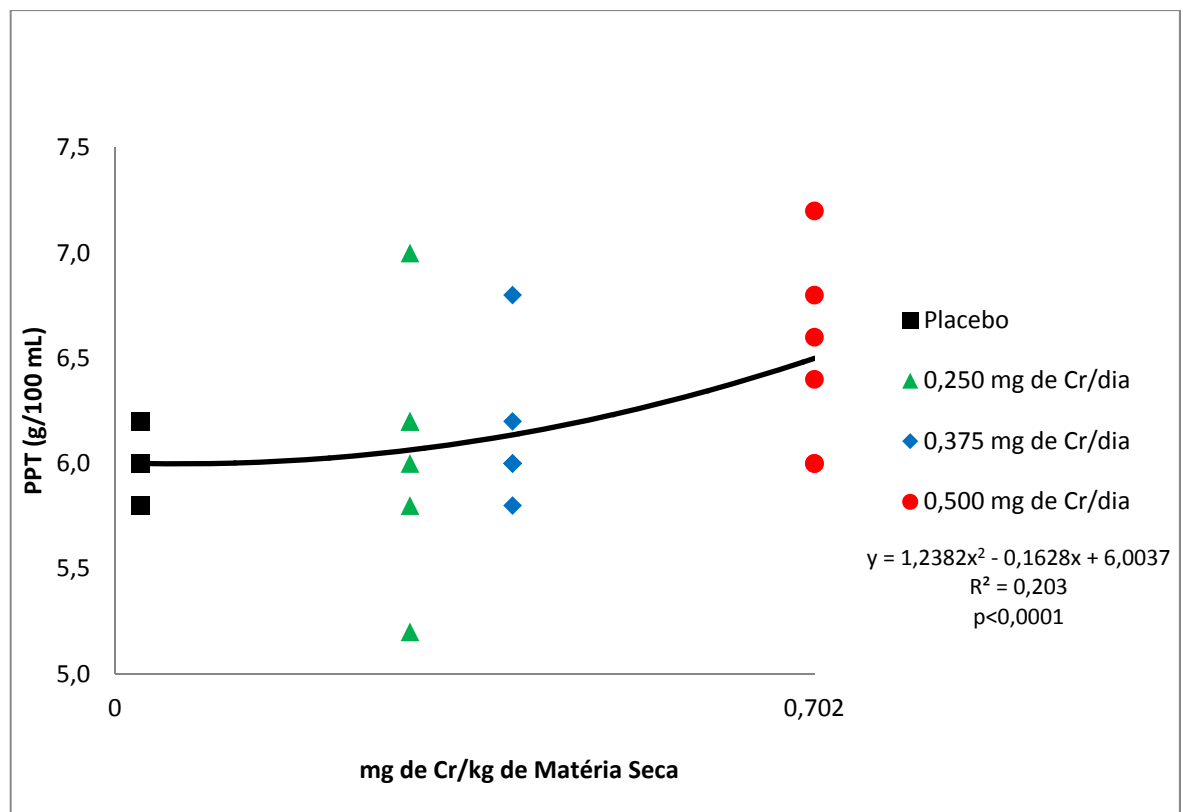


Figura 3.3. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre PPT de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 56º dia do experimento.

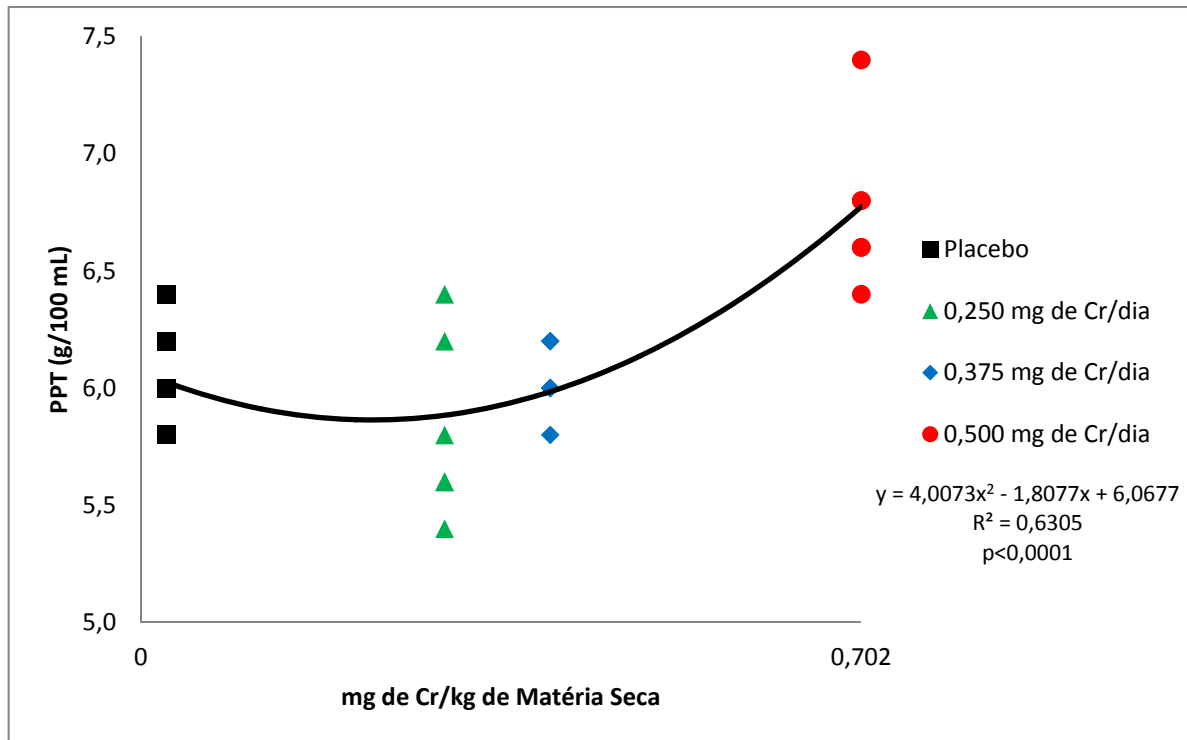


Figura 3.4. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre PPT de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 84º dia do experimento.

3.5.3. Leucograma

Nenhuma das variáveis mensuradas no leucograma apresentou influência da interação entre o tempo e o Cr suplementar (Tabela 3.4).

O tempo influenciou LEU ($p=0,0013$), LIN ($p=0,0247$) e SEG ($p=0,0118$), porém, sem padrão temporal. Enquanto MON e EOS apresentaram regressões (positiva e negativa, respectivamente) com a quantidade de Cr suplementar dietético no 56º dia do experimento (Figuras 3.5 e 3.6).

Tabela 3.4. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre o número de leucócitos, monócitos, linfócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.

Dia	Tratamento (mg de Cr/dia)				DPM ¹	Nível de Significância	Valor de referência* (média)
	Placebo	0,250	0,375	0,500			
	Leucócitos (x 10 ³ /μL)						
0	8033,3	8875,0	9783,3	10083,3	2442	ns ²	4000-12000
14	10250,0	9241,7	9225,0	9808,3	3524	ns	(8000)
28	11275,0	9441,7	11616,7	9425,0	2993	ns	
42	8491,7	9050,0	10708,3	10571,7	2724	ns	
56	8016,7	9066,7	9800,0	9483,3	2474	ns	
70	8583,3	9316,7	8516,7	9525,0	2297	ns	
84	7408,3	8133,3	7716,7	8816,7	2570	ns	
	Monócitos (x 10 ³ /μL)						
0	133,5	420,5	316,8	395,7	313	ns	0-750
14	170,2	217,5	74,7	292,3	173	ns	(200)
28	65,5	120,7	295,0	93,7	177	ns	
42	207,3	90,0	230,0	323,7	179	ns	
56	44,2	116,8	139,5	298,7	154	ns	
70	180,3	367,0	388,2	197,5	316	ns	
84	164,3	293,3	366,2	227,0	203	ns	
	Linfócitos (x 10 ³ /μL)						
0	4816,7	4444,2	5057,8	4579,0	1555	ns	2000-9000
14	5064,0	5733,3	5861,8	4976,8	2556	ns	(5000)
28	5401,7	4822,3	6719,5	3785,7	2291	ns	
42	5166,3	5433,0	5838,0	6298,2	2099	ns	
56	3929,3	4520,0	4766,0	4574,2	1575	ns	
70	5089,0	5567,2	4847,0	5158,2	1606	ns	
84	4419,0	4481,7	4119,2	4983,2	1751	ns	
	Segmentados (x 10 ³ /μL)						
0	2715,3	3783,8	4234,2	4923,2	1868	ns	
14	4607,8	3117,8	3130,8	4342,5	2157	ns	700-6000
28	5411,3	4225,5	4310,2	5315,8	2156	ns	(2400)
42	2885,7	3179,5	4168,2	3748,2	1459	ns	
56	3860,7	4186,7	4686,2	4532,3	1672	ns	
70	3111,2	3187,7	3063,3	4009,3	1246	ns	
84	2556,2	3095,7	3093,7	3373,7	1010	ns	
	Eosinófilos (x 10 ³ /μL)						
0	347,5	187,5	175,0	186,2	192	ns	0-1000
14	407,8	173,3	158,0	155,0	262	ns	(400)
28	396,8	273,8	291,3	292,0	316	ns	
42	220,5	348,0	180,8	193,8	215	ns	
56	183,0	244,2	209,2	39,3	159	ns	
70	203,7	178,5	199,3	150,0	202	ns	
84	269,3	262,8	137,7	233,0	158	ns	

	Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)						
0	20,3	39,7	0,0	0,0	37	ns	0-300
14	0,0	0,0	0,0	41,7	26	ns	(50)
28	0,0	0,0	0,0	0,0	0	.	
42	0,0	0,0	0,0	0,0	0	.	
56	0,0	0,0	0,0	39,2	24	ns	
70	0,0	16,7	16,0	10,2	26	ns	
84	0,0	0,0	0,0	0,0	0	.	

¹DPM = desvio padrão médio (n=6);

²ns = não significativo;

*De acordo com Jain (1993).

