

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Simone Stefanello

**IMPACTO DA INFUSÃO MESENTÉRICA DE COMPOSTOS
NITROGENADOS SOBRE O FLUXO VISCERAL DE METABÓLITOS
EM OVINOS**

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Simone Stefanello

**IMPACTO DA INFUSÃO MESENTÉRICA DE COMPOSTOS NITROGENADOS
SOBRE O FLUXO VISCERAL DE METABÓLITOS EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia.**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stefanello, Simone
Impacto da infusão mesentérica de compostos nitrogenados sobre o fluxo visceral de metabólitos em ovinos / Simone Stefanello.-2016.
62 f.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2016

1. Fígado 2. Glicose 3. Ureia 4. Veia hepática 5. Veia porta I. Kozloski, Gilberto Vilmar II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Simone Stefanello. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: simonestefanello@yahoo.com.br

Simone Stefanello

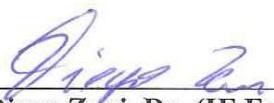
**IMPACTO DA INFUSÃO MESENTÉRICA DE COMPOSTOS NITROGENADOS
SOBRE O FLUXO DE METABÓLITOS EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia.**

Aprovada em 16 de fevereiro de 2016:



Gilberto Vilmar Kozloski, Ph.D (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Diego Zeni, Dr. (IF Farroupilha)



Fernanda Hentz, Dr. (UFFS)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos à Deus, que me presenteou com uma profissão encantadora que me realiza a cada dia. E por ele ter me dado o melhor que se espera de um experimento: animais que me ensinaram que o amor cura, salva e produz bons resultados. Com lágrimas nos olhos, de emoção e alegria, me recordo de cada um: Meu querido Tick, o mais especial de todos, que permanece ao meu lado até hoje e permanecerá por muitos anos, o mais feroz, Lhama, louco por carinho, o 47 que era o menos afetuoso, porém o mais charmoso, o 49 doce e amigável e por último, meu 46, de início assustado, porém surpreendeu por sua mansidão. Agradeço todos os dias por terem mudado minha percepção do que representa ser Veterinário. Vocês me ensinaram que todos os esforços valem sim à pena, que quanto maior o amor, o cuidado e o respeito, melhores serão as lembranças e os resultados. E é para vocês que dedico todo meu esforço e estudo, todo o trabalho, para que essa pesquisa produzisse bons resultados. A vocês meu eterno amor e gratidão.

Agradeço a toda minha família, minha origem, meu chão! Agradeço por cada ensinamento e por toda a força e carinho que sempre recebi! Agradeço meu pai e minha mãe, pela preocupação, pelo cuidado e pelo amor incondicional. Meus segundos pais, meu padrinho e minha madrinha, que me ensinaram ter garra e força para realizar aquilo que se almeja. Meus irmãos do coração: Flávia, Claudia e Emerson, pela parceria, pela companhia, por me empurrarem sempre para frente, ainda meus cunhados irmãos Gracieli, Fabiano e André, por todo o carinho! Agradeço por terem me dado os melhores presentinhos: Amábile, Amadeu e Natalia, que enchem minha vida de alegria. Minha família não é perfeita, mas é a melhor família que alguém pode ter, por vocês tenho todo o amor que cabe no coração! Também tenho muito que agradecer meu namorado Fernando, pela compreensão e pela cumplicidade, pelas inúmeras camionetes cheias de pasto, pelas ajudas na madrugada, pelo esforço em me acompanhar e por entender que naquele momento os animais precisavam mais de mim!

E como não lembrar dos meus amigos, que mesmo na distância não deixaram de me fazer sorrir, não me deixaram sozinha, e não se esqueceram de mim! Agradeço pela companhia de alguns nas madrugadas, pelas visitas, por tudo que sempre fizeram por mim!

E por último, reservei o espaço para agradecer o Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, que há muito tempo me acolheu (sete anos)! Agradeço o professor Gilberto, pelo exemplo de professor e pesquisador. Tens minha admiração e respeito! Ser orientada pelo professor foi um marco muito grande na minha vida, te agradeço muito por

tudo que me ensinaste! Queria agradecer minha amiga de fé, na boa e na ruim, que não me deixou sozinha uma noite, nem um dia, nem uma análise. Mari, te devo essa! Sem teu apoio, e que apoio hein, eu não iria conseguir dar conta! Sou muita grata, minha amiga querida! Também agradeço muito por tudo, Suka, que mesmo de longe sempre esteve presente, que foi grande responsável pela minha formação enquanto estagiária! Amo muito vocês duas! Também quero agradecer meu parceiro de luta e de risada, Tiago, que nunca permitiu que o mau humor chegasse perto, sempre esforçado resolvendo todos meus problemas estatísticos. Agradeço muito a duas pessoas especiais: Fernanda e Diego! Obrigada por me ensinarem tanto e por me induzirem a seguir a produção animal.

Agradeço toda equipe, sem a participação de cada um, os resultados não seriam os mesmos, e mais que agradecer o trabalho, agradeço a amizade, Carol, Laís, Andressa, Rafael, Flaiane, Elissandra, Ricardo, Guilherme, Andressa, Nandara, Cristiano, Gisele, Vitor, Clóvis, Claudio, Alsiane, Marcelo, a todos, meu Muito Obrigado!

Também agradeço os percalços causados por alguns, acredito que não é em vão que passamos por dificuldades, e em cima delas cresci e aprendi a sorrir, ser forte e superar. Obrigada por me ensinarem tudo que eu não quero ser!

Agradeço imensamente a Universidade Federal de Santa Maria, ao Departamento de Zootecnia e em especial ao LabRumen, pela oportunidade de estudar, de aprimorar meus conhecimentos. Agradeço pelo privilégio de estudar em uma universidade pública e de qualidade!

Também agradeço a empresa Bioclin - QUIBASA por patrocinar minhas análises colorimétricas e possibilitar que tenham sido realizadas com reagentes de qualidade e confiabilidade!

Agradeço a FAPERGS/CNPq e ao projeto NUTRIOVI pertencente à instituição EMBRAPA pela bolsa de estudo, apoio financeiro e pela concessão de recursos.

A todos, meu sincero Muito Obrigado!

**Cuidemos de nosso coração,
porque é de lá que sai o que é bom e
o que é ruim, o que constrói e o que
destrói!**

**Porém se o mal é contagioso, o bem
também é! Deixemo-nos contagiar
pelo bem!**

Papa Francisco

RESUMO

IMPACTO DA INFUSÃO MESENTÉRICA DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE O FLUXO VISCERAL DE METABÓLITOS EM OVINOS

