SANDRA SATIKO KITAMURA

**INTOXICAÇÃO POR AMÔNIA EM BOVINOS E RATOS:
O DESEMPENHO RENAL NA DESINTOXICAÇÃO E O
EMPREGO DE TRATAMENTOS ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Orientador:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

**São Paulo
2002**

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1113 Kitamura, Sandra Satiko
FMVZ Intoxicação por amônia em bovinos e ratos: o desempenho renal na desintoxicação e o emprego de tratamentos alternativos / Sandra Satiko Kitamura.
92 f. : il.
Dissertação (mestrado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2002.
Área de concentração: Clínica Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

Unitermos: 1.Amônia (tratamento). 2.Intoxicação.
3.Rins. 4.Bovinos. 5.Ratos.

Data da Defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus queridos pais,
Orlando e Satiko, por dedicarem suas vidas na minha
formação e dos meus irmãos, nos ensinando a ter
respeito, dedicação, honestidade e principalmente por
constituir uma verdadeira família.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos,
Fábio, Vanessa, Cristina, Fernando, Gabi e Yan, pela
convivência harmoniosa, alegre e saudável.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani**, pela preocupação paternal com seus orientados. Exemplo de orientação, dedicação, apoio e estímulo. Agradeço a compreensão, paciência e o auxílio prestado neste período. Espero contar com a sua eterna amizade.

Aos professores da FMVZ-USP: **Wanderley de Araújo, Eduardo Birgel Júnior, Márcia Kogika, Eduardo Birgel, Cássio de Mendonça Junior, Fernando Benesi, Flavio Prada, Raquel Baccarin, Wilson Fernandes, Luís Cláudio Silva, Mitika Hagiwara e Sílvia Lucas** pela convivência harmoniosa, conhecimentos transmitidos e pela amizade.

A minha família de Pós-Graduação: **Celso Akio Maruta, Maria Claudia Araripe Sucupira, Pierre Castro Soares e Alexandre Coutinho Antonelli** que me receberam com muito carinho e respeito, e passaram todas as suas experiências e conhecimentos que foram úteis para a execução e conclusão deste trabalho; e espero também ter sido útil para que eles executem seus experimentos. Agradeço o convívio “familiar” diário, os momentos felizes, a ajuda na realização das colheitas e tratamento dos animais, o espírito de equipe e, principalmente, pela amizade.

À **Clara Satsuki Mori**, técnica de nível superior responsável pelo Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas, pelo convívio diário, ajuda irrestrita e resolução de vários problemas técnicos e pessoais. Agradeço sua ajuda, paciência e espero contar com sua eterna amizade.

À **Regina Mieko Sakata Mirandola**, técnica de nível superior responsável pelo Laboratório de Pesquisa da Pós-Graduação e pela resolução dos vários problemas dos pós-graduandos. Agradeço a atenção, o respeito, a ajuda nas determinações laboratoriais, paciência e amizade.

À minha grande amiga, **Sônia Maria Cazzoli**, que mesmo distante, sempre torceu pelo meu crescimento profissional como pessoal. Agradeço a convivência, a paciência e a sincera amizade que cultivamos juntas há anos.

À minha *quase irmã* querida *Alice Maria Melville Paiva Della Libera*, companheira nos momentos mais importantes, e desde que nos conhecemos sempre foi uma referência para a minha vida profissional e pessoal, exemplo de dedicação, orientação, estímulo, consideração, sabedoria e companheirismo que deve ser seguido, espero contar com sua eterna amizade.

Ao *Prof. Dr. Maurício Garcia* pelo seu estímulo, apoio, dedicação, orientação e consideração, depositadas em mim, desde a minha graduação. Espero contar com sua amizade, sempre.

Ao *Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa* que apesar de pouco tempo de convivência tem se mostrado um grande amigo e companheiro, sempre torcendo pelo meu sucesso.

À minha amiga *Andrea Rosenfeld* pela paciência, agradável convívio, pelas longas e proveitosas conversas, que nestes últimos meses foram essenciais para que eu pudesse realizar com sucesso os meus objetivos. Que nossa amizade se torne cada vez mais sincera e unida.

Aos amigos *Patrícia Berbare, Karina Yazbek, Andreza Ávila, Maria Fernanda Define e Marcelo Golovaty*, pela amizade, agradável convívio e pelas conversas sempre proveitosas durante estes anos todos.

Aos amigos de pós-graduação: *Agnes Mori, Carla Belli, Clarisse Coelho, Lilian Michima, Melanie Marques, Lúcia Wachholz, Gláucia Abramovitz, Paulo Eduardo, Enio Mori, Júlio Lisbôa, Liliane Benatti, Consuelo Ayres, Fernanda Biojone, Valéria Sant'Ana, Marta Leal, Rinaldo Viana, Paulo Mattos, André Zoppa, Márcio Ferreira, Carolina Pita, João Paulo Saut, Ricardo Marques e Heloísa Bertagnon* pelo agradável convívio, troca de conhecimentos e amizade.

À secretária da pós-graduação, *Harumi Doi Shiraishi*, pela paciência, agradável convívio, ajuda, compreensão e amizade.

Às secretárias *Maria Aparecida de Freitas (Cida), Maria Alice, Adelaide Borges*, pela constante ajuda, agradável convívio.

À *Claudia Mori*, responsável pelo Biotério da FMVZ-USP, pelo fornecimento dos ratos, imprescindível para o desenvolvimento da fase inicial deste projeto.

À **Marly Castro**, pela generosa acolhida, ajuda nas análises bioquímicas e principalmente pela sua amizade.

Ao funcionário do Galpão de Experimentação Clínica de Ruminantes: **Agnaildo dos Santos**, pela ajuda nas colheitas, no trato dos animais e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica: **Abelardo de Souza (Dinho)**, **Edna dos Santos (Dinha)**, **Márcio Chiacchio e equipe (Marquinhos, José Antônio, Cícero, Gervásio, Osmar, Luizinho, Elias)**, **Henrique**, **Maria Florência de Oliveira**, **Creide e Carmem Ribeiro**, pela importante colaboração, agradável convívio e amizade.

Ao **Rewrry** meu fiel companheiro durante toda a minha vida, motivo o qual me levou a me dedicar à Medicina Veterinária.

Aos funcionários da biblioteca, pelo profissionalismo, cordial atendimento e amizade.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP** que oferece condições favoráveis para a execução de pesquisa e pela minha formação.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de Mestrado (99/12730-4).

Ao **CNPq** pelo financiamento do projeto (467521-00).

A **Baldacci** pelo gentil fornecimento do Ornitargin[®], medicamento importante para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

E principalmente a todos os animais, ratos e bovinos, que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

A **Deus** que sempre esteve presente em todas as minhas conquistas.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
®	marca registrada
ABE	excesso ácido-base
C	controle
SSF	solução salina fisiológica
NH_4^+Cl	cloreto de amônio
O	ornitargin
F	furosemide
H	hidratante
ip	intraperitoneal
DL	dose letal
SNC	sistema nervoso central
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
m	mol
NNP	nitrogênio não-protéico
iv	intravenosa
im	intramuscular
cm	centímetros
mm	milímetros
min	minutos
IEUA	índice de excreção urinária de amônio
IEFAU	índice de excreção fracional de amônio urinário
g	grama
Graf.	gráfico
h	hora
H^+	hidrogênio
kg	quilograma
mMol	milimol
μMol	micromol
L	litro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
Mov	movimento
MS	matéria seca
PV	peso vivo
$\text{PV}^{0,75}$	peso metabólico

p	nível de significância
r	coeficiente de correlação
pH	potencial hidrogeniônica
Tab.	tabela
NH ₄	amônio
NaCl	cloreto de sódio
Hemat	hematócrito
FCard	frequência cardíaca
FResp	frequência respiratória
MRum	movimento ruminal
Temp	temperatura
HCO ₃	bicarbonato
bpm	batimentos por minutos
mpm	movimetos por minutos
°C	grau celsius

RESUMO GERAL

KITAMURA, S. S. **Intoxicação por amônia em bovinos e ratos: o desempenho renal na desintoxicação e o emprego de tratamentos alternativos.** [Ammonia poisoning in cattle and rats: the role of the kidneys for detoxifying ammonia and use of alternative treatments]. 2002. 92 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Para estudar o papel dos rins e o de tratamentos alternativos na desintoxicação da amônia quatro trabalhos foram realizados em ratos e bovinos. Ratos Wistar (n=367) foram utilizados para testar oito tratamentos (O= aminoácidos do ciclo da uréia; F= furosemida; H= solução hidratante, O+F; H+F, O+H; O+F+H, C= controle) no combate à intoxicação por amônia. Acetato de amônio foi injetado pela via intraperitoneal e 3min após os tratamentos eram injetados pela mesma via. Maiores sobrevivências e menores teores de amônia plasmática foram obtidos nos tratamentos O+F+H (62,5%) e O+H (57%). A medicação com O, H e F promoveu maior teor sérico de uréia e menor de creatinina e menos pronunciado edema pulmonar, respectivamente. No segundo trabalho, desenvolveu-se, em 15 garrotes, um modelo de intoxicação por amônia por meio de infusão de cloreto de amônio (NH_4^+Cl) [iv] até o surgimento de convulsão. O quadro clínico exibido foi idêntico à intoxicação natural e todos os animais sobreviveram. Durante a infusão elevaram-se os teores sangüíneos de amônia, uréia, lactato-L, glicose, potássio e hematócrito, e diminuíram o pH e o bicarbonato sangüíneos. A acidose metabólica ocorreu por aumento do teor de lactato-L; quanto menor o pH do sangue maior o teor de potássio. O modelo de indução foi seguro, prático, de alta reprodutibilidade e não causou efeitos

colaterais. Nestes mesmos animais, durante a indução foram estudados o desempenho renal na excreção de amônio e a relação desta com a resistência dos bovinos à intoxicação. Quanto maior o volume de urina excretado durante a infusão maior a quantidade de NH_4^+Cl injetado para provocar convulsão, assim como maior a quantidade de amônio excretado na urina. Quanto menor o pH sanguíneo e urinário maior o índice de excreção urinário de amônio. Alguns animais ficaram desidratados, mas esta não foi causada pela diurese. Concluiu-se que os rins têm um papel importante na excreção de amônia em bovinos intoxicados e quanto maior a diurese menos propenso o animal é a intoxicação. Em seguida, os bovinos intoxicados foram distribuídos ao acaso e tratados com O+F+H, O+H ou C no decorrer de 3h após o término da infusão de NH_4^+Cl . Os dois primeiros tratamentos promoveram melhora clínica pronunciada, em relação ao grupo C, diminuíram os teores de amônia e lactato-L, urinaram e excretaram NH_4^+ mais abundantemente e tiveram menor pH urinário. Os tratamentos propostos foram efetivos na desintoxicação por amônia.

Unitermos: amônia (tratamento), intoxicação, rins, bovinos, ratos.

SUMMARY

KITAMURA, S. S. **Ammonia poisoning in cattle and rats: the role of the kidneys for detoxifying ammonia and use of alternative treatments.** [Intoxicação por amônia em bovinos e ratos: o desempenho renal na desintoxicação e o emprego de tratamentos alternativos]. 2002. 92 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

To study the role of the kidneys and of alternative treatments for detoxifying ammonia four experiments were carried out in cattle and rats. Wistar rats (n=367) were used to compare eight treatments (O= urea-cycle amino acids; F= furosemide; H= saline solution, O+F; H+F; O+H; O+F+H; C=control) to reverse ammonia poisoning. Ammonium acetate solution was injected [ip] and 3 min later the treatments were injected through the same via. Higher survival rate and lower plasma ammonia levels were detected in rats treated with O+F+H (62.5%) and O+H (57%). Rats treated with O, H and F had higher urea serum, lower creatinine and less pronounced lung edema, respectively. To develop a practical model to induce ammonia poisoning through [iv] ammonium chloride infusion until the appearance of convulsion (NH_4^+Cl) 15 yearling steer were used. The clinical picture showed was identical to the natural poisoning. Higher blood levels of ammonia, urea, L-lactate, glucose, potassium and hematocrit and lower bicarbonate and blood pH were detected during the infusion. A metabolic acidosis occurred by the increase of L-lactate; the lower the blood pH, the higher the hypercalemia. The model was very practical, reliable, and highly reproducible; no side effects were seen. All steers survived after the poisoning. During the same trial the role of the kidney to excrete ammonium was studied as well as the

relation of this excretion with the individual resistance to the poisoning. The higher the urine volume excreted during the infusion, the higher the volume of NH_4^+Cl infused to cause convulsion and the greater the amount of NH_4^+ excreted in the urine. The lower the blood and urine pH, the higher the urinary ammonium excretion rate. Some steers were dehydrated, but dehydration was not caused by diuresis. In conclusion, the kidneys have an important role in the excretion of ammonium in the ammonia poisoning cattle, the higher the diuresis throughout the induction, the more resistant the cattle is to the poisoning. Afterwards, the same poisoned steers were randomly distributed and treated for 3h with O+F+H, O+H or C (small amount of saline - iv). The two former treatments produced a pronounced clinical improvement, lowering the blood ammonium and L-lactate levels and urine pH and increasing the urinary volume and NH_4^+ excretion. The selected treatments were very effective for detoxifying ammonia in poisoned cattle.

Uniterms: ammonia (treatment), poisoning, kidneys, cattle, rats.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1	INTRODUÇÃO..... 10
2	TRABALHO 1..... 20
	Resumo..... 20
2.1	Introdução..... 21
2.2	Materiais e Métodos..... 23
2.2.1	Análise Estatística..... 25
2.3	Resultados..... 25
2.4	Discussão..... 28
2.5	Conclusões..... 31
2.6	Referências..... 32
3	TRABALHO 2..... 33
	Resumo..... 33
3.1	Introdução..... 34
3.2	Materiais e Métodos..... 36
3.2.1	Animais e Dieta..... 36
3.2.2	Protocolo..... 36
3.2.3	Análise Estatística..... 37
3.3	Resultados..... 38
3.4	Discussão..... 41
3.5	Conclusões..... 46
3.6	Referências..... 47

4	TRABALHO 3.....	49
	Resumo.....	49
4.1	Introdução.....	50
4.2	Materiais e Métodos.....	53
4.2.1	Animais e Dieta.....	53
4.2.2	Protocolo.....	53
4.2.3	Análise Estatística.....	55
4.3	Resultados.....	55
4.4	Discussão.....	61
4.5	Conclusões.....	65
4.6	Referências.....	66
5	TRABALHO 4.....	68
	Resumo.....	68
5.1	Introdução.....	69
5.2	Materiais e Métodos.....	72
5.2.1	Análise Estatística.....	74
5.3	Resultados.....	74
5.4	Discussão.....	80
5.5	Conclusões.....	85
5.6	Referências.....	86
6	REFERÊNCIAS GERAIS.....	88

1. INTRODUÇÃO

Entre os vários nutrientes essenciais a proteína é o mais limitante para o crescimento de bovinos criados extensivamente em países de clima tropical ou subtropical, causando na sua carência surgimento de efeitos adversos mais imediatos, tais como redução tanto no peso corpóreo como no apetite, que o tão propalado fósforo (BORTOLUSSI et al., 1996). A carência de proteína nos ruminantes geralmente ocorre no período invernal, ou de seca, quando os capins diminuem marcadamente o teor de proteína bruta (MINSON, 1990).

Para prevenir tal carência tem sido recomendado a suplementação de ruminantes, em especial bovinos, durante o inverno com farelos ricos em proteína, como o de soja e algodão. Porém, o custo desta suplementação é cara, visto que estes alimentos são exportados e seus preços são cotados em dólar americano. Assim estes farelos geralmente são utilizados em pequena quantidade nos chamados “sais proteinados”, já que parte do nitrogênio requerido pelos ruminantes deve ser proveniente de fonte orgânica (VAN HORN et al., 1967; FRØSLIE, 1977). Para complementar esta suplementação de forma barata e eficiente, tem sido amplamente utilizada fonte de nitrogênio não-protéico (NNP). Praticamente, pode-se dizer que a uréia é a mais disponível e barata fonte de NNP utilizada nos “sais proteinados”.

Estima-se hoje que cerca de 10 milhões de bovinos recebam no período invernal tais sais contendo uréia (MORGULIS, 2002)¹. Outra forma comum de utilização da uréia é a sua consorciação com cana-de-açúcar, mais empregada na alimentação de novilhas e vacas leiteiras (SILVA e OLIVEIRA, 1985).

Embora o uso de uréia proporcione várias vantagens na alimentação de bovinos, a sua utilização inadequada pode trazer sérios danos à saúde animal, tais como problemas de infertilidade em vacas e principalmente intoxicação aguda. Esta última anormalidade ocorre esporadicamente nos rebanhos (MORRIS e PAYNE, 1970). Contudo, quando de seu surgimento o quadro é drástico, rápido e na maioria das vezes devastador, podendo levar bovinos à morte em até 30 minutos após a sua ingestão (WORD et al., 1969; BARTLEY et al., 1976; ORTOLANI et al. 2000). Na verdade, a intoxicação nos ruminantes não é pela uréia alimentar, mas sim pela amônia gerada do primeiro composto por meio da fermentação ruminal (HALIBURTON e MORGAN, 1989).

A intoxicação pela amônia pode ocorrer quando ruminantes ganham acesso a grandes quantidades de uréia ou quando esta é ingerida em quantidades significativas por bovinos não adaptados à mesma, ou quando a uréia é inadequadamente misturada aos alimentos (REPP et al., 1955; DAVIS e ROBERTS, 1959; RADOSTITS et al., 1995; ORTOLANI et al., 2000).

A uréia ingerida é rapidamente transformada no rúmen em compostos amoniacais (amônio-NH₄⁺ e amônia-NH₃) pelos microorganismos presentes

¹ MORGULIS, S. C. F. **Comunicação pessoal**. São Paulo: Minerthal, 2002.

neste órgão. Com custo de energia, os micróbios ruminais incorporam o nitrogênio amoniacal produzindo suas próprias proteínas. Dependendo do pH ruminal a uréia é transformada em amônio ou em amônia (VISEK, 1968; VISEK, 1984). Quanto mais alto o pH ruminal maior a concentração do último composto. Enquanto que o amônio é hidrossolúvel e não absorvível pela parede ruminal a amônia é lipossolúvel e muito disponível para ser absorvida (BARTLEY et al., 1976). Assim, condições que favoreçam o surgimento de pH alcalino, tais como jejum, dieta rica em fibra e/ou com baixo teor de carboidratos solúveis ou mesmo a ingestão de quantidades consideráveis de uréia, aumentam e aceleram a absorção de amônia para o organismo (DAVIDOVICH et al., 1977a). O principal local para absorção da amônia é o epitélio ruminal e omasal. No sistema porta a amônia é enviada aos hepatócitos para ser desintoxicada no chamado ciclo da uréia ou ciclo de Krebs & Hanseleit. Neste local uma molécula de amônia se combina com uma de aspartato formando como produto final uma molécula de uréia. Enquanto que amônia em altas quantidades é tóxica ao organismo a uréia é praticamente inócua (VISEK, 1979). O pleno funcionamento do ciclo de uréia necessita da atividade de cinco enzimas (carbamil fosfato sintetase, ornitina transcarbamilase, argininosuccinato sintetase, argininosuccinase e arginase) da presença de cinco substratos (aspartato, arginina, ornitina, citrulina e argininosuccinato) e de três moléculas de ATP, geradas no ciclo do ácido cítrico. A arginina funciona como cofator deste ciclo ativando as enzimas supracitadas. A mortalidade de ratos é diminuída em casos de intoxicação por amônia quando estes são infundidos com solução contendo arginina,

citulina e ornitina, em especial do primeiro substrato, devido o aumento substancial da atividade do ciclo da uréia (GREENSTEIN et al., 1956; VISEK, 1979; ORTOLANI e MARCONDES, 1995). Estes estudos foram bem conduzidos e avaliados em ratos, faltando ainda um experimento que indique a validade ou não destes medicamentos em ruminantes, em especial em bovinos. A hiperamoniemia *per se* pode diminuir sensivelmente o funcionamento do ciclo da uréia, pois bloqueia a atividade da enzima glutamina sintetase, assim como o ciclo do ácido cítrico, diminuindo a oferta de ATP para a transformação de amônia em uréia (VISEK, 1979; FRØSLIE, 1977).

Os rins também têm um papel na depuração de amônia do organismo. A amônia pode ser filtrada no túbulo contornado proximal se combinando na luz deste segmento com um íon H^+ , formando amônio o qual é eliminado pela urina. Para cada mol de amônio excretado a célula do túbulo proximal produz um mol de bicarbonato, pela ação da anidrase carbônica, o qual é reabsorvido para a corrente circulatória. Segundo MALNIC e MARCONDES (1986) quanto maiores forem o fluxo urinário, o grau de acidez tanto da urina como a do sangue maiores serão as excreções urinárias de amônio. Tais fenômenos foram bastante investigados em cães e em animais de laboratório, mas nada foi estudado em bovinos, em especial nos submetidos à intoxicação por amônia, com ênfase na excreção total de amônio pela urina. Curiosamente, EDJTEHADI et al. (1978) fizeram uma breve notificação que numa intoxicação experimental por amônia em ovinos os únicos animais que conseguiram sobreviver apresentaram intensa

diurese, ocorrendo o inverso com os demais. Os diuréticos poderiam também interferir na excreção de amônio urinário, já que estes medicamentos aumentam substancialmente a produção urinária.

No decorrer do curso da intoxicação por amônia existe o desenvolvimento de desidratação, causada possivelmente pela passagem de fluídos para os pulmões, gerando um quadro de edema pulmonar (ROLLER et al., 1982; KOPCHA, 1987; ORTOLANI e MARCONDES, 1995; ORTOLANI et al., 2000). O edema pulmonar é devido à reconhecida ação irritante que a amônia tem nos tecidos pulmonares. É possível que além da hiperamoniemia a amônia tenha acesso nos pulmões pela erutação e entrada do gás amônia para estes órgãos (BARTLEY et al., 1976). É reconhecido que um dos principais mecanismos compensatórios para diminuir os efeitos deletérios da desidratação é a redução no fluxo sangüíneo para os rins, reabsorção de água pelos túbulos renais e conseqüente menor produção de urina (RADOSTITS et al., 1995). Assim, parece lógico o tratamento de animais intoxicados por amônia com o uso de fluidoterapia, para combater a desidratação, e de diurético para diminuir o edema pulmonar, restituir este fluido “seqüestrado” para a corrente circulatória e aumentar ao mesmo tempo a produção de urina. ORTOLANI et al. (2000) trataram cinco caprinos intoxicados por amônia, sendo que dois já apresentavam quadro convulsivo, com solução salina [iv] e furosemida [im] Todos os animais apresentaram plena recuperação, após desenvolverem intensa diurese. As eficiências destes tratamentos alternativos ainda precisam ser avaliadas, visto que a terapia ainda em uso é administração de

ácidos fracos no rúmen, para diminuir o pH do fluído deste órgão e aumentar a transformação de amônia em amônio. Contudo, muitas vezes quando este tratamento é realizado os resultados não são satisfatórios, pois quantidades pronunciadas de amônia já foram absorvidas e já estão provocando efeitos deletérios no organismo dos animais. BARTLEY et al. (1976) trataram com ácido acético 125 bovinos intoxicados por amônia no início dos tremores musculares e mesmo assim 25 animais (20%) morreram. WORD et al. (1969) realizaram o mesmo tratamento quando do início dos episódios convulsivos ocorrendo a morte de todos os bovinos. Estes resultados reforçam a necessidade de se estudar novas formas de tratamento mais eficientes.