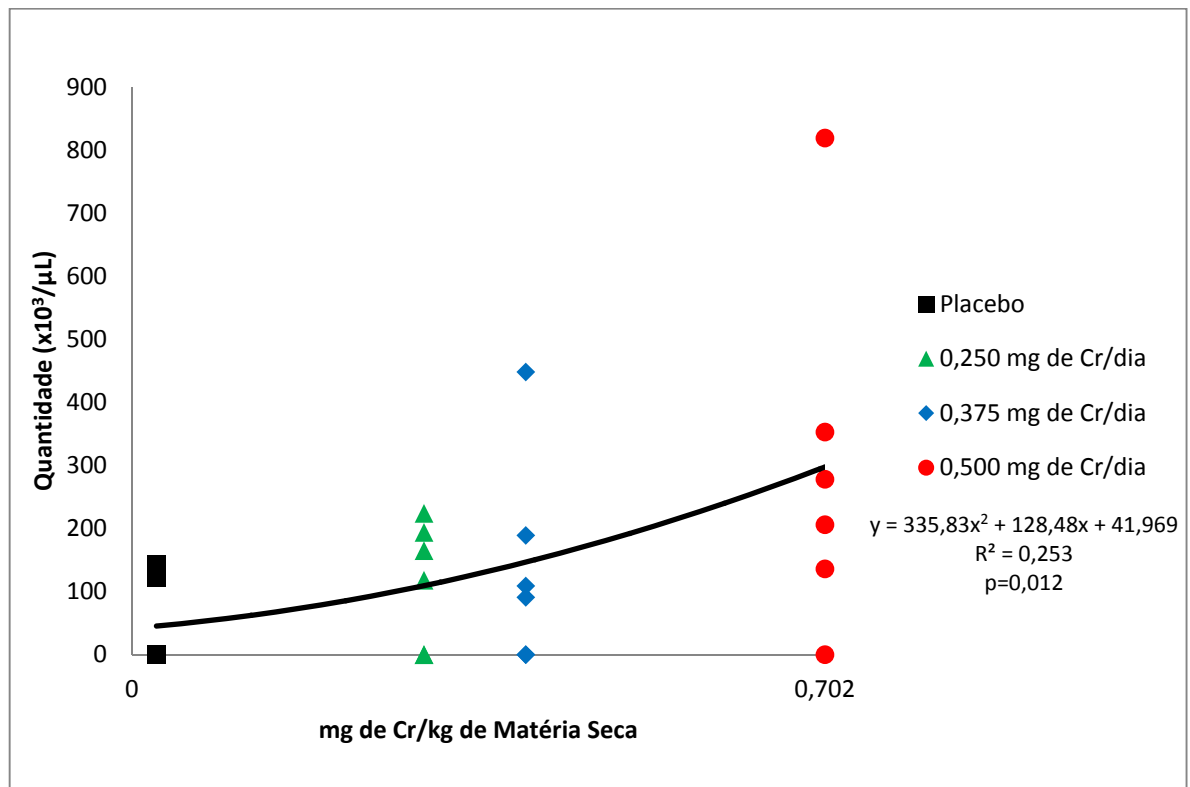


Figura 3.5. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a quantidade de monócitos de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 56º dia do experimento.

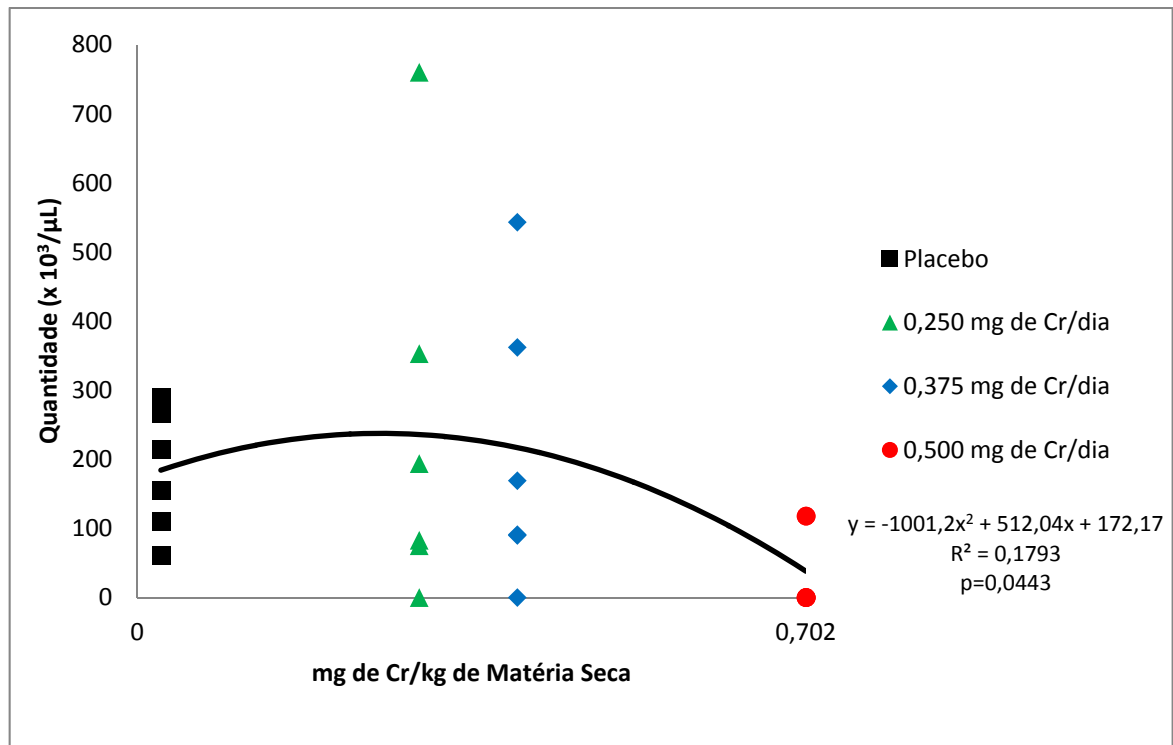


Figura 3.6. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a quantidade de eosinófilos de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 56º dia do experimento.

3.5.4. Bioquímico Sérico

A glicose sérica, o colesterol e a concentração de HDL não foram influenciados pela suplementação de Cr. Efeitos da interação entre o tempo e a suplementação de CrPic foram observados nos dias 70 e 84 de experimentação sobre a concentração de triglicerídios séricos ($p=0,0029$ e $p=0,0347$, respectivamente) (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre glicose sérica, colesterol, HDL e triglicerídios séricos em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.

Dia	Tratamento (mg de Cr/dia)				DPM ¹	Nível de Significância	Valor de referência* (média)
	Placebo	0,250	0,375	0,500			
	Glicose (mg/100 mL)						
0	66,3	65,0	64,2	64,0	10,4	ns ²	50-80
14	59,0	59,2	61,7	61,7	5,0	ns	(68 ± 6)
28	60,8	61,2	67,7	61,8	9,5	ns	
42	42,0	46,8	48,5	49,8	13,7	ns	
56	67,3	58,3	63,7	56,7	9,0	ns	
70	62,0	63,2	72,0	75,8	13,8	ns	
84	51,3	47,7	52,7	50,7	5,0	ns	
	Colesterol (mg/100 mL)						52-76
0	29,8	39,3	40,0	36,5	8,9	ns	(64 ± 12)
14	29,3	29,0	30,7	33,7	8,0	ns	
28	32,8	37,5	41,2	37,7	8,3	ns	
42	33,3	34,8	38,8	35,2	5,7	ns	
56	33,5	33,0	38,5	32,2	8,5	ns	
70	37,7	34,2	41,5	34,8	7,0	ns	
84	57,2	50,3	59,2	52,7	10,3	ns	
	HDL (mg/100 mL)						-
0	19,7	21,9	23,8	25,1	5,6	ns	
14	158,8	147,2	160,6	148,1	45,0	ns	
28	123,4	123,4	140,8	141,7	25,1	ns	
42	117,6	110,7	127,7	114,8	20,6	ns	
56	18,8	19,7	19,5	16,4	3,9	ns	
70	133,7	117,6	138,8	132,4	32,3	ns	
84	12,3	12,4	14,9	14,7	5,1	ns	
	Triglicerídios (mg/100 mL)						-
0	75,5	107,8	319,7	80,5	216,6	ns	
14	10,2	9,3	12,2	12,2	4,7	ns	
28	16,7	82,7	166,2	34,2	112,7	ns	
42	11,5	15,3	15,0	17,0	5,5	ns	
56	22,2	20,7	26,3	20,2	15,8	ns	
70	21,0 ^a	14,0 ^b	19,7 ^{ab}	23,5 ^a	3,7	0,0029	
84	21,3	11,0	19,0	11,2	6,3	0,0347	

¹DPM = desvio padrão médio (n=6);²ns = não significativo;

*De acordo com Kaneko et al. (2008).

As concentrações de AST, GGT, Uréia e Creatinina não foram modificadas pela adição do CrPic à dieta (Tabela 3.6). Embora não tenha sido observado padrão temporal

sobre esses resultados, o tempo exerceu influência ($p < 0,0001$) sobre todos os parâmetros bioquímicos séricos mensurados.

Tabela 3.6. Efeito da concentração de Cr dietético e tempo de experimento sobre AST, GGT, Uréia sérica (BUN) e Creatinina em ovinos Santa Inês controle e suplementados com CrPic.

Dia	Tratamento (mg de Cr/dia)				DPM ¹	Nível de Significância	Valor de referência* (média)
	Placebo	0,250	0,375	0,500			
AST (UI/L)							
0	188,5	156,9	273,0	180,1	88,9	ns ²	60-280
14	78,9	83,6	86,3	97,5	19,8	ns	(307 ± 43)
28	94,7	89,1	108,6	121,6	20,3	ns	
42	131,8	134,6	167,1	163,4	42,4	ns	
56	82,6	77,0	89,1	92,8	22,9	ns	
70	98,4	103,9	106,8	107,7	26,8	ns	
84	86,3	83,6	91,0	66,8	27,4	ns	
GGT (UI/L)							
0	29,2	31,3	29,3	40,8	9,8	ns	20-52
14	32,3	27,2	25,2	37,7	11,2	ns	(33,5 ± 4,3)
28	41,8	47,0	45,0	51,5	13,3	ns	
42	33,5	36,7	37,7	39,8	12,3	ns	
56	41,0	42,8	38,5	55,8	18,5	ns	
70	30,2	39,7	27,0	32,3	9,5	ns	
84	20,8	24,2	27,2	25,0	8,8	ns	
BUN (mg/100 mL)							
0	50,0	45,0	47,8	40,0	13,5	ns	8-20
14	26,3	15,2	19,7	16,8	8,7	ns	
28	27,5	18,7	19,7	22,5	8,4	ns	
42	35,2	30,2	33,8	36,7	6,5	ns	
56	28,7	23,5	23,5	22,8	5,5	ns	
70	29,7	31,2	26,0	27,2	4,8	ns	
84	26,3	21,3	23,5	21,7	4,8	ns	
Creatinina (mg/100 mL)							
0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,1	ns	1,2-1,9
14	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	ns	
28	0,6	0,6	0,6	0,5	0,1	ns	
42	0,7	0,7	0,7	0,6	0,1	ns	
56	0,7	1,1	0,8	0,9	0,3	ns	
70	0,6	0,6	0,7	0,7	0,1	ns	
84	0,5	0,6	0,6	0,5	0,2	ns	

¹DPM = desvio padrão médio (n=6);

²ns = não significativo;

*De acordo com Kaneko et al. (2008).

No dia 70 de experimentação, a concentração de triglicerídios apresentou regressão quadrática positiva ($p=0,0239$) em relação à quantidade de Cr suplementar (Figura 3.7).