AUTORA: Simone Stefanello
ORIENTADOR: Gilberto Vilmar Kozloski

O objetivo do estudo foi avaliar o impacto da ureagênese e da neoglicogênese sobre o gasto visceral de oxigênio e se a infusão mesentérica de arginina, alanina e bicarbonato de amônio aumentam o consumo de energia pelo sistema visceral. Também foi avaliado se há diferença no gasto de energia pelos tecidos viscerais em função do tipo de composto nitrogenado infundido. Foram conduzidos dois ensaios com ovinos, sendo um para avaliar a digestibilidade da dieta e outro para avaliar parâmetros relacionados ao metabolismo visceral. Foram utilizados quatro ovinos machos (45 ± 2 kg de peso corporal) com catéteres permanentes implantados cirurgicamente, em um delineamento experimental Quadrado Latino 4x4 alimentados com feno de tifton + concentrado em quantidades restritas a 2,5% PV para a oferta de volumoso e 0,7% PV para a oferta de concentrado. Os dados obtidos no ensaio de digestibilidade foram complementares aos obtidos no ensaio de metabolismo. Os animais passaram por quatro períodos com duração de um dia, onde em cada período foi infundido um dos tratamentos, sendo eles: solução fisiológica (controle), alanina, arginina e bicarbonato de amônio, totalizando quatro dias consecutivos de avaliação por animal. As infusões foram efetuadas na veia mesentérica com o auxílio de uma bomba de infusão contínua com capacidade de infundir concomitantemente o tratamento e o marcador de fluxo sanguíneo (PAH). Foram obtidas amostras de sangue em três diferentes pontos, sendo eles: artéria carótida, veia hepática e veia porta, em diferentes horários. Foram realizadas análises de gasometria, hematócrito e concentração sanguínea dos nutrientes: glicose, ureia, amônia, hemoglobina e de ácido paramino-hipúrico. A infusão de compostos nitrogenados e maior captação hepática dos mesmos, aumentou o gasto hepático de O_2 como consequência de um aumento na ureagênese, o que não foi observado para a neoglicogênese. O incremento da circulação portal de amônia aumenta a síntese de ureia e consequentemente o custo energético. O gasto de O_2 associado à síntese de ureia é maior do que o gasto de O_2 relacionado à neoglicogênese. O aumento da carga hepática de alanina ou de arginina não alterou o gasto de O_2 por este órgão. Ainda, não foi possível comparar os aminoácidos em estudo, visto que a infusão de arginina não alterou nenhuma das variáveis observadas.

Palavras-chave: Fígado. Glicose. Ureia. Veia hepática. Veia porta.

ABSTRACT

IMPACT OF NITROGENOUS COMPOUNDS MESENTERIC INFUSION ON METABOLITES VISCERAL FLOW IN SHEEP

AUTHOR: Simone Stefanello
ADVISOR: Gilberto Vilmar Kozloski

The aim of the study is measure the impact of the mesenteric infusion of different N compounds: alanine, arginine and ammonium bicarbonate on oxygen uptake by splanchnic tissues relative the ureagenesis and gluconeogenesis. In an attempt to quantify the digestibility diet initially and after visceral metabolism, a trial with four multicatheterized wethers (45 ± 2 kg body weight) was conducted as a 4×4 Latin Square feeding Tifton hay (2,5 %) and protein concentrate (0,7%) with 210 minutes daily periods during 4 days. The data obtained in the digestibility trial were complementary to those obtained in metabolism trial. The blood flow through portal- drained viscera (PDV) and total splanchnic tissues (ST) were determined by downstream dilution of 15 g/L *p*-aminohippurate (PAH) infused continuously (1.5mL/min) into the mesenteric vein. In parallel, wethers were continually infused into the mesenteric vein with aphysiological saline (0.15 MNaCl) solution during 90 minutes followed by the infusion, during more 120 minutes, of either solution: physiological saline (control), 0.25 MNH₄HCO₃, 0.25 M L-alanine or 0.125 M L-arginine, all of them infused at a rate of 1.5 mL/min to provide 375 μmol N/min. The infusion of nitrogenous compounds and their greater hepatic uptake increased hepatic O₂ spent as a result of an increase in ureagenesis, which was not observed for gluconeogenesis. The higher ammonia portal circulation increases urea synthesis and thus the energy cost. O₂ expense associated with the urea synthesis is higher than O₂ expense related to gluconeogenesis. Increased alanine or arginine uptake by liver did not change the cost of O₂. Moreover, it was not possible to compare the amino acids in study, since the infusion of arginine did not change any of the variables examined.

Keywords: Glucose. Hepatic vein. Liver. Portal vein. Urea.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos alimentos ofertados durante o ensaio de digestibilidade e de metabolismo visceral	31
Tabela 2 – Consumo, digestibilidade e excreção fecal da matéria orgânica (CMO, DMO, EFMO), fibra em detergente neutro (CFDN, DFDN, EFFDN) e nitrogênio (CN, DN, EFN) em ovinos alimentados com feno de tifton e refinazil	37
Tabela 3 – Variabilidade (i.e. erro padrão da média (EPM)) das medidas de concentração plasmática e de fluxo visceral de metabólitos em ovinos em função do método analítico ¹	38
Tabela 4 – Concentração de ácido paramino-hipúrico (PAH), fluxo de plasma (FP) e fluxo de sangue (FS) pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com diferentes tratamentos.	40
Tabela 5 – Concentração sanguínea e captação de oxigênio pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 $\mu\text{mol N/min}$ de diferentes compostos nitrogenados. ...	41
Tabela 6 – Concentração sanguínea e fluxo de N-ureia pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 $\mu\text{mol N/min}$ de diferentes compostos nitrogenados. ...	43
Tabela 7 – Concentração sanguínea e fluxo de N-amônia pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 $\mu\text{mol N/min}$ de diferentes compostos nitrogenados. ...	44
Tabela 8 – Concentração sanguínea e fluxo de glicose pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 $\mu\text{mol N/min}$ de diferentes compostos nitrogenados. ...	46
Tabela 9 – Produção de calor (oxigênio consumido na forma de energia) dos tecidos viscerais (PCV), tecidos hepáticos (PCH) e tecidos drenados pela veia porta (PCP) antes e após a infusão de diferentes compostos nitrogenados	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática da histologia e da irrigação sanguínea hepática..... 17
- Figura 2 – Ilustração esquemática de aspectos de zoneamento relacionados ao metabolismo intermediário (GEBHARDT, 1992)..... 19
- Figura 3 – Representação dos sítios de implantação de cateteres (●) no sistema visceral em ruminantes. (adaptado de Lindsay e Reynolds, 2005).....20
- Figura 4 – Representação esquemática do Ciclo da Ureia e as reações que nele introduzem os grupos amino (NELSON e COX, 2008).....26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	HIPÓTESES.....	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	GERAL.....	15
3.2	ESPECÍFICOS.....	15
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1	SISTEMA VISCERAL: TECIDOS DRENADOS PELA VEIA PORTA E FÍGADO	16
4.1.1	Aspectos anatômicos e fisiológicos dos Tecidos Drenados pela Veia Porta.....	16
4.1.2	Aspectos anatômicos e fisiológicos do fígado.....	17
4.2	TÉCNICAS DE ESTUDO PARA MENSURAÇÃO DE NUTRIENTES EM TECIDOS	19
4.2.1	Considerações sobre o procedimento cirúrgico e alocação de cateteres.....	19
4.2.2	Marcador e fluxo de sangue.....	21
4.3	METABOLISMO HEPÁTICO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS, UREAGÊNESE E NEOGLICOGÊNESE.....	22
4.3.1	Compostos nitrogenados	22
4.3.2	Obtenção de energia, importância do oxigênio	22
4.3.3	Ureagênese.....	23
4.3.4	Neoglicogênese.....	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	LOCAL E ÉPOCA	28
5.2	ENSAIO 1: DIGESTIBILIDADE	28
5.2.1	Animais, dietas e período experimental.....	28
5.2.2	Coleta de amostras.....	29
5.2.3	Análises químicas.....	29
5.3	ENSAIO 2: METABOLISMO VISCERAL.....	30
5.3.1	Preparação dos animais e delineamento experimental	30
5.3.2	Condução do experimento	30
5.3.3	Coleta de amostras.....	31
5.3.4	Análises Químicas.....	32
5.3.5	Utilização de resultados.....	33
5.4	CÁLCULOS	34
5.5	MODELO MATEMÁTICO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6	RESULTADOS	36
6.1	ANIMAIS	36
6.2	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE	36
6.3	ERRO PADRÃO DA MÉDIA COMO CRITÉRIO DE ESCOLHA	37
6.4	CONCENTRAÇÃO E FLUXO DOS METABÓLITOS	39
7	DISCUSSÃO	48
8	CONCLUSÕES.....	52
	BIBLIOGRAFIA	53

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes domésticos são herbívoros altamente versáteis, nutrindo-se com forrageiras, fontes de nitrogênio não-proteico, grãos de cereais, leguminosas e alimentos de origem animal, que apresentam vasta diferença quanto à composição nutricional e satisfação das exigências (HUNTINGTON, 1990).