Normalmente, pequenas concentrações de amônia podem passar incólumes da transformação hepática e excreção renal, sem causar danos ao organismo. Caso o ingresso de amônia ruminal seja grande demais, sobrepujando a capacidade do ciclo de Krebs & Hanseleit, este composto alcançará a circulação periférica penetrando nas células em especial nas do sistema nervoso central e periférico (LEWIS et al., 1957; LEWIS, 1960; DAVIDOVICH et al., 1977a; O'CONNOR e COSTELL, 1990). Um estudo demonstrou que durante a intoxicação por amônia, em bovinos, que o teor desta substância é 30% inferior na veia jugular que na artéria carótida, indicando que ocorreu retenção desta no SNC (BARTLEY et al., 1976). Tanto os altos teores de amônia como a menor atividade do ciclo do ácido cítrico no SNC, geram a maioria dos sinais nervosos observados no animal intoxicado, como irritabilidade, incoordenação dos movimentos, sialorréia,

atonía ruminal, meteorismo gasoso, diarreia, prostração, decúbito esternal e lateral, vocalização, midríase, nistagmo, e quadro convulsivo (DAVIS e ROBERTS, 1959; WORD et al., 1969; STILES et al., 1970; HELMER e BARTLEY, 1971; BOLING et al., 1976; EDJTEHADI et al., 1978; HALIBURTON e MORGAN, 1989; ORTOLANI e MARCONDES, 1995). Nos neurônios a amônia promove desestabilização na passagem do estímulo nervoso, gerando o quadro de tetania muscular (VISEK, 1984; KOPCHA, 1987). Um estudo que indique pormenorizadamente a ocorrência de cada um dos sinais clínicos supracitados ainda necessita ser realizado.

Como a amônia bloqueia o ciclo de Krebs, para obtenção de energia, ocorrerá um aumento da glicólise anaeróbica gerando no processo abundantes quantidades de ácido láctico no interior da célula, o qual migrará para a corrente circulatória. No sangue este ácido se dissociará rapidamente liberando H^+ e lactato-L. O primeiro íon combinará com o bicarbonato depletando este tampão sanguíneo provocando uma acidose metabólica. Caso esta seja muito acentuada ocorrerá uma hipercalemia, que promoverá arritmia e parada cardíaca, levando o animal à morte durante espasmo tetânico (MORRIS e PAYNE, 1970; BARTLEY et al., 1976; VISEK, 1979; ORTOLANI e MARCONDES, 1995).

A amônia ainda interfere no metabolismo da glicose, fazendo como que ocorra uma marcante hiperglicemia durante a intoxicação (DAVIDOVICH et al., 1977b). Isto ocorre devido a uma maior liberação de glucagon, estimulador da gliconeogênese, e de adrenalina que ativa a glicogenólise hepática. A hiperglicemia é incrementada ainda pela redução na utilização

da glicose por tecidos periféricos (SPIRES e CLARK, 1979; SYMONDS et al., 1981), além de uma menor ação da insulina, hormônio mediador da passagem da glicose da corrente para as células (VISEK, 1984; FERNANDEZ et al., 1990). Segundo EDJTEHADI et al. (1978), o teor de glicose no plasma sanguíneo aumenta de duas a cinco vezes em quadros de hiperamonemia em ovinos.

Um dos problemas que existe em relação ao estudo da intoxicação por amônia em bovinos é o desenvolvimento de um modelo experimental que seja idêntico ao quadro natural, de alta reprodutibilidade, seguro, sem efeito colaterais e que capacite a avaliação detalhada da patogenia, sinais clínicos e que permita o teste de novos tratamentos alternativos. O modelo clássico de indução é por meio de administração de doses relativamente altas de uréia no interior do rúmen (WORD et al., 1969; BARTLEY et al., 1976). O principal inconveniente deste método é que a reação dos animais é imprevisível; BARTLEY et al. (1976) para ter sucesso em 125 induções tiveram que repetir a intoxicação 244 oportunidades. Outro problema revelado é quanto a absorção da amônia ruminal, pois enquanto a concentração de amônio ruminal foi idêntica entre os intoxicados ou não, o teor de amônia sanguínea foi cerca de duas vezes maior nos bovinos que se intoxicaram (BARTLEY et al., 1976). Desta forma, há necessidade de se desenvolver um modelo experimental que contorne esses problemas, tornando possível um estudo que determine homogêneas concentrações sanguíneas de amônia em todos os animais empregados.

Até o momento, o tratamento usual, mais proposto, para o mal é a

rápida administração de ácidos fracos (ácido acético ou vinagre) transformando a amônia em amônio e diminuindo sua absorção pela parede ruminal (DAVIS e ROBERTS, 1959; WORD et al., 1969; BARTLEY et al., 1976). O ácido fraco deve ser administrado o mais rápido possível, assim que os primeiros sinais clínicos surjam. Quando utilizado como único tratamento, nova administração deve ocorrer dentro de 30 minutos após a primeira infusão do ácido (WORD et al., 1969). BARTLEY et al. (1976) induziram experimentalmente a intoxicação por amônia em garrotes. Assim que os primeiros sinais de tetania surgiram os animais eram medicados com quantidades suficientes de ácido acético. Apesar do tratamento, este não foi suficiente para evitar que 20% dos garrotes sucumbissem, exibindo quadro clássico da intoxicação. Outro detalhe importante no tratamento é a velocidade com que os sinais ocorrem nesta intoxicação, exigindo que o veterinário atue de maneira emergencial e que o mesmo tenha a sua pronta disposição o “antídoto”, em quantidade suficiente, assim como a sonda esofágica, condições nem sempre encontradas na rotina. Além deste fator, relatos de campo têm surgido informando que acidentes nesse tratamento são freqüentes, principalmente quando o mesmo é realizado por leigos e quando da administração de ácido fraco em bovinos apresentando quadro convulsivo, onde muitas vezes este fluido encontra o pulmão, gerando uma pneumonia por aspiração.

Esta dissertação de mestrado está dividida, além deste intróito, em quatro experimentos, representados por quatro trabalhos sequenciais. Num deles foram utilizados ratos enquanto que nos outros três foram empregados

bovinos. O primeiro experimento (TRABALHO 1), com ratos, teve como finalidade testar previamente uma série de tratamentos alternativos a fim de selecionar os dois melhores para serem futuramente utilizados em bovinos (TRABALHO 4). Os ratos foram empregados devido à facilidade de se obter um grande número de exemplares, assim como pelo domínio prévio do método de indução de intoxicação por amônia nesses animais (ORTOLANI e MARCONDES, 1995).

Os três experimentos com bovinos, na verdade, constituíram um ensaio seqüencial em que foram utilizados os mesmos animais, divididos em dois segmentos. O primeiro representou o período de indução em que os garrotes foram continuamente infundidos com solução de cloreto de amônio, e os valores estão expressos nos TRABALHOS 2 e 3. Como foi desenvolvido com sucesso um método de indução específico para este experimento e como os sinais clínicos exibidos pelos animais foram idênticos ao quadro natural os resultados foram reunidos e apresentados no TRABALHO 2 . No TRABALHO 3 foram descritos os dados pertinentes ao volume de urina produzido e a excreção de amônio e de uréia urinários no decorrer da indução. O segundo segmento (TRABALHO 4) teve seu início quando encerrou-se a infusão de cloreto de amônio e prosseguiu no decorrer de três horas, quando os tratamentos foram conduzidos. Neste segmento testou-se a ação dos tratamentos por meio de avaliação bioquímica e da melhora no quadro clínico, complementando o estudo com a determinação do volume e a excreção de amônia e de uréia urinários.

TRABALHO 1

ESTUDO COMPARATIVO DE ALGUNS TRATAMENTOS DA INTOXICAÇÃO POR AMÔNIA EM RATOS

RESUMO

Este trabalho comparou em ratos o efeito de uma solução de aminoácidos do ciclo da uréia (L-arginina, L-citrulina e L-ornitina - O), de um diurético (furosemida - F) e de hidratante (solução salina - H) no tratamento da intoxicação por amônia. Ratos (367) machos Wistar foram injetados [ip] com solução de acetato de amônio (DL 99,9%) e após três minutos distribuídos, ao acaso, e medicados com um dos oito tratamentos (Controle-C; O; F, H, O+F, O+H, H+F, O+F+H). Para avaliar a eficiência da desintoxicação da amônia foram determinadas os teores de amônia, uréia e creatinina plasmáticos, hematócrito e a porcentagem de matéria seca pulmonar. Maiores taxas de sobrevivência foram obtidas nos tratamentos O+H (57%) e O+F+H (62,5%); sendo a menor no grupo C (6%). Os teores de amônia foram 10 vezes menores nos ratos medicados com O+H e O+F+H, que nos demais tratamentos ($p < 0,0001$). Ratos que sucumbiram apresentaram maiores teores de amônia e creatinina plasmáticas, desidratação e edema pulmonar, e menores concentrações de uréia no plasma que os sobreviventes. Ratos medicados com tratamentos que continham O, H e F apresentavam ($p < 0,005$) maiores teores de uréia e menores de creatinina no plasma, assim como edema pulmonar menos pronunciado, respectivamente, que os não tratados.

2.1 INTRODUÇÃO

A forma mais barata de se suplementar uma dieta carente de proteína em ruminantes é por meio de nitrogênio não-protéico (NNP). Sem qualquer dúvida, a uréia é a principal fonte de NNP disponível para esses animais. O seu uso inadequado pode causar grave intoxicação por amônia, fatal na maioria dos casos. O tratamento usual, por meio da administração de ácidos fracos, nem sempre é eficiente, havendo necessidade de se desenvolver novas terapias complementares que aumentem a reversão do quadro tóxico (ORTOLANI et al., 2000).

Tanto a patogenia como o quadro clínico de ratos intoxicados por amônia é bastante semelhante ao que ocorre em bovinos, podendo ser utilizado como um modelo avaliar tratamentos desse quadro em bovinos (ORTOLANI e MARCONDES, 1995).

A amônia, tanto injetada sistemicamente em ratos ou absorvida do tubo gastrintestinal de ruminantes, é desintoxicada no fígado à uréia, no ciclo do mesmo nome. Dependendo da quantidade amônia na corrente sangüínea e do grau de eficiência do ciclo da uréia a amônia pode ou não ser totalmente desintoxicada nesse ciclo. A infusão de aminoácidos do ciclo da uréia (arginina, citrulina e ornitina) em ratos intoxicados por amônia aumentou significativamente a sobrevivência dos mesmos e a eficiência do ciclo da uréia (ORTOLANI e MARCONDES, 1995). Caso a quantidade de amônia seja superior a capacidade de bio-transformação do composto esse se difunde por toda economia animal, gerando graves transtornos. A amônia é facilmente absorvida pelas células, principalmente do SNC, bloqueando o

ciclo de Krebs, desencadeando glicólise anaeróbica resultando numa maior produção de ácido láctico, o qual pode gerar uma intensa acidose metabólica. Nos neurônios a amônia promove a desestabilização na passagem de estímulo nervoso, causando tetania muscular e convulsão. No auge da acidose o potássio migra dos tecidos para a corrente circulatória matando o animal por parada cardíaca (BARTLEY et al., 1976; VISEK, 1979; ORTOLANI e MARCONDES, 1995).

A desidratação é outro sinal citado nos animais gravemente intoxicados. Parte deste quadro pode ser explicado pelo intenso edema pulmonar que aparentemente se estabelece tanto em ratos como em ruminantes, desviando para este órgão parte dos fluidos intravasculares (ROLLER et al., 1982; ORTOLANI e MARCONDES, 1995; MORGAN, 1997; ORTOLANI et al., 2000). A resposta homeostática do organismo frente ao déficit hídrico é a diminuição do fluxo sangüíneo renal, decrescendo assim a produção urinária e provavelmente a excreção de amônia pelos rins. Embora não tenham implementado a idéia, ROLLER et al. (1982) detectaram desidratação em ovinos intoxicados com amônia e sugeriram a rápida hidratação para aumentar a diurese. Tal sugestão ainda precisa ser devidamente testada. Outra hipótese a ser avaliada é o uso de diurético que pudesse ao mesmo tempo remover o excesso de fluidos acumulado nos pulmões e mobilizar rapidamente água dos tecidos, aumentando intensamente a excreção urinária dos animais.

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito associado ou não de alguns tratamentos aminoácidos do ciclo da uréia (O), diurético (F) e

hidratante (H) na intoxicação experimental por amônia em ratos, avaliando a taxa de sobrevivência dos mesmos e o metabolismo da amônia.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 367 ratos machos adultos, da linhagem Wistar, com cerca de 200g de peso vivo. Os ratos foram intoxicados com injeção intraperitoneal de uma solução de acetato de amônio, na dose de 10,8 mMol/kg PV, a qual representa segundo GREENSTEIN et al., (1956) dose letal 99,9%.

Três minutos após os animais foram medicados com um dos oito tratamentos descritos abaixo, num experimento em blocos ao acaso. O grupo controle (C) recebeu 1,2 mL de água bidestilada. Os três grupos seguintes foram tratados com um único medicamento. O primeiro deles constitui-se de uma solução comercial de aminoácidos do ciclo da uréia (O) (L-arginina, L-citrulina e L-ornitina - Ornitargin[®]), tendo como padrão a concentração de L-arginina, que foi aplicada na base de 2mM/kg PV (ORTOLANI e MARCONDES, 1995). O segundo grupo recebeu um diurético a base de furosemida (Lasix[®]) (F), na dose de 2mg/kg PV, aplicado pela via intramuscular. O derradeiro grupo foi medicado com solução salina isotônica (H), 7 mL/ por rato, injetado pela via intraperitoneal. Três grupos de ratos foram injetados com associação de dois medicamentos, pelas vias e doses descritas acima. Ou seja, os ratos foram medicados com O+F; O+H e F+H. Finalmente, um grupo foi tratado com os três medicamentos associados (O+F+H).

Por questões éticas e estatísticas, foram utilizados 50 ratos em tratamentos cuja taxa de sobrevivência foi inferior a 25%; no caso de sobrevivência superior o experimento foi interrompido toda vez que se atingisse 20 ratos sobreviventes.

Para avaliar a eficiência hepática de desintoxicação da amônia, determinaram-se as concentrações plasmáticas de uréia e de amônia, proveniente de sangue obtido de punção intracardíaca; a técnica descrita por TALKE e SCHUBERT (1965) foi utilizada para a determinação dos teores de uréia. O sangue foi colhido no momento da morte de animais que sucumbiram, ou 1 h após o tratamento em ratos sobreviventes. Antes de ser realizada a colheita estes últimos ratos foram anestesiados profundamente com pentobarbital sódico, na dose de 50 mg/kg PV. Também foi determinada a concentração de creatinina plasmática, utilizando método cinético descrito por LUTSGARTEN e WENK (1972). Para estimar o grau de hidratação dos ratos foi determinado o hematócrito utilizando-se sangue total colhido em seringa contendo anticoagulante (EDTA). Finalmente, foi determinado o teor de matéria seca dos pulmões, para detectar a presença de edema pulmonar. Para este cálculo os pulmões foram pesados antes e após 24h de secagem em estufa com ventilação controlada a 103° C.

Vinte ratos adicionais foram utilizados para a determinação de valores basais de uréia e de amônia plasmática, como da MS pulmonar. Antes do sacrifício os ratos foram anestesiados, por método já descrito.

2.2.1 Análise estatística

O resultado da taxa de sobrevivência foi avaliado por meio de análise de proporções usando uma tabela de contingência 2X8, seguida de outra 2X2 para comparar tratamentos, segundo SAMPAIO (1998).

As concentrações médias de uréia e creatinina, os valores de hematócrito e matéria seca dos pulmões, foram inicialmente avaliadas por meio de teste F (análise de variância), e quando significativo às médias foram confrontadas pelo teste de Duncan (SAMPALIO, 1998). Estas médias foram comparadas entre os tratamentos, assim como entre os animais sobreviventes e mortos, ou entre os tratamentos que incluíam um determinado medicamento contra os que não continham o mesmo. Devido à distribuição não-paramétrica de seus valores, os resultados de amônia plasmática foram comparados pelo teste de Mann-Whitney e expressos em mediana (SIEGEL, 1975).

2.3 RESULTADOS

Todos os ratos, infundidos com solução de acetato de amônio, apresentaram quadro típico de intoxicação. A taxa de sobrevivência dos ratos, após a intoxicação com dose letal (99,9%) com amônia, variou de acordo com o tratamento realizado. Na tabela 1 encontram-se tais resultados, ressaltando-se que a sobrevivência foi menor (6%) no grupo controle (C) e maior nos tratamentos O+H (57%) e O+F+H (62,5%), ficando os demais tratamentos em situação intermediária. A morte ocorria em média aos 15 minutos após a intoxicação.

Tabela 1 – Influência de alguns tratamentos, utilizados na reversão da intoxicação por amônia (99,9%), sobre a taxa de letalidade e de sobrevivência em ratos – São Paulo – 2002

Tratamentos	Nº ratos por tratamento	Taxa de sobrevivência
Controle (C)	50	(3/50) 6% ^c
Ornitargin® (O)	50	(12/50) 24% ^{b#}
Lasix® (F)	50	(10/50) 20% ^{b#}
Hidratante (H)	50	(12/50) 24% ^{b#}
H+F	50	(7/50) 14% ^{bc}
F+O	50	(7/50) 14% ^{bc}
O+H	35	(20/35) 57% ^{a##}
O+F+H	32	(20/32) 62,5% ^{a##}

Letras diferentes apresentam diferença estatística entre si (# p<0,05; ## p<0,01).

Os teores de amônia foram 10 vezes menores nos ratos medicados com O+H e O+F+H que nos demais (p<0,05). Mesmo assim, a amoniemia desses melhores grupos foi superior aos valores basais (p<0,0001). Todos os grupos intoxicados apresentaram maiores teores de uréia e creatinina plasmáticas que os ratos do controle basal (p<0,0001) (Tab. 2). Maiores porcentagens de matéria seca foram encontrados nos grupos F e O+F que nos grupos H e O+F+H.

Tabela 2 – Mediana dos teores de amônia plasmática (umol/L) e médias dos teores de uréia (mmol/L) e creatinina (umol/L) plasmáticas em ratos normais e intoxicados com dose letal (99,9%) de acetato de amônio e tratados com diferentes medicamentos – São Paulo – 2002

Tratamentos	Mediana Amônia (umol/L)	Uréia plasmática (mmol/L)	Creatinina plasmática (umol/L)	Matéria seca Pulmonar (%)
C	6906,8 ^a	13,17 ± 1,53 ^{bc}	0,128 ± 0,024 ^{ab}	21,2 ± 2,3 ^{ab}
O	7009,8 ^a	14,65 ± 2,18 ^a	0,128 ± 0,041 ^{ab}	21,3 ± 2,3 ^{ab}
F	7950 ^a	13,09 ± 1,87 ^{bc}	0,125 ± 0,028 ^{ab}	22,3 ± 2,1 ^a
H	7033,2 ^a	12,08 ± 2,10 ^{cd}	0,117 ± 0,029 ^b	20,0 ± 2,4 ^b
H+F	6609,8 ^a	11,66 ± 2,12 ^d	0,120 ± 0,029 ^b	21,7 ± 2,5 ^{ab}
F+O	7347,7 ^a	13,50 ± 2,53 ^{ab}	0,143 ± 0,033 ^a	22,5 ± 2,5 ^a
O+H	473,2 ^{b#}	13,62 ± 2,37 ^{ab}	0,115 ± 0,034 ^b	21,1 ± 2,6 ^{ab}
O+F+H	667,8 ^{b#}	14,32 ± 2,45 ^{ab}	0,116 ± 0,018 ^b	20,6 ± 2,4 ^b
Normais	115,8 ^{c##}	9,30 ± 1,77 ^{e##}	0,081 ± 0,030 ^c	21,7 ± 1,1 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística entre si (# p<0,05; ## p<0,0001)

Ratos que sucumbiram apresentaram maiores teores de amônia e creatinina plasmáticas e hematócrito ($p < 0,00001$), e menores matéria seca pulmonar ($p < 0,026$) e concentração de uréia ($p < 0,00001$) que os sobreviventes (Tab. 3).

Tabela 3 – Mediana dos teores de amônia plasmática (umol/L), e média dos valores de hematócrito (%), de uréia (mmol/L) e creatinina (umol/L) plasmáticas e valores de matéria seca pulmonar (%) em ratos sobreviventes ou mortos à dose letal (99,9%) de acetato de amônio e submetidos a diferentes tratamentos medicamentosos – São Paulo – 2002

	Sobreviventes	Mortos
Amônia plasmática (umol/L)	146,5 ^{b##}	7420,9 ^a
Hematócrito (%)	46,7 ± 5,4 ^{b##}	51,4 ± 7,7 ^a
Uréia plasmática (mmol/L)	14,62 ± 2,82 ^{a##}	12,72 ± 1,91 ^b
Creatinina plasmática (umol/L)	0,107 ± 0,027 ^{b##}	0,130 ± 0,031 ^a
Matéria seca pulmonar (%)	21,8 ± 1,5 ^{a#}	21,2 ± 2,8 ^b

Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística entre si (# $p < 0,026$; ## $p < 0,00001$)

Maiores teores de uréia plasmática foram obtidos em ratos cujo tratamento continha aminoácidos do ciclo da uréia ($p < 0,00001$). Constataram-se menores teores de creatinina plasmática em ratos cujo tratamento continha hidratante ($p < 0,001$). Maior matéria seca pulmonar foi obtida, em ratos tratados com furosemida, que nos demais ($p < 0,005$) (Tab. 4).