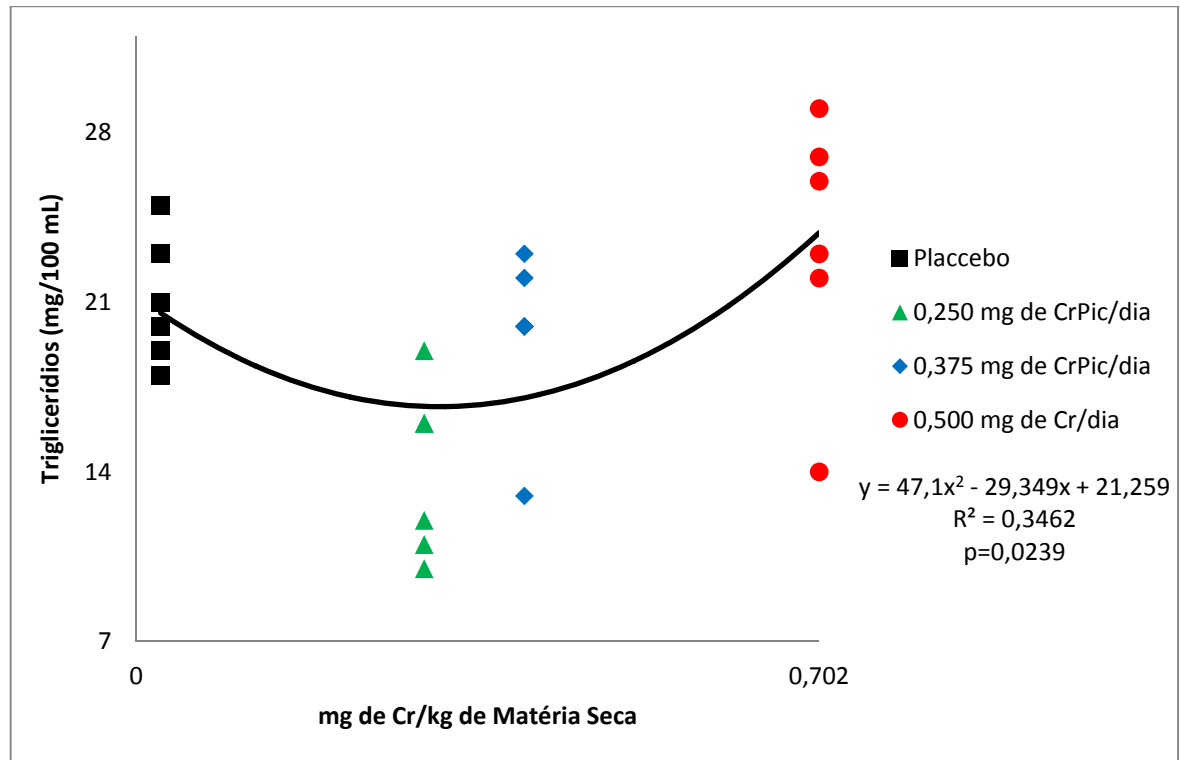


Figura 3.7. Efeito da concentração de Cr suplementar sobre a concentração de triglicerídios séricos de ovinos SI controle e suplementados com CrPic no 70º dia do experimento.

3.5.5. Histopatologia

O exame ao microscópio óptico indicou estrutura arquitetônica normal nos órgãos avaliados dos animais controles (placebo), exceto para os pulmões que, independentemente do nível de Cr suplementar, se apresentaram com extenso tecido linfóide broncoassociado (BALT) e espessamento difuso do septo alveolar (Figura 3.8).

No músculo cardíaco não foram verificadas alterações histopatológicas.

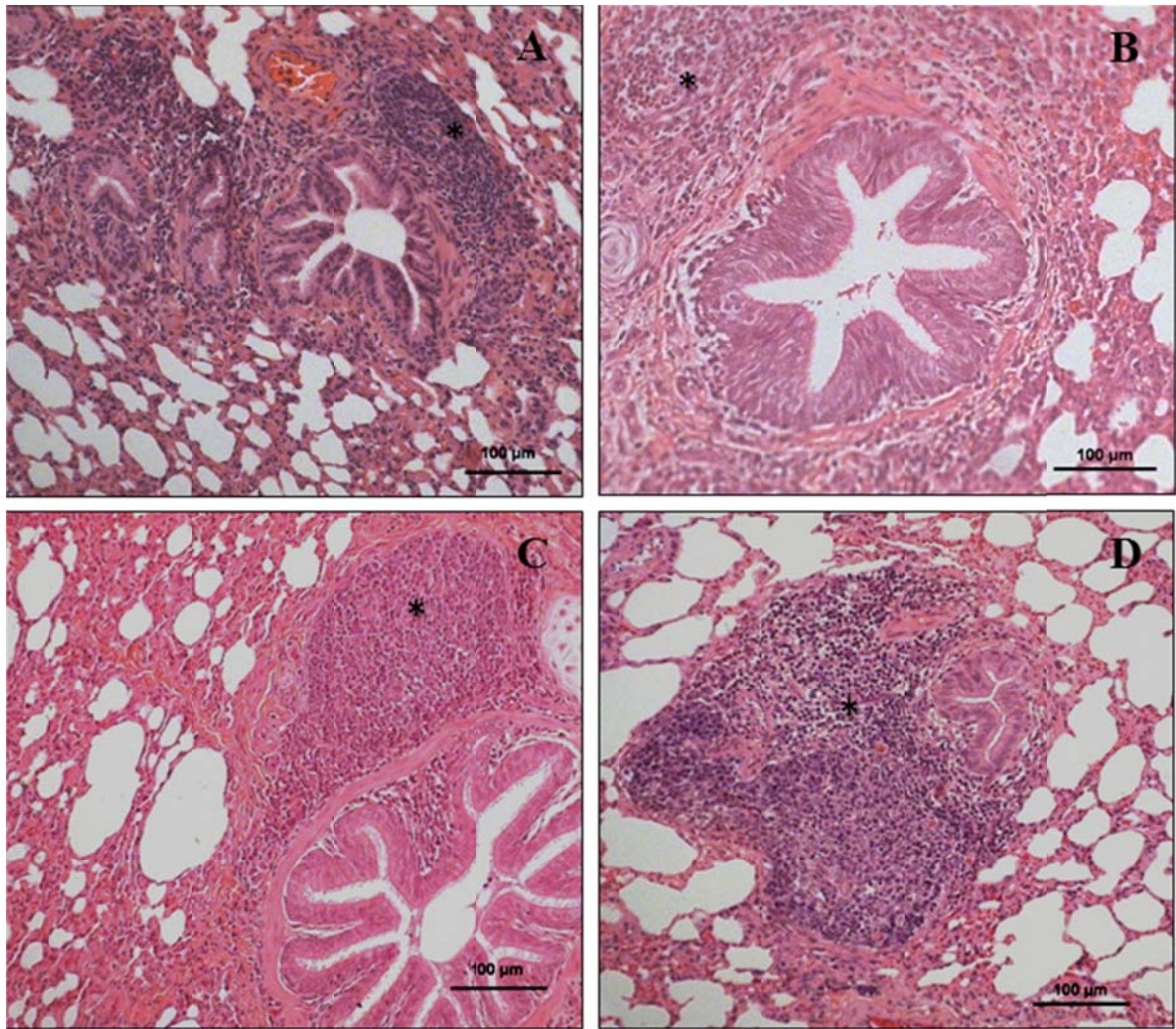


Figura 3.8. Fotomicrografia de pulmão de animal controle (A), suplementado com 0,250 mg de CrPic/dia (B), suplementado com 0,375 mg de CrPic/dia (C) e suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (D). O asterisco (*) denota a presença de tecido linfoide broncoassociado – BALT. Notar o espessamento dos septos alveolares em todos os tratamentos. Aumento de 20x (HE).

Um animal (16%) suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia apresentou lesões hepáticas com marcante vacuolização do parênquima na região periportal além de infiltrado inflamatório linfocítico leve nessa região (Figura 3.9D). Em adição, um dos animais (16%) suplementados com 0,375 mg de CrPic/dia apresentou regiões difusas de infiltrado inflamatório linfocítico leve, porém a arquitetura do órgão estava preservada, sem indícios de dano hepatobiliar (Figura 3.9C).

Os rins também se apresentaram hígidos, à exceção de alguns glomérulos com espessamento de cápsula de Bowman nas lâminas oriundas de dois animais (33%) suplementados com 0,500 mg de CrPic/dia (Figura 3.10).

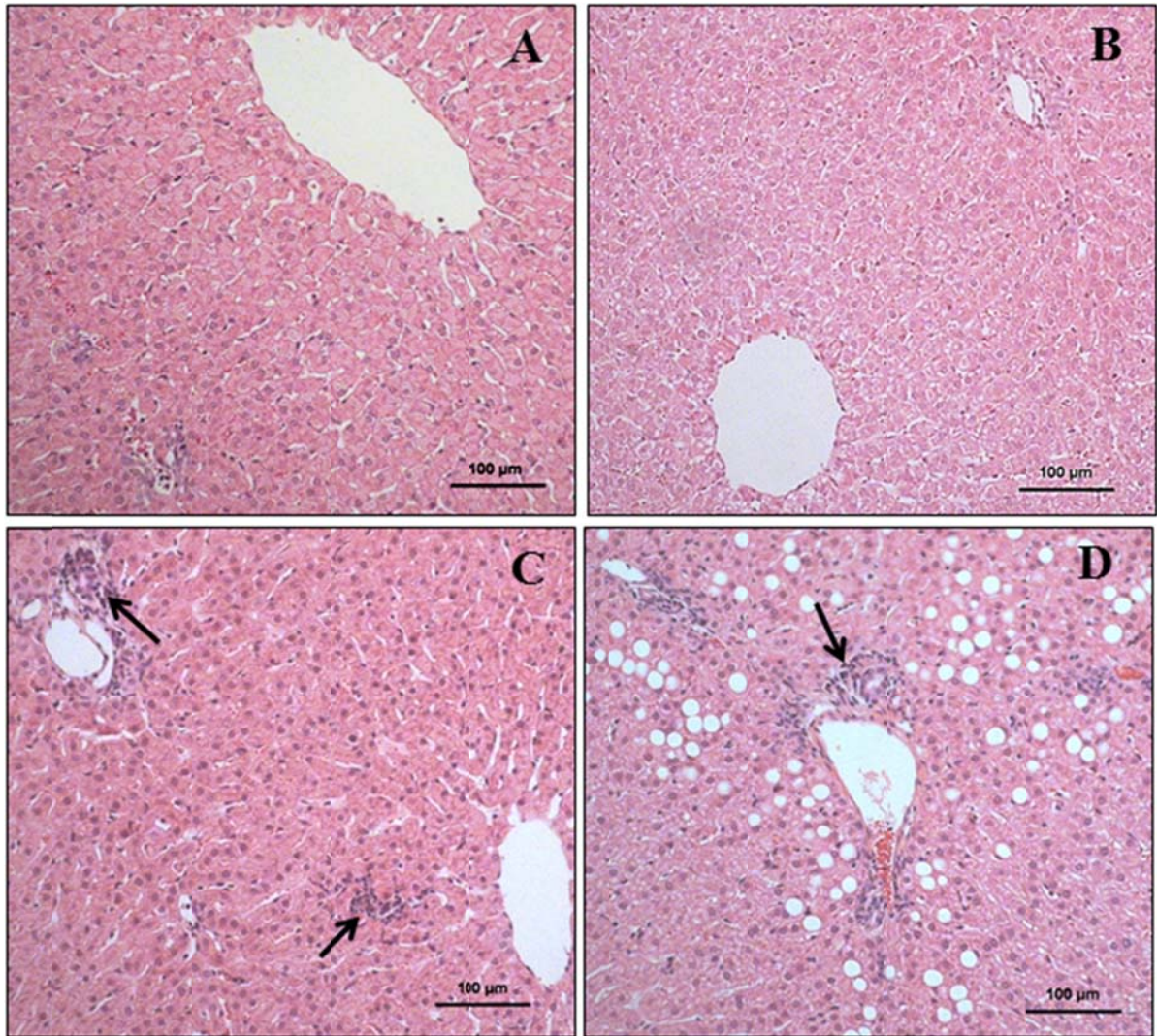


Figura 3.9. Fotomicrografia de fígado de animal controle (A), suplementado com 0,250 mg de CrPic/dia (B), suplementado com 0,375 mg de CrPic/dia (C) e suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (D). As setas (→) indicam a presença de infiltrado inflamatório linfocítico. Em (D) marcante vacuolização na região periportal de um (16%) animal suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia. Aumento de 20x (HE).