Alimentos de baixa qualidade são frequentemente limitantes no fornecimento das exigências protéicas dos animais e não atendem a quantidade requerida pela microflora ruminal. Dessa forma, se faz necessário a suplementação protéica quando se almeja a otimização da produção. Entretanto, um consumo excessivo de proteína degradável pode resultar em concentrações de amônia ruminal que excedem as necessidades, aumentando consequentemente a concentração sanguínea e a ureagênese hepática e a subsequente excreção urinária, podendo incrementar os gastos energéticos na ureagênese, contribuindo potencialmente para uma utilização ineficiente do nitrogênio (N) e energia contidos na dieta (ATKINSON et al., 2010).

A ureagênese hepática está intimamente ligada à degradabilidade do N dietético e subsequente absorção de amônia. Ruminantes, especialmente consumindo leguminosas ou gramíneas imaturas dependem do fígado para processar a amônia que atinge os tecidos hepáticos, após ter sido absorvida via intestino, sendo a capacidade de detoxificação do fígado raramente ultrapassada (HUNTINGTON e ARCHIBEQUE, 1999).

O estímulo da ureagênese pelo excesso de amônia na dieta reduz a quantidade de energia disponível para o propósito produtivo. Além disso, o aumento do fluxo portal de amônia leva ao aumento concomitante do gasto de oxigênio (O₂) pelo fígado e interfere no metabolismo da glicose, podendo ocasionar redução na neoglicogênese (RECAVARREN e MILANO, 2013).

A importância da neoglicogênese em ruminantes, principalmente em pastoreio, recebendo forragens ricas em fibra, se deve ao fato de que o organismo absorve quantidades insignificantes de glicose pelo trato digestivo e sua capacidade de armazenamento é limitada. A maior fonte de energia absorvível em ruminantes são os ácidos graxos voláteis (AGV), sendo o propionato o principal precursor neoglicogênico. Em períodos de jejum, entretanto, os principais precursores neoglicogênico são: o lactato, o glicerol e a alanina, porém suas produções são insuficientes para suprir o requerimento total (HERDT, 1988).

A ureagênese está conectada ao ciclo de Krebs e a neoglicogênese hepática através de metabólitos comuns como o aspartato, o oxaloacetato, o α -cetoglutarato e o glutamato. Assim, quando a concentração de amônia ruminal está elevada é gerada uma sobrecarga na ureagênese por conta da excessiva demanda de intermediários do ciclo da ureia, os quais são provenientes de precursores que são divididos com o ciclo de Krebs e a via neoglicogênica (NORO e WITTEWER, 2011).

Durante o processo de síntese de ureia têm-se um custo energético para o animal, onde são gastos quatro moléculas de ATP (são gastos 3 ATP e formados 2 ADP e 1 AMP e na conversão de AMP para ADP há o gasto de mais um ATP) para cada molécula de ureia sintetizada, porém essa situação parece ser contrabalanceada, em parte, pela síntese de uma molécula de fumarato. No ciclo de Krebs, o fumarato libera um NADH, o qual pode resultar na síntese de três moléculas de ATP quando oxidado na cadeia respiratória mitocondrial. Devido a esse fato, o gasto líquido de energia para sintetizar ureia parece ser menor do que o tradicionalmente proposto (KOZLOSKI, 2011).

Em vista disso, sugere-se que o maior gasto energético em situações que há aumento da ureagênese hepática tem maior relação com o aumento concomitante da neoglicogênese a partir de aminoácidos como glicina e alanina, do que à síntese de ureia em si.

2 HIPÓTESES

O aumento da carga hepática de compostos nitrogenados aumenta o gasto hepático de O_2 como consequência do aumento na ureagênese e/ou gliconeogênese.

O gasto de O_2 associado à síntese de ureia é menor do que o gasto de O_2 relacionado à neoglicogênese.

O aumento da carga hepática de alanina tem maior impacto sobre o gasto de O_2 por este órgão do que a arginina.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar o impacto da ureagênese e da neoglicogênese sobre o gasto visceral de oxigênio.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se a infusão mesentérica de arginina, alanina e bicarbonato de amônia aumentam o consumo de energia pelo sistema visceral;

- Avaliar se há diferença no gasto de energia pelos tecidos viscerais em função do tipo de composto nitrogenado infundido (arginina, alanina e bicarbonato de amônio);

- Comparar diferentes metodologias analíticas para a obtenção dos resultados através das mesmas amostras de plasma, identificando a mais robusta, tendo como critério o menor Erro Padrão da Média.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 SISTEMA VISCERAL: TECIDOS DRENADOS PELA VEIA PORTA E FÍGADO

4.1.1 Aspectos anatômicos e fisiológicos dos Tecidos Drenados pela Veia Porta

Na maioria dos animais, incluindo os ruminantes domésticos, os tecidos drenados pela veia porta (TDVP) são a interface entre a dieta e o restante do organismo, de forma que o fígado, órgão metabólico central, é responsável pelo encontro dos TDVP com o restante do organismo. Dentre as principais funções dos tecidos esplênicos, que incluem fígado e TDVP, estão a digestão e absorção de nutrientes dietéticos (HUNTINGTON, 1990).

Os tecidos drenados pela veia mesentérica incluem o abomaso e o intestino delgado (duodeno e íleo), que são irrigados pelo sangue arterial, e o sangue venoso flui para dentro dos ramos da veia mesentérica eferente. Os TDVP incluem os tecidos drenados pela veia mesentérica mais o rúmen e o intestino grosso e outros órgãos, tais como o pâncreas, baço e tecido adiposo mesentérico e omental (KRAFT, 2009).

O sangue eferente do rúmen é drenado através da veia ruminal e o sangue eferente do intestino grosso é drenado através da veia ileocecal. As veias ruminal, ileocecal e mesentérica confluem e formam a veia porta. A veia porta em ruminantes tem uma distinção, sendo ela muito curta (4-5 cm em ovelhas). A soma dos tecidos drenados pela veia porta aos tecidos drenados pela veia mesentérica dá origem ao sistema portal (KRAFT, 2009).

O trato gastrointestinal e o fígado possuem uma alta atividade metabólica, onde o trato gastrointestinal representa somente cerca de 5 a 10% da massa total, e utiliza em torno de 20% do O₂ total utilizado pelo organismo; o fígado representa em torno de 1 a 3% da massa total e utiliza até 40% do O₂ total utilizado pelo organismo, sendo o fígado, o coração, a glândula mamária e os tecidos do trato gastrointestinal, os tecidos metabólicos mais ativos dos animais, tanto quando mensurado o gasto de energia por quilograma de peso, quanto gasto de energia em porcentagem relacionado com o gasto total do organismo (KOZLOSKI, 2011; SMITH e BALDWIN, 1973).

4.1.2 Aspectos anatômicos e fisiológicos do fígado

Os cordões de hepatócitos estão dispostos mais ou menos radialmente ao redor da veia central. Entre os cordões hepáticos cursam os sinusóides, que são espaços forrados de endotélio análogos aos capilares em outros órgãos. Na periferia do lóbulo estão as tríades porta (Figura 1), consistindo de uma veia porta, uma artéria hepática e um ducto biliar, onde o sangue da artéria hepática e da veia porta fluem centralmente no sinusóide (SWENSON e REECE, 1996).