Tabela 4 – Ação de tratamentos que continham ou não aminoácidos, hidratante e diuréticos sobre algumas variáveis estudadas – São Paulo – 2002

	Uréia plasmática (umol/L)	Creatinina plasmática (umol/L)	Matéria seca pulmonar (%)
Com Aminoácidos	14,0 ± 2,4 ^a		
Sem Aminoácidos	12,5 ± 2,01 ^b		
Com Hidratante		0,117 ± 0,028 ^b	
Sem Hidratante		0,131 ± 0,033 ^a	
Com Furosemida			21,83 ± 2,48 ^a
Sem Furosemida			20,90 ± 2,45 ^b

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística entre si

2.4 DISCUSSÃO

A intoxicação pela amônia provocou quadro típico nos ratos, com surgimento de hiperestesia, tremores musculares e convulsão. O grupo controle apresentou alta letalidade, como era previsto.

Os dois tratamentos mais efetivos da intoxicação por amônia em ratos, observados neste experimento, foram O+H e O+F+H (Tab. 1). Ambos possibilitaram a maior sobrevivência dos ratos, devido a pronunciada redução nos teores de amônia sangüínea (Tab. 2). Tal resultado indica que o fígado transformou mais adequadamente a amônia em uréia e sugere que tenha ocorrido uma maior excreção tanto de uréia como principalmente de amônio pelos rins. Na hiperamoniemia moderada, como ocorreu nesses tratamentos supracitados, desde que haja produção urinária ocorrerá uma intensa excreção de amônio por este fluido (BRENNER, 1996). O volume urinário não foi avaliado no decorrer deste experimento, mas ratos que receberam solução hidratante, em especial naqueles que sobreviveram por tempo superior a 15 minutos, urinaram visivelmente em maior quantidade que os demais animais.

Os ratos que sucumbiram apresentaram ao mesmo tempo uma maior concentração de amônia plasmática o que levou a um quadro mais intenso de desidratação, verificado pelo maior valor de hematócrito, e a uma menor filtração glomerular, caracterizada pela maior concentração de creatinina plasmática, e um edema pulmonar mais pronunciado, indicado pelo menor teor de matéria seca pulmonar (Tab. 3). A amônia “per se” causa uma grande irritação pulmonar provocando intensa migração de fluidos para este

órgão, gerando assim parcialmente a desidratação (ROLLER et al., 1982; ORTOLANI e MARCONDES, 1995 ; ORTOLANI et al., 2000). É reconhecido classicamente que estados de desidratação desencadeiam, por mecanismos homeostáticos, menor irrigação sangüínea nos rins, o que provoca uma diminuição na filtração glomerular e na produção de urina. Embora apenas o uso de aminoácidos do ciclo de uréia ou da solução hidratante tenha efetivamente aumentado a taxa de sobrevivência (Tab. 1), em relação ao grupo controle, essa taxa passou a ter valores bastante expressivos só quando esses tratamentos foram utilizados em conjunto (O+H e O+F+H), mostrando o efeito aditivo desses medicamentos. Esta ação sinérgica da solução hidratante ocorreu definitivamente pela maior filtração glomerular, já que ratos tratados somente com solução hidratante ou esta associada a outro medicamento proporcionaram menores concentrações de creatinina plasmática (Tab. 4), explicando em parte as observações visuais que estes ratos urinavam mais que os não medicados com hidratante. Embora o incentivo da filtração glomerular seja importante no tratamento da intoxicação a homeostase desta variável não parece ser vital para a sobrevivência dos ratos, visto que a taxa de sobrevivência foi baixa nos ratos dos grupos H e H+F que não recebiam os aminoácidos do ciclo da uréia.

A furosemida (F) quando aplicada isoladamente ou em associação com um segundo tratamento (O+F e H+F) não chegou na maioria dos ratos a apresentar um efeito diurético. Segundo JONES et al. (1977), a furosemida aplicada por via pela via intravenosa tem ação diurética quase que imediata, mas pela via intramuscular o seu efeito será notado ao redor do 30^o min da

aplicação. Neste experimento a morte de boa parte dos ratos ocorreu dentro de 15 min da injeção de amônio e de 12 min da infusão da furosemida. Especula-se que caso esta droga tivesse sido injetada pela via endovenosa, em vez da intramuscular, os resultados poderiam ter sido melhores. Mesmo assim, quando a furosemida foi aplicada conjuntamente com a solução hidratante e aminoácidos do ciclo da uréia (grupo O+F+H) os ratos apresentaram uma diurese bastante abundante. Os tratamentos que utilizaram furosemida determinaram uma maior porcentagem de matéria seca dos pulmões ($p < 0,005$) que aqueles que não continham tal medicamento (Tab. 4). Em outras palavras, a furosemida diminuiu de maneira significativa o edema pulmonar. Apesar deste efeito medicamentoso grande parte dos ratos dos grupos que utilizaram furosemida (F; F+O; H+F), com exceção do grupo O+F+H, sucumbiram (Tab. 1), indicando que o edema pulmonar não foi a principal causa *mortis* da intoxicação.

Ratos medicados com aminoácidos do ciclo da uréia (O) apresentaram maiores teores de uréia plasmática que os tratamentos sem esses compostos (Tab. 4), indicando claramente as suas ações efetivas na conversão de uréia em amônia, no fígado. O mesmo ocorreu com os ratos sobreviventes em relação aos que sucumbiram (Tab. 3), demonstrando que a conversão hepática de amônia em uréia é fundamental no processo de cura. Porém quando analisados isoladamente (Tab. 2), os teores de uréia plasmática foram semelhantes entre os ratos intoxicados com amônia e tratados com diferentes medicamentos, inclusive o grupo controle. Estes

últimos dados têm que ser analisados com cuidado. Em todos esses grupos os teores de uréia plasmática foram bastante superiores ao grupo de ratos normais (Tab. 2), superando em muito o limiar renal de excreção de uréia, aumentando assim sua excreção pela urina. É bem provável que ratos medicados com “O” tenham excretado maiores quantidades de uréia pela urina que os demais grupos testados, nivelando assim os teores de uréia no plasma. Esta suposição é especulativa, pois não foram determinadas as concentrações de uréia na urina dos ratos. Infusão intravenosa de uréia em ratos normais demonstrou que quanto maior foi a sua concentração na corrente sangüínea maior a foi a sua excreção pela urina (BRENNER, 1996).

Os melhores tratamentos evidenciados neste trabalho com ratos devem ser agora testados em ruminantes intoxicados experimentalmente com amônia.

2.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho conclui-se que mais de 50% dos ratos intoxicados com dose letal de amônio podem ter o quadro revertido com o uso de O+H e O+F+H, basicamente pela redução da hiperamoniemia. Os aminoácidos do ciclo da uréia e o hidratante tiveram efeito sinérgico complementar na reversão da intoxicação. Ratos que sucumbiram apresentaram um quadro mais intenso de desidratação e de edema pulmonar, assim como menor filtração glomerular.

2.6 REFERÊNCIAS

BARTLEY, E. E.; DAVIDOVICH, A.; BARR, G. W.; GRIFFEL, G. W.; DAYTON, A. D.; DEYOE, C. W.; BECHTLE, R. M. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatments methods. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 835-841, 1976.

BRENNER, B. M. **The kidney**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. 2702 p.

GREENSTEIN, J. P.; GULLINO, P.; WINITZ, M. Studies on the metabolism of amino acids and related compounds in vivo III. Prevention of ammonia toxicity by arginine and related compounds. **Archives Biochemistry of Biophysics**, v. 64, p. 342-354, 1956.

JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 4 th ed. Ames: Iowa State University Press, 1977. 1380 p.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MORGAN, S. E. Ammonia pipeline rupture: risk assessment to cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 3, p.159-161, 1997.

ORTOLANI, E. L.; MARCONDES, M. C. M. Treatment of ammonia intoxication in rats through the use of amino acids from the urea cycle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 217-220, 1995.

ORTOLANI, E. L.; MORI, C. S.; FILHO, J. A. R. Ammonia toxicity from urea in a brazilian dairy goat flock. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 87-89, 2000.

ROLLER, M. H.; RIEDEMANN, G. S.; ROMKEMA, G. E.; SWANSON, R. N. Ovine blood chemistry values measured during ammonia toxicosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 1068-1071, 1982.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1ª ed. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221 p.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: Mcgraw-Hill, 1975. 350 p.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. **Klinische Wochenschrift**, v. 43, n. 174, 1965.

WISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v. 37, n. 9, p. 273-282, 1979.

TRABALHO 2

UM MODELO EFICIENTE DE INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE INTOXICAÇÃO POR AMÔNIA EM BOVINOS

RESUMO

Para estudar um modelo para indução de intoxicação por amônia foram utilizados 15 garrotes. Cada animal foi intoxicado somente uma vez, com infusão de cloreto de amônio até a ocorrência do quadro convulsivo, quando esta era interrompida. Foram colhidas amostras de sangue no tempo basal, no momento dos tremores musculares e convulsão, para as determinações de amônia, glicose, lactato-L, bicarbonato, potássio, pH e hematócrito. Nos mesmos períodos foram mensurados as freqüências cardíaca e respiratória, temperatura retal e movimento ruminal. Outros sinais foram anotados durante a indução. Os tremores musculares se manifestaram entre 10 a 63 min (38 ± 16) e as convulsões entre 35 a 180 min (96 ± 49). Os teores plasmáticos de amônia, glicose, lactato-L, assim como a uréia e o potássio sérico, hematócrito e freqüência cardíaca se elevaram durante a indução; o inverso ocorreu com o movimento ruminal, pH sangüíneo e os teores de bicarbonato, e não houve alterações na freqüência respiratória e na temperatura retal. Quanto maior os teores de lactato-L, menor o pH sangüíneo ($r = -0,89$, $p < 0,0001$) e os teores de bicarbonato ($r = -0,85$, $p < 0,0001$) e quanto menor o pH sangüíneo maior o teor de potássio ($r = -0,71$, $p < 0,0001$). Concluiu-se que o método de indução é seguro, prático, de alta reprodutibilidade, sem causar efeitos colaterais podendo ser utilizado no estudo da patogenia e tratamento da enfermidade.

3.1 INTRODUÇÃO

A uréia tem sido amplamente utilizada na alimentação de ruminantes, em especial durante o período da seca, como suplemento barato de nitrogênio não-protéico, tanto nos mantidos em regime extensivo como intensivo (MINSON, 1990). Estima-se que pelo menos 10 milhões de bovinos estejam recebendo o chamado “sal proteinado”, onde boa parte do nitrogênio está presente em forma de uréia (MORGULIS, 2002)¹. Desde que os ruminantes sejam adequadamente adaptados e que as quantidades de uréia na dieta sejam rigidamente seguidas, casos de intoxicação por amônia são esporádicos. Contudo, com o uso massivo de uréia e o não cumprimento integral das recomendações para seu uso, os surtos de intoxicação por amônia em ruminantes têm aumentado (REPP et al., 1955; RADOSTITS et al., 1995; ORTOLANI et al., 2000).

A uréia quando ingerida é transformada no rúmen em amônio (NH_4^+) e em menor quantidade em amônia (NH_3). O amônio não é tóxico e desde que haja energia suficiente, as bactérias o incorporam para seu crescimento. Por outro lado, se a amônia for gerada em grande quantidade ela pode ser rapidamente absorvida, e caso esta ultrapasse a capacidade do fígado de desdobra à uréia, no ciclo do mesmo nome, a intoxicação por amônia pode advir, sendo fatal na maioria dos casos (FRØSLIE, 1977).

Embora muitos estudos já tenham sido feitos em relação ao tratamento dos animais intoxicados, os resultados na prática nem sempre são satisfatórios (RADOSTITS et al., 1995). Existe a necessidade de serem

¹ MORGULIS, S. C. F. **Comunicação pessoal**. São Paulo: Minerthal, 2002.

desenvolvidas novas estratégias de terapia mais eficientes e confiáveis. Para a realização de tais pesquisas é necessário o uso de modelos experimentais seguros, de fácil reprodução e que manifestem idêntico quadro exibido na intoxicação natural. Até os dias de hoje, o método de indução mais utilizado é a administração de uréia em grande quantidade pela via oral ou no interior do rúmen. Contudo, a taxa de êxito deste tipo de indução é relativamente baixa e de pequena previsibilidade. Num experimento clássico administraram-se altas doses de uréia, via cânula ruminal, em 26 bovinos utilizados em 244 testes. Desses a intoxicação foi bem sucedida em apenas 51,2% dos casos (125) (BARTLEY et al., 1976). Resultados similares foram obtidos num outro experimento semelhante (WORD et al., 1969). Outra desvantagem desse modelo é a alta mortalidade dos animais intoxicados. No trabalho de BARTLEY et al. (1976) mesmo com um tratamento radical, com a administração de ácido acético no rúmen, e precoce, sem esperar o surgimento de sinais mais evidentes da intoxicação, 20% dos bovinos morreram. Num outro estudo, quando esse ácido foi administrado um pouco mais tardiamente todos os bovinos sucumbiram (WORD et al., 1969)

Assim sendo, um novo modelo experimental mais eficiente, seguro, de alta reprodutibilidade e prático precisa ser desenvolvido, a fim de diminuir a mortalidade dos animais e utilizar um menor número destes numa pesquisa, sendo estes os objetivos do presente trabalho.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais e Dieta

Quinze garrotes mestiços de um ano de idade e com peso médio em torno de 250 kg foram utilizados. Todos animais eram providos de cânula ruminal. Os animais foram mantidos em baias individuais contendo bebedouro, com fornecimento irrestrito de água. A quantidade total de matéria seca (MS) ingerida correspondia a 2,5% do peso vivo individual, sendo composta de 75% da MS de feno de capim coast-cross e 25% de concentrado comercial, a fim de proporcionar um ganho de peso de 200g/dia. A dieta continha 12% de proteína bruta e era ausente de qualquer fonte de nitrogênio não-protéico. Diariamente, cada garrote recebia cerca de 30g de sal mineral comercial, contendo fontes de cloreto de sódio, macro e microelementos. Os animais foram alimentados com esta dieta por no mínimo dois meses antes do começo das induções.

3.2.2 Protocolo

Cada animal foi submetido à intoxicação apenas uma vez durante o experimento. A fim de evitar quaisquer complicações a alimentação foi retirada 16 horas antes de cada indução, mas água foi oferecida à vontade até momentos antes da infusão. Para a realização desta um cateter de polietileno de 20cm X 1,4mm foi inserido na veia jugular externa. Para a indução da intoxicação foi utilizada uma solução de 1,5 M de cloreto de amônio, corrigida para pH 7,0 com uma solução de hidróxido de sódio. Esta solução foi infundida pelo cateter a uma velocidade de 400 mL/hora,

controlado por uma bomba infusora (Digibomb®). A solução foi injetada ininterruptamente até o aparecimento do primeiro episódio convulsivo, quando a mesma era imediatamente interrompida. Os protocolos de tratamento para a reversão do quadro estão descritos com pormenores no TRABALHO 4.

Avaliação da frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal e movimento ruminal foram mensuradas no início da indução, no surgimento dos tremores musculares e quando do primeiro episódio convulsivo. Amostras de sangue venoso foram colhidos para determinação de amônia plasmática, hematócrito, lactato-L, glicose, potássio e pH sangüíneo nos mesmos momentos. Outros sinais clínicos foram observados e anotados durante a indução. As concentrações plasmáticas de amônia, lactato-L e glicose foram determinadas com o uso de kits diagnósticos (Raichem®, Sigma® n°735-10 e Biotrol®, respectivamente). Os teores de potássio sérico foram mensurados em espectrofotômetro de chama.

3.2.3 Análise estatística

Todas as variáveis estudadas apresentaram distribuição paramétrica, sendo analisados inicialmente pelo teste F e quando significativas às médias foram confrontadas pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5% (SAMPAIO, 1998). No estudo da relação entre duas variáveis foram utilizadas as análises de regressão linear e coeficiente de correlação. A significância obtida nas regressões lineares foi avaliada pelo teste F.

3.3 RESULTADOS

A infusão de cloreto de amônio provocou em todos os animais quadro clínico característico da intoxicação por amônia. Embora todos garrotes tenham exibido os sinais clínicos mais característicos do quadro tóxico (tremores musculares e convulsão), alguns deles apresentaram ou não manifestações isoladas, tais como se encontram listados os sinais clínicos constatados nos animais submetidos à indução (Quadro 1).

Os momentos em que tanto os tremores como as convulsões surgiram foram variáveis de animal para animal. Os tremores musculares se manifestaram entre 10 a 63 min de infusão (38 ± 16) e os episódios convulsivos de entre 35 a 180 min (96 ± 49).

Todos os animais sobreviveram, a despeito que um terço deles não serem medicados (grupo controle) (TRABALHO 4).

Quadro 1 – Resumo dos sinais clínicos apresentados pelos animais intoxicados – São Paulo – 2002

Sinais Clínicos	Relação	Porcentagem (%)
Hipersensibilidade	15 / 15	100
Inquietude	15 / 15	100
Tremores musculares	15 / 15	100
Vasos episclerais injetados	15 / 15	100
Decúbito lateral e esternal	15 / 15	100
Nistagmo horizontal	15 / 15	100
Atonia ruminal	15 / 15	100
Apoio em obstáculos	15 / 15	100
Posição em cavalete	15 / 15	100
Midríase bilateral	10 / 15	66,7
Sialorréia	10 / 15	66,7
Fezes amolecidas	9 / 15	60
Edema pulmonar	8 / 15	53,4
Congestão de mucosas	7 / 15	46,7
Diurese	6 / 15	40
Arritmia cardíaca	6 / 15	40
Taquicardia	5 / 15	33,4
Meteorismo gasoso ruminal	5 / 15	33,4
Muflo seco	4 / 15	26,7
Diarréia	1 / 15	6,7
Secreção serosa nasal	1 / 15	6,7

Tabela 1 – Médias gerais e desvios-padrão das concentrações de diferentes variáveis sangüíneas e dos exames clínicos durante a indução – São Paulo – 2002

Variáveis	Basal	Tremores	Convulsão
Amônia (uMol/L)	30,2 ± 14,4 ^c	914,3 ± 334,2 ^b	1943,2 ± 372,6 ^a
Hemat (%)	33 ± 4 ^b	35 ± 3 ^b	42 ± 5 ^a
FCard (bpm)	68 ± 25 ^b	66 ± 17 ^b	103 ± 36 ^a
FResp (mpm)	26 ± 11 ^a	26 ± 9 ^a	34 ± 11 ^a
MRum (mov/3min)	3 ± 1 ^a	1 ± 1 ^b	0 ^c
Temp (°C)	38,2 ± 0,5 ^a	38,2 ± 0,7 ^a	37,9 ± 0,8 ^a
Glicose (mMol/L)	3,7 ± 0,6 ^c	7,2 ± 3,9 ^b	12,1 ± 3,5 ^a
Lactato-L (mMol/L)	1,5 ± 1,1 ^b	3,7 ± 2,8 ^b	12,0 ± 4,4 ^a
Uréia sérica (mMol/L)	3,06 ± 0,40 ^b	4,07 ± 0,45 ^{ab}	5,12 ± 0,46 ^a
pH sangue	7,41 ± 0,03 ^a	7,35 ± 0,07 ^a	7,17 ± 0,10 ^b
HCO₃ (mMol/L)	26,3 ± 3,7 ^a	20,6 ± 3,9 ^b	13,5 ± 3,2 ^c
Potássio (mMol/L)	3,9 ± 0,4 ^c	4,4 ± 0,7 ^b	5,3 ± 0,5 ^a

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Os teores de amônia plasmáticos, glicemia e do potássio se elevaram no decorrer da infusão ($p < 0,0001$; Tab. 1). Semelhantes resultados foram obtidos com os valores de hematócrito, os teores de lactato-L, pH sanguíneo ($p < 0,0001$), concentração de uréia ($p < 0,008$) e a frequência cardíaca ($p < 0,0006$), os quais foram superiores no momento da convulsão (Tab. 1). No decorrer do experimento o movimento de rúmen e o teor de bicarbonato sangüíneo diminuíram constantemente ($p < 0,0001$; Tab. 1). Maiores teores de uréia sérica foram detectados no surgimento da convulsão em relação ao tempo zero ($p < 0,008$; Tab. 1). Não foram constatadas alterações na frequência respiratória como na temperatura retal ($p > 0,1$; Tab. 1).

Quanto maior foi o teor de lactato-L plasmático menor foi o pH sanguíneo ($r = -0,89$; $p < 0,0001$; Graf. 1). Quanto maiores as concentrações de lactato-L menores foram os teores de bicarbonato ($r = -0,85$; $p < 0,0001$; Graf. 2). Quanto menor o pH sangüíneo maior o teor de potássio ($r = -0,71$; $p < 0,0001$, Graf. 3).

Gráfico 2 – Relação entre as concentrações sanguíneas de lactato – L (mMol/L) e o bicarbonato sanguíneo (mMol/L) durante o período de indução – São Paulo – 2002

Gráfico 3 – Relação entre o pH sanguíneo venoso e a concentração sérica de potássio (mMol/L) durante o período de indução – São Paulo – 2002

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram claramente que o método de indução gerado neste trabalho foi altamente eficiente, com a manifestação dos principais sinais clínicos clássicos descritos num quadro de intoxicação natural em bovinos sem provocar a morte de nenhum animal (Tab. 1) (WORD et al., 1969; BARTLEY et al., 1976; ORTOLANI et al., 2000). O

presente modelo de indução mostrou-se muito prático e de fácil execução, obtendo-se um quadro convulsivo em média aos 96 min de infusão. Outra grande vantagem foi à previsibilidade obtida neste método, pois todos os animais se intoxicaram, diferentemente da indução por meio de administração de uréia pela via oral ou intraruminal realizada por BARTLEY et al. (1976). Neste trabalho americano, apesar dos autores administrarem idênticas quantidades de uréia no rúmen existiu marcada diferença nas concentrações de amônia ruminal de garrotes intoxicados ou não, o que influenciou de forma imprevisível o surgimento do quadro tóxico. O presente método teve êxito, pois independeu da concentração de amônia no rúmen e de sua taxa de absorção ao organismo, para causar intoxicação.

A infusão de cloreto de amônio provocou nos animais o quadro tóxico desejado, sem o aparecimento de efeitos colaterais, como o observado em outros modelos de indução, como, por exemplo, no de hipocalcemia em vacas, pela injeção de ácido etilenodiaminotetraacetato sódico (Na_2EDTA) (JØRGENSEN et al., 1999).