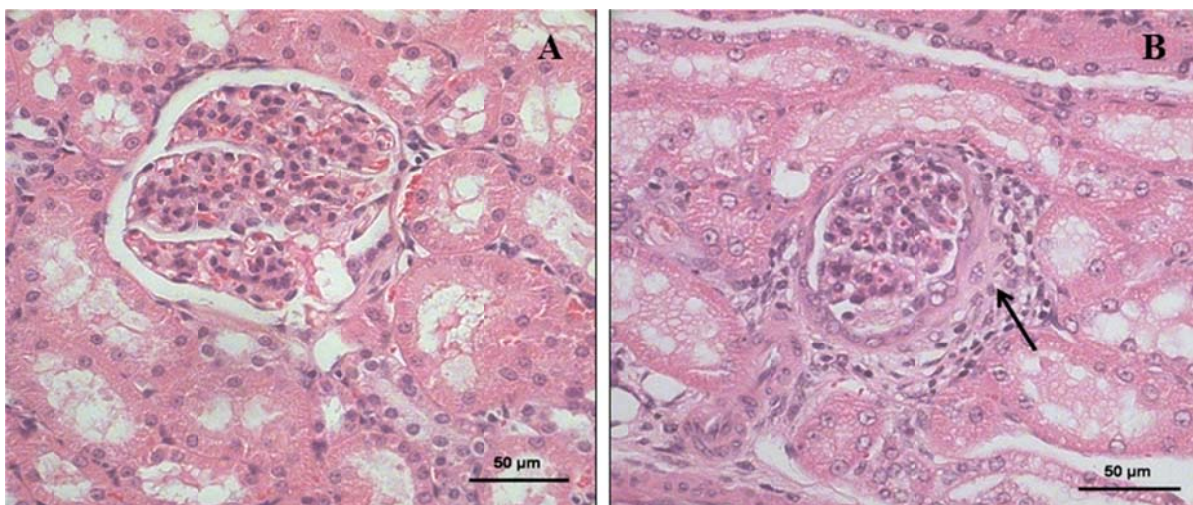


Figura 3.10. Glomérulo de animal controle (A) e suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (B). A seta (→) indica o espessamento da cápsula de Bowman. Aumento de 40x (HE).

A extensa retração das células de Leydig observada em todas as amostras pode ter ocorrido como artefato de preservação, uma vez que os testículos foram fixados em formol 10% tamponado. Contudo, a morfologia e arquitetura da região interna dos túbulos seminíferos foi preservada. No geral, diferentes graus de maturação da gônada foram observados, entretanto, em um dos animais (16%) suplementados com 0,500 mg de CrPic/dia não houve indícios de espermatogênese e apenas uma a duas camadas de células primordiais na base do epitélio seminífero (Figura 3.11C, D).

Em adição, embora os animais estivessem com cerca de 28 semanas de idade (a puberdade em ovinos SI ocorre em $28,2 \pm 0,8$ semanas, de acordo com Souza et al., 2010), o fato de que os túbulos seminíferos desse animal estavam pÉrvios e, portanto com ampla luz, afastam a possibilidade de que o animal ainda não havia atingido a puberdade (Aguiar et al., 2006) e, assim, já deveria apresentar certo grau de espermatogênese, o que, de fato não foi observado.

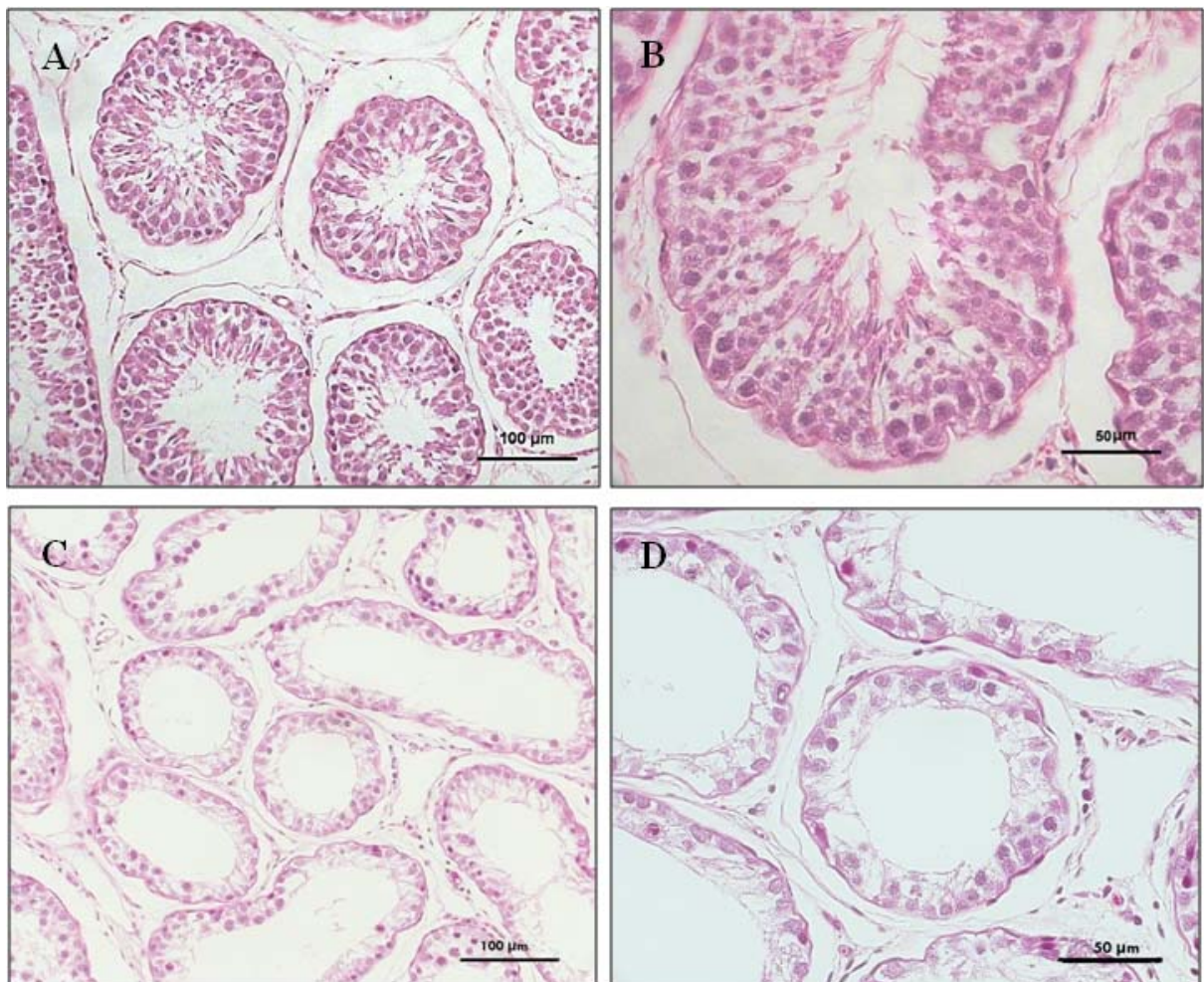


Figura 3.11. Testículo de animal controle (A – aumento de 20x e B – aumento de 40x) e testículo de um animal (16%) suplementado com 0,500 mg de CrPic/dia (C – aumento de 20x e D – aumento de 40x). Observar a ausência de espermatogênese em túbulos seminíferos pÉrvios em C e D. (HE).

Tabela 3.7. Resumo dos achados histopatológicos em ovinos SI controle e suplementados com CrPic de acordo com a suplementação dietética de Cr.

Órgão	Alteração		Tratamento (mg de CrPic/dia)				
			Placebo	0,250	0,375	0,500	
Pulmão	BALT*	Presença	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	ns ¹
		Intensidade	+++	+++	+++	+++	
	Espessamento de Septo Alveolar	Presença	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	ns
		Intensidade	+++	+++	+++	+++	
Fígado	Infiltrado Inflamatório	Presença	0/6 (0%)	0/6 (0%)	2/6 (33%)	1/6 (16%)	ns
		Intensidade	-	-	+	+	
	Vacuolização Periportal	Presença	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	1/6 (16%)	ns
		Intensidade	-	-	-	++	
Rim	Espessamento de Cápsula de Bowman	Presença	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	2/6 (33%)	ns
		Intensidade	-	-	-	+	
Testículo	Ausência de Espermatogênese	Presença	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	1/6 (16%)	ns
		Intensidade	-	-	-	+++	

¹ns = não significativo;

*BALT = tecido linfoide broncoassociado.

3.6. Discussão

As funções vitais desempenhadas pelo sangue, bem como a alta capacidade de proliferação e a susceptibilidade à intoxicação, fazem do tecido hematopoiético e sanguíneo órgãos-alvo de especial interesse aos possíveis agentes tóxicos. De acordo com Klaassen (2001), o sangue, o fígado e os rins figuram entre os órgãos de maior importância na avaliação toxicológica de populações expostas a elementos potencialmente tóxicos, como o Cr. Por ser um tecido de grande capacidade proliferativa e de regeneração, o sangue é particularmente sensível a agentes antimitóticos e a efeitos secundários de substâncias capazes de afetar o suprimento de nutrientes, a excreção de toxinas e metabólitos e a produção de fatores vitais para a manutenção da homeostase. Contudo, pelo menos com as doses administradas e o período experimental testado neste experimento, não houve indícios de que o CrPic tenha ação tóxica sobre o tecido hematopoiético: a exceção de valores marginalmente abaixo dos índices de referência para PPT e Hb, não houve alterações dignas de nota nos resultados dos animais suplementados com o mineral.