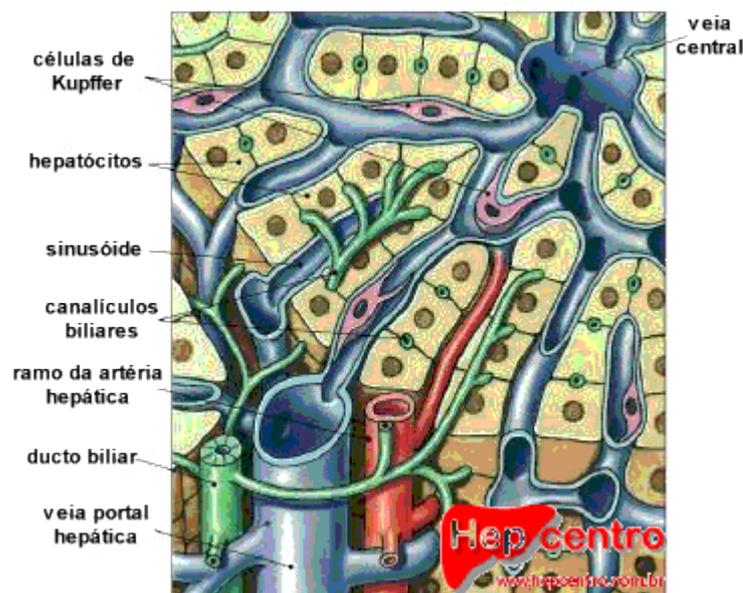


Figura 1 – Representação esquemática da histologia e da irrigação sanguínea hepática.

O fígado recebe o sangue através da artéria hepática e da veia porta. O sangue de ambas estas fontes mistura-se nos sinusóides hepáticos e retorna a circulação geral através das veias hepáticas, que desembocam na veia cava caudal (DYCE et al., 1996).

As menores unidades funcionais do fígado são os hepatócitos. O fígado é um órgão altamente irrigado, cujo sangue compreende em torno de 25% de sua massa. Apesar de constituir menos de 2% da massa corporal total, o fígado recebe cerca de 25% do débito cardíaco (LOBLEY; MILANO; VAN DER WALT, 2000).

As células do parênquima hepático ou hepatócitos são o tipo de células predominantes do fígado contabilizando 60% do número total e cerca de 80% do volume, sendo esse o maior grupo, somados aos macrófagos ou células de Kupffer (8 a 12%), as células endoteliais

delineando o Espaço de Disse (15 a 20%) e os adipócitos (JUNGERMANN e KIETZMANN, 1996).

O metabolismo do N no fígado não é homogêneo em todos hepatócitos que constituem um ácino. De acordo com as características e atividade metabólica, os hepatócitos são divididos em periportais, localizados mais próximos dos ramos venosos portais e dos capilares, e em perivenosos, os quais estão mais próximos aos ramos venosos hepáticos localizados no lado oposto. Os hepatócitos periportais têm alta capacidade de captação de amônia, apesar da baixa afinidade pela molécula, enquanto, em situação oposta os perivenosos não sintetizam ureia, mas captam amônia com alta afinidade, apesar da baixa capacidade (KOZLOSKI, 2011).

O fígado possui um importante papel no metabolismo da ureia e da glutamina. A nível acinar, estas vias são parte de uma organização estrutural e funcional sofisticada com interações metabólicas entre diferentes populações de hepatócitos, sendo os hepatócitos periportais os primeiros a receber o sangue aferente portal e os que possuem as cinco enzimas envolvidas no Ciclo da Ureia (Figura 2) e a glutaminase mitocondrial (HAUSSINGER, 1990).

As células perivenosas estão ao redor dos ramos da veia hepática e não possuem as enzimas do Ciclo da Ureia, sugerindo que a produção de ureia ocorrerá especificamente nas células periportais (KUO et al., 1991).

A especialidade dos hepatócitos perivenosos é a produção de glutamina através da glutamina sintetase, proporcionando assim uma outra oportunidade de remover amônia da circulação antes que ela atinja a veia hepática. Assim, nos hepatócitos periportais e perivenosos, as enzimas do ciclo da ureia juntamente com as reações de transaminação são estruturalmente orientadas para formar ureia a partir da amônia absorvida do intestino e usar a síntese de glutamina como outro caminho para remover essencialmente toda a amônia do sangue portal (HUNTINGTON e ARCHIBEQUE, 1999).

De acordo com Haussinger (1990), da total concentração fisiológica de amônia circulante, 2/3 da amônia é convertida a ureia e 1/3 é convertida em glutamina.

Por ser o pH (potencial hidrogeniônico) fisiológico em torno de duas unidades menor que o pKa (constante de acidez) da amônia, basicamente toda amônia presente no trato gastrointestinal dos ruminantes está na forma protonada (NH_4^+). A protonação e desprotonação da amônia possibilita a essa molécula um mecanismo de movimentação através das membranas. A amônia é absorvida ou difundida em todas as seções do trato digestivo. Antes de difundir através do epitélio ruminal, o íon amônio é convertido em amônia na parede do intestino, difunde-se para as células epiteliais como amoníaco, e é em seguida protonado

para formar novamente o íon amônio. Além da difusão, existem outros mecanismos de transporte, como a associação com bicarbonato e ácidos graxos voláteis. A concentração de amônia ruminal decresce em resposta a fatores que levam a diminuição da produção de amônia ou fatores que promovem o uso da amônia como, por exemplo, a sincronização entre energia e nitrogênio fermentável (HUNTINGTON e ARCHIBEQUE, 1999).

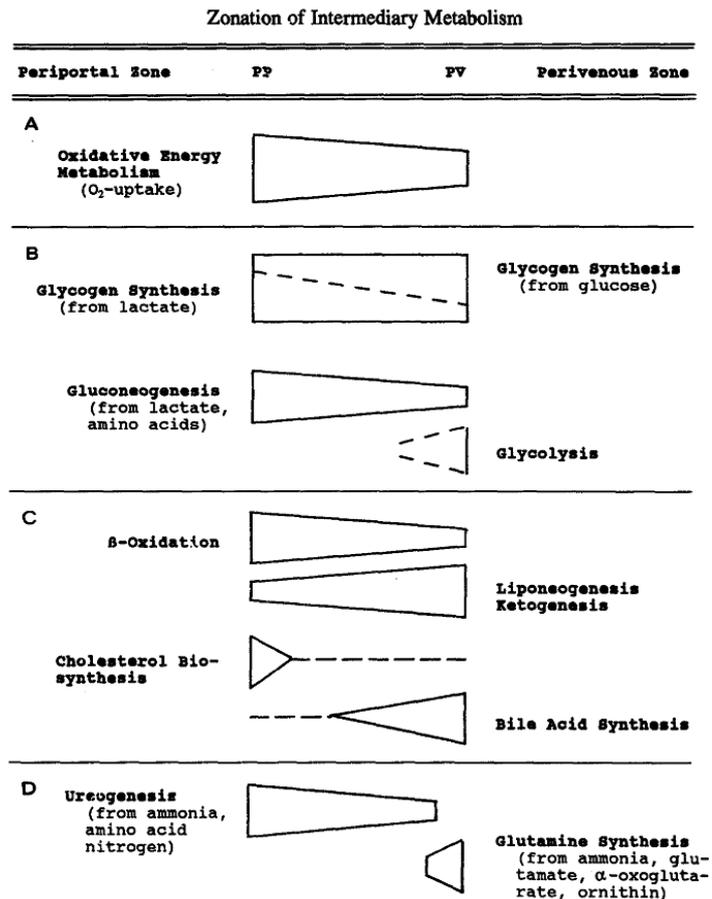


Figura 2 – Ilustração esquemática de aspectos de zoneamento relacionados ao metabolismo intermediário (GEBHARDT, 1992).