Este presente trabalho ainda quantificou a presença dos sinais clínicos. Alguns destes sinais devem ser melhor discutidos, como, por exemplo, o edema pulmonar, vasos episclerais injetados e nistagmo horizontal. O edema pulmonar foi detectado em 53,4% dos animais e surgiu próximo ou logo em seguida ao episódio convulsivo. Dos oito animais com edema três apresentaram uma elevação marcante no hematócrito (50%) em relação ao tempo basal (animais sem edema média 33%). Isto sugere que parte da hipovolemia poderia ser explicada pela passagem de água aos

pulmões. Embora, o edema nestes casos tenha sido bastante severo, o tratamento realizado foi suficiente para reverter o quadro. O edema pulmonar é causado pela ação irritante da amônia no trato respiratório (FRØSLIE, 1977; ROLLER et al., 1982; KOPCHA, 1987; ORTOLANI e MARCONDES, 1995; MORGAN, 1997; ORTOLANI et al., 2000). Segundo BARTLEY et al. (1976), este quadro respiratório poderia ser causado pela amônia ruminal eructada e absorvida pelos pulmões. Os presentes resultados indicam que a hiperamoniemia “per se” pode causar edema pulmonar, já que a indução era por via sistêmica.

Outro sinal evidente foi à observação de vasos episclerais injetados e aumentados em número, em todos aos animais. Estes vasos externos são provenientes das artérias carótidas, e como na intoxicação existe uma marcante congestão vascular cerebral, devido a ação da amônia, os vasos episclerais refletiriam tal estado de hiperemia. Outro sinal constante foi o nistagmo horizontal, presente em todos animais após o estabelecimento dos tremores musculares. Este sinal era mantido mesmo com a mudança na posição da cabeça, o que segundo OLIVER Jr e LORENZ (1993) é sugestivo de alteração nervosa no tronco encefálico, mais especificamente no centro vestibular.

A midríase bilateral não era reduzida com o estímulo luminoso e acometia os animais quando do surgimento do episódio convulsivo. Acredita-se que este sinal seja proveniente de lesões difusas no SNC, como ocorre em muitas encefalopatias (RADOSTITS et al., 1995).

Entre as funções vitais destacam-se as modificações na motilidade ruminal. No surgimento dos tremores musculares constatou-se uma significativa diminuição no número de movimentos ruminais, os quais se tornaram ausentes durante a convulsão (Tab.1). Segundo ITABISASHI (1977), a atonia ruminal em cabras intoxicadas por amônia ocorreu quando estes teores plasmáticos atingiam cerca de 650 $\mu\text{Mol/L}$. No presente trabalho, os animais com tremores musculares e com um pouco mais de 900 $\mu\text{Mol/L}$ de amônia plasmática ainda apresentavam em média um movimento ruminal a cada 3 min. É possível que exista influência de espécie animal sobre a ação e a concentração de amônia sistêmica na motilidade ruminal, o que deve merecer uma futura avaliação. Como resultado da atonia ruminal cinco bovinos desenvolveram meteorismo gasoso, sendo facilmente debelado com a abertura da cânula implantada no órgão. Provavelmente, a amônia “per se” atue no centro da ruminação diminuindo a motilidade ruminal, pois já no início dos tremores esta variável já se apresentava comprometida (COOMBE et al., 1960).

Mesmo considerando que parte (53,4%) dos garrotes desenvolveu um quadro de edema pulmonar associado a maior frequência respiratória (máximo de 48 mov. resp./min), não existiu diferença significativa nesta variável no decorrer da indução ($p>0,1$), pois os demais animais mantiveram a frequência constante (Tab. 1). A frequência cardíaca se elevou no momento da convulsão ($p<0,0006$) associado provavelmente com o estado de excitação e talvez dor, decorrente do espasmo tetânico. Três dos seis

garrotes com arritmia cardíaca apresentaram evidente hipercalemia (5,7 a 6,7 mMol/L).

Semelhante às intoxicações naturais por amônia, esta indução experimental provocou expressiva hiperglicemia, hiperlactemia-L e acidose metabólica, com queda no pH e na concentração de bicarbonato sanguíneo (Tab. 1). A intensidade da hiperglicemia revela o grau da ação deletéria da amônia sobre o organismo de um animal intoxicado, já que a hiperamoniemia diminui a atuação da insulina e estimula a glicogenólise (VISEK, 1979). Os animais em questão, durante a convulsão elevaram os valores basais de glicemia em mais de três vezes. A hiperlactemia-L constatada durante a indução indicou que o ciclo de Krebs estava sendo menos utilizado, pelo efeito bloqueador da amônia neste ciclo, obrigando as células a lançar mão de intensa glicólise anaeróbica para obtenção de energia (VISEK, 1979). O acúmulo de ácido láctico no sangue foi tão grande e imediato que provocou nos animais o surgimento de um quadro significativo de acidose metabólica, caracterizado pelas diminuições do pH (Tab. 1; Graf. 1) e dos teores de bicarbonato sanguíneo (Tab.1; Graf. 2).

Quanto menor o pH sanguíneo no decorrer da infusão maior o grau da hipercalemia (Graf. 3). Segundo TENNANT et al. (1978) quanto mais intensa for a acidose metabólica maior é a passagem de potássio do meio intracelular para o espaço extracelular. Com o avançar da infusão de cloreto de amônio também ocorreu aumento nos teores de potássio séricos (Tab. 1). Caso a infusão não fosse interrompida ao início da primeira convulsão a hipercalemia aumentaria sua intensidade levando o animal à morte por

parada cardíaca (MORRIS e PAYNE, 1970; BARTLEY et al., 1976; FRØSLIE, 1977; VISEK, 1979; ORTOLANI e MARCONDES, 1995).

A elevação do hematócrito (Tab. 1) indica que no decorrer da intoxicação os animais tornaram-se hipovolêmicos e em alguns casos desidratados. Este achado não foi estudado com detalhes pelos trabalhos clássicos sobre o assunto. A perda de fluidos nessa intoxicação pode ocorrer tanto pela passagem de água para os pulmões, caracterizado pelo edema pulmonar, encontrado em 53,4% dos bovinos estudados, como pela perda de água pela diurese pronunciada, observada em alguns animais (33,3%).

3.5 CONCLUSÕES

Concluiu-se que o método de indução de intoxicação por amônia é seguro, prático, sem trazer efeitos colaterais e com resultados idênticos aos encontrados num quadro de doença natural, podendo ser utilizado como modelo nos estudos de patogenia e tratamento desta enfermidade. Animais intoxicados já com episódio convulsivo apresentaram atonia ruminal e taquicardia além de elevarem significativamente o hematócrito e suas concentrações sanguíneas de glicose, lactato-L e potássio, desenvolvendo marcante acidose metabólica. Quanto mais intensa foi a hiperlactemia-L maior o grau de acidose metabólica, a qual influenciou positivamente na intensidade de hipercalemia.

TRABALHO 4

AVALIAÇÃO DE ALGUNS TRATAMENTOS ALTERNATIVOS NA INTOXICAÇÃO POR AMÔNIA EM BOVINOS.

RESUMO

Para estudar a ação de tratamentos alternativos na intoxicação por amônia 15 garrotes foram infundidos com solução de NH_4^+Cl , até o surgimento de convulsão. Em seguida, foram distribuídos ao acaso em três grupos de cinco animais cada e tratados [iv], como descrito a seguir: 1- controle “C”, infundidos com pequena quantidade de solução salina fisiológica (SSF) 1mL/kg PV; 2- grupo O+H, medicados com aminoácidos do ciclo da uréia “O” (Ornitargin[®]-1mL/kg PV) e 20 mL/kg PV de SSF “H”; 3- grupo O+F+H, o mesmo protocolo do grupo 2 acrescido de 265mg/animal de furosemida “F”. Por 3h após o início do tratamento os animais foram monitorados, colhendo-se amostras sangüíneas e todo volume urinário. Os tratamentos O+F+H e O+H promoveram uma melhora clínica pronunciada, em relação ao grupo C, ficando em estação, retornando o movimento de rúmen e apetite e se recuperando do edema pulmonar mais rapidamente; os animais do grupo C ao término do experimento apresentaram hipotermia. No decorrer do tratamento os grupos O+F+H e O+H apresentaram menores teores plasmáticos de amônia e lactato-L, urinaram mais abundantemente, excretaram pela urina maior quantidade de amônio e tiveram menor pH urinário. No decorrer da 1ª h pós-tratamento a amônia foi depurada mais intensamente do sangue e a quantidade de amônio e uréia excretada pela urina em relação ao NH_4^+Cl injetado foi maior nos grupos O+F+H e O+H.

Concluiu-se que os tratamentos propostos tiveram uma ação efetiva principalmente por diminuir a hiperamoniemia, por meio da maior excreção de renal de amônio e maior transformação hepática de amônia em uréia.

5.1 INTRODUÇÃO

Para uma adequada produtividade dos bovinos criados em condições extensivas é imperiosa a suplementação invernal com fontes de nitrogênio, quer seja ela protéica ou não (BORTOLUSSI et al., 1996). Devido ao alto preço dos farelos protéicos é crescente o número de pecuaristas que tem adotado o uso de nitrogênio não-protéico, em especial uréia, junto às misturas minerais nos chamados “sais proteinados” ou com outros alimentos, tais como cana-de-açúcar, melaço e silagem de milho.

Embora este maior emprego de uréia tenha trazido avanços à pecuária, ocasionalmente o uso inadequado tem levado ao surgimento de surtos de intoxicação, geralmente fatais e com prejuízos econômicos (CALDOW e WAIN, 1991; ORTOLANI et al., 2000). Estes surtos ocorrem subitamente e são devido à rápida transformação de uréia em amônia no rúmen, com absorção desta última substância a qual migra para as células, bloqueando o ciclo de Krebs, aumentando a glicólise anaeróbica e gerando acidose metabólica e hipercalemia terminal. Além desta consequência a amônia interfere no sistema nervoso central e periférico aumentando a condução nervosa e provocando quadro de tetania e convulsão, causando entre outras complicações atonia ruminal e meteorismo; além do mais como a amônia é irritante ao tecido pulmonar ela provoca marcante edema neste

órgão (BARTLEY et al., 1976; FRØSLIE, 1977; ORTOLANI & MARCONDES, 1995; ORTOLANI et al., 2000; TRABALHOS 2 e 3).

O tratamento deve ser rápido e baseia-se na administração de ácido acético, para diminuir o pH ruminal e a absorção de amônia para o organismo. Segundo RADOSTITS et al. (1995), o resultado deste tratamento usual é incerto e improvável de ser eficiente. De fato, BARTLEY et al. (1976) trataram garrotes com ácido acético, precocemente, quando do surgimento da tetania, mesmo assim 80% dos animais sucumbiram. WORD et al. (1969) utilizaram o ácido acético quando do surgimento da convulsão em bovinos e não alcançando sucesso em nenhum caso. ORTOLANI et al. (2000) trataram cinco cabras intoxicadas, sendo que duas já apresentavam convulsão, com vinagre e associaram com hidratação intravenosa e furosemda; todos os animais se recuperaram com sucesso. Os autores especularam a possibilidade de ocorrer maior excreção de amônia pela urina.

No TRABALHO 3 notou-se que quanto maior foi a diurese maior a excreção de amônio pela urina, exigindo maiores doses de cloreto de amônio para intoxicar os bovinos que mais urinaram. Este resultado indicou que o pleno funcionamento renal é importante para a eliminação de amônia circulante e acelerar o processo de desintoxicação desta no organismo. Contudo, nesse mesmo trabalho verificou-se que muitos animais apresentavam significativa hipovolemia, em especial na convulsão, e é conhecida que uma das primeiras respostas a este estado é a diminuição do fluxo sangüíneo renal, diminuindo assim a filtração glomerular (RADOSTITS et al., 1995). Assim, a hipótese de correção da hipovolemia associado ao

uso de um diurético para remover fluidos seqüestrados em órgãos, como os pulmões, e aumentar a produção urinária parecem pertinentes.

É reconhecido que a principal forma de desintoxicação da amônia no organismo é por meio do ciclo da uréia, nos hepatócitos, transformando a amônia em uréia. A capacidade de desintoxicação deste ciclo é dependente da integridade dos hepatócitos, além da atividade enzimática desenvolvida anteriormente a intoxicação, sendo correspondente à quantidade de proteína ou de nitrogênio não-protéico ingerido (FRØSLIE, 1977; VISEK, 1979). Outro fator limitante da atividade deste ciclo também é a quantidade de aminoácidos participantes do mesmo (arginina, citrulina e ornitina), disponíveis no hepatócito. Cerca de 33% de ratos intoxicados com doses letais (DL 99,9%) de amônia sobreviveram após o tratamento com uma combinação destes aminoácidos, enquanto que no grupo controle a sobrevivência foi mínima (1%) (ORTOLANI & MARCONDES, 1995).

O TRABALHO 1 teve como objetivo realizar um estudo de triagem a este presente experimento, onde foram testadas diferentes combinações de tratamentos a base de hidratante (H), furosemida (F) e aminoácidos do ciclo da uréia (O), em ratos. Os dois melhores resultados, julgados pela taxa de sobrevivência, foram os seguintes: O+F+H e O+H.

O presente trabalho teve como objetivo testar os dois supracitados tratamentos na recuperação de bovinos intoxicados com amônia, por meio de acompanhamento clínico e laboratorial, com ênfase no papel do rim na desintoxicação desta substância.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os detalhes sobre os animais, dieta e protocolo de indução por amônia, coleta de materiais biológicos, respectivas técnicas de determinações das variáveis no sangue e urina, estão detalhadamente descritos nos TRABALHOS 2 e 3.

Logo em seguida ao surgimento do episódio convulsivo a infusão de cloreto de amônio foi interrompida e se convencionou a chamar este tempo como zero. Neste momento, todo animal foi casualmente distribuído em um dos três grupos, de cinco garrotes cada, segundo o tratamento proposto.

O primeiro grupo foi o controle (C), cujo tratamento foi composto de 1mL de solução fisiológica de NaCl/kg PV, infundida pela cânula implantada na veia jugular no decorrer das três horas seguintes. Esta quantidade era diminuta e tinha o intuito de manter a fluidez na citada cânula. O segundo grupo foi tratado com O+H na dose de 1mL de solução de aminoácidos do ciclo da uréia/kg PV (Ornitargin[®] : contendo 0,075 g de cloreto de arginina-L; 0,02 g de aspartato de ornitina-L e 0,005 g de citrulina-L e 0,2g de frutose por mL) e de 20 mL de solução de NaCl/kg PV O 3º tratamento (O+F+H) recebeu os dois medicamentos citados no grupo anterior, adicionado de 265 mg de furosemida [iv]. Tanto o tratamento F como o O foram injetados imediatamente após ao fim da infusão de cloreto de amônio, sendo continuado o tratamento com H no decorrer de três horas.

Amostras de sangue e de urina foram coletadas durante o tratamento, nos seguintes momentos: convulsão (tempo zero), aos 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. No sangue foram determinadas as concentrações de

amônia e lactato-L plasmáticos; uréia e creatinina sérica, além do hematócrito. Na urina foram analisadas as concentrações de amônio, uréia e creatinina urinárias, assim como o volume total eliminado pelos animais.

Para reduzir a influência do peso corporal sobre o índice de excreção urinária de amônio (IEUA) uma fórmula proposta por CHEN et al. (1992) foi utilizada:

$$\text{IEUA } (\mu\text{Mol/L}) = \left[\frac{\text{amônio urinário } (\mu\text{Mol/L})}{\text{creatinina urinária } (\mu\text{Mol/L})} \right] \times \text{PV}^{0,75}$$

O índice de excreção fracional de amônio urinário (IEFAU) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{IEFAU } (\%) = \left[\frac{\text{amônio urinário } (\mu\text{Mol/L}) \times \text{creatinina sérica } (\mu\text{Mol/L})}{\text{amônia plasmática } (\mu\text{Mol/L}) \times \text{creatinina urinária } (\mu\text{Mol/L})} \right] \times 100$$

Foram calculadas as quantidades percentuais de excreção de amônio e de uréia pela urina em relação à quantidade de NH_4^+Cl injetado. Para tal foi utilizado a quantidade total destas substâncias excretadas na urina. Como segundo MARTIN Jr et al. (1981), no ciclo da uréia um mol de amônia é transformado num mol de uréia, a eliminação de um mol desta última substância na urina equivaleu à desintoxicação de um mol de amônia.

Foram monitoradas durante os tratamentos as seguintes variáveis: o número de batimentos cardíacos, frequência respiratória, movimento de rúmen e temperatura retal. Foi anotado o tempo em que os animais deixavam de permanecer em decúbito, se posicionando em estação, assim como o momento em que retomavam seus apetites. Como a literatura cita que a amônia é irritante aos pulmões podendo causar edema nos mesmos,

foi acompanhado, por meio de auscultação, o surgimento e o desaparecimento de sinais indicativos de edema pulmonar, tais como estertores úmidos. O pH urinário foi acompanhado nos momentos supracitados.

5.2.1 Análise estatística

Todas as variáveis urinárias, com exceção do pH urinário, apresentaram distribuição não-paramétrica, sendo comparadas pelo Teste de Mann-Whitney. As demais variáveis apresentaram distribuição paramétrica, e foram analisadas inicialmente pelo teste F e quando significativas às médias foram confrontadas pelo teste de Duncan. Foram calculados o coeficiente de correlação e a equação de regressão linear entre algumas variáveis urinárias, sendo que a significância do último parâmetro foi verificada por meio de teste F (SAMPAIO, 1998). As análises estatísticas foram processadas com uso de dois programas computadorizados (MINITAB release 13, 2000 e Statistical Analysis System, SAS 8.01- 2000).

5.3 RESULTADOS

Tabela 1 – Valores médios e desvios-padrão da concentração de amônia plasmática (umol/L) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	2098,5 ^{Aa} ± 300,89	1547,6 ^{Ab} ± 235,02	1232,7 ^{Ac} ± 226,44	1023,6 ^{Ac} ± 214,8	491,5 ^{Bd} ± 135,1	270,8 ^{Bde} ± 77,62	183,9 ^{Be} ± 73,98	102,7 ^{Be} ± 56,06
O+H	1785,4 ^{Aa} ± 307,68	1475,7 ^{Ab} ± 259,93	1345,5 ^{Ab} ± 331,75	1191,5 ^{Ab} ± 229,17	787,9 ^{Abc} ± 240,5	463,3 ^{Bd} ± 163,66	300,2 ^{Bde} ± 105,24	91,5 ^{Be} ± 39,93
Controle	1805,6 ^{Aa} ± 461,9	1452,3 ^{Aab} ± 427,75	1439,6 ^{Aab} ± 554,51	1290,9 ^{Aab} ± 542,17	1028,8 ^{Abc} ± 474,06	847,9 ^{Abcd} ± 363,99	617 ^{Ac} ± 343,1	349,4 ^{Ad} ± 243,55

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Não existiu diferença entre os tratamentos nos teores de amônia no momento zero ($p>0,52$). O tratamento O+F+H promoveu uma diminuição nas concentrações de amônia plasmática em relação ao grupo controle a partir do 60^o min até o final do experimento ($p<0,02$). A partir do 90^o min o mesmo fato ocorreu no grupo O+H em relação ao grupo controle. O tratamento O+F+H só foi superior ao O+H no 60^o min ($p<0,05$). Dentro de cada um dos tratamentos a amônia apresentou queda significativa em sua concentração detectada na convulsão já no 10^o min nos grupos O+F+H e O+H e no 60^o min no grupo controle ($p<0,05$) (Tab. 1).

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de lactato-L plasmático (mmol/L) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	10,45 ^{Aabc} ± 5,95	12,20 ^{Aab} ± 5,66	12,45 ^{Aab} ± 5,31	13,37 ^{Aa} ± 4,97	10,81 ^{Bab} ± 4,11	7,90 ^{Babc} ± 2,95	5,85 ^{Bbc} ± 2,63	4,02 ^{Bc} ± 3,68
O+H	13,05 ^{Aab} ± 5,03	15,58 ^{Aa} ± 4,33	16,31 ^{Aa} ± 3,88	15,49 ^{Aa} ± 3,60	13,86 ^{ABa} ± 4,23	10,68 ^{Bab} ± 4,94	7,70 ^{Bbc} ± 4,56	4,24 ^{Bc} ± 4,02
Controle	12,53 ^{Ab} ± 1,81	15,97 ^{Aab} ± 1,4	17,84 ^{Aa} ± 2,31	18,23 ^{Aa} ± 3,32	18,84 ^{Aa} ± 4,75	18,26 ^{Aa} ± 3,69	15,66 ^{Aab} ± 5,04	11,99 ^{Ab} ± 4,84

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Do momento zero até o 30^o min não existiu diferença nas concentrações de lactato-L, entre os tratamentos ($p>0,13$), porém a partir do 60^o min o grupo O+F+H foi sempre inferior ao controle, existindo a mesma condição para o tratamento O+H a partir da 90^o min ($p<0,03$). Dentro dos tratamentos, constatou-se no grupo O+F+H que no 30^o min ocorreu um maior teor de lactato-L em relação aos 120 e 180 min ($p<0,03$); no tratamento O+H o mesmo fenômeno existiu do 10^o ao 60^o min em relação

ao 120^o e 180^o min ($p < 0,0008$); no grupo controle idêntica situação ocorreu do 20^o ao 90^o min em relação aos tempos zero e 180 min ($p < 0,03$) (Tab. 2).

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de uréia sérica (mmol/L) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	6,65 ^{Aa} ± 1,73	6,38 ^{Aa} ± 1,16	6,45 ^{Aa} ± 1,77	6,59 ^{Aa} ± 1,74	6,51 ^{Aa} ± 1,83	5,71 ^{Aa} ± 1,83	6,53 ^{Aa} ± 1,84	6,51 ^{Aa} ± 1,83
O+H	3,58 ^{Ba} ± 0,89	3,65 ^{Ba} ± 0,88	3,6 ^{Ba} ± 0,99	3,55 ^{Ba} ± 0,96	3,57 ^{Ba} ± 0,99	3,65 ^{Ba} ± 0,95	3,76 ^{Ba} ± 1,05	3,83 ^{Ba} ± 1,11
Controle	5,13 ^{ABa} ± 1,29	4,88 ^{ABa} ± 1,12	4,99 ^{ABa} ± 1,18	4,88 ^{ABa} ± 1,17	5,10 ^{ABa} ± 1,34	5,13 ^{Aa} ± 1,34	5,16 ^{ABa} ± 1,28	5,17 ^{ABa} ± 1,16

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Durante todo o experimento o grupo O+F+H apresentou maiores teores de uréia que o O+H ($p < 0,05$); não existiu diferença entre os grupos controle e O+F+H ($p > 0,12$); o grupo controle só foi superior ao O+H no 90^o min ($p < 0,05$). Não existiram diferenças dentro dos três tratamentos ($p > 0,20$) (Tab. 3).