As diferenças detectadas nos parâmetros eritrocitários entre os tratamentos nos diferentes dias de experimentação não são consistentes, pois não persistiram no decorrer do tempo ou só foram observadas no último dia de experimentação, de modo que inferências quanto a manutenção e consolidação desses padrões não podem ser extrapoladas para além de 84 dias de suplementação com CrPic. Desse modo, a necessidade apontada por Hepburn e Vincent (2002) de que estudos visando avaliar os efeitos crônicos da utilização de CrPic são importantes, é fortalecida pelos resultados apresentados neste experimento. Contudo, nossos resultados sugerem vantagens sutis aos animais suplementados com o mineral. Por exemplo, VG mais elevado (Figura 3.1) ou PPT em maior quantidade (Figuras 3.3 e 3.4) representam, ao menos em princípio, menor propensão a anemias e a disproteinemias, respectivamente (Kaneko et al., 2008).

Em relação à concentração de Hb, o significado prático das alterações observadas aqui é ínfimo, visto que os resultados mantiveram-se dentro dos valores de referência para a espécie (9-15 g/100 mL, de acordo com Jain, 1993). Entretanto, concentração mais elevada de Hb representa maior capacidade de carreamento de oxigênio para o animal. Assim, ao menos no dia 84, os animais suplementados estavam em vantagem biológica em relação aos animais controle.

As concentrações elevadas de CHCM nos dias 56 e 70 devem ter ocorrido em função de hemólise *in vitro* uma vez que hiper Cromia (aumento da quantidade de Hb nas hemácias) verdadeira não existe (Thrall, 2007) e os valores deste parâmetro apresentaram-se uniformemente elevados em todos os tratamentos.

O estudo e acompanhamento das células brancas do sangue tem sido utilizado para a detecção e interpretação de alterações toxicológicas, inflamatórias e emocionais. Nesse sentido, a ausência de alterações no leucograma observada aqui, indicam que a suplementação de CrPic não apresenta efeito direto sobre a produção de leucócitos, pois a quantidade dessas células permaneceram dentro dos intervalos de referência ($4000-12000 \times 10^3/\mu\text{L}$, de acordo com Jain, 1993). Em adição, a contagem diferencial de leucócitos corrobora com essa tese, uma vez que não há alteração na proporção normal das linhagens leucocitárias. Contudo, isso não exclui a possibilidade de prejuízos ao sistema imunitário, pois aqui não há referência à capacidade funcional das células de defesa do organismo. De fato, Dallago (2008) utilizando estes mesmos animais, revelou prejuízos associados à suplementação de CrPic ao menos à função dos linfócitos.

A elevação na quantidade de monócitos no 56º dia de experimentação (Figura 3.5) não foi suficiente para ultrapassar o limite superior do valor de referência para a espécie

($0-750 \times 10^3/\mu\text{L}$, de acordo com Jain, 1993) e tão pouco houve consolidação desse padrão, que voltou a não apresentar diferenças significativas entre os tratamentos no 70º dia experimental. Em adição, a monocitose por si só não é uma alteração muito relevante, exceto quando a concentração celular está muito além do normal (Thrall, 2007), o que não foi o caso.

Por outro lado, a redução na quantidade de eosinófilos observada no 56º dia de experimentação pode não ter qualquer significado clínico ou toxicológico uma vez que valores tão baixos quanto o valor nulo são normais para esse parâmetro. Em adição a falta de consolidação nesse padrão no decorrer do tempo corrobora com a insignificância do achado.

A associação entre a suplementação de Cr, o metabolismo de carboidratos e a glicemia é inegável (Zanetti et al, 2003; Pechova e Pavlata, 2007). Uyanik (2001) observou leves reduções na glicemia de cordeiros suplementados com 200 μg de Cr/kg da dieta sob a forma de CrCl_3 , enquanto Zanetti et al. (2003) verificaram a tendência de animais suplementados com CrPic em eliminar a glicose mais rapidamente. Kitchalong et al. (1995) relataram resultados semelhantes aos observados neste experimento ao suplementar cordeiros em crescimento com 0,250 mg de CrPic/kg. Nesses experimentos as concentrações de glicose sérica não estiveram alteradas durante o período de suplementação. Isso corrobora com a hipótese ratificada por Dallago et al. (2011) de que os efeitos do Cr suplementar somente são notados quando na presença de fatores estressantes. Quando não há a presença de um fator estressor, a suplementação com o elemento-traço parece não afetar de forma significativa o metabolismo de carboidratos (Swanson et al., 2000; Dallago et al., 2011). Isto pode estar relacionado ao papel potencializador exercido pelo Cr sobre a insulina, pois na presença de um estressor a demanda metabólica por carboidratos tornar-se-ia aumentada, elevando a glicemia e causando conseqüente mobilização de Cr para atuar junto à insulina. Em seguida, o Cr utilizado seria excretado via urina, o que elevaria a concentração de Cr urinário e reduziria a concentração de Cr no organismo. No caso de um animal suplementado com o mineral, o Cr perdido via urina seria repostado pelo Cr suplementar, suprindo a demanda orgânica pelo mineral. Em um animal não suplementado, a ação da insulina ficaria prejudicada em virtude da ausência de Cr na quantidade demandada pelo organismo. Assim, o aporte de glicose para as células estaria diminuído, reduzindo a quantidade de energia prontamente disponível a estas.

Na ausência de agente estressor, a demanda por Cr não se elevaria, de maneira tal que o Cr suplementar não seria requisitado pelo organismo e, portanto, a suplementação seria dispensável.

A mesma linha de pensamento pode ser utilizada para explicar a ausência de diferenças entre os tratamentos em relação à concentração de colesterol sérico e HDL. Entretanto é incapaz de explicar os efeitos sobre os triglicerídios séricos. Estudos sugerem que o Cr é necessário para o metabolismo normal de lipídios (Kitchalong et al., 1995). De acordo com Lefavi et al. (1993) e Anderson (1995), a suplementação com esse elemento-traço reduz as concentrações totais de colesterol, aumentando a proporção de HDL e diminuindo a proporção de LDL e triacilgliceróis. Uyanik (2001) observou reduções na concentração de triglicerídios nos cordeiros tratados com Cr. Por outro lado, Sano et al. (1999) não verificaram alterações nas concentrações séricas de glicose e de ácidos graxos não esterificados em ovinos suplementados com Cr. Assim, há indícios de que os efeitos da suplementação de Cr nesses parâmetros nem sempre são consistentes.

Independentemente disso, Lefavi et al. (1993) afirmaram que os efeitos desse mineral sobre o metabolismo lipídico são independentes dos efeitos sobre o metabolismo da glicose, o que explicaria os resultados observados aqui para os triglicerídios séricos. Contudo, esse conceito é, no mínimo, passível de críticas, sobretudo pelo fato de que o metabolismo lipídico depende, ao menos em parte, do metabolismo de carboidratos. Em adição, o simples fato de que o Cr possa ser um agente hepatotóxico já seria o suficiente para suscitar a possibilidade do mineral influenciar o metabolismo lipídico-energético.

As mensurações das enzimas hepáticas (AST e GGT) permaneceram dentro dos valores de referência em quase todos os dias de experimentação (exceto no dia 56 para os animais suplementados com 0,500 mg de CrPic/dia), afastando a hipótese de danos hepáticos causados pela suplementação de CrPic. Mesmo nos animais que apresentaram média alterada no dia 56, o rápido retorno à normalidade dos valores de GGT (dia 70) refletem a possibilidade de causas exógenas para o aumento da concentração dessa enzima no soro. Ademais, a análise histopatológica apoia os achados da análise bioquímica sérica, tanto no que se refere ao fígado, quanto no que tange à função renal. Assim, embora muitos trabalhos apontem o CrPic como um elemento tóxico (Hepburn e Vincent, 2002; Stearns et al., 2002; Levina e Lay, 2008), os achados deste experimento refutam essa hipótese em virtude da ausência estatística de sinais de toxicidade. Por outro lado, o fato de que alguns animais suplementados com o CrPic apresentaram lesões hepáticas, renais e principalmente testiculares indica a necessidade de estudos mais aprofundados nesse sentido ou por períodos mais prolongados de suplementação.

As lesões pulmonares observadas neste experimento podem ser devido à forma de apresentação do alimento aos animais: o concentrado fornecido era farelado e possuía

baixa granulometria, sendo facilmente aspirado. Assim, as diminutas partículas de concentrado podem ter elicitado resposta imunológica local nos pulmões, culminando com acentuada proliferação de tecido linfóide broncoassociado (BALT). Isso pode ser uma explicação para o fato de que também nos animais controle houve alterações no tecido pulmonar. Em adição, os pulmões possuem seus próprios meios de oxidar substâncias nocivas complementarmente ao fígado. Essas reações de detoxificação normalmente transformam substâncias menos tóxicas em substâncias mais tóxicas, porém com menor tempo de meia-vida (Maxie, 2007). Talvez com a presença extra de Cr devido à suplementação, os pulmões tenham aumentado a intensidade desse processo, elevando a concentração do elemento-traço neste órgão (fato observado no experimento complementar a este – segundo capítulo desta tese). Independentemente disso, esse mecanismo de detoxificação foi bem descrito por Levina e Lay (2008) e comprovadamente ocorre com o CrPic, onde a molécula de Cr³⁺, acaba por se transformar em Cr²⁺ ou em Cr⁶⁺, que são mais reativas. Por sua vez, o sistema respiratório é o principal alvo de toxicidade do Cr⁶⁺ com uma série de patologias associadas à exposição crônica ao mineral (EPA, 1998).

Os valores acentuadamente elevados de uréia sérica observados em todos os tratamentos é explicado pela adição desse composto na dieta à base de 3,5%. Assim, o aporte de nitrogênio ureico foi aumentado. Por conseguinte, a excreção desse composto também o foi.

A creatinina é um metabólito secundário do metabolismo proteico. Os valores baixos de creatinina sérica estão associados à redução da massa muscular, aporte dietético insuficiente de proteínas ou doença hepática concorrente (Russel e Roussel, 2007). No entanto, experimentos realizados por Forbes et al. (1998) e Kegley e Spears (1999) indicaram não haver perda de tecido muscular em virtude da suplementação com o mineral e Mostafa-Tehrani et al. (2006) observaram melhorias na composição de carcaça de ovinos suplementados com nicotinato de Cr e com cloreto de Cr. No presente experimento as possibilidades indicadas pela literatura consultada para as baixas concentrações de creatinina, não procedem.

De fato, os resultados quanto à avaliação de carcaça destes animais não demonstraram redução de peso em nenhum dos cortes cárneos realizados (comunicação pessoal), a concentração dietética de proteínas foi adequada durante todo o experimento e não houve indícios de doença hepática concomitante. Conquanto valores de referência para a creatinina na raça Santa Inês não tenham sido estabelecidos, especialmente em cordeiros em

crescimento, há a possibilidade de que esta raça tenha como normal, valores relativamente baixos de creatinina.