4.2 TÉCNICAS DE ESTUDO PARA MENSURAÇÃO DE NUTRIENTES EM TECIDOS

4.2.1 Considerações sobre o procedimento cirúrgico e alocação de cateteres

O uso do procedimento de multicateterização têm contribuído muito para o conhecimento do metabolismo gastrointestinal e do fígado em ruminantes, possibilitando a visualização de valores de absorção e de metabolismo de nutrientes a nível de tecidos esplênicos. Catéteres inseridos em um determinado vaso sanguíneo podem, portanto, ser

utilizados para a mensuração do metabolismo do tecido específico através de seus leitos vasculares (SEAL e REYNOLDS, 1993).

A concentração de nutrientes, assim como de O_2 em um determinado tecido se torna possível, através da mensuração dessa concentração na entrada e na saída desse tecido. Com a cateterização desses pontos, obtêm-se amostras de sangue aferente e eferente, nas quais se pode proceder a análise da composição e concentração de diferentes nutrientes, assim como a avaliação do fluxo sanguíneo aferente e eferente, exigindo o auxílio de marcadores de fluxo, como, por exemplo, o ácido paramino-hipúrico (PAH).

A compartimentalização do metabolismo hepático entre os diferentes lobos, não influencia a composição do sangue drenado pelos ramos da veia hepática, e desse modo, a implantação de três cateteres é suficiente para mensurar o balanço líquido de nutrientes ao nível hepático. O fígado tem a particularidade de receber dois tipos de sangues aferentes: a veia porta e a artéria hepática, enquanto que os ramos da veia hepática (Figura 3) são as únicas vias eferentes do fígado (SEAL e REYNOLDS, 1993).

A veia porta é compreendida pela união das veias ruminal, ileocecal e mesentérica comportando a drenagem dos TDVP e tecidos mesentéricos.

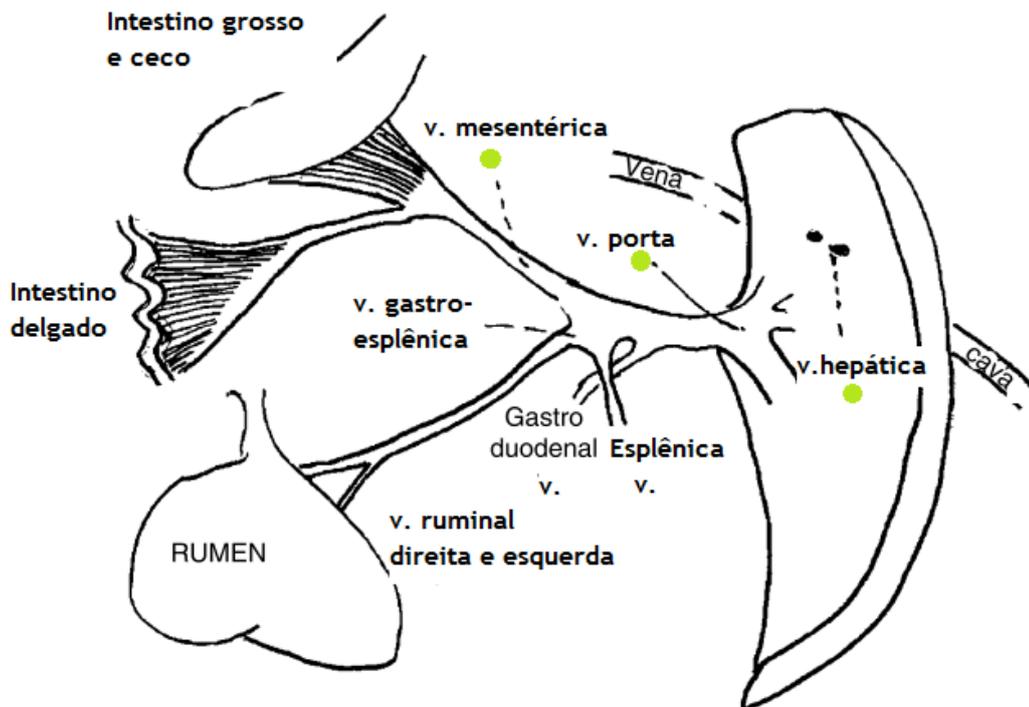


Figura 3 – Representação dos sítios de implantação de cateteres (●) no sistema visceral em ruminantes. (adaptado de Lindsay e Reynolds, 2005).

Com exceção das artérias pulmonares, a concentração de um nutriente é igual em todas as artérias, e a escolha do sítio arterial a ser cateterizado é independente do tecido de interesse. Em geral, a artéria aorta, carótida, ou um dos ramos da artéria mesentérica é cateterizada (ORTIGUES e DURAND, 1994).

4.2.2 Marcador e fluxo de sangue

Para medir o fluxo de sangue através de um vaso, utiliza-se um método de diluição que consiste em infundir um marcador, não metabolizável pelos tecidos, e medir a concentração deste marcador em nível sanguíneo aferente e eferente. Uma considerável extração do marcador pelos rins ou fígado é requerida em cada ciclo de circulação para manter a concentração arterial do marcador constante. O principal marcador utilizado é o ácido paraminohipúrico (PAH) (KATZ e BERGMANN, 1969). Para medir o fluxo sanguíneo a nível visceral, o marcador é infundido em um ramo da veia mesentérica e as coletas de sangue são realizadas em um ponto antes (catéter da artéria) e depois (catéter das veias porta e hepática) do sítio de infusão.

O fluxo de sangue na veia porta ou hepática pelo método dos marcadores é calculado pela diferença de concentração portal ou hepática, menos a concentração arterial, em relação à taxa de infusão do marcador. O fluxo de sangue arterial no fígado é calculado como a diferença entre o fluxo de sangue visceral menos o fluxo de sangue portal.

O fluxo líquido de qualquer nutriente pelo sistema portal ou visceral total é calculado como a diferença entre a concentração portal ou hepática menos a concentração arterial do nutriente, multiplicado pelo fluxo de sangue da veia em questão (método de diferença de concentração artério-venosa (A-V)). Se a concentração venosa for mais alta que a arterial, o fluxo será positivo e indicará produção do nutriente, enquanto que, em situação inversa, indicará utilização do nutriente pelo órgão ou sistema (KOZLOSKI, 2011). Exigências fundamentais do método de diferença A-V são a habilidade em medir acuradamente o fluxo de sangue e pequenas diferenças de concentração A-V.

4.3 METABOLISMO HEPÁTICO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS, UREAGÊNESE E NEOGLICOGÊNESE

4.3.1 Compostos nitrogenados

Algumas particularidades dos compostos nitrogenados utilizados no estudo são relevantes. A solução de alanina 0,25M e arginina 0,125M infundidas apresentam essa diferença de molaridade, atribuída ao fato de que a massa molar da arginina corresponde ao dobro do valor da massa molar da alanina.

A alanina quando empregada como precursor glicogênico, gera piruvato através de sua transaminação dentro da mitocôndria, onde seu grupamento α -amino é transferido para um α -cetoácido carboxílico. A seguir, piruvato é convertido a oxaloacetato, por ação da piruvato descarboxilase e da coenzima biotina, e nessa reação têm-se o gasto de um ATP (adenosina trifosfato). Como a membrana mitocondrial não tem transportador para o oxaloacetato, então para ser exportado para o citosol é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase e tem o custo de um NADH (nicotinamida dinucleotídeo). O malato deixa a mitocôndria e quando atinge o citosol é reoxidado a oxaloacetato, com produção de um NADH. O oxaloacetato é convertido a fosfoenolpiruvato pela fosfoenolpiruvato carboxicinase requerendo o gasto de um GTP (guanosina trifosfato), e o fosfoenolpiruvato ingressa na rota neoglicolítica (NELSON e COX, 2008).

A via biossintética para a formação de glicose permite a síntese de glicose não apenas a partir do piruvato, mas também dos intermediários do ciclo do ácido cítrico, sendo que todos são passíveis de serem oxidados a oxaloacetato e ingressar na via neoglicolítica. A arginina é um aminoácido neoglicogênico que é convertido a α -cetogluturato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico, que por sua vez é oxidado a oxaloacetato, que ingressa na via neoglicolítica (NELSON e COX, 2008).