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de hematócrito (%) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	42 ^{ABa} ± 5	39 ^{Aab} ± 6	40 ^{Aab} ± 6	41 ^{Aab} ± 7	39 ^{Aab} ± 6	36 ^{Aabc} ± 5	35 ^{Abc} ± 4	31 ^{Ac} ± 3
O+H	46 ^{Aa} ± 2	42 ^{Aabc} ± 2	43 ^{Aab} ± 2	42 ^{Aabc} ± 2	40 ^{Abcd} ± 4	38 ^{Acd} ± 5	36 ^{Ade} ± 6	32 ^{Ae} ± 4
Controle	38 ^{Ba} ± 4	38 ^{Aa} ± 4	37 ^{Aa} ± 4	38 ^{Aa} ± 5	37 ^{Aa} ± 5	36 ^{Aa} ± 4	34 ^{Aa} ± 3	32 ^{Aa} ± 3

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Com exceção do momento zero, que os valores de hematócrito foram superiores no grupo O+H que no controle ($p<0,02$), não existiram diferenças significativas entre os valores dos tratamentos ($p>0,16$). Porém, menores valores em relação ao tempo zero foram constatados a partir do 60^o e 120^o min nos tratamentos O+H ($p<0,0001$) e O+F+H ($p<0,03$), respectivamente; não existiu diferença dentro do grupo controle ($p>0,31$) (Tab. 4). Não ocorreram diferenças significativas nos valores de creatinina entre os diferentes tratamentos ($p>0,05$).

Tabela 5 - Valores de mediana de volume urinário, excreção total de amônio e de uréia e índice de excreção urinário de amônio e uréia no decorrer da 1^a h ou até a 3^a h, após diferentes tratamentos de bovinos intoxicados com cloreto de amônio – São Paulo – 2002

		Até 1 ^a hora	Global (3h)
Volume urinário (mL)	O+F+H	3690 ^A	11120 ^A
	O+H	4640 ^A	9520 ^A
	Controle	50 ^B	2455 ^B
Excreção total de amônio (mM)	O+F+H	39,65 ^A	79,17 ^A
	O+H	47,45 ^A	88,22 ^A
	Controle	0,42 ^B	13,61 ^B
Índice de excreção de amônio urinário (uM)	O+F+H	1613,4 ^A	2283,2 ^A
	O+H	1416,4 ^A	2598,4 ^A
	Controle	333,1 ^B	1341 ^A
Índice de excreção fracional de amônio urinário (%)	O+F+H	588,1 ^A	851,2 ^A
	O+H	359,6 ^{AB}	722,5 ^A
	Controle	186,3 ^B	328,2 ^A
Excreção total de uréia (mM)	O+F+H	72,51 ^A	201,4 ^A
	O+H	42,25 ^{AB}	74,9 ^B
	Controle	1,68 ^B	93,5 ^{AB}
Índice de excreção de uréia urinária (mM)	O+F+H	2200,2 ^A	4799,2 ^A
	O+H	866,8 ^A	2333,8 ^A
	Controle	584,4 ^A	5779,1 ^A
Índice de excreção fracional de uréia urinária (%)	O+F+H	101,0 ^A	95,1 ^A
	O+H	74,2 ^A	66,0 ^A
	Controle	107,3 ^A	110,0 ^A

Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Os animais tratados com O+F+H e O+H urinaram mais abundantemente, eliminaram mais amônio pela urina que os animais controle tanto no decorrer das três horas do tratamento como na primeira hora deste ($p<0,05$); estes mesmos grupos apresentaram maiores índice de excreção urinário de amônio urinário na 1ª h que o grupo controle ($p<0,05$) (Tab 5).

O índice de excreção fracional de amônio e a excreção total de uréia foi superior no grupo O+F+H que no controle ($p<0,05$) na primeira hora, não existindo diferença no tempo global ($p>0,14$). Não existiram diferenças significativas tanto o índice de excreção de uréia urinária como no seu índice fracional ($p>0,1$) (Tab 5).

Tabela 6 – Média do total de NH_4^+Cl injetado para obtenção de convulsão e mediana da excreção percentual urinária de amônio ou uréia e ambos na 1ª h e durante as 3h de tratamento em relação ao NH_4^+Cl injetado – São Paulo – 2002

Grupos	Total de amônio injetado (mM)	Excreção (%) urinário de amônio e uréia em relação ao NH_4Cl injetado					
		Amônio (1h)	Amônio (Global – 3h)	Uréia (1h)	Uréia (Global – 3h)	Total de amônio + uréia (1h)	Total de amônio + uréia (3h)
O+F+H	356 ± 195,2 ^a	12 ^a	15,5 ^a	22,2 ^a	59,2 ^a	34,2 ^a	77 ^a
O+H	390 ± 118,5 ^a	14 ^a	25,2 ^a	10,1 ^a	21,5 ^b	28,7 ^a	51 ^a
Controle	322 ± 305,8 ^a	0,26 ^b	14,4 ^a	2 ^b	29,8 ^b	2,5 ^b	48,7 ^a
Significância	$p>0,90$	$p<0,04$	$p>0,29$	$p<0,03$	$p<0,05$	$p<0,05$	$p>0,11$

Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

O total de NH_4^+Cl injetado para provocar convulsão foi semelhante entre os grupos ($p>0,90$). Na 1ª h os tratados com O+F+H e O+H excretaram pela urina maiores quantidades tanto de amônio e uréia, como da somatória de ambos. No decorrer das três horas de tratamento o grupo O+F+H excretou maiores quantidades de uréia, não ocorrendo diferença

entre os tratamentos no concernente os valores de amônio ou de uréia+amônio (Tab. 6).

Tabela 7 - Influência do tratamento (O+F+H e O+H) sobre as variáveis que estimam melhora clínica e o pH urinário – São Paulo – 2002

Grupos	Tempo para ficar em estação (min)	Retorno do mov. ruminal (min)	Recuperação do edema pulmonar (min)	Retorno do apetite (min)	Temperatura corpórea (°C) no 180° min	pH urinário
Tratados (O+F+H e O+H)	72 ± 35 ^a	41 ± 32 ^a	33 ± 23 ^a	65 ± 15 ^a	38,1 ± 0,7 ^b	6,14 ± 0,44 ^a
Controle	162 ± 61 ^b	126 ± 49 ^b	108 ± 45 ^b	120 ± 40 ^b	36,6 ± 1,4 ^a	7,13 ± 0,43 ^b
Significância	p<0,05	p<0,001	p<0,04	p<0,04	p<0,013	p<0,006

Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Não existiu diferença entre tratamentos e dentro dos mesmos tanto na frequência cardíaca como na respiratória ($p>0,20$). No momento zero todos animais apresentaram atonia ruminal. Os grupos O+F+H e O+H em conjunto retornaram os movimentos ruminais mais precocemente que os garrotes do grupo controle, recuperando mais rapidamente também seus apetites. A temperatura retal foi semelhante entre os grupos, com exceção do 180° min em que os tratados com O+F+H e O+H apresentaram temperaturas superiores ao controles. Os garrotes medicados com O+F+H e O+H se levantaram mais rapidamente, permanecendo em seguida em estação. Oito bovinos apresentaram edema pulmonar, que surgia na maioria dos casos logo em seguida a convulsão, sendo cinco nos animais do grupo controle e três do O+H, enquanto nenhum animal medicado com O+F+H manifestou tal sinal; os tratados com O+H recuperaram-se mais rapidamente que os não-tratados. O pH urinário médio no decorrer dos tratamentos foi inferior nos medicados com O+F+H e O+H que nos controles (Tab. 7).

Gráfico 1 – Relação entre a média de pH urinário e a excreção total de amônio urinário (mM) nos bovinos intoxicados experimentalmente com cloreto de amônio – São Paulo – 2002

Quanto menor foi o pH urinário no decorrer do tratamento maior foi a excreção total de amônio durante o período ($p < 0,001$) (Graf. 1). Quanto maior o volume urinário menor a média do pH urinário durante o tratamento ($r = -0,53$; $p < 0,05$); quanto maior o volume urinário maior a excreção de amônio urinário durante o período do tratamento ($r = 0,52$; $p < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os tratamentos propostos proporcionaram uma melhora significativa no quadro tóxico, se comparado ao grupo controle, diminuindo sensivelmente a hiperamoniemia, em especial durante a 1ª h após o início do tratamento, quando os animais geralmente sucumbem. Os garrotes do grupo O+F+H apresentavam na 1ª h teores de amônia ($491,5 \mu\text{M/L}$) (Tab. 1) muito abaixo dos constatados quando do surgimento de tremores musculares ($827,7 \mu\text{M/L}$) (TRABALHO 2), ou dos bovinos não-tratados ($1028,8 \mu\text{M/L}$). O tratamento O+H também foi mais

eficiente em reduzir a hiperamoniemia, embora de maneira não tão rápida como no O+F+H. Nenhum animal não-tratado morreu, provavelmente pela interrupção da injeção de amônio que reduziu gradativamente a hiperamoniemia (Tab. 1), tornando menor a sobrecarga dos efeitos danosos da amônia no organismo.

Embora seja bastante conhecida a importância da desintoxicação da amônia no ciclo da uréia, os presentes resultados demonstraram, semelhante aos obtidos no TRABALHO 3, que os rins têm papel preponderante na excreção de amônia, via amônio urinário, em especial na 1ª h pós-tratamento. Considerando a quantidade média de amônio e uréia eliminada pela urina durante a 1ª h (Tab. 6), os bovinos tratados desintoxicaram em média 31,5% do amônio injetado, contra apenas 2,5% do grupo controle. Da significativa desintoxicação causada pelos tratamentos cerca de 44% foram gerados pela eliminação de amônia e 56% pelo ciclo da uréia, demonstrando o quão importante foi o primeiro mecanismo no processo de depuração da amônia do organismo. Este fato também foi constatado pelos maiores índices de excreções tanto urinárias como fracional de amônio na 1ª h (Tab. 5), que indicam que os animais tratados, principalmente com O+F+H, eliminaram mais amônia por peso metabólico e que foram mais aptos em eliminar a amônia da corrente circulatória. Esta maior eliminação de amônia pela urina esta intimamente ligada a dois fatores, a maior diurese (Tab. 5) e ao mais baixo pH urinário (Tab. 7) constatado nos animais tratados. Segundo MALNIC e MARCONDES (1986), quanto maior for o volume urinário e menor for o pH urinário maior será a

excreção de amônio pelo túbulo contornado proximal. De fato, semelhante aos resultados obtidos no TRABALHO 3 quanto menor o pH urinário maior a excreção total de amônio urinário (Graf. 1), confirmando aquela afirmação.

A maior diurese, constatada nos grupos O+F+H e O+H, foi causada, provavelmente, pela hidratação rápida a qual deve ter aumentado a perfusão renal, diminuída pelo estado de desidratação quando do fim do momento de convulsão (TRABALHO 3). Embora os animais desses grupos perdessem fluidos pela urina no decorrer do tratamento os animais diminuíram os valores de hematócrito no período (Tab. 4) retornado aos seus valores normais, indicando que a hidratação foi suficiente para repor a volemia.

O uso de aminoácidos do ciclo da uréia nos tratamentos O+F+H e O+H, sem dúvida, incrementou a atividade do ciclo da uréia na 1^a h, se constatado pela excreção de uréia urinária no período (Tab. 6). Porém, o mesmo fato não se verifica no decorrer de todo tratamento com curso de 3^a h, pois não ocorreu diferença na eliminação de uréia entre os não-tratados e o grupo O+H. Estes resultados sugerem que os aminoácidos empregados nos tratamentos suprimiram o ciclo da uréia no auge de sua atividade e que passaram a ter papel mais secundário em seguida, pois a atividade do ciclo foi exacerbada mesmo nos animais não-tratados.

Do ponto de vista prático este fato é relevante, pois estes aminoácidos são caros e necessitam ser empregados em altas dosagens tornando difícil seu emprego rotineiro no protocolo do tratamento dessa intoxicação. Por outro lado, o uso de fluidos e furosemida torna o tratamento muito disponível e com baixo custo. Embora os resultados com estes

supracitados medicamentos não tenham conseguido reverter adequadamente a intoxicação em ratos (TRABALHO 1), os mesmos foram muito efetivos em recuperar cinco cabras acometidas com este mal (ORTOLANI et al., 2000). Pelo fato do custo e da disponibilidade dos fluidos e da furosemida novo experimento deve ser conduzido para estudar a eficiência dos mesmos na excreção de amônia pela urina.

A furosemida não aumentou o volume urinário nem a excreção de amônia na urina, em relação grupo O+H. Esperava-se que este medicamento exacerbasse a diurese, mas tal fenômeno não foi evidenciado. Aplicou-se uma dose fixa de 265 mg/animal, preconizada pelo fabricante, ao redor de 1mg/kg PV; é possível que uma dose maior, de até 2mg/kg PV como indica (JONES et al., 1978), aumentasse significativamente a diurese. Mesmo assim, os animais tratados com diurético não desenvolveram edema pulmonar, possivelmente pela ação imediata da furosemida que foi aplicada [iv] em seguida a convulsão.

A dinâmica da concentração de uréia sérica, no decorrer deste experimento, é de interpretação mais complexa. Esperava-se que esta concentração aumentasse muito no decorrer dos tratamentos, devido ao incremento de atividade do ciclo da uréia (Tab. 3). Contudo, não ocorreram diferenças nos teores de uréia sangüínea dentro dos grupos nesse período (Tab. 3). Provavelmente, isto ocorreu devido a um enorme incremento na depuração sangüínea, nos três tratamentos, visto pelo índice de excreção fracional de uréia urinária (Tab. 5), que indicou que mais de 74% da uréia na

corrente sangüínea era eliminada na urina, mantendo-se alta esta depuração até o final do experimento.

A redução da hiperamoniemia (Tab. 1) foi acompanhada paralelamente com a melhora nas condições clínicas dos animais em questão (Tab. 7). Os animais tratados com O+F+H e O+H apresentaram uma nítida recuperação da higidez já no final da primeira hora. Animais tratados com ambos tratamentos recobram a movimentação ruminal, ficaram em estação mais rapidamente e o apetite mais precocemente. Esta melhora no estado clínico é indicativa que o teor de amônia no sistema nervoso central e periférico diminuiu sensivelmente durante o tratamento, re-estabelecendo as funções ruminais, motoras e o apetite. Muitos animais do grupo controle permaneceram em estupor e depressão no estado geral por longo tempo, e no término do experimento apresentaram ligeira hipotermia. Um desses se encontrava num quadro tão deplorável ao término do experimento (temperatura retal 34,5°C, meteorismo ruminal, regurgitamento ruminal, estupor, taquicardia intensa, taquipnéia com respiração em golpes, midríase etc) que foi necessário um tratamento intensivo para a melhora do quadro.

Outro metabólito que refletiu a depuração da amônia do organismo e a conseqüente recuperação clínica, após os tratamentos estudados, foi o lactato-L, que diminuiu sensivelmente sua concentração no plasma no decorrer da 1ª h com o uso de O+F+H e no 90º min com O+H (Tab. 2). O alto teor de lactato-L plasmático é decorrente da utilização indevida da via glicolítica anaeróbica para obtenção celular de energia. Este fato é

provocado pelo acúmulo intracelular de amônia, a qual bloqueia o ciclo de Krebs, obrigando as células a obter energia por meios anaeróbicos (FRØSLIE, 1977; VISEK, 1979).

Os valores de hematócrito diminuíram dentro do tratamento O+F+H e O+H com o decorrer do experimento (Tab. 4). Apesar desses animais excretarem maior quantidade de urina que o grupo controle eles praticamente corrigiram a volemia de maneira eficiente, provavelmente pela ação do hidratante e pelo retorno de água seqüestrada nos tecidos, derivada do efeito irritativo da amônia. Dos oito garrotes que apresentaram edema pulmonar, evidente nos momentos em seguida à convulsão, três eram do grupo tratado com O+H e cinco eram do grupo controle. A recuperação do edema pulmonar (desaparecimento de estertores úmidos/bolhosos audíveis na auscultação) foi muito mais rápida no grupo tratado que no grupo controle (Tab. 7).

5.5 CONCLUSÕES

Os tratamentos utilizados desintoxicaram mais eficientemente a amônia do organismo, por meio da maior excreção desta pela urina e pela maior atividade do ciclo da uréia, no fígado. A maior eliminação de amônia pela urina foi acompanhada de maior diurese e menor pH urinário. Os tratamentos promoveram uma eficiente melhora no quadro clínico, verificado pelo restabelecimento mais rápido da movimentação ruminal, do apetite, do tempo para se levantar, do edema pulmonar e da hiperlactemia-L.

5.6 REFERÊNCIAS

BARTLEY, E. E.; DAVIDOVICH, A.; BARR, G. W.; GRIFFEL, G. W.; DAYTON, A. D.; DEYOE, C. W.; BECHTLE, R. M. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatments methods. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 835-841, 1976.

BORTOLUSSI, G.; TERNOUTH, J. H.; McMENIMAN, N. P. Dietary nitrogen and phosphorus depletion in cattle and their effects on liveweight gain, blood metabolite concentrations and phosphorus kinetics. **Journal of Agricultural Science**, n. 126, p. 493-501, 1996.

CALDOW, G. L.; WAIN, E. B. Urea poisoning in suckler cows. **Veterinary Record**, v. 128, p. 489-491, 1991.

CHEN, X. B.; GRUBIC, G.; ØRSKOV, E. R.; OSUJI, P. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **Animal Production**, v. 55, n. 2, p. 185-191, 1992.

FRØSLIE, A. Feed-related urea poisoning in ruminants. **Folia Veterinaria**, v. 7 n. 1, p. 17-37, 1977.

JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 4th ed. Ames: Iowa State University Press, 1978. 1380 p.

MALNIC, G.; MARCONDES, M. **Fisiologia renal**. 3a ed. São Paulo: EPU, 1986, 409 p.

MARTIN Jr., D. W.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's review of biochemistry**. 18th ed. Los Altos, California: Lange Medical, 1981. 614 p.

MINITAB – **The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education** – 13.0 Release. User's Manual. New York: Addison – Wesley, 2000.

ORTOLANI, E. L.; MARCONDES, M. C. M. Treatment of ammonia intoxication in rats through the use of aminoacids from the urea cycle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 217-220, 1995.

ORTOLANI, E. L.; MORI, C. S.; FILHO, J. A. R. Ammonia toxicity from urea in a brazilian dairy goat flock. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 87-89, 2000.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine** – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 8th ed. London: Baillière Tindall, 1995. 1763 p.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1a ed. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221 p.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide**: Statistics Cary, 2000.

WISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v. 37, n. 9, p. 273-282, 1979.

WORD, J. D.; MARTIN, L. C.; WILLIAMS, D. L.; WILLIAMS, E. I.; PANCIERA, R. J.; NELSON, T. E.; TILLMAN, A. D. Urea toxicity studies in the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 4, p. 786-791, 1969.

3.6 REFERÊNCIAS

BARTLEY, E. E.; DAVIDOVICH, A.; BARR, G. W.; GRIFFEL, G. W.; DAYTON, A. D.; DEYOE, C. W.; BECHTLE, R. M. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatments methods. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 835-841, 1976.

COOMBE, J. B.; TRIBE, D. E.; MORRISON, J. W. C. Some experimental observations on the toxicity of urea to sheep. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 11, p. 247-256, 1960.

FRØSLIE, A. Feed-related urea poisoning in ruminants. **Folia Veterinaria Latina**, v. 7 n. 1, p. 17-37, 1977.

ITABISASHI, T. Urea-ammonia poisoning and ruminal motility in goats. **Natural Institute Animal Health Quart**, v. 17, p. 128-129, 1977.

JØRGENSEN, R. J.; NYENGAARD, N. R.; DANIEL, R. C. W.; MELLAU, L. S. B.; ENEMARK, J. M. D. Induced hypocalcaemia by Na₂EDTA infusion. A review. **Journal Veterinary Medicine, Serie A**, v. 46, p. 389-407, 1999.

KOPCHA, M. Nutritional and metabolic diseases involving the nervous system. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 3, n. 1, p. 119-135, 1987.

MINSON, D. J. **Forage in ruminant nutrition**. Queensland: Academic Press, 1990. 483 p.

MORGAN, S. E. Ammonia pipeline rupture: risk assessment to cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 159-161, 1997.

MORRIS, J. G.; PAYNE, E. Ammonia and urea toxicoses in sheep and their relation to dietary nitrogen intake. **Journal Agricultural Science**, v. 74, p. 259-271, 1970.

OLIVER Jr, J. E.; LORENZ, M. D. Blindness, anisocoria, and abnormal eye movements. In: **Handbook of Veterinary Neurology**, 2nd ed, Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. chapter 12, p. 261-271.

ORTOLANI, E. L.; MARCONDES, M. C. M. Treatment of ammonia intoxication in rats through the use of aminoacids from the urea cycle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 217-220, 1995.

ORTOLANI, E. L.; MORI, C. S.; FILHO, J. A. R. Ammonia toxicity from urea in a brazilian dairy goat flock. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 87-89, 2000.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine** – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 8th ed. London: Baillière Tindall, 1995. 1763 p.

REPP, E. W.; WARD, W.; HALE, W. H. The influence of oral administration of non-protein nitrogen compounds upon blood ammonia and urea levels in lambs. **Journal of Animal Science**, v. 14, n. 18, 1955.

ROLLER, M. H.; RIEDEMANN, G. S.; ROMKEMA, G. E.; SWANSON, R. N. Ovine blood chemistry values measured during ammonia toxicosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 1068-1071, 1982.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1a ed. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221 p.

TENNANT, B.; WARD, D. E.; BRAUN, R. K.; HUNT, E. L.; BALDWIN, B. H. Clinical management and control of neonatal enteric infections of calves. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 5, p. 654-661, 1978.

WISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v. 37, n. 9, p. 273-282, 1979.

WORD, J. D.; MARTIN, L. C.; WILLIAMS, D. L.; WILLIAMS, E. I.; PANCIERA, R. J.; NELSON, T. E.; TILLMAN, A. D. Urea toxicity studies in the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 4, p. 786-791, 1969.

TRABALHO 3

A DIURESE ALIVIA A INTOXICAÇÃO POR AMÔNIA EM BOVINOS POR MEIO DA EXCREÇÃO DE AMÔNIO NA URINA.