3.7. Conclusão

Embora a suplementação com CrPic não tenha se provado tóxica ou capaz de alterar os parâmetros sanguíneos de forma consistente, a utilização de CrPic como suplemento alimentar permanece sob suspeita, especialmente pelos achados histopatológicos no fígado, rim e testículo de animais suplementados com o mineral.

3.8. Agradecimentos

Este experimento foi financiado pelo CNPq (INCT-IGSPB e Universal), FAP-DF, FINATEC e ao Programa de Cooperação CAPES/PROCAD Novas Fronteiras 2007. Agradecimentos especiais ao Laboratório de Microscopia Eletrônica/UnB, Embrapa-CPAC e à Escola de Veterinária-UFMG pela cessão das instalações e equipamentos.

3.9. Aprovação do Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal – CEUA/UnB, processo nº 033/2009.

3.10. Referências

- Aguiar, G.S.; Araújo, A.A.; Moura, A.A.A. (2006). Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1629-1638.
- Anderson, R. A. (1987). Chromium. In: Mertz, E. Trace elements in human and animal nutrition. 1st edition. New York: Academic Press, p.225-244.
- Anderson, R.A. (1995). Chromium, glucose tolerance, diabetes and lipid metabolism. **Journal of Advanced Medicine**, v. 8, p. 37-49.
- Dallago, B.S.L. (2008). Efeitos da suplementação de cromo (Cr) sobre o desempenho produtivo, a população de protozoários ruminais e a resposta imunitária em ovinos. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, Brasília, 2008.
- Dallago, B.S.L.; McManus, C.M.; Caldeira, D.F. et al. (2011). Performance and ruminal protozoa in lambs with chromium supplementation. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 253-256.
- EPA - U.S. Environmental Protection Agency. (1998). Toxicological review of trivalent chromium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- Forbes, C.D.; Fernandez, J.M., Bunting, L.D. et al. (1998). Growth and metabolic characteristics of Suffolk and Gulf Coast Native yearling ewes supplemented with chromium tripicolinate. **Small Ruminant Research**, v. 28, p. 149-160.
- Hepburn, D.D.; Vincent, J.B. (2002). In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, p. 93-100.
- Hodgson, E.; Cope, W.G.; Leidy, R.B. (2004). Classes of Toxicants: Use Classes. In: Hodgson, E. A Textbook of Modern Toxicology. 3rd edition. New Jersey: Wiley-Interscience, p.49-74.
- Jain, N. C., 1993. Essentials of veterinary hematology. 417 p. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. (2008). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. San Diego: Academic Press.
- Kegley, E.B.; Spears, J.W. (1999). Chromium and cattle nutrition. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 12, p. 141-147.
- Kitchalong, L.; Fernandez, J.M.; Bunting, L.D. (1995). Influence of Chromium Tripicolinate on Glucose Metabolism and Nutrient Partitioning in Growing Lambs. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2694-2705.

- Klaassen, C.D. (2001). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill: New York. 6th ed.
- Klaassen, C.D. (2006). Metais Pesados e Antagonistas dos Metais Pesados. In: Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11^a edição, Rio de Janeiro: McGrawhill, p. 1585-1605.
- Lefavi, R.G.; Wilson, G.D.; Keith, R.E. (1993). Lipid-lowering effect of a dietary chromium (III)-nicotinic acid complex in male athletes. **Nutrition Research**, v.13, p. 239-249.
- Levina, A.; Lay, P.A. (2008). Chemical properties and toxicity of chromium(III) nutritional supplements. **Chemical Research in Toxicology**, v.21, p. 563-571.
- Maxie, M.G. (2007). Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Saunders Elsevier, pp. 2340.
- Merrill, J.C.; Morton, J.J.P.; Soileau, S.D. (2001). Metals. In: Hayes, A. W. Principles and methods of Toxicology. 4th edition. Boston: Taylor & Francis, p. 649-698.
- Mostafa-Tehrani, A.; Ghorbani, G.; Zare-Shahneh, A. et al. (2006). Non-carcass componentes and wholesale cuts of Iranian fat-tailed lambs fed chromium nicotinate or chromium chloride. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 12-19.
- Pechova, A.; Pavlata, L. (2007). Chromium as an Essential Nutrient: a Review. **Veterinari Medicina**, v. 52, p. 1-18.
- Russel, K.E.; Roussel, A.J. (2007). Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, p. 403-426.
- Sano, H.; Kato, Y.; Takebayashi, A. et al. (1999). Effects of supplemental chromium and isolation stress on tissue responsiveness and sensitivity to insulin in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 33, p. 239-246.
- SAS Institute. (1999). SAS statistical package for Windows v. 8.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Silva, D.J.; Queiroz, A.C. (2006). Determinação da Cinza ou Matéria Mineral. In: _____ Análise de Alimentos – Métodos Químicos e Biológicos. p. 77-86.
- Souza, C.E.A.; Araújo, A.A.; Oliveira, J.T.A. et al. (2010). Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 644-653.
- Stearns, D.M.; Silveira, S.M.; Wolf, K.K. (2002). Chromium(III) tris(picolinate) is Mutagenic at the Hypoxanthine (guanine) Phosphoribosyltransferase locus in Chinese Hamster Ovary Cells. **Mutation Research**, v. 513, p. 135-142.
- Stoecker, B.J. (2006). Chromium. In: Shils, M.E.; Shike, M.; Ross, A.C.; Caballero, B.; Cousins, R.L. Modern Nutrition in Health and Disease. 10th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 332-337.

- Subramanian, S.; Rajendiran, G.; Sekhar, P. et al. (2006). Reproductive Toxicity of Chromium in Adult Bonnet Monkeys (*Macaca radiata* Geoffrey). Reversible Oxidative Stress in the Semen. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.215, p. 237-249.
- Swanson, K. C.; Harmon, D.L.; Jacques, K.A. et al. (2000). Efficacy of Chromium-yeast Supplementation for Growing Beef Steers. **Animal Feed and Science Technology**, v. 86, p. 95-105.
- Thrall, M.A. (2007). Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª ed. São Paulo: Roca, 582 p.
- Uyanik, F. (2001). The effects of dietary chromium supplementation on some blood parameters in sheep. **Biological Trace Element Research**, v. 84, p. 93-101.
- Vincent, J.B. (2004). Recent Advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutritional Society*, v. 63, p. 41.
- Woski, S.A.; Speetjens, J.K.; Vincent, J.B. (1999). The nutritional supplement chromium (III) tris(picolinate) cleaves DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, p. 483-487.
- Zanetti, M.A.; Salles, M.S.V.; Brisola, M.L. et al. (2003). Desempenho e resposta metabólica de bezerros recebendo dietas suplementadas com Cr. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1532-1535.

CAPÍTULO 4
CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1. Considerações Finais

Embora a indústria de suplementos alimentares a animais de produção estimulem indiscriminadamente o uso de CrPic na alimentação animal, a adição de Cr na dieta deve ocorrer de forma cuidadosa, especialmente pela ausência de provas de sua inocuidade a longo prazo. Em adição, a possibilidade da ocorrência do processo de bioacumulação e biomagnificação do Cr pela cadeia alimentar eleva ainda mais a necessidade de cautela no momento de proceder com a suplementação mineral aos animais.

Os recentes trabalhos científicos que tentaram analisar a eficácia, inocuidade e necessidade de suplementação mineral com Cr parecem apontar uma mesma direção: a de que a utilização do Cr deve ocorrer de forma estratégica, quando elementos estressantes possam estar presentes no processo produtivo. Nesse sentido, experimentos com maior tempo de suplementação e que envolvam um agente estressor são necessários para elucidar o verdadeiro papel desempenhado pelo Cr no organismo animal e por à prova os resultados obtidos neste trabalho.

Assim, até que as lacunas de conhecimento em relação à exposição a longo prazo e à necessidade de um estressor estejam esclarecidas, a utilização de CrPic na alimentação de ovinos é contraindicada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. (2005). Ativação de Linfócitos T. In: _____. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier. p.169-195.
- Aboul-Enein, H.Y.; Koll, M.; Hoenen, H. (2005). A validated method for analysis of chromium picolinate in nutraceuticals by reversed phase high performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 119-122.
- Abraham, A.S.; Sonnenblick, M.; Eini, M. (1982a). The action of chromium on serum lipids and on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v. 42, p. 185-195.
- Abraham, A.S.; Sonnenblick, M.; Eini, M. (1982b). The effect of chromium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, v.41, p. 371-379.
- Aguiar, G.S.; Araújo, A.A.; Moura, A.A.A. (2006). Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1629-1638.
- Anderson, R. A. (1987). Chromium. In: Mertz, E. Trace elements in human and animal nutrition. 1st edition. New York: Academic Press, p.225-244.
- Anderson, R.A. (1988). Chromium. In: Smith, K.T. Trace Minerals in Food. New York: Marcel Dekker.
- Anderson, R.A. (1994). Stress effects on chromium nutrition of humans and farm animals. In: Lyons, P. & Jacques, K.A. Proceedings of Alltech's 10th Annual Symposium, Biotechnology in the Feed Industry. Nottingham: University Press, pp.267-274.
- Anderson, R.A. (1995). Chromium, glucose tolerance, diabetes and lipid metabolism. **Journal of Advanced Medicine**, v. 8, p. 37-49.
- Anderson, R.A.; Bryden, N.A.; Polansky, M.M. et al. (1996b). Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 9, p. 11-17.
- Anderson, R.A.; Cheng, N.; Bryden, N.A. (1996a). Beneficial effects of chromium for people with type II diabetes. **Diabetes**, v.45, p. 124A.
- Anderson, R.A.; Polansky, M.M.; Bryden, N.A. (2001). Chromium-histidine complexes as nutrient supplements. United States Patent 6689383. **Chemical Abstracts**, v. 134.
- ANUALPEC - Anuário da Pecuária Brasileira. (2007). 1ª ed. São Paulo. Instituto FNP 332p.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2005). Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 269, de 22 de Setembro de 2005.
- Archer, F.C.; Hodgson, J.H. (1987). Total and extractable trace element content of soils in England and Wales. **Journal of Soil Science**, v. 38, p. 421-431.