4.3.2 Obtenção de energia, importância do oxigênio

A energia é obtida a partir da oxidação dos combustíveis metabólicos e é convertida a ATP, que é uma forma de energia de rápida mobilização disponível às células. O ATP é gerado como resultado do transporte de elétrons ao longo do complexo enzimático presente na membrana interna da mitocôndria. Em uma série de reações de redução e oxidação, os elétrons são conduzidos ao longo da membrana, passando de um complexo ao outro, até

atingirem seu destino final, onde se combinam ao O₂ molecular, o elemento mais eletronegativo, o qual é reduzido em 2H₂O. Essa necessidade de O₂ dá ao processo de transporte de elétrons a denominação de cadeia respiratória, responsável pelo maior gasto de O₂ do organismo (HARVEY e FERRIER, 2012).

O ciclo de Krebs é uma via catabólica central e universal por meio do qual os compostos derivados da degradação são oxidados a CO₂ com maior parte da energia da oxidação temporariamente armazenada na forma de NADH e FADH. São essas coenzimas ricas em energia que durante o metabolismo aeróbico transferem elétrons ao O₂ e a energia é capturada na forma de ATP (CAMPBELL e FARRELL, 2015).

4.3.3 Ureagênese

A ureagênese desempenha funções que são de grande importância para o organismo animal, incluindo a remoção do excesso de aminoácidos requerido para os processos anabólicos, regulação do balanço ácido-básico, remoção do excesso de NH₃ proveniente do trato gastrointestinal, permanecendo o suficiente para proporcionar substrato para reações tais como a síntese de ácidos nucleicos e mantendo a concentração abaixo do limiar que ocasionaria toxicidade para o sistema nervoso central (LOBLEY, 1995).

As variações no gasto de O₂ pela ureagênese podem estar relacionadas a fatores como a alteração da disponibilidade de amônia ao fígado. Condições em que a concentração de N na dieta é elevada, de alta degradabilidade ruminal, ou quando a disponibilidade de carboidratos rapidamente fermentáveis não está em quantidade, ou velocidade de degradação compatível à taxa de produção de amônia no rúmen, aumentam a liberação de N-NH₃ para o sangue portal. Alta captação de AA pelo fígado ocorre com excessiva liberação pelos TDVP em relação às exigências para síntese de proteína nos tecidos periféricos, baixa disponibilidade de propionato ou lactato relativo à necessidade para a gliconeogênese e/ou alta captação de amônia pelo fígado (REYNOLDS, 1992).

Precusores neoglicogênicos interferem na ureagênese através do aumento da síntese de aspartato, que fornece o segundo átomo de N para a síntese da molécula de ureia e que também é um substrato limitante para a síntese de glicose. O aspartato é precursor do oxaloacetato citosólico e é transferido da mitocôndria para o citosol em troca com o glutamato (BAREJ, 1987).

Durante o processo de síntese de ureia têm-se um custo energético para o animal, onde são gastos quatro moléculas de ATP (são gastos 3 ATP e formados 2 ADP e 1 AMP e na

conversão de AMP para ADP há o gasto de mais um ATP) para cada molécula de ureia sintetizada, porém essa situação parece ser contrabalanceada, em parte, pela síntese de uma molécula de fumarato. No ciclo de Krebs, o fumarato libera um NADH, o qual pode resultar na síntese de três moléculas de ATP quando oxidado na cadeia respiratória mitocondrial. Devido a esse fato, o gasto líquido de energia para sintetizar ureia parece ser melhor do que o tradicionalmente proposto (KOZLOSKI, 2011).

A ureagênese hepática (Figura 5) depende da disponibilidade de quantidades equivalentes de molaes de amônia livre e aspartato citosólico. O ciclo da ureia inicia no interior da mitocôndria, entretanto os três seguintes passos ocorrem no citosol, com isso, o ciclo abrange dois compartimentos diferentes. A amônia que chega ao fígado oriunda de processos metabólicos, assim como, amônia que chega com a veia porta originada da oxidação de aminoácidos pelas bactérias ruminais/intestinais. A amônia presente no interior da matriz mitocondrial hepática é reunida com CO_2 que está presente na forma de bicarbonato HCO_3 , que foi produzido pela respiração mitocondrial, para formar o carbamoil fosfato, sendo essa reação dependente de ATP, catalisada pela carbamoil fosfato sintetase I (NELSON e COX, 2008).

O carbamoil fosfato ingressa no ciclo da ureia, doando seu grupamento carbamoil para a ornitina, formando a citrulina e liberando Pi . A citrulina passa para o citosol, na qual é adicionado um segundo grupamento amino (originado do aspartato na mitocôndria, transportado para o citosol) formando o argininossuccinato, catalisado pela enzima argininossuccinatosintetase. Depois o argininossuccinato é clivado por uma argininossuccinase liberando arginina e fumarato, que são também intermediários do ciclo do ácido cítrico mitocondrial. Por último a enzima citosólica arginase hidrolisa arginina em ornitina e ureia, sendo que a ornitina é transportada para o interior da mitocôndria onde inicia novamente o ciclo (NELSON e COX, 2008).

Arginina têm função de ativador mitocondrial da n-acetil glutamato sintetase (união do acetil-CoA mais glutamato). N-acetil glutamato sintetase ativa a Carbamil-P sintetase I que é responsável pela incorporação de amônia na Carbamil-P. Tendo-se aumento da arginina, têm-se consequentemente aumento da incorporação de amônia ao ciclo da ureia (NELSON e COX, 2008).

Praticamente toda a amônia presente na circulação portal é captada pelo fígado. Uma pequena parte da amônia é utilizada em reações de transaminação para a síntese de compostos protéicos, mas a maior parte é convertida em ureia (KOZLOSKI, 2011).

O papel da ureagênese hepática no metabolismo de N é prevenir que a amônia passe pelo fígado e atinja a circulação periférica em níveis tóxicos ao animal e prover uma via de excreção dos AA que estão em excesso às exigências corporais (LOBLEY et al., 2000).

As características e atividade metabólica dos hepatócitos periportais são diferentes dos perivenosos, onde os hepatócitos periportais têm alta capacidade de captação de amônia, mas as enzimas envolvidas nesse processo, particularmente a carbamoil sintetase tem baixa afinidade por esta molécula (K_m de 1 a 2), já os perivenosos não sintetizam ureia, mas são capazes de captar amônia através da síntese de glutamina a partir de glutamato pela ação da glutamina sintetase, a qual tem baixa capacidade e alta afinidade por amônia (K_m de 0,1 a 0,3 mM). A efetividade desses dois sistemas de captação garante que mais de 98% da amônia absorvida seja neutralizada como ureia no fígado (KOZLOSKI, 2011).