RESUMO

Quinze garrotes foram usados para estudar o desempenho renal na excreção de amônio durante a intoxicação experimental por amônia. Cada garrote foi intoxicado somente uma vez com infusão de cloreto de amônio até ocorrência de convulsão. Toda urina foi coletada durante a infusão. Amostras de sangue e urina foram coletados antes da indução, no surgimento dos tremores e na convulsão. Os índices de excreção urinária e de excreção fracional urinária de amônio foram calculados. Três garrotes não urinaram durante a indução e quatro tiveram intensa diurese. Quanto maior o volume de urina excretado durante a infusão, maiores foram: o volume de cloreto de amônio infundido para causar convulsão ($r = 0,91$). Quanto maior o volume de urina excretado durante a infusão, maior a quantidade total de amônio urinário excretado ($r = 0,97$), o índice de excreção de amônio ($r = 0,87$) e o índice de excreção fracional urinário de amônia ($r = 0,98$). Quanto menor o pH sangüíneo ($r = -0,88$) e o pH urinário ($r = -0,67$), maior o índice de excreção urinária de amônio. Maiores índices de excreção urinária de amônio e menor pH sangüíneo e urinário foram detectados na convulsão. Neste momento, menor pH sangüíneo e maior aumento na uréia sérica foram encontrados nos garrotes mais resistentes à intoxicação por amônia. Estes garrotes excretaram pela urina 3 vezes mais amônia e uréia do que os animais restantes. Quatro garrotes ficaram

desidratados, sendo que estes e mais outros quatro apresentaram edema pulmonar. A desidratação não foi ocasionada pela diurese, pois não existiu correlação significativa ($p>0,14$) entre o volume excretado de urina e a elevação no hematócrito. Conclui-se que além da desintoxicação da amônia pelo fígado os rins têm papel fundamental na excreção de amônia em bovinos intoxicados.

4.1 INTRODUÇÃO

O fornecimento de nitrogênio não-protéico (NNP), aos microorganismos ruminais, tais como a uréia e sais de amônio têm sido um procedimento aceito na nutrição em ruminantes há muito tempo (MINSON, 1990). No Brasil, anualmente, cerca de 10 milhões de gado de corte e leiteiro são alimentados com uréia (MORGULIS, 2002)¹.

A hidrólise da uréia dentro do rúmen permite a liberação de gás amônia que é incorporada dentro da proteína microbiana ou é rapidamente difundida para os tecidos. A maioria da amônia absorvida é rapidamente desintoxicada, no fígado, em uréia através do ciclo do mesmo nome (HELMER e BARTLEY, 1971; FRØSLIE, 1977; HUBER, 1978).

A intoxicação por amônia ocorre quando ruminantes têm acesso a grandes quantidades de uréia, ou no caso desta ser inadequadamente misturada aos alimentos, ou ofertada em excesso conjuntamente com dietas pobres em energia. Ainda é citada a intoxicação no caso de alta ingestão de uréia em animais pouco ou nada acostumados a esta substância. Nestas

¹ MORGULIS, S. C. F. **Comunicação pessoal**. São Paulo: Minerthal, 2002.

circunstâncias a geração de amônia ruminal é cerca de quatro vezes maior do que a capacidade de seu aproveitamento. Como resultado do uso generalizado de uréia nas fazendas, freqüentemente misturados com suplementos minerais, concentrados ou forragens, incidentes de intoxicação ocorrem periodicamente em ruminantes (CALDOW e WAIN, 1991; ORTOLANI et al., 2000).

Há um consenso da importância fundamental do ciclo da uréia para a desintoxicação da amônia no organismo (FRØSLIE, 1977). Geralmente, a capacidade do ciclo da uréia está limitada pela disponibilidade de seus substratos (arginina, ornitina e citrulina) e atividade de suas enzimas. Uma alimentação rica em proteína antes da ingestão de uréia pelos ruminantes pode aumentar a tolerância destes à intoxicação pela amônia, por aumentar a atividade do ciclo de uréia (PAYNE e PAYNE, 1987). Além disso, o funcionamento normal do fígado é essencial para uma adequada desintoxicação da amônia. Quanto mais intenso o grau de insuficiência hepática em ovinos menor a capacidade destes em tolerarem uma intoxicação por amônia (PARKINS et al., 1973).

A maioria dos ruminantes não adaptada e submetida a altas doses de uréia dietética morre intoxicada por amônia. Contudo, alguns animais podem resistir a grandes ingestões de uréia dietética. Em um experimento, três de 14 ovinos não adaptados receberam altas doses de uréia (0,6 ou 0,75 g de uréia/kg PV) e sobreviveram sem nenhum tratamento (EDJTEHADI et al., 1978). Apesar dos sobreviventes terem apresentado um quadro clínico típico de intoxicação por amônia, os sinais foram moderados e de curta

duração. Diferentemente dos ovinos que sucumbiram os sobreviventes urinaram freqüentemente. Cinco cabras com intoxicação por amônia foram tratados com sucesso, com infusão [iv] de grandes quantidades de solução salina e um diurético [im] (furosemida), além da administração oral de vinagre (ORTOLANI et al., 2000). A recuperação da intoxicação foi gradual enquanto uma intensa diurese ocorreu no decorrer de duas horas depois do tratamento. Foi sugerido que o tratamento ideal para intoxicação por amônia em ruminantes deva proporcionar diurese, a fim de aumentar a excreção urinária (sic) (ROLLER et al., 1982). Assim, é provável que uma intensa diurese possa depurar e diminuir a concentração de uma substância tóxica da corrente circulatória, nesse caso a amônia.

Normalmente, os rins excretam pequenas quantidades de amônio na urina. Três fatores parecem controlar a excreção urinária de amônio: a acidez urinária, a quantidade de amônia gerada dentro das células renais do túbulo proximal, e a quantidade da produção urinária (MALNIC e MARCONDES, 1986; BRENNER, 1996). Muitos estudos realizados para entender estes mecanismos foram feitos em cães, animais de laboratório e em seres humanos, mas não em bovinos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho renal na desintoxicação da amônia, com especial atenção na excreção urinária de amônio.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Animais e dieta

Quinze garrotes mestiços de um ano de idade pesando cerca de 250 kg foram utilizados. Os animais foram mantidos em baias individuais e alimentados com uma dieta padrão composta de 75% de feno coast-cross e 25% de concentrado comercial para ganhar 200g/dia; suplemento mineral e água oferecida à vontade. Esta dieta total continha 12% de proteína bruta e ausente de qualquer fonte de NNP. Os animais foram alimentados com esta dieta pelo menos dois meses antes do início do experimento.

4.2.2 Protocolo

Cada animal foi submetido à intoxicação por amônia uma única vez durante o experimento. A comida foi retirada 16 h antes de cada ensaio, mas a água foi oferecida à vontade.

Na manhã do experimento um cateter de polietileno (20cm X 1,4mm) foi inserido na veia jugular esquerda na direção do fluxo sangüíneo. A excreção total de urina foi coletada num copo plástico implantado no prepúcio. A intoxicação foi causada pela infusão de uma solução 1,5M de cloreto de amônio (NH_4^+Cl), tamponada previamente para o pH 7,0 com solução de hidróxido de sódio, preparado no dia do teste. Esta solução era infundida no cateter numa velocidade de 400 mL/h, e seu fluxo foi controlado por meio de bomba infusora (Digibomb[®]). A solução foi infundida até o surgimento do primeiro episódio de convulsão. O protocolo de tratamento da intoxicação dos animais está descrito no TRABALHO 4.

Amostras de sangue e urina foram coletadas para determinações de pH, amônia, uréia e creatinina antes da infusão e no surgimento dos primeiros sinais de tremores musculares e convulsão; concentrações de bicarbonato e excesso de ácido-base (ABE) e hematócrito também foram determinados no sangue nos mesmos momentos. A produção total de urina foi registrada durante a infusão da solução de amônio. As concentrações de amônio, uréia e creatinina foram mensuradas em alíquotas de urina e então multiplicadas ao volume correspondente para se saber a concentração de amônio ou uréia urinária total. Para reduzir a influência do peso corporal sobre o índice de excreção urinária de amônio (IEUA) foi utilizada uma fórmula proposta por CHEN et al. (1992):

$$\text{IEUA } (\mu\text{Mol/L}) = \left[\frac{\text{amônio urinário } (\mu\text{Mol/L})}{\text{creatinina urinária } (\mu\text{Mol/L})} \right] \times \text{PV}^{0.75}$$

O índice de excreção fracional de amônio urinário (IEFAU) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{IEFAU } (\%) = \left[\frac{\text{amônio urinário } (\mu\text{M/L})}{\text{amônia plasmática } (\mu\text{M/L})} \times \frac{\text{creatinina sérica } (\mu\text{M/L})}{\text{creatinina urinária } (\mu\text{M/L})} \right] \times 100$$

Amônia plasmática, amônio urinário e uréia foram determinados com kits reativos (Raichem[®], BAYER[®]); creatinina foi mensurada pela técnica descrita por LUTSGARTEN e WENK (1972), pH de sangue venoso, bicarbonato e ABE foram determinados num analisador hemogasométrico (Radiometer[®], modelo ABL 5), imediatamente após a colheita do sangue.

4.2.3 Análise estatística

Por ter distribuição não-paramétrica, o índice de excreção urinária de amônio foi comparado pelo teste Mann-Whitney. As variáveis restantes foram comparadas por análise de variância com aplicação do teste de Duncan. Para calcular o aumento (%) na concentração de uréia sérica (Tab. 2) e do valor de hematócrito (Graf. 7) entre os garrotes mais susceptíveis e mais resistentes do tempo basal para a convulsão utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\{(\text{valor na convulsão} - \text{valor basal} / \text{valor basal}) \times 100\}$$

Regressão linear entre duas variáveis foi avaliada por análise de variância; valores de coeficiente de correlação também foram determinados (SNEDCOR e COCKRAM, 1967).

4.3 RESULTADOS

Quatro garrotes foram excluídos de algumas análises de correlação e regressão linear, por não urinarem durante a infusão (3) ou no momento da convulsão (1) (Graf. 2 a 4). Para análise da influência do pH sangüíneo e urinário sobre os valores do índice de excreção urinário de amônio foram considerados os valores obtidos no momento basal, tremor e convulsão (Graf. 5 e 6). Devido a altos valores no índice de excreção fracional de amônio urinário, causado pelos baixíssimos e médios teores de amônia plasmáticos no tempo basal e nos tremores, foram utilizados na correlação com o volume urinário (Graf. 4) apenas os valores de IEFAU obtidos no momento da convulsão.

Na convulsão tanto o pH sangüíneo como urinário foram significativamente menores que os valores basais. Inversamente, o hematócrito foi maior na convulsão. O índice de excreção urinária de amônio aumentou durante a infusão da solução de cloreto de amônio (Tab. 1).

Tabela 1- Alguns valores sangüíneos e urinários obtidos em diferentes tempos da indução da intoxicação por amônia em garrotes – São Paulo – 2002

	Basal	Tremores musculares	Convulsão
pH sangüíneo	7,41 ± 0,03 ^a	7,35 ± 0,07 ^a	7,17 ± 0,09 ^{b##}
pH urinário	7,85 ± 0,39 ^a	7,38 ± 0,41 ^{ab}	7,19 ± 0,41 ^{b#}
Hematócrito (%)	33 ± 4 ^b	35 ± 3 ^b	42 ± 5 ^{a##}
Índice de excreção urinária de amônio (μMol/L)	20,2 ^c	280,4 ^b	1135 ^{a#}

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças entre si (# p<0,05; ## p< 0,0001)

Menor pH sangüíneo foi determinado nos garrotes mais resistentes na convulsão. Não foram observadas diferenças nas concentrações de bicarbonato sangüíneo, excesso de ácido-básico na convulsão, e da uréia sérica nos tempos basal e convulsão entre os garrotes mais resistentes e os mais susceptíveis. Os garrotes mais resistentes aumentaram percentualmente mais os valores de uréia do tempo basal para a convulsão que os mais susceptíveis (Tab. 2).

Tabela 2 – Valores de balanço ácido-básico sangüíneo na convulsão e uréia sérica nos tempos basal e convulsão nos garrotes mais susceptíveis e mais resistentes na intoxicação por amônia– São Paulo – 2002

	Mais Susceptíveis (n = 6)	Mais Resistentes (n = 4)
pH sangüíneo	7,25 ± 0,03 ^a	7,14 ± 0,08 ^{b ##}
Bicarbonato (mmol/L)	15 ± 1,83 ^a	14,8 ± 1,2 ^a
Excesso ácido-base (mmol/L)	-11,5 ± 2,5 ^a	-12,5 ± 1,3 ^a
Uréia sérica basal (mmol/L)	3,9 ± 1,3 ^a	2,9 ± 1,8 ^a
Uréia sérica na convulsão (mmol/L)	5,5 ± 1,2 ^a	6,2 ± 2,3 ^a
Aumento percentual da na uréia sérica entre o tempo basal e a convulsão.	40,9 ± 17 ^b	146,8 ± 71,6 ^{a #}

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças entre si. (# p<0,05; ## p<0,007)

Os garrotes mais resistentes tiveram um menor pH urinário que os demais animais que urinaram na convulsão. Em relação à quantidade de amônio infundido os garrotes mais resistentes excretaram, pela urina, maiores quantidades de uréia, amônio, amônio e uréia que os demais animais durante a infusão (Tab. 3).

Tabela 3 – Valores de pH urinário na convulsão e percentagem de excreção urinária de amônio (mM), uréia (mM) e amônio (mM) + uréia (mM) durante a infusão em relação ao amônio (mM) infundido dos garrotes mais resistentes e os demais – São Paulo – 2002

	Mais Resistentes (n =4)	Restante (n = 8)
pH urinário	6,9 ± 0,2 ^b	7,8 ± 0,3 ^{a ###}
Excreção urinária NH₄/NH₄ infundido (%)	9,4 ± 2,2 ^a	3,1 ± 3,5 ^{b ###}
Excreção urinária de uréia/ NH₄ infundido (%)	27,7 ± 12,2 ^a	7,9 ± 3,5 ^{b #}
Excreção urinária NH₄ + uréia/ NH₄ infundido (%)	36,8 ± 13,4 ^a	10,9 ± 3,4 ^{b ##}

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças entre si (# p<0,05; ## p<0,003; ### p<0,007)

Quanto maior volume de urina excretado durante a infusão, maior o volume de solução de cloreto de amônio infundido para causar convulsão ($r = 0,91$; Graf. 1).

Gráfico 1 - Influência da produção urinária durante a indução de intoxicação por amônia sobre a quantidade de solução de cloreto de amônio usado para causar convulsão em garrotes – São Paulo – 2002

Quanto maior o volume de urina excretado durante a infusão, maior a quantidade total de amônio urinário excretado ($r = 0,97$; Graf. 2), o índice de excreção de amônio ($r = 0,87$; Graf. 3), e o índice de excreção fracional urinário de amônio no momento da convulsão ($r = 0,98$; Graf. 4).

Gráfico 2 – Influência da produção urinária durante a indução de intoxicação por amônia sobre a quantidade total de amônio excretado durante a infusão de NH_4Cl – São Paulo – 2002

Gráfico 3 – Influência da produção urinária durante a indução de intoxicação por amônia sobre o índice de excreção de amônio urinário – São Paulo – 2002

Gráfico 4 - Influência da produção urinária durante a indução de intoxicação por amônia sobre o índice de excreção fracional urinário de amônia no momento da convulsão – São Paulo – 2002

Quanto menor o pH sanguíneo, maior o índice de excreção urinária de amônio ($r = -0,88$; Graf. 5).

Gráfico 5 – Influência do pH sanguíneo, durante a indução, sobre o índice de excreção de amônio urinário – São Paulo – 2002

Igualmente, quanto o menor pH urinário, maior o índice de excreção urinária de amônio ($r = -0,67$; Graf. 6).

Gráfico 6 – Influência do pH urinário, durante a indução de intoxicação por amônia, sobre o índice de excreção de amônio urinário – São Paulo – 2002

Não existiu correlação significativa entre o hematócrito e o volume de urina excretado ($r = 0,40$; $p > 0,14$; Graf. 7).

Gráfico 7 – Influência da produção urinária durante a intoxicação por amônia sobre o aumento do hematócrito na convulsão – São Paulo – 2002

4.4 DISCUSSÃO

Este experimento mostrou claramente o papel importante dos rins para excretar amônio na urina de bovinos intoxicados por amônia. Os garrotes que não urinaram durante a indução necessitaram cerca de 4 vezes menos de solução de cloreto de amônio para causar convulsão, quando comparado com os garrotes mais resistentes (Graf. 1). Estes últimos animais tiveram uma produção urinária cerca de 39 vezes maior do que os garrotes mais susceptíveis que pouco urinaram. A produção urinária também foi altamente correlacionada com a excreção de amônio urinário (Graf. 2, 3 e 4). Estes resultados mostraram que a diurese influencia positivamente a excreção de amônio. Em outras palavras, a diurese não somente aumenta a quantidade total de amônio urinário excretado durante a infusão (Graf. 2), mas também aumenta a quantidade de amônio excretado por peso metabólico (Graf. 3) e a depuração da amônia da corrente sangüínea (Graf. 4). De fato, quanto maior produção a urinária, maior a difusão passiva de amônia do plasma para as células do túbulo proximal e então para a urina (MALNIC e MARCONDES, 1986). Assim, parece muito lógico o tratamento [iv] com altas quantidades de fluido e diurético, como utilizado por ORTOLANI et al., (2000) para a reversão da intoxicação por amônia em ruminantes.

A intoxicação por amônia causou uma significativa acidose metabólica nos garrotes, principalmente quando ocorria a convulsão (Tab. 1). Provavelmente, a acidose sistêmica influenciou o pH urinário para tornar-se levemente ácida na convulsão (Tab. 1). Quanto menor o pH sangüíneo e

urinário, maior o índice de excreção urinária de amônio (Graf. 5 e 6). Os garrotes mais resistentes à intoxicação por amônia tiveram menor pH urinário que o resto dos animais que urinaram menos durante a infusão (Tab. 2). A acidose induz o túbulo contorcido proximal a gerar e excretar maiores quantidades de amônio, e aumentam a difusão da amônia do interstício medular para o ducto coletor medular e, assim, a excreção de amônio (GRABER et al., 1981; GOOD et al., 1987). Acidose crônica pode aumentar até 7 vezes a excreção de amônio através da urina (BRENNER, 1996). Assim, a alta produção urinária e o baixo pH urinário parecem ser sinérgicos e concomitantes para aumentar a excreção urinária de amônio nos garrotes mais resistentes.

Os mais resistentes à intoxicação por amônia foram capazes de excretar extraordinárias quantidades de amônio (cerca de 9%) injetado na corrente sangüínea, enquanto que os animais restantes excretaram 3 vezes menos. Os primeiros bovinos também tiveram uma melhor atividade do ciclo da uréia no fígado como medido pelo maior aumento percentual dos teores de uréia do momento basal para a convulsão (Tab. 2) e a maior excreção de uréia urinária por solução de cloreto de amônio infundido (Tab. 3). Para cada mol de NH_3 desintoxicado nos hepatócitos há uma produção de um mol de uréia (BRENNER, 1996). Assim, o cálculo da quantidade da excreção urinária da uréia mostrou que até 27% da amônia infundida foi transformada em uréia nos garrotes mais resistentes enquanto que os restantes provavelmente produziram até 3,5 vezes menos uréia (Tab. 3). Mais estudos são necessários para entender a possível relação entre a maior atividade do

ciclo da uréia e a maior excreção urinária de amônio nos garrotes mais resistentes a intoxicação por amônia.

As médias calculadas por meio da adição de uréia mais amônia excretados na urina/quantidade de amônio injetado também mostraram que os garrotes mais resistentes foram capazes de desintoxicar NH_3 mais que 3 vezes em relação os garrotes intermediários e os mais susceptíveis (Tab. 3).

Neste presente trabalho os garrotes mais resistentes à intoxicação por amônia tiveram um menor pH sangüíneo (Tab. 2) que os mais susceptíveis na convulsão. Apesar deste baixo pH sangüíneo, concentrações similares de bicarbonato sangüíneo e excesso ácido-base foram verificados nos animais mais susceptíveis e resistentes na convulsão (Tab. 2). A acidemia pode ser em parte explicada pelas altas quantidades de solução de cloreto de amônio necessárias para causar convulsão nos bovinos mais resistentes. Na corrente sangüínea o amônio é transformado em amônia, liberando no processo H^+ . Outra possível causa para esta acidemia pronunciada é a alta atividade do ciclo da uréia presente nos garrotes mais resistentes (Tab. 2 e 3). De acordo com estudos no processo de síntese hepática de uréia há consumo de bicarbonato (KURTZ et al., 1990). Por outro lado, esses animais excretaram mais amônio na urina do que os mais susceptíveis (Graf. 2 e 3). Para cada mol de NH_4^+ excretado através das células do túbulo contornado proximal há geração metabólica de um mol de bicarbonato, nestas mesmas células, que entram na circulação sistêmica e repõe diretamente a concentração plasmática de bicarbonato, reduzindo a acidose (BRENNER, 1996). Assim, a diurese tem um duplo efeito benéfico na

correção da acidose metabólica, gerada na intoxicação por amônia, pela excreção de íons hidrogênio e geração de tampão. Os valores similares dos teores de bicarbonato sangüíneo e excesso ácido-base entre os garrotes mais resistentes e os mais susceptíveis (Tab. 2) sugerem que os primeiros animais compensam o grande consumo de bicarbonato, utilizado para tamponar o NH_4^+ e no ciclo da uréia, pela geração de bicarbonato nas células tubulares proximais. Estudos futuros são necessários para entender melhor estes mecanismos.

Quatro garrotes ficaram desidratados (muflo seco) durante a infusão, sendo que apenas um era do grupo dos mais resistentes à intoxicação. Todos esses e mais outros quatro, do grupo intermediário ou mais susceptível, apresentaram edema pulmonar. A amônia é um potente irritante pulmonar produzindo edema neste órgão em animais intoxicados (ORTOLANI et al., 2000). Como no edema há retenção de fluidos orgânicos pode-se sugerir que este fenômeno foi parcialmente responsável pela desidratação. Por outro lado, a intensa diurese não foi a causadora da desidratação, já que não existiu correlação entre a excreção total de urina e o aumento no hematócrito (Graf. 7). Tais resultados demonstram a necessidade de se tratar os animais intoxicados com um diurético, que consiga remover o fluido retido nos tecidos edemaciados.

4.5 CONCLUSÕES

Em conclusão, os bovinos mais resistentes à intoxicação por amônia tiveram alta produção urinária, baixos pH sangüíneo e urinário, excretaram grandes quantidades de amônio e uréia pela urina. Pode-se afirmar que conjuntamente com a desintoxicação hepática da amônia os rins são fundamentais para aliviar a intoxicação por amônia em bovinos.

4.6 REFERÊNCIAS

BRENNER, B. M. **The kidney**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. 2702 p.

CALDOW, G. L.; WAIN, E. B. Urea poisoning in suckler cows. **Veterinary Record**, v. 128, p. 489-491, 1991

CHEN, X. B.; GRUBIC, G.; ØRSKOV, E. R.; OSUJI, P. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **Animal Production**, v. 55, n. 2, p. 185-191, 1992.

EDJTEHADI, M; SZABUNIEWICZ, M.; EMMANUEL, B.. Acute urea toxicity in sheep. **Canadian Journal Compendium Medicine**, v. 42, p. 63-68, 1978.

FRØSLIE, A. Feed-related urea poisoning in ruminants. **Folia Veterinary Latina**, v. 17, n. 7, p. 17-37, 1977.