- Arfsten, D.P. (1998). Chromium In: Zelikoff, J.T. Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals. London: Taylor & Francis, p. 63-92.
- Asimov, I. (1980). Gênios da Humanidade. Rio de Janeiro: Bloch Editores, v.1, p.213.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2000). Toxicological Profile for Chromium. Syracuse: U. S. Department of Health & Human Services.
- Bagchi D.; Stohs, S.J.; Downs, B.W. et al. (2002a). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. **Toxicology**, v. 180, p. 5–22.
- Bagchi, D.; Balmoori, J.; Bagchi, M. et al. (2002b). Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. **Toxicology**, v. 175, p. 73-82.
- Becker, J.S.; Jakubowski, N. (2009). The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1969-1983.
- Bi, J.M.; Tan, G.Y.; Zheng, S.S. et al. (2008). Study of oxidative damage in growing-finishing pigs with continuous excess dietary chromium picolinate intake. **Biological Trace Element Research**, v. 126, p. 129-140.
- Bievre, P.; Barnes, I.L. (1985). Table of the isotopic composition of the elements as determined by mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 65, p. 211-230.
- Borel, J.S.; Anderson, R.A. (1984). Chromium In: Frieden, E. Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements. New York: Plenum Press, p. 175-199.
- Braun, J.P; Trumel, C; Bézille, P. (2010). Clinical biochemistry in sheep: a selected review. **Small Ruminant Research**, v. 92, p. 10-18.
- Brindley, D.N. (1991). Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. In: Vance, D.E.; Vance, J. New York: Elsevier, p. 171-203.
- Broom, D.M. (1991). Animal Welfare: Concepts and Measurement. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4167-4175.
- Bruss, M.L. (2008). Lipids and Ketones. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th ed. San Diego: Academic Press.
- Burton, J.L.; Mallard, B.A.; Mowat, D.N. (1993). Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1532-1539.
- Cerulli J.; Grabe, D.W.; Gauthier, I. et al.(1998). Chromium picolinate toxicity. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.32, p. 428.

- Chang, X.; Mowat, D.N. (1992). Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 70, 559-565.
- Dallago, B.S.L. (2008). Efeitos da suplementação de cromo (Cr) sobre o desempenho produtivo, a população de protozoários ruminais e a resposta imunitária em ovinos. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, Brasília, 2008.
- Dallago, B.S.L.; Braz, S.V.; McManus, C.M. et al. (2008). Morphological analysis of sheep liver by optical and transmission electron microscopy following oral supplementation with chromium picolinate. Simpósio de Microscopia no Cerrado. Documentos 265. EMBRAPA: Pirenópolis. p. 273-275.
- Dallago, B.S.L.; McManus, C.M.; Caldeira, D.F. et al. (2011). Performance and ruminal protozoa in lambs with chromium supplementation. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 253-256.
- DiSilvestro, R.A.; Dy, E. (2007). Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p.120-124.
- Doisy, R.J.; Strenten, D.H.P.; Freiberg, J.M. (1976). Chromium metabolism in man and biological effects. In: Prasad, A.S. Trace Elements in Human Health and Disease, vol. II, New York: Plenum Medical Book Company.
- Engel, A.; Berger, C.E.; Kröner, A. et al. (2002). Effects of marathon running on the trace minerals chromium, cobalt, nickel, and molybdenum. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 15, p. 201-209.
- Ensminger, M.E.; Oldfield, J.E.; Heinemann, W.W. (1990). Nutrients/Metabolism. In: _____ Feeds & Nutrition. 2nd ed. California: Ensminger Publishing Company, p. 67-172.
- EPA - U.S. Environmental Protection Agency. (1998). Toxicological review of trivalent chromium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- Forbes, C.D.; Fernandez, J.M., Bunting, L.D. et al. (1998). Growth and metabolic characteristics of Suffolk and Gulf Coast Native yearling ewes supplemented with chromium tripicolinate. **Small Ruminant Research**, v. 28, p. 149-160.
- Gardner, G.E.; Pethick, D.W.; Smith, C. (1998). Effect of chromium chelative supplementation on the metabolism of glycogen and lipid in adult Merino sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 49, p. 137-145.
- Gonyou, H.W.; Hemsworth, P.H.; Barnett, J.L. (1986). Effects of frequent interactions with humans on growing pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 16, p. 269-278.
- Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 249-257.

- Healy, W.B. (1974). Trace Elem. Metab. Anim. Proc. Int. Symp. 2nd edition, p. 448.
- Heitzmann, J.F. (1999). Alterações na Composição do Solo nas Proximidades de Depósitos de Resíduos Domésticos na Bacia do Rio Piracicaba, São Paulo, Brasil. São Paulo: Associação Brasileira de Geologia e Engenharia Ambiental, Síntese de Tese n. 9.
- Hepburn, D.D.; Vincent, J.B. (2002). In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, p. 93-100.
- Hepburn, D.D.; Vincent, J.B. (2003). Tissue and subcellular distribution of chromium picolinate with time after entering the bloodstream. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.94, p. 86-93.
- Hininger, I.; Benaraba, R.; Osman, M. et al. (2007) Safety of trivalent chromium complexes: no evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, 42, 1759–1765.
- Hodgson, E.; Cope, W.G.; Leidy, R.B. (2004). Classes of toxicants: use classes. In: Hodgson, E. A textbook of modern toxicology. 3rd edition. New Jersey: Wiley-Interscience, p.49-74.
- Hung, C.L.H.; Lau, R.K.F.; Lam, J.C.W. et al. (2007). Risk assessment of trace elements in the stomach contents of Indo-Pacific humpback dolphins and finless porpoises in Hong Kong waters. **Chemosphere**, v. 66, p.1175-1182.
- Huszonek, J. (1993). Over-the-counter chromium picolinate. **America Journal of Psychiatry**, v.150, p.1560-1561.
- Jain, N. C., 1993. Essentials of veterinary hematology. 417 p. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Jain, S.K.; Lim, G. (2006). Chromium chloride inhibits TNF α and IL-6 secretion in isolated human blood mononuclear cells exposed to high glucose. **Hormone and Metabolic Research**, v. 38, p. 60–62.
- Jeejeebhoy, K.N.; Chu, R.C.; Marliss, E.B. et al. (1977). Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.30, p. 531-538.
- Johnson, L. R. (2004). *In vitro* assessment of hepatic disease. **Waltham Focus**, v.14, n.2, p.7-11.
- Jones, M.L.; Allison, R.W. (2007). Evaluation of the ruminant complete blood cell count. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, p. 377-402.
- Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. (1992). Trace Elements in Plants In: _____ Trace Elements in Soils and Plants. 2nd edition. Florida: CRC Press.

- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. San Diego: Academic Press.
- Kato, I.; Vogelman, J.H.; Dilman, V. et al. (1998). Effect of supplementation with chromium picolinate on antibody titers to 5-hydroxymethyl uracil. **European Journal of Epidemiology**, v. 14, p.621-626.
- Kegley, E.B.; Spears, J.W. (1999). Chromium and cattle nutrition. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 12, p. 141-147.
- Kegley, E.B.; Spears, J.W.; Brown Jr., T.T. (1997). Effect of shipping and chromium supplementation on performance, immune response, and disease resistance of steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1956-1964.
- Kelley, C.; Kareus, S.A.; Sinclair, P.R. et al. (2001). Release of Cr(III) from chromium(III)-picolinate upon metabolic activation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 84, p. 163-174.
- Kerger, B.D.; Paustenbach, D.J.; Corbett, G.E. et al. (1996). Absorption and elimination of trivalent and hexavalent chromium in humans following ingestion of a bolus dose in drinking water. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, p. 145-158.
- Kitchalong, L.; Fernandez, J.M.; Bunting, L.D. (1995). Influence of Chromium Tripicolinate on Glucose Metabolism and Nutrient Partitioning in Growing Lambs. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2694-2705.
- Klaassen, C.D. (2001). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. McGraw-Hill: New York. 6th ed.
- Klaassen, C.D. (2006). Metais pesados e antagonistas dos metais pesados. In: Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L. Goodman & Gilman: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11^a edição, Rio de Janeiro: McGrawhill, p. 1585-1605.
- Komorowski, J.K.; Juturu, V. (2004). Dietary chromium picolinate: efficacy and safety. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 17, p. 291-293.
- Largerwaard, A.; Woittiez, J.R.W.; Goeij, J.J.M. (1995). An independent accurate reference method for the determination of chromium in biological materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 351, p.786-789.
- Lefavi, R.G.; Wilson, G.D.; Keith, R.E. (1993). Lipid-lowering effect of a dietary chromium (III)-nicotinic acid complex in male athletes. **Nutrition Research**, v.13, p. 239-249.
- Lehninger, A.L. (2005). *Principles of Biochemistry*. 4th ed. Freeman Press.
- Lepherd, M.L.; Canfield, P.J.; Hunt, G.B. et al. (2009). Hematological, biochemical and selected acute phase protein reference intervals for weaned female Merino Lambs. **Australian Veterinary Journal**, v.87, p. 5-11.
- Levina, A.; Lay, P.A. (2005). Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. **Coordination Chemistry Reviews**, v.249, p. 281-198.

- Levina, A.; Lay, P.A. (2008). Chemical properties and toxicity of chromium(III) nutritional supplements. **Chemical Research in Toxicology**, v.21, p. 563-571.
- Levine, K.E.; Stout, M.D.; Ross, G.T. et al. (2010). Validation and application of a method for the determination of total chromium in rat tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p.883-891.
- Mahboob, M.; McNeil, L.; Tolliver, T. et al. (2002). Effects of chromium picolinate on antioxidant enzyme levels in rats. **Toxicological Sciences**, v. 66 (suppl. 1), p. 32 (Abstract 154).
- Mariante, A.S.; McManus, C.M.; Mezzadra, C. et al. (2008). Development of production systems in South America: beef production in the Southern cone and its impact on the global market. *Animal Production and Animal Science Worldwide-WAAP Book of the year 2007*, 264 p.
- Martin, W.R.; Fuller, R.E. (1998). Suspected chromium picolinate-induced rhabdomyolysis. **Pharmacotherapy**, v. 18, p. 860–862.
- Mattos, J.C.P.; Nunes, M.A.G.; Rodrigues, L.F. et al. (2007). Determinação de cromo em amostras orgânicas e inorgânicas empregando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e amostragem direta de sólidos. *Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química– FAPESP – Águas de Lindóia, SP*.
- Maxie, M.G. (2007). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th ed. Saunders Elsevier, pp. 2340.
- McCarty, M.F. (1993). Homologous physiological effects of phenformin and chromium picolinate. **Medical Hypotheses**, v. 41, p. 316-124.
- McCarty, M.F. (1994). Longevity effect of chromium picolinate-“rejuvenation” of hypothalamic function? **Medical Hypotheses**, v. 43, p. 253-265.
- McDowell, L.R. (1999). *Minerais para Ruminantes sob Pastejo em Regiões Tropicais, Enfatizando o Brasil*. 3ª edição, Flórida: IMC, p.1-92.
- McDowell, L.R.; Van Soest, P.J.; Cestero, H. et al. (1977). Voluntary intake and apparent digestibility of artificially dried stargrass feed to Holstein bull calves. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.61, p. 429-37.
- Merrill, J.C.; Morton, J.J.P.; Soileau, S.D. (2001). Metals. In: Hayes, A.W. *Principles and methods of Toxicology*. 4th edition. Boston: Taylor & Francis, p. 649-698.
- Mertz, W. (1993). Essencial trace metals: New definitions based on new paradigms. **Nutrition Reviews**, v. 51, p. 287-295.
- Mirasol, F. (2000). Chromium picolinate market sees robust growth and high demand. **Chemical Market Reporter**, v. 257.