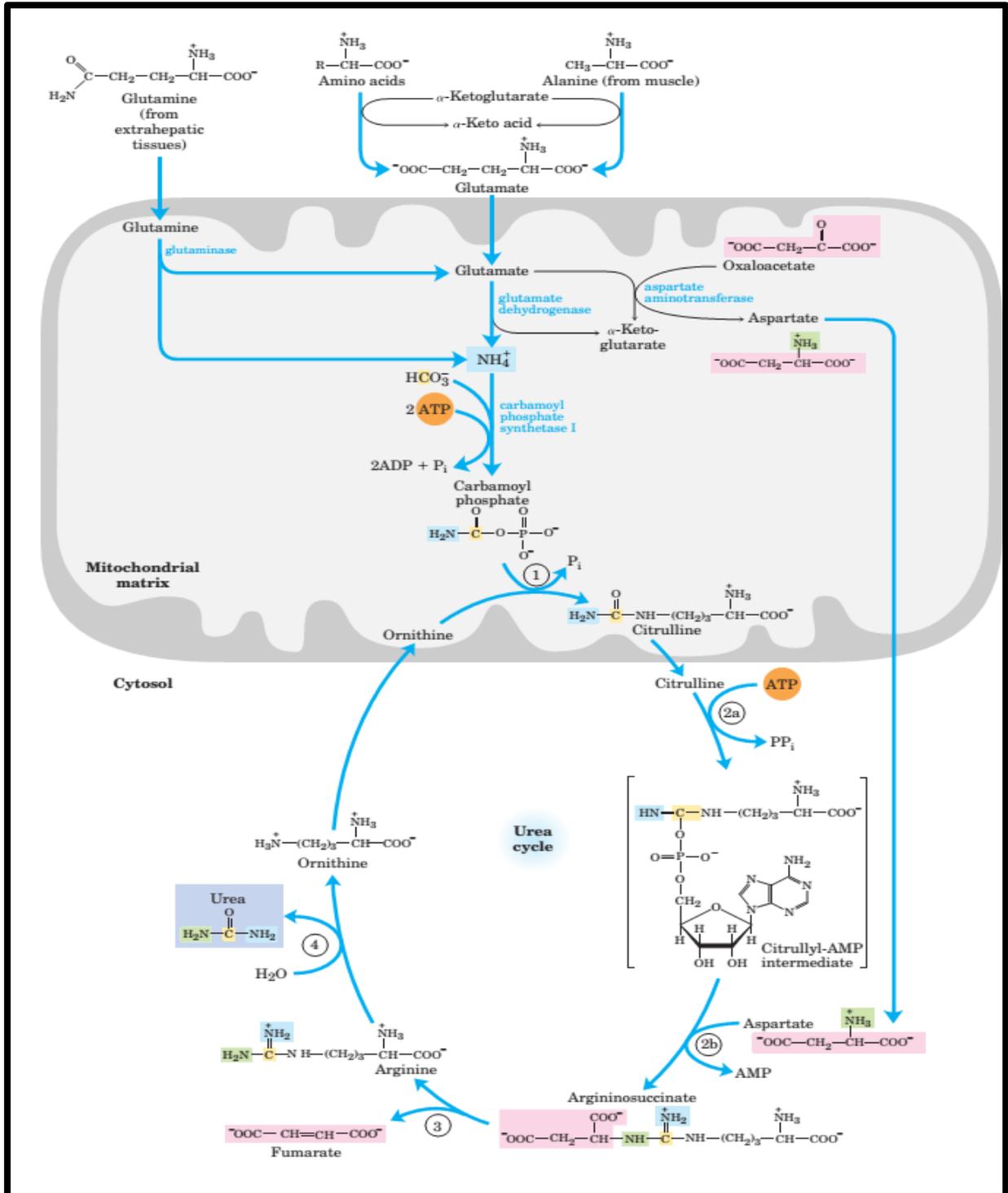


Figura 4 – Representação esquemática do Ciclo da Ureia e as reações que nele introduzem os grupos amino (NELSON e COX, 2008).

Não está completamente esclarecido se a ureagênese é ativa ou passivamente controlada e quais são os fatores envolvidos. Porém, as concentrações e atividades das enzimas do ciclo da ureia podem controlar a ureagênese (LOBLEY et al., 2000).

4.3.4 Neoglicogênese

O requerimento metabólico de glicose não difere entre ruminantes e não-ruminantes, entretanto a absorção de glicose pelo trato gastrointestinal em ruminantes é baixa, limitada a dietas ricas em amido. Assim, a habilidade de sintetizar glicose a partir de precursores não glicolíticos é obrigatória. Os grupos carbono da glicose podem ser fornecidos pelo propionato, assim como outros compostos como o lactato, valerato, glicerol ou ainda pelos aminoácidos neoglicogênicos (VAN SOEST, 1994).

As taxas de utilização de glicose pelos ruminantes são semelhantes às dos monogástricos, sendo 50 a 55% da glicose metabolizada pelo tecido muscular, 20 a 30% pelos TDVP, 0 a 15% pelo fígado e 10% pelo cérebro. O fígado produz aproximadamente 85% da glicose utilizada pelo organismo nos ruminantes, sendo esta produção resultante da síntese *de novo* de glicose através de muitos precursores, sendo eles: propionato principalmente, L-lactato, aminoácidos gliconeogênicos (alanina e glicina), e glicerol (ORTIGUES-MARTY; VERNET; MAJDOUB, 2003).

A neoglicogênese hepática têm um custo energético significativo e variável, dependendo do substrato disponível. A síntese de glicose a partir do propionato implica um balanço negativo de 4 moles de ATP por mol de glicose produzida, na síntese de glicose a partir do lactato o balanço é 6 moléculas de ATP negativo, e quando a partir do glicerol o balanço é de 4 moléculas de ATP positivo. Quando os aminoácidos se tornam os precursores, o balanço de ATP na rota neoglicogênica torna-se amplamente variável quando o somatório é feito a partir dos diferentes intermediários do ciclo de Krebs gerados por eles. No estado alimentado, os principais precursores de glicose no fígado são o propionato, e os aminoácidos alanina e glicina e, quando a partir desses substratos a neoglicogênese têm um custo energético bastante significativo (KOZLOSKI, 2011).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL E ÉPOCA

Foram conduzidos dois ensaios, um de digestibilidade e outro de metabolismo visceral, nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Os ensaios foram desenvolvidos no período de março de 2014 a fevereiro de 2016, contemplando todas as atividades referentes à dissertação: preparação dos animais, cirurgia, coleta de amostras, análise de amostras, obtenção de resultados e interpretação dos mesmos.

5.2 ENSAIO 1: DIGESTIBILIDADE

5.2.1 Animais, dietas e período experimental

O protocolo de pesquisa seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, protocolo 23081.000480/2012-01. Quatro ovinos machos, adultos e castrados da raça Texel ($45 \pm 2,5$ kg PV) foram utilizados para mensurar o valor energético da dieta experimental unicamente. Por isso não estão incluídos tratamentos, esse ensaio teve por objetivo a caracterização da dieta a fim de complementar os resultados obtidos no ensaio de metabolismo visceral. Antes do início do ensaio de digestibilidade, os animais foram tratados com medicação antiparasitária e casqueamento corretivo. Os animais foram alojados em baias individuais, livres de condições estressantes.

O período experimental foi de 21 dias, sendo os 14 primeiros dias para a adaptação dos animais às instalações e à dieta, e os últimos 7 dias destinados a coleta de amostras.

A dieta ofertada foi composta por feno de Tifton (*Cynodon spp.*) e suplementação com concentrado proteico a base de farelo proteinado de milho, em quantidades restritas a 2,5% do peso vivo (PV) e 0,7% PV respectivamente. A quantidade diária de alimento a ser ofertado era dividida em três porções iguais e fornecida às 08:00, 12:00 e 17:00 horas. Sal mineral e água estiveram permanentemente disponíveis.

5.2.2 Coleta de amostras

Durante o período experimental o alimento ofertado foi pesado e amostrado diariamente entre o 14° e o 20° dia. As sobras do alimento ofertado foram coletadas do 15° ao 21° dia, assim como o total de fezes excretadas, de forma cumulativa, para a obtenção da produção total. Alimentos, sobras e fezes foram armazenados congelados a -20° C para posterior amostragem.

Após o término do período experimental, alimentos, sobras e fezes obtidos durante a coleta foram descongelados, pesados, homogeneizados e uma amostra representativa do total (10%) foi coletada para cada um dos animais. Essas amostras, posteriormente, foram secas a 55 °C durante pelo menos 72 h em estufa com ventilação forçada, e moídas (moinho tipo Willey, Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, EUA) em peneira com porosidade de 1 mm para as análises químicas. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da digestibilidade.