GOOD, D. W.; CAFLISCH, C. R.; DuBOSE Jr., T. D. Transepithelial ammonia concentration gradients in inner medulla of the rat. **American Journal Physiology**, v. 252, p. 491-500, 1987.

GRABER, M. L.; BENGELE, H. H.; MROZ, E. et al. Acute metabolic acidosis augments collecting duct acidification rate in the rat. **American Journal Physiology**, v. 241, p. 669-676, 1981.

HELMER, L. G.; BARTLEY, E. E. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 1, p. 25-51, 1971.

HUBER, J. T. Nonprotein nitrogen in dairy cattle rations. In: WILCOX, C. J.; VAN HORN, H. H.; HARRIS JR., B.; HEAD, H. H.; MARSHALL, S. P.; THATCHER, W. W.; WEBB, D. W.; WING, J. M. **Large dairy herd management**. Gainesville: University of Florida Press, 1978. cap. 11, p. 293-315.

KURTZ, I.; DASS, P. D.; CRAMER, S. The importance of renal ammonia metabolism to whole body acid-base balance: A reanalysis of the pathophysiology of renal tubular acidosis. **Miner Electrolyte Metabolite**, v. 16, p. 331-340, 1990.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MALNIC, G.; MARCONDES, M. **Fisiologia renal**. 3a ed. São Paulo: EPU, 1986, 409 p.

MINSON, D. J. **Forage in ruminant nutrition.** Queensland: Academic Press, 1990, 483 p.

ORTOLANI, E. L.; MORI, C. S.; FILHO, J. A. R. Ammonia toxicity from urea in a brazilian dairy goat flock. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 87-89, 2000.

PARKINS, J. J.; HEMINGWAY, R. G.; BROWN, N. A. The increasing susceptibility of sheep to dietary urea toxicity associated with progressive liver dysfunction. **Research Veterinary Science**, v. 14, p. 130-132, 1973.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile test.** New York: Oxford University Press, 1987. 179 p.

ROLLER, M. H.; RIEDEMANN, G. S.; ROMKEMA, G. E.; SWANSON, R. N. Ovine blood chemistry values measured during ammonia toxicosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 1068-1071, 1982.

SNEDCOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods.** 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1967. 593 p.

Concluiu-se que os tratamentos propostos tiveram uma ação efetiva principalmente por diminuir a hiperamoniemia, por meio da maior excreção de renal de amônio e maior transformação hepática de amônia em uréia.

5.1 INTRODUÇÃO

Para uma adequada produtividade dos bovinos criados em condições extensivas é imperiosa a suplementação invernal com fontes de nitrogênio, quer seja ela protéica ou não (BORTOLUSSI et al., 1996). Devido ao alto preço dos farelos protéicos é crescente o número de pecuaristas que tem adotado o uso de nitrogênio não-protéico, em especial uréia, junto às misturas minerais nos chamados “sais proteinados” ou com outros alimentos, tais como cana-de-açúcar, melaço e silagem de milho.

Embora este maior emprego de uréia tenha trazido avanços à pecuária, ocasionalmente o uso inadequado tem levado ao surgimento de surtos de intoxicação, geralmente fatais e com prejuízos econômicos (CALDOW e WAIN, 1991; ORTOLANI et al., 2000). Estes surtos ocorrem subitamente e são devido à rápida transformação de uréia em amônia no rúmen, com absorção desta última substância a qual migra para as células, bloqueando o ciclo de Krebs, aumentando a glicólise anaeróbica e gerando acidose metabólica e hipercalemia terminal. Além desta consequência a amônia interfere no sistema nervoso central e periférico aumentando a condução nervosa e provocando quadro de tetania e convulsão, causando entre outras complicações atonia ruminal e meteorismo; além do mais como a amônia é irritante ao tecido pulmonar ela provoca marcante edema neste

órgão (BARTLEY et al., 1976; FRØSLIE, 1977; ORTOLANI & MARCONDES, 1995; ORTOLANI et al., 2000; TRABALHOS 2 e 3).

O tratamento deve ser rápido e baseia-se na administração de ácido acético, para diminuir o pH ruminal e a absorção de amônia para o organismo. Segundo RADOSTITS et al. (1995), o resultado deste tratamento usual é incerto e improvável de ser eficiente. De fato, BARTLEY et al. (1976) trataram garrotes com ácido acético, precocemente, quando do surgimento da tetania, mesmo assim 80% dos animais sucumbiram. WORD et al. (1969) utilizaram o ácido acético quando do surgimento da convulsão em bovinos e não alcançando sucesso em nenhum caso. ORTOLANI et al. (2000) trataram cinco cabras intoxicadas, sendo que duas já apresentavam convulsão, com vinagre e associaram com hidratação intravenosa e furosemda; todos os animais se recuperaram com sucesso. Os autores especularam a possibilidade de ocorrer maior excreção de amônia pela urina.

No TRABALHO 3 notou-se que quanto maior foi a diurese maior a excreção de amônio pela urina, exigindo maiores doses de cloreto de amônio para intoxicar os bovinos que mais urinaram. Este resultado indicou que o pleno funcionamento renal é importante para a eliminação de amônia circulante e acelerar o processo de desintoxicação desta no organismo. Contudo, nesse mesmo trabalho verificou-se que muitos animais apresentavam significativa hipovolemia, em especial na convulsão, e é conhecida que uma das primeiras respostas a este estado é a diminuição do fluxo sangüíneo renal, diminuindo assim a filtração glomerular (RADOSTITS et al., 1995). Assim, a hipótese de correção da hipovolemia associado ao

uso de um diurético para remover fluidos seqüestrados em órgãos, como os pulmões, e aumentar a produção urinária parecem pertinentes.

É reconhecido que a principal forma de desintoxicação da amônia no organismo é por meio do ciclo da uréia, nos hepatócitos, transformando a amônia em uréia. A capacidade de desintoxicação deste ciclo é dependente da integridade dos hepatócitos, além da atividade enzimática desenvolvida anteriormente a intoxicação, sendo correspondente à quantidade de proteína ou de nitrogênio não-protéico ingerido (FRØSLIE, 1977; VISEK, 1979). Outro fator limitante da atividade deste ciclo também é a quantidade de aminoácidos participantes do mesmo (arginina, citrulina e ornitina), disponíveis no hepatócito. Cerca de 33% de ratos intoxicados com doses letais (DL 99,9%) de amônia sobreviveram após o tratamento com uma combinação destes aminoácidos, enquanto que no grupo controle a sobrevivência foi mínima (1%) (ORTOLANI & MARCONDES, 1995).

O TRABALHO 1 teve como objetivo realizar um estudo de triagem a este presente experimento, onde foram testadas diferentes combinações de tratamentos a base de hidratante (H), furosemida (F) e aminoácidos do ciclo da uréia (O), em ratos. Os dois melhores resultados, julgados pela taxa de sobrevivência, foram os seguintes: O+F+H e O+H.

O presente trabalho teve como objetivo testar os dois supracitados tratamentos na recuperação de bovinos intoxicados com amônia, por meio de acompanhamento clínico e laboratorial, com ênfase no papel do rim na desintoxicação desta substância.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os detalhes sobre os animais, dieta e protocolo de indução por amônia, coleta de materiais biológicos, respectivas técnicas de determinações das variáveis no sangue e urina, estão detalhadamente descritos nos TRABALHOS 2 e 3.

Logo em seguida ao surgimento do episódio convulsivo a infusão de cloreto de amônio foi interrompida e se convencionou a chamar este tempo como zero. Neste momento, todo animal foi casualmente distribuído em um dos três grupos, de cinco garrotes cada, segundo o tratamento proposto.

O primeiro grupo foi o controle (C), cujo tratamento foi composto de 1mL de solução fisiológica de NaCl/kg PV, infundida pela cânula implantada na veia jugular no decorrer das três horas seguintes. Esta quantidade era diminuta e tinha o intuito de manter a fluidez na citada cânula. O segundo grupo foi tratado com O+H na dose de 1mL de solução de aminoácidos do ciclo da uréia/kg PV (Ornitargin[®] : contendo 0,075 g de cloreto de arginina-L; 0,02 g de aspartato de ornitina-L e 0,005 g de citrulina-L e 0,2g de frutose por mL) e de 20 mL de solução de NaCl/kg PV O 3º tratamento (O+F+H) recebeu os dois medicamentos citados no grupo anterior, adicionado de 265 mg de furosemida [iv]. Tanto o tratamento F como o O foram injetados imediatamente após ao fim da infusão de cloreto de amônio, sendo continuado o tratamento com H no decorrer de três horas.

Amostras de sangue e de urina foram coletadas durante o tratamento, nos seguintes momentos: convulsão (tempo zero), aos 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. No sangue foram determinadas as concentrações de

amônia e lactato-L plasmáticos; uréia e creatinina sérica, além do hematócrito. Na urina foram analisadas as concentrações de amônio, uréia e creatinina urinárias, assim como o volume total eliminado pelos animais.

Para reduzir a influência do peso corporal sobre o índice de excreção urinária de amônio (IEUA) uma fórmula proposta por CHEN et al. (1992) foi utilizada:

$$\text{IEUA } (\mu\text{Mol/L}) = \left[\frac{\text{amônio urinário } (\mu\text{Mol/L})}{\text{creatinina urinária } (\mu\text{Mol/L})} \right] \times \text{PV}^{0,75}$$

O índice de excreção fracional de amônio urinário (IEFAU) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{IEFAU } (\%) = \left[\frac{\text{amônio urinário } (\mu\text{Mol/L}) \times \text{creatinina sérica } (\mu\text{Mol/L})}{\text{amônia plasmática } (\mu\text{Mol/L}) \times \text{creatinina urinária } (\mu\text{Mol/L})} \right] \times 100$$

Foram calculadas as quantidades percentuais de excreção de amônio e de uréia pela urina em relação à quantidade de NH_4^+Cl injetado. Para tal foi utilizado a quantidade total destas substâncias excretadas na urina. Como segundo MARTIN Jr et al. (1981), no ciclo da uréia um mol de amônia é transformado num mol de uréia, a eliminação de um mol desta última substância na urina equivaleu à desintoxicação de um mol de amônia.

Foram monitoradas durante os tratamentos as seguintes variáveis: o número de batimentos cardíacos, frequência respiratória, movimento de rúmen e temperatura retal. Foi anotado o tempo em que os animais deixavam de permanecer em decúbito, se posicionando em estação, assim como o momento em que retomavam seus apetites. Como a literatura cita que a amônia é irritante aos pulmões podendo causar edema nos mesmos,

foi acompanhado, por meio de auscultação, o surgimento e o desaparecimento de sinais indicativos de edema pulmonar, tais como estertores úmidos. O pH urinário foi acompanhado nos momentos supracitados.

5.2.1 Análise estatística

Todas as variáveis urinárias, com exceção do pH urinário, apresentaram distribuição não-paramétrica, sendo comparadas pelo Teste de Mann-Whitney. As demais variáveis apresentaram distribuição paramétrica, e foram analisadas inicialmente pelo teste F e quando significativas às médias foram confrontadas pelo teste de Duncan. Foram calculados o coeficiente de correlação e a equação de regressão linear entre algumas variáveis urinárias, sendo que a significância do último parâmetro foi verificada por meio de teste F (SAMPAIO, 1998). As análises estatísticas foram processadas com uso de dois programas computadorizados (MINITAB release 13, 2000 e Statistical Analysis System, SAS 8.01- 2000).

5.3 RESULTADOS

Tabela 1 – Valores médios e desvios-padrão da concentração de amônia plasmática (umol/L) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	2098,5 ^{Aa} ± 300,89	1547,6 ^{Ab} ± 235,02	1232,7 ^{Ac} ± 226,44	1023,6 ^{Ac} ± 214,8	491,5 ^{Bd} ± 135,1	270,8 ^{Bde} ± 77,62	183,9 ^{Be} ± 73,98	102,7 ^{Be} ± 56,06
O+H	1785,4 ^{Aa} ± 307,68	1475,7 ^{Ab} ± 259,93	1345,5 ^{Ab} ± 331,75	1191,5 ^{Ab} ± 229,17	787,9 ^{Abc} ± 240,5	463,3 ^{Bd} ± 163,66	300,2 ^{Bde} ± 105,24	91,5 ^{Be} ± 39,93
Controle	1805,6 ^{Aa} ± 461,9	1452,3 ^{Aab} ± 427,75	1439,6 ^{Aab} ± 554,51	1290,9 ^{Aab} ± 542,17	1028,8 ^{Abc} ± 474,06	847,9 ^{Abcd} ± 363,99	617 ^{Ac} ± 343,1	349,4 ^{Ad} ± 243,55

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Não existiu diferença entre os tratamentos nos teores de amônia no momento zero ($p>0,52$). O tratamento O+F+H promoveu uma diminuição nas concentrações de amônia plasmática em relação ao grupo controle a partir do 60^o min até o final do experimento ($p<0,02$). A partir do 90^o min o mesmo fato ocorreu no grupo O+H em relação ao grupo controle. O tratamento O+F+H só foi superior ao O+H no 60^o min ($p<0,05$). Dentro de cada um dos tratamentos a amônia apresentou queda significativa em sua concentração detectada na convulsão já no 10^o min nos grupos O+F+H e O+H e no 60^o min no grupo controle ($p<0,05$) (Tab. 1).

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de lactato-L plasmático (mmol/L) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	10,45 ^{Aabc} ± 5,95	12,20 ^{Aab} ± 5,66	12,45 ^{Aab} ± 5,31	13,37 ^{Aa} ± 4,97	10,81 ^{Bab} ± 4,11	7,90 ^{Babc} ± 2,95	5,85 ^{Bbc} ± 2,63	4,02 ^{Bc} ± 3,68
O+H	13,05 ^{Aab} ± 5,03	15,58 ^{Aa} ± 4,33	16,31 ^{Aa} ± 3,88	15,49 ^{Aa} ± 3,60	13,86 ^{ABa} ± 4,23	10,68 ^{Bab} ± 4,94	7,70 ^{Bbc} ± 4,56	4,24 ^{Bc} ± 4,02
Controle	12,53 ^{Ab} ± 1,81	15,97 ^{Aab} ± 1,4	17,84 ^{Aa} ± 2,31	18,23 ^{Aa} ± 3,32	18,84 ^{Aa} ± 4,75	18,26 ^{Aa} ± 3,69	15,66 ^{Aab} ± 5,04	11,99 ^{Ab} ± 4,84

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Do momento zero até o 30^o min não existiu diferença nas concentrações de lactato-L, entre os tratamentos ($p>0,13$), porém a partir do 60^o min o grupo O+F+H foi sempre inferior ao controle, existindo a mesma condição para o tratamento O+H a partir da 90^o min ($p<0,03$). Dentro dos tratamentos, constatou-se no grupo O+F+H que no 30^o min ocorreu um maior teor de lactato-L em relação aos 120 e 180 min ($p<0,03$); no tratamento O+H o mesmo fenômeno existiu do 10^o ao 60^o min em relação

ao 120^o e 180^o min ($p < 0,0008$); no grupo controle idêntica situação ocorreu do 20^o ao 90^o min em relação aos tempos zero e 180 min ($p < 0,03$) (Tab. 2).

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de uréia sérica (mmol/L) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	6,65 ^{Aa} ± 1,73	6,38 ^{Aa} ± 1,16	6,45 ^{Aa} ± 1,77	6,59 ^{Aa} ± 1,74	6,51 ^{Aa} ± 1,83	5,71 ^{Aa} ± 1,83	6,53 ^{Aa} ± 1,84	6,51 ^{Aa} ± 1,83
O+H	3,58 ^{Ba} ± 0,89	3,65 ^{Ba} ± 0,88	3,6 ^{Ba} ± 0,99	3,55 ^{Ba} ± 0,96	3,57 ^{Ba} ± 0,99	3,65 ^{Ba} ± 0,95	3,76 ^{Ba} ± 1,05	3,83 ^{Ba} ± 1,11
Controle	5,13 ^{ABa} ± 1,29	4,88 ^{ABa} ± 1,12	4,99 ^{ABa} ± 1,18	4,88 ^{ABa} ± 1,17	5,10 ^{ABa} ± 1,34	5,13 ^{Aa} ± 1,34	5,16 ^{ABa} ± 1,28	5,17 ^{ABa} ± 1,16

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Durante todo o experimento o grupo O+F+H apresentou maiores teores de uréia que o O+H ($p < 0,05$); não existiu diferença entre os grupos controle e O+F+H ($p > 0,12$); o grupo controle só foi superior ao O+H no 90^o min ($p < 0,05$). Não existiram diferenças dentro dos três tratamentos ($p > 0,20$) (Tab. 3).

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de hematócrito (%) em bovinos intoxicados com cloreto de amônio nos diferentes tratamentos – São Paulo – 2002

Grupos	Tempos (minutos)							
	0	10	20	30	60	90	120	180
O+F+H	42 ^{ABa} ± 5	39 ^{Aab} ± 6	40 ^{Aab} ± 6	41 ^{Aab} ± 7	39 ^{Aab} ± 6	36 ^{Aabc} ± 5	35 ^{Abc} ± 4	31 ^{Ac} ± 3
O+H	46 ^{Aa} ± 2	42 ^{Aabc} ± 2	43 ^{Aab} ± 2	42 ^{Aabc} ± 2	40 ^{Abcd} ± 4	38 ^{Acd} ± 5	36 ^{Ade} ± 6	32 ^{Ae} ± 4
Controle	38 ^{Ba} ± 4	38 ^{Aa} ± 4	37 ^{Aa} ± 4	38 ^{Aa} ± 5	37 ^{Aa} ± 5	36 ^{Aa} ± 4	34 ^{Aa} ± 3	32 ^{Aa} ± 3

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas dentro dos tratamentos.

Com exceção do momento zero, que os valores de hematócrito foram superiores no grupo O+H que no controle ($p<0,02$), não existiram diferenças significativas entre os valores dos tratamentos ($p>0,16$). Porém, menores valores em relação ao tempo zero foram constatados a partir do 60^o e 120^o min nos tratamentos O+H ($p<0,0001$) e O+F+H ($p<0,03$), respectivamente; não existiu diferença dentro do grupo controle ($p>0,31$) (Tab. 4). Não ocorreram diferenças significativas nos valores de creatinina entre os diferentes tratamentos ($p>0,05$).

Tabela 5 - Valores de mediana de volume urinário, excreção total de amônio e de uréia e índice de excreção urinário de amônio e uréia no decorrer da 1^a h ou até a 3^a h, após diferentes tratamentos de bovinos intoxicados com cloreto de amônio – São Paulo – 2002

		Até 1 ^a hora	Global (3h)
Volume urinário (mL)	O+F+H	3690 ^A	11120 ^A
	O+H	4640 ^A	9520 ^A
	Controle	50 ^B	2455 ^B
Excreção total de amônio (mM)	O+F+H	39,65 ^A	79,17 ^A
	O+H	47,45 ^A	88,22 ^A
	Controle	0,42 ^B	13,61 ^B
Índice de excreção de amônio urinário (uM)	O+F+H	1613,4 ^A	2283,2 ^A
	O+H	1416,4 ^A	2598,4 ^A
	Controle	333,1 ^B	1341 ^A
Índice de excreção fracional de amônio urinário (%)	O+F+H	588,1 ^A	851,2 ^A
	O+H	359,6 ^{AB}	722,5 ^A
	Controle	186,3 ^B	328,2 ^A
Excreção total de uréia (mM)	O+F+H	72,51 ^A	201,4 ^A
	O+H	42,25 ^{AB}	74,9 ^B
	Controle	1,68 ^B	93,5 ^{AB}
Índice de excreção de uréia urinária (mM)	O+F+H	2200,2 ^A	4799,2 ^A
	O+H	866,8 ^A	2333,8 ^A
	Controle	584,4 ^A	5779,1 ^A
Índice de excreção fracional de uréia urinária (%)	O+F+H	101,0 ^A	95,1 ^A
	O+H	74,2 ^A	66,0 ^A
	Controle	107,3 ^A	110,0 ^A

Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Os animais tratados com O+F+H e O+H urinaram mais abundantemente, eliminaram mais amônio pela urina que os animais controle tanto no decorrer das três horas do tratamento como na primeira hora deste ($p<0,05$); estes mesmos grupos apresentaram maiores índice de excreção urinário de amônio urinário na 1ª h que o grupo controle ($p<0,05$) (Tab 5).

O índice de excreção fracional de amônio e a excreção total de uréia foi superior no grupo O+F+H que no controle ($p<0,05$) na primeira hora, não existindo diferença no tempo global ($p>0,14$). Não existiram diferenças significativas tanto o índice de excreção de uréia urinária como no seu índice fracional ($p>0,1$) (Tab 5).

Tabela 6 – Média do total de NH_4^+Cl injetado para obtenção de convulsão e mediana da excreção percentual urinária de amônio ou uréia e ambos na 1ª h e durante as 3h de tratamento em relação ao NH_4^+Cl injetado – São Paulo – 2002

Grupos	Total de amônio injetado (mM)	Excreção (%) urinário de amônio e uréia em relação ao NH_4Cl injetado					
		Amônio (1h)	Amônio (Global – 3h)	Uréia (1h)	Uréia (Global – 3h)	Total de amônio + uréia (1h)	Total de amônio + uréia (3h)
O+F+H	356 ± 195,2 ^a	12 ^a	15,5 ^a	22,2 ^a	59,2 ^a	34,2 ^a	77 ^a
O+H	390 ± 118,5 ^a	14 ^a	25,2 ^a	10,1 ^a	21,5 ^b	28,7 ^a	51 ^a
Controle	322 ± 305,8 ^a	0,26 ^b	14,4 ^a	2 ^b	29,8 ^b	2,5 ^b	48,7 ^a
Significância	$p>0,90$	$p<0,04$	$p>0,29$	$p<0,03$	$p<0,05$	$p<0,05$	$p>0,11$

Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

O total de NH_4^+Cl injetado para provocar convulsão foi semelhante entre os grupos ($p>0,90$). Na 1ª h os tratados com O+F+H e O+H excretaram pela urina maiores quantidades tanto de amônio e uréia, como da somatória de ambos. No decorrer das três horas de tratamento o grupo O+F+H excretou maiores quantidades de uréia, não ocorrendo diferença

entre os tratamentos no concernente os valores de amônio ou de uréia+amônio (Tab. 6).