- Moonsie-Shageer, S.; Mowat, D.N. (1993). Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 232-238.
- Morris, D.D. (2002). Alterations in leukogram. In: Smith, B.P. Large animal internal medicine. 3rd ed. Philadelphia: Mosby, p. 420-6.
- Mostafa-Tehrani, A.; Ghorbani, G.; Zare-Shahneh, A. et al. (2006). Non-carcass components and wholesale cuts of Iranian fat-tailed lambs fed chromium nicotinate or chromium chloride. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 12-19.
- Mullick, F.G.; van der Voet, G.B.; Sarafanov, A. et al. (2008). Clinical and analytical toxicology of dietary supplements: a case study and a review of the literature. **Biological Trace Element Research**, v. 125, p. 1-12.
- Nicholson, F.A.; Chambers, B.J.; Williams, J.R. et al. (1999). Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. **Bioresource Technology**, v.70, p.23-31.
- Nielsen, P.; Kottwitz, K.; Laschinsky, N. et al. (2009). Absorption, excretion and retention of ⁵¹Cr from labeled Cr-(III)-picolinate in rats. **Biometals**, v. 22, p. 289-295.
- NRC - National Research Council. (1997). The Role of Chromium in Animal Nutrition. Washington D. C.: National Academy of Sciences, National Academy Press.
- NTP – National Toxicology Program. (2008). Toxicology and carcinogenesis studies of chromium picolinate monohydrate (CAS No 27882-76-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). NTP technical report 556, NIH Publication 08-5897.
- Olsen, Q.R.; Rule, D.C.; Field, R.A. (1996). Dietary chromium picolinate does not influence growth or carcass composition in feedlot lambs. **Sheep and Goat Research Journal**, v. 12, p. 22-24.
- Olson, O.E.; Cary, E.E.; Allaway, W.H. (1977a). Control of chromium concentrations in food plants.1. absorption and translocation of chromium by plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 25, p. 300-304.
- Olson, O.E.; Cary, E.E.; Allaway, W.H. (1977b). Control of chromium concentrations in food plants. 2. chemistry of chromium in soils and its availability to plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 25, p. 305-309.
- Ondei, V. (2004). Nova cobertura para um setor em ascensão. **Revista DBO**, v. 282, p. 162.
- Page, T.G.; Southern, L.L.; Ward, T.L. et al. (1993). Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 656-662.
- Pechova, A.; Pavlata, L. (2007). Chromium as an Essential Nutrient: a Review. **Veterinarni Medicina**, v. 52, p. 1-18.

- Pedraza-Chaverri, J.; Barrera, D.; Medina-Campos, O.N. et al. (2005). Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity. **BMC Nephrology**, v. 6, p. 4.
- Polizopoulou, Z.S. (2010). Haematological tests in sheep health management. **Small Ruminant Research**, v. 92, p. 88-91.
- Puls, R. (1994). Mineral Levels in Animal Health. 2nd edition. British Columbia: Sherpa International.
- Ranthotra, G.S.; Gelroth, J.A. (1986). Effects of high-chromium baker's yeast on glucose tolerance and blood lipids in rats. **Cereal Chemistry**, v. 63, p. 411-413.
- Rosa, I. V. (1980). Dietary Phosphorus and Trace Elements Interrelationships in Ruminants. Dissertação, University of Florida, Gainesville.
- Russel, K.E.; Roussel, A.J. (2007). Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, p. 403-426.
- Sahin, K.; Sahin, N.; Güler, T. (2001). The effect of supplemental dietary chromium on performance, some blood parameters and tissue chromium contents of rabbits. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 25, p. 217-221.
- Sahin, N.; Uyanik, F.; Eren, M. et al. (2005). Effects of dietary chromium supplementation on performance, carcass traits, serum metabolites, and tissue chromium levels of japanese quails. **Biological Trace Element Research**, v. 103, p. 187-197.
- Sano, H.; Kato, Y.; Takebayashi, A. et al. (1999). Effects of supplemental chromium and isolation stress on tissue responsiveness and sensitivity to insulin in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 33, p. 239-246.
- SAS Institute. (1999). SAS statistical package for Windows v. 8.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Schnellmann, R.G. (2001). Toxic responses of the kidney. In: Klaassen, C.D. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill: New York. 6th ed.
- Schulkin, J. (2003). Allostasis: a neural behavioral perspective. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 21-27.
- Schwarz, K.; Mertz, W. (1959). Chromium (III) and the glucose tolerance factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 85, p. 292-295.
- Silva, C.S.; Pedrozo, M.F.M. (2001). Ecotoxicologia do cromo e seus compostos. Salvador: Centro de Recursos Ambientais - CRA. 100f. (Caderno de Referência ambiental, v.5). 2001.
- Silva, D.J.; Queiroz, A.C. (2006). Determinação da Cinza ou Matéria Mineral. In: _____ Análise de Alimentos – Métodos Químicos e Biológicos. p. 77-86.

- Soudani, N.; Amara, I.B.; Sefi, M. et al. (2011). Effects of selenium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adults rats. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 63, p. 541-548.
- Souza, A. D. (2006). Mercado interno e perspectivas para carne ovina. [online]. Disponível em: < <http://www.farmpoint.com.br> >. Acesso em: 18 set.2006.
- Souza, C.E.A.; Araújo, A.A.; Oliveira, J.T.A. et al. (2010). Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 644-653.
- Sreejayan, N.; Dong, F.; Kandadi, M.R. et al. (2008). Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice. **Obesity**, 16:1331-1337.
- Starich, G.H.; Blincoe, C. (1983). Dietary Chromium – forms and availabilities. **The Science of the Total Environment**, v. 28, p. 443-454.
- Stearns, D.M. (2007). Evaluation of chromium(III) genotoxicity with cell culture and *in vitro* assays. In: Vincent, J.B. The Nutritional Biochemistry of Chromium(III). Amsterdam: Elsevier, pp. 209-224.
- Stearns, D.M.; Patierno, S.R.; Wetterhahn, K.E. et al. (1995). Chromium(III) picolinate produces chromosome damage in chinese hamster ovary cells. **FASEB Journal**, v. 9, p. 1643-1648.
- Stearns, D.M.; Silveira, S.M.; Wolf, K.K. (2002). Chromium(III) tris(picolinate) is Mutagenic at the Hypoxanthine (guanine) Phosphoribosyltransferase locus in Chinese Hamster Ovary Cells. **Mutation Research**, v. 513, p. 135-142.
- Stewart, J.A. (2006). The detrimental effects of allostasis: allostatic load as a measure of cumulative stress. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 25 p. 133-145.
- Stoecker, B.J. (2006). Chromium. In: Shils, M.E.; Shike, M.; Ross, A.C.; Caballero, B.; Cousins, R. L. Modern Nutrition in Health and Disease. 10th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 332-337.
- Subramanian, S.; Rajendiran, G.; Sekhar, P. et al. (2006). Reproductive Toxicity of Chromium in Adult Bonnet Monkeys (*Macaca radiata* Geoffrey). Reversible Oxidative Stress in the Semen. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.215, p. 237-249.
- Sun, Y.; Ramirez, J.; Woski, S.A. et al. (2000). The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, p.129-136.
- Swanson, K. C.; Harmon, D.L.; Jacques, K.A. et al. (2000). Efficacy of Chromium-yeast Supplementation for Growing Beef Steers. **Animal Feed and Science Technology**, v. 86, p. 95-105.

- Swenson, M.J.; Reece, W.O. (1996). *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 11^a ed.
- Taylor, J.A. (2000). Leukocyte responses in ruminants. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 391-402.
- Tennant, B.C. (2008). Hepatic Function. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. San Diego: Academic Press.
- Tezuka, M.; Momiyama, K.; Edano, T. (1991). Protective effect of Chromium (III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.42, p. 1-8.
- Thrall, M.A. (2007). *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1^a ed. São Paulo: Roca, 582 p.
- Toepfer, E.W.; Mertz, W.; Roginski, E.E. (1973). Chromium in foods in relation to biological activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, p. 69-73.
- Underwood, E.J. (1977). Chromium. In: Underwood, E. J. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. 4th edition. New York: Academic Press.
- Underwood, E.J.; Suttle, N.F. (1999). Occasionally beneficial elements (Boron, Chromium, Lithium, Molybdenum, Nickel, Silicon, Tin, Vanadium) In: Underwood, E.J.; Suttle, N. F. *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd edition. New York: CABI Publishing.
- Urberg, M.; Gemel, M.B. (1987). Evidence for synergism between chromium and nicotinic acid in the control of glucose tolerance in elderly humans. **Metabolism**, v. 36, p. 896-899.
- Uyanik, F.; Eren, M.; Güçlü, B.K. et al. (2005). Effects of dietary chromium supplementation on performance, carcass traits, serum metabolites, and tissue chromium levels of Japanese quails. **Biological Trace Element Research**, v. 103, p.187-197.
- Uyanik, F. (2001). The effects of dietary chromium supplementation on some blood parameters in sheep. **Biological Trace Element Research**, v. 84, p. 93-101.
- Vincent, J.B. (2000). The biochemistry of chromium. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 715-718.
- Vincent, J.B. (2003). Recent advances in the biochemistry of chromium(III). **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v.16, p.227.
- Vincent, J.B. (2004). Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. **Proceedings of the Nutritional Society**, v. 63, p. 41.
- Vincent, J.B.; Davis, C.M. (2001). Use of Triqua- μ^3 -oxohexakis- μ -propionatotrichromium(1+), $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, as a nutritional supplement or

in treatment of medical conditions. United States Patent 6197816. **Chemical Abstracts**, v. 134, 2001.

Webelements™. (2008). WebElements™, the periodic table . Disponível em: < <http://www.webelements.com/>>. Acesso em 14 de Março de 2008.

WHO - World Health Organization. (2003). Chromium in Drinking-water. Background document for development of who guidelines for drinking-water quality.

Witmer, C.M.; Park, H.S.; Shupack, S.I. (1989). Mutagenicity and disposition of chromium. **Science of the Total Environment**, v. 86, p. 131-148.

Woski, S.A.; Speetjens, J.K.; Vincent, J.B. (1999). The nutritional supplement chromium (III) tris(piccolinate) cleaves DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, p. 483-487.

Yoshida, M.; Hatakeyama, E.; Hosomi, R. et al. (2010). Tissue accumulation and urinary excretion of chromium in rats fed diets containing graded levels of chromium chloride or chromium picolinate. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, p. 485-491.

Zanetti, M.A.; Salles, M.S.V.; Brisola, M.L. et al. (2003). Desempenho e resposta metabólica de bezerros recebendo dietas suplementadas com Cr. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1532-1535.

Zayed, A.; Lytle, C.M.; Terry, N. et al. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. **Planta**, v. 206, p. 293-299.

Zha, L.Y.; Wang, M.Q.; Xu, Z.R. et al. (2007). Efficacy of chromium(III) supplementation on growth, body composition, serum parameters, and tissue chromium in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 119, p. 42-50.