Tabela 7 - Influência do tratamento (O+F+H e O+H) sobre as variáveis que estimam melhora clínica e o pH urinário – São Paulo – 2002

Grupos	Tempo para ficar em estação (min)	Retorno do mov. ruminal (min)	Recuperação do edema pulmonar (min)	Retorno do apetite (min)	Temperatura corpórea (°C) no 180° min	pH urinário
Tratados (O+F+H e O+H)	72 ± 35 ^a	41 ± 32 ^a	33 ± 23 ^a	65 ± 15 ^a	38,1 ± 0,7 ^b	6,14 ± 0,44 ^a
Controle	162 ± 61 ^b	126 ± 49 ^b	108 ± 45 ^b	120 ± 40 ^b	36,6 ± 1,4 ^a	7,13 ± 0,43 ^b
Significância	p<0,05	p<0,001	p<0,04	p<0,04	p<0,013	p<0,006

Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Não existiu diferença entre tratamentos e dentro dos mesmos tanto na frequência cardíaca como na respiratória ($p>0,20$). No momento zero todos animais apresentaram atonia ruminal. Os grupos O+F+H e O+H em conjunto retornaram os movimentos ruminais mais precocemente que os garrotes do grupo controle, recuperando mais rapidamente também seus apetites. A temperatura retal foi semelhante entre os grupos, com exceção do 180° min em que os tratados com O+F+H e O+H apresentaram temperaturas superiores ao controles. Os garrotes medicados com O+F+H e O+H se levantaram mais rapidamente, permanecendo em seguida em estação. Oito bovinos apresentaram edema pulmonar, que surgia na maioria dos casos logo em seguida a convulsão, sendo cinco nos animais do grupo controle e três do O+H, enquanto nenhum animal medicado com O+F+H manifestou tal sinal; os tratados com O+H recuperaram-se mais rapidamente que os não-tratados. O pH urinário médio no decorrer dos tratamentos foi inferior nos medicados com O+F+H e O+H que nos controles (Tab. 7).

Gráfico 1 – Relação entre a média de pH urinário e a excreção total de amônio urinário (mM) nos bovinos intoxicados experimentalmente com cloreto de amônio – São Paulo – 2002

Quanto menor foi o pH urinário no decorrer do tratamento maior foi a excreção total de amônio durante o período ($p < 0,001$) (Graf. 1). Quanto maior o volume urinário menor a média do pH urinário durante o tratamento ($r = -0,53$; $p < 0,05$); quanto maior o volume urinário maior a excreção de amônio urinário durante o período do tratamento ($r = 0,52$; $p < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os tratamentos propostos proporcionaram uma melhora significativa no quadro tóxico, se comparado ao grupo controle, diminuindo sensivelmente a hiperamoniemia, em especial durante a 1ª h após o início do tratamento, quando os animais geralmente sucumbem. Os garrotes do grupo O+F+H apresentavam na 1ª h teores de amônia ($491,5 \mu\text{M/L}$) (Tab. 1) muito abaixo dos constatados quando do surgimento de tremores musculares ($827,7 \mu\text{M/L}$) (TRABALHO 2), ou dos bovinos não-tratados ($1028,8 \mu\text{M/L}$). O tratamento O+H também foi mais

eficiente em reduzir a hiperamoniemia, embora de maneira não tão rápida como no O+F+H. Nenhum animal não-tratado morreu, provavelmente pela interrupção da injeção de amônio que reduziu gradativamente a hiperamoniemia (Tab. 1), tornando menor a sobrecarga dos efeitos danosos da amônia no organismo.

Embora seja bastante conhecida a importância da desintoxicação da amônia no ciclo da uréia, os presentes resultados demonstraram, semelhante aos obtidos no TRABALHO 3, que os rins têm papel preponderante na excreção de amônia, via amônio urinário, em especial na 1ª h pós-tratamento. Considerando a quantidade média de amônio e uréia eliminada pela urina durante a 1ª h (Tab. 6), os bovinos tratados desintoxicaram em média 31,5% do amônio injetado, contra apenas 2,5% do grupo controle. Da significativa desintoxicação causada pelos tratamentos cerca de 44% foram gerados pela eliminação de amônia e 56% pelo ciclo da uréia, demonstrando o quão importante foi o primeiro mecanismo no processo de depuração da amônia do organismo. Este fato também foi constatado pelos maiores índices de excreções tanto urinárias como fracional de amônio na 1ª h (Tab. 5), que indicam que os animais tratados, principalmente com O+F+H, eliminaram mais amônia por peso metabólico e que foram mais aptos em eliminar a amônia da corrente circulatória. Esta maior eliminação de amônia pela urina esta intimamente ligada a dois fatores, a maior diurese (Tab. 5) e ao mais baixo pH urinário (Tab. 7) constatado nos animais tratados. Segundo MALNIC e MARCONDES (1986), quanto maior for o volume urinário e menor for o pH urinário maior será a

excreção de amônio pelo túbulo contornado proximal. De fato, semelhante aos resultados obtidos no TRABALHO 3 quanto menor o pH urinário maior a excreção total de amônio urinário (Graf. 1), confirmando aquela afirmação.

A maior diurese, constatada nos grupos O+F+H e O+H, foi causada, provavelmente, pela hidratação rápida a qual deve ter aumentado a perfusão renal, diminuída pelo estado de desidratação quando do fim do momento de convulsão (TRABALHO 3). Embora os animais desses grupos perdessem fluidos pela urina no decorrer do tratamento os animais diminuíram os valores de hematócrito no período (Tab. 4) retornado aos seus valores normais, indicando que a hidratação foi suficiente para repor a volemia.

O uso de aminoácidos do ciclo da uréia nos tratamentos O+F+H e O+H, sem dúvida, incrementou a atividade do ciclo da uréia na 1^a h, se constatado pela excreção de uréia urinária no período (Tab. 6). Porém, o mesmo fato não se verifica no decorrer de todo tratamento com curso de 3^a h, pois não ocorreu diferença na eliminação de uréia entre os não-tratados e o grupo O+H. Estes resultados sugerem que os aminoácidos empregados nos tratamentos suprimiram o ciclo da uréia no auge de sua atividade e que passaram a ter papel mais secundário em seguida, pois a atividade do ciclo foi exacerbada mesmo nos animais não-tratados.

Do ponto de vista prático este fato é relevante, pois estes aminoácidos são caros e necessitam ser empregados em altas dosagens tornando difícil seu emprego rotineiro no protocolo do tratamento dessa intoxicação. Por outro lado, o uso de fluidos e furosemida torna o tratamento muito disponível e com baixo custo. Embora os resultados com estes

supracitados medicamentos não tenham conseguido reverter adequadamente a intoxicação em ratos (TRABALHO 1), os mesmos foram muito efetivos em recuperar cinco cabras acometidas com este mal (ORTOLANI et al., 2000). Pelo fato do custo e da disponibilidade dos fluidos e da furosemida novo experimento deve ser conduzido para estudar a eficiência dos mesmos na excreção de amônia pela urina.

A furosemida não aumentou o volume urinário nem a excreção de amônia na urina, em relação grupo O+H. Esperava-se que este medicamento exacerbasse a diurese, mas tal fenômeno não foi evidenciado. Aplicou-se uma dose fixa de 265 mg/animal, preconizada pelo fabricante, ao redor de 1mg/kg PV; é possível que uma dose maior, de até 2mg/kg PV como indica (JONES et al., 1978), aumentasse significativamente a diurese. Mesmo assim, os animais tratados com diurético não desenvolveram edema pulmonar, possivelmente pela ação imediata da furosemida que foi aplicada [iv] em seguida a convulsão.

A dinâmica da concentração de uréia sérica, no decorrer deste experimento, é de interpretação mais complexa. Esperava-se que esta concentração aumentasse muito no decorrer dos tratamentos, devido ao incremento de atividade do ciclo da uréia (Tab. 3). Contudo, não ocorreram diferenças nos teores de uréia sangüínea dentro dos grupos nesse período (Tab. 3). Provavelmente, isto ocorreu devido a um enorme incremento na depuração sangüínea, nos três tratamentos, visto pelo índice de excreção fracional de uréia urinária (Tab. 5), que indicou que mais de 74% da uréia na

corrente sangüínea era eliminada na urina, mantendo-se alta esta depuração até o final do experimento.

A redução da hiperamoniemia (Tab. 1) foi acompanhada paralelamente com a melhora nas condições clínicas dos animais em questão (Tab. 7). Os animais tratados com O+F+H e O+H apresentaram uma nítida recuperação da higidez já no final da primeira hora. Animais tratados com ambos tratamentos recobram a movimentação ruminal, ficaram em estação mais rapidamente e o apetite mais precocemente. Esta melhora no estado clínico é indicativa que o teor de amônia no sistema nervoso central e periférico diminuiu sensivelmente durante o tratamento, re-estabelecendo as funções ruminais, motoras e o apetite. Muitos animais do grupo controle permaneceram em estupor e depressão no estado geral por longo tempo, e no término do experimento apresentaram ligeira hipotermia. Um desses se encontrava num quadro tão deplorável ao término do experimento (temperatura retal 34,5°C, meteorismo ruminal, regurgitamento ruminal, estupor, taquicardia intensa, taquipnéia com respiração em golpes, midríase etc) que foi necessário um tratamento intensivo para a melhora do quadro.

Outro metabólito que refletiu a depuração da amônia do organismo e a conseqüente recuperação clínica, após os tratamentos estudados, foi o lactato-L, que diminuiu sensivelmente sua concentração no plasma no decorrer da 1ª h com o uso de O+F+H e no 90º min com O+H (Tab. 2). O alto teor de lactato-L plasmático é decorrente da utilização indevida da via glicolítica anaeróbica para obtenção celular de energia. Este fato é

provocado pelo acúmulo intracelular de amônia, a qual bloqueia o ciclo de Krebs, obrigando as células a obter energia por meios anaeróbicos (FRØSLIE, 1977; VISEK, 1979).

Os valores de hematócrito diminuíram dentro do tratamento O+F+H e O+H com o decorrer do experimento (Tab. 4). Apesar desses animais excretarem maior quantidade de urina que o grupo controle eles praticamente corrigiram a volemia de maneira eficiente, provavelmente pela ação do hidratante e pelo retorno de água seqüestrada nos tecidos, derivada do efeito irritativo da amônia. Dos oito garrotes que apresentaram edema pulmonar, evidente nos momentos em seguida à convulsão, três eram do grupo tratado com O+H e cinco eram do grupo controle. A recuperação do edema pulmonar (desaparecimento de estertores úmidos/bolhosos audíveis na auscultação) foi muito mais rápida no grupo tratado que no grupo controle (Tab. 7).

5.5 CONCLUSÕES

Os tratamentos utilizados desintoxicaram mais eficientemente a amônia do organismo, por meio da maior excreção desta pela urina e pela maior atividade do ciclo da uréia, no fígado. A maior eliminação de amônia pela urina foi acompanhada de maior diurese e menor pH urinário. Os tratamentos promoveram uma eficiente melhora no quadro clínico, verificado pelo restabelecimento mais rápido da movimentação ruminal, do apetite, do tempo para se levantar, do edema pulmonar e da hiperlactemia-L.

5.6 REFERÊNCIAS

BARTLEY, E. E.; DAVIDOVICH, A.; BARR, G. W.; GRIFFEL, G. W.; DAYTON, A. D.; DEYOE, C. W.; BECHTLE, R. M. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatments methods. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 835-841, 1976.

BORTOLUSSI, G.; TERNOUTH, J. H.; McMENIMAN, N. P. Dietary nitrogen and phosphorus depletion in cattle and their effects on liveweight gain, blood metabolite concentrations and phosphorus kinetics. **Journal of Agricultural Science**, n. 126, p. 493-501, 1996.

CALDOW, G. L.; WAIN, E. B. Urea poisoning in suckler cows. **Veterinary Record**, v. 128, p. 489-491, 1991.

CHEN, X. B.; GRUBIC, G.; ØRSKOV, E. R.; OSUJI, P. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **Animal Production**, v. 55, n. 2, p. 185-191, 1992.

FRØSLIE, A. Feed-related urea poisoning in ruminants. **Folia Veterinaria**, v. 7 n. 1, p. 17-37, 1977.

JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 4th ed. Ames: Iowa State University Press, 1978. 1380 p.

MALNIC, G.; MARCONDES, M. **Fisiologia renal**. 3a ed. São Paulo: EPU, 1986, 409 p.

MARTIN Jr., D. W.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's review of biochemistry**. 18th ed. Los Altos, California: Lange Medical, 1981. 614 p.

MINITAB – **The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education** – 13.0 Release. User's Manual. New York: Addison – Wesley, 2000.

ORTOLANI, E. L.; MARCONDES, M. C. M. Treatment of ammonia intoxication in rats through the use of aminoacids from the urea cycle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 217-220, 1995.

ORTOLANI, E. L.; MORI, C. S.; FILHO, J. A. R. Ammonia toxicity from urea in a brazilian dairy goat flock. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 87-89, 2000.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine** – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 8th ed. London: Baillière Tindall, 1995. 1763 p.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1a ed. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221 p.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide**: Statistics Cary, 2000.

WISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v. 37, n. 9, p. 273-282, 1979.

WORD, J. D.; MARTIN, L. C.; WILLIAMS, D. L.; WILLIAMS, E. I.; PANCIERA, R. J.; NELSON, T. E.; TILLMAN, A. D. Urea toxicity studies in the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 4, p. 786-791, 1969.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

BARTLEY, E. E.; DAVIDOVICH, A.; BARR, G. W.; GRIFFEL, G. W.; DAYTON, A. D.; DEYOE, C. W.; BECHTLE, R. M. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatments methods. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 835-841, 1976.

BOLING, J. A.; KATANYUKUL, P. J.; NUZUM, C. T. Urea cycle enzyme activity in lambs fed different nitrogen levels at low dietary intakes. **International Journal Nutrition Research**, v. 46, p. 395-399, 1976.

BORTOLUSSI, G.; TERNOUTH, J. H.; McMENIMAN, N. P. Dietary nitrogen and phosphorus depletion in cattle and their effects on liveweight gain, blood metabolite concentrations and phosphorus kinetics. **Journal of Agricultural Science**, n. 126, p. 493-501, 1996.

BRENNER, B. M. **The kidney**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. 2702 p.

CALDOW, G. L.; WAIN, E. B. Urea poisoning in suckler cows. **Veterinary Record**, v. 128, p. 489-491, 1991

CHEN, X. B.; GRUBIC, G.; ØRSKOV, E. R.; OSUJI, P. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **Animal Production**, v. 55, n. 2, p. 185-191, 1992.

COOMBE, J. B.; TRIBE, D. E.; MORRISON, J. W. C. Some experimental observations on the toxicity of urea to sheep. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 11, p. 247-256, 1960.

DAVIDOVICH, A.; BARTLEY, E. E.; BECHTLE, R. M.; DAYTON, A. D. Ammonia toxicity in cattle. III. Absorption of ammonia gas from the rumen and passage of urea and ammonia from rumen to the duodenum. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 551-558, 1977a.

DAVIDOVICH, A.; BARTLEY, E. E.; CHAPMAN, T. E.; BECHTLE, R. M.; DAYTON, A. D.; FREY, R. A. Ammonia toxicity in cattle. II. Change in carotid and jugular blood components associated with toxicity. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 4, p. 702-709, 1977b.

DAVIS, G. K.; ROBERTS, H. F.. Urea toxicity in cattle. **Florida Agricultural Experimental State Bulletin**, p. 611, 1959.

EDJTEHADI, M; SZABUNIEWICZ, M.; EMMANUEL, B.. Acute urea toxicity in sheep. **Canadian Journal Compendium Medicine**, v. 42, p. 63-68, 1978.

FERNANDEZ, J. M.; CROOM, W. J.; TATE JR., L. P.; JOHNSON, A. D. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on hepatic and portal-drained visceral flux of metabolites and regulatory hormones. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1726-1742, 1990.

FRØSLIE, A. Feed-related urea poisoning in ruminants. **Folia Veterinary Latina**, v. 7 n. 1, p. 17-37, 1977.

GOOD, D. W.; CAFLISCH, C. R.; DuBOSE Jr., T. D. Transepithelial ammonia concentration gradients in inner medulla of the rat. **American Journal Physiology**, v. 252, p. 491-500, 1987.

GRABER, M. L.; BENGELE, H. H.; MROZ, E. et al. Acute metabolic acidosis augments collecting duct acidification rate in the rat. **American Journal Physiology**, v. 241, p. 669-676, 1981.

GREENSTEIN, J. P.; GULLINO, P.; WINITZ, M. Studies on the metabolism of amino acids and related compounds in vivo III. Prevention of ammonia toxicity by arginine and related compounds. **Archives Biochemistry of Biophysics**, v. 64, p. 342-354, 1956.

HALIBURTON, J. C.; MORGAN, S. E. Nonprotein nitrogen-induced ammonia toxicosis and ammoniated feed toxicity syndrome. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 5, n. 2, p. 237-249, 1989.

HELMER, L. G.; BARTLEY, E. E. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 1, p. 25-51, 1971.

HUBER, J. T. Nonprotein nitrogen in dairy cattle rations. In: WILCOX, C. J.; VAN HORN, H. H.; HARRIS JR., B.; HEAD, H. H.; MARSHALL, S. P.; THATCHER, W. W.; WEBB, D. W.; WING, J. M. **Large dairy herd management**. Gainesville: University of Florida Press, 1978. cap. 11, p. 293-315.

ITABISASHI, T. Urea-ammonia poisoning and ruminal motility in goats. **Natural Institute Animal Health Quart**, v. 17, p. 128-129, 1977.

JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 4th ed. Ames: Iowa State University Press, 1978. 1380 p.

JØRGENSEN, R. J.; NYENGAARD, N. R.; DANIEL, R. C. W.; MELLAU, L. S. B.; ENEMARK, J. M. D. Induced hypocalcaemia by Na₂EDTA infusion. A review. **Journal Veterinary Medicine, Serie A**, v. 46, p. 389-407, 1999.

KOPCHA, M. Nutritional and metabolic diseases involving the nervous system. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 3, n. 1, p. 119-135, 1987.

KURTZ, I.; DASS, P. D.; CRAMER, S. The importance of renal ammonia metabolism to whole body acid-base balance: A reanalysis of the pathophysiology of renal tubular acidosis. **Miner Electrolyte Metabolite**, v. 16, p. 331-340, 1990.

LEWIS, D.; HILLS, K. H.; ANNISON, E. F. Studies on the portal blood of sheep I. Absorption off ammonia from the rumen of sheep. **Biochemistry Journal**, n. 66, p. 587-590, 1957.

LEWIS, D. Ammonia toxicity in the ruminant. **Journal Agricultural Science**, n. 55, p. 111-115, 1960.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MALNIC, G.; MARCONDES, M. **Fisiologia renal**. 3a ed. São Paulo: EPU, 1986, 409 p.

MARTIN Jr., D. W.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's review of biochemistry**. 18th ed. Los Altos, California: Lange Medical, 1981. 614 p.

MINITAB – **The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education** – 13.0 Release. User's Manual. New York: Addison – Wesley, 2000.

MINSON, D. J. **Forage in ruminant nutrition**. Queensland: Academic Press, 1990. 483 p.

MORGAN, S. E. Ammonia pipeline rupture: risk assessment to cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 159-161, 1997.

MORRIS, J. G.; PAYNE, E. Ammonia and urea toxicoses in sheep and their relation to dietary nitrogen intake. **Journal Agricultural Science**, v. 74, p. 259-271, 1970.

O'CONNOR, J. E.; COSTELL, M. New roles of carnitine metabolism in ammonia cytotoxicity. In: GRISOLÍA, S.; FELIPO, V.; MIÑANA, M. D. **Advances in experimental medicine and biology**. New York: Plenum Press, 1990. v. 272, cap. 12, p. 183-195.

OLIVER Jr, J. E.; LORENZ, M. D. Blindness, anisocoria, and abnormal eye movements. In: **Handbook of Veterinary Neurology**, 2nd ed, Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. chapter 12, p. 261-271.

ORTOLANI, E. L.; MARCONDES, M. C. M. Treatment of ammonia intoxication in rats through the use of amino acids from the urea cycle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 217-220, 1995.

ORTOLANI, E. L.; MORI, C. S.; FILHO, J. A. R. Ammonia toxicity from urea in a brazilian dairy goat flock. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 87-89, 2000.

PARKINS, J. J.; HEMINGWAY, R. G.; BROWN, N. A. The increasing susceptibility of sheep to dietary urea toxicity associated with progressive liver dysfunction. **Research Veterinary Science**, v. 14, p. 130-132, 1973.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile test**. New York: Oxford University Press, 1987. 179 p.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 8th ed. London: Baillière Tindall, 1995. 1763 p.

REPP, E. W.; WARD, W.; HALE, W. H. The influence of oral administration of non-protein nitrogen compounds upon blood ammonia and urea levels in lambs. **Journal of Animal Science**, v. 14, n. 18, 1955.

ROLLER, M. H.; RIEDEMANN, G. S.; ROMKEMA, G. E.; SWANSON, R. N. Ovine blood chemistry values measured during ammonia toxicosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 1068-1071, 1982.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1a ed. Belo Horizonte: UFMG, 1998, 221 p.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide**: Statistics Cary, 2000.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: Mcgraw-Hill, 1975. 350 p.

SILVA e OLIVEIRA, J. Utilização de cana+uréia na recria de bovinos. **EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de gado de leite – CNPGL**, circular técnica, n. 23, 1985, 20 p.

SNEDCOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1967. 593 p.

SPIRES, H. R.; CLARK, J. H. Effect of intraruminal urea administration on glucose metabolism in dairy steers. **Journal Nutrition**, v. 109, p. 1438-1447, 1979.

STILES, D. A.; BARTLEY, E. E.; MEYER, R. M.; DEYOE, C. W.; PFOST, H. B. Feed processing. VII. Effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (Starea) on rumen metabolism in cattle and on urea toxicity. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 10, p. 1437-1447, 1970.

SYMONDS, H. W.; MATHER, D. L.; COLLIS, K. A. The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia. **British Journal Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 481-486, 1981.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. **Klinische Wochenschrift**, v. 43, n. 174, 345 p, 1965.

TENNANT, B.; WARD, D. E.; BRAUN, R. K.; HUNT, E. L.; BALDWIN, B. H. Clinical management and control of neonatal enteric infections of calves. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 5, p. 654-661, 1978.

VAN HORN, H. H.; FOREMAN, C. F.; RODRIGUEZ, J. E. Effect of high-urea supplementation on feed intake and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 5, p. 709-714, 1967.

WISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v. 37, n. 9, p. 273-282, 1979.

WISEK, W. J. Ammonia: Its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 3, p. 481-498, 1984.

WISEK, W. J. Some aspects of ammonia toxicity in animals cells. **Journal of Dairy Science**, v. 51, n. 2, p. 286-295, 1968.

WORD, J. D.; MARTIN, L. C.; WILLIAMS, D. L.; WILLIAMS, E. I.; PANCIERA, R. J.; NELSON, T. E.; TILLMAN, A. D. Urea toxicity studies in the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 4, p. 786-791, 1969.