5.2.3 Análises químicas

A determinação do teor de matéria seca (MS) das amostras de alimento, sobras e fezes foi realizada por volatilização através de secagem em estufa à 110 °C durante pelo menos 8 h. O conteúdo de matéria mineral (MM) foi determinado por combustão da matéria orgânica em mufla à 600 °C durante 4 h. Assim, o teor de matéria orgânica (MO) foi calculado por diferença de massa (MS – MM). Também foi avaliado o conteúdo de nitrogênio total através do método Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997).

A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada com base nos procedimentos descritos por Mertens (2002) com uso de α -amilase termoestável. As determinações de fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas de acordo com o método 973.18 da AOAC (1997) exceto que as amostras de FDN e FDA foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade 16 μ m) e tratadas com detergente neutro e ácido, respectivamente, por 40 minutos em autoclave a 110°C conforme Senger et al., (2008).

Apenas para as amostras de alimentos foram analisadas as concentrações de extrato etéreo (EE) utilizando o aparelho Ankon XT15 (Nova York, EUA), tratando a amostra com éter de petróleo a 90°C por 60 minutos.

5.3 ENSAIO 2: METABOLISMO VISCERAL

5.3.1 Preparação dos animais e delineamento experimental

Foram utilizados quatro ovinos machos, adultos e castrados da raça Texel ($45 \pm 2,5$ kg PV), em um delineamento experimental Quadrado Latino 4×4 , com períodos experimentais de 1 dia, totalizando 4 períodos.

Os animais passaram por uma implantação cirúrgica de cateteres permanentes nos ramos da veia mesentérica, porta e hepática, assim como dissecação e elevação da artéria carótida para o subcutâneo, fixada através da musculatura. O procedimento cirúrgico obedeceu todas as exigências do Comitê de Ética, contemplando medicações anestésicas, analgésicas, anti-inflamatórios e antibióticos, contando com a participação de profissionais especializados em tais procedimentos. Após a intervenção cirúrgica, os animais passaram por um período de recuperação mínimo de quatro semanas, se prolongando de acordo com as necessidades, período no qual, foram monitorados através de um exame clínico específico da espécie, além da avaliação e controle da dor, lançando mão da análise de cortisol sanguíneo e hemogasometria. Ainda, receberam uma dieta de alta densidade energética e proteica, com livre acesso à água e sal mineral, a fim de obter uma melhor recuperação.

5.3.2 Condução do experimento

A dieta ofertada no ensaio de metabolismo visceral foi a mesma do ensaio de digestibilidade, compreendendo feno de tifton (2,5% PV) e concentrado a base de farelo de glúten de milho (0,7% PV), com água e sal mineral ofertados à vontade (Tabela 1). Após um período de adaptação de 14 dias a esta dieta, os animais foram submetidos, sequencialmente, e de acordo com o delineamento proposto aos seguintes tratamentos: cloreto de sódio 0,9%, bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0.25M (375 $\mu\text{mol}/\text{min}$), L-alanina hidrocloreídrica 0.25M (375 $\mu\text{mol}/\text{min}$) ou L-arginina hidrocloreídrica 0.125M (188 $\mu\text{mol}/\text{min}$).

A cada semana, um único animal passou pelos quatro diferentes tratamentos (períodos) durante quatro dias consecutivos. No 15º dia, foi implantado nos animais um catéter (22 gauges, 0,9 mm d.e. e 25 mm comprimento, Descarpac, SP, Brasil) na artéria carótida, acoplado a uma extensão com uma torneira de três vias, que permaneceu durante todos os períodos de coleta.

Tabela 1 – Composição química dos alimentos ofertados durante o ensaio de digestibilidade e de metabolismo visceral

Item ¹	Feno de Tifton	D.P. ²	Concentrado Proteico	D.P. ²
MS(%)	81,39	0,05	87,38	0,38
<i>Composição (% na MS)</i>				
MO	93,99	0,16	93,65	0,34
FDN	73,72	6,28	46,45	0,6
FDA	33,29	3,1	11,63	0,27
PB	7,50	0,07	24,84	0,46
EE	1,50	0,06	4,13	0,2

¹Avaliação da composição do alimento, onde MS=Matéria Seca, MO=Matéria Orgânica, FDN=Fibra em Detergente Neutro, FDA=Fibra em Detergente Ácido, PB= Proteína Bruta e EE= Extrato Etéreo. ²D.P.= Desvio Padrão.

5.3.3 Coleta de amostras

Para a obtenção dos valores de fluxo de sangue através dos TDVP e fígado dos animais, foi realizada a infusão na veia mesentérica de 15 mL (*primed*) de paraminohipurato (PAH), seguido de infusão contínua (1,5 mL/minuto) de uma solução de PAH a 1,5 % (p/v), pH 7,4, com auxílio de uma bomba de infusão. O PAH (Sigma-AldrichCo., St. Louis, MO, USA) foi preparado utilizando-se água deionizada de acordo com Huntington, Reynolds e Stroud,(1989), filtrado em filtros de celulose (papel filtro quantitativo, porosidade 7.5 micras, diâmetro12.5, Nalgon, Alemanha), o pH ajustado a 7,4 com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl), autoclavado a 110°C por 20 minutos e armazenado a 4 °C em frascos de vidro até as infusões. O PAH foi infundido nos animais a temperatura ambiente, utilizando-se equipos esterelizados (Cale Parmer), equipados com um filtro (0,45 µm) acoplado na extremidade do equipo.

Cinco horas após a alimentação da manhã (08:00), iniciou-se a infusão de PAH (*primed* + infusão contínua). Esta infusão permaneceu constante até o último horário de coleta. A primeira coleta foi realizada 40 minutos após o início da infusão. Foram no total sete horários de coletas com intervalo de 30 minutos entre elas, sendo realizadas amostragens de sangue portal, hepático e arterial, simultaneamente, utilizando seringas heparinizadas. Duas amostras de cada tipo de sangue foram coletadas, uma com o auxílio de seringa de 1 mL e outra com seringa de 8 mL. As amostras coletadas em seringas de 1 mL foram mantidas em suas respectivas seringas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas para análise gasométrica num prazo máximo de 2 horas. Dessa amostra de 8 mL, 6 mL foram transferidas

para tubos cônicos de centrífuga contendo fluoreto de sódio 35% (NaF), centrifugadas (Eppendorf, modelo 5416, Alemanha) a 2200 rotações por minuto durante 20 minutos, e o plasma coletado e armazenado a -20°C para posterior análise. Os 2 mL restantes foram armazenados na forma de sangue total para a análise de hemoglobina, além de ser utilizado para a confecção de capilares que foram processados em uma centrífuga específica para micro-hematócrito.

Durante os três primeiros horários de coleta de sangue, que correspondem aos primeiros 90 minutos de infusão, em todos os tratamentos/períodos foram infundidos: solução de PAH 1,5% a uma taxa de 1,5 mL/min concomitante ao cloreto de sódio 0,9% a uma taxa de 1,5mL/min (totalizando 3 mL/min), a fim de obter amostras controle. Nos quatro últimos horários de coleta, que correspondem ao período de 90 a 210 minutos de infusão, foram infundidos: solução de PAH 1,5% a uma taxa de 1,5 mL/min concomitante a um dos quatro tratamentos: cloreto de sódio 0,9%, NH_4HCO_3 (0.25M), L-alanina hidrocloreídrica (0.25M) ou L-arginina hidrocloreídrica (0.125M) uma taxa de 1,5mL/min (totalizando 3 mL/min). As soluções foram infundidas com auxílio de uma bomba de infusão (Cole Palmer Instrument, modelo 200-CE, EUA).

A patência dos catéteres durante as coletas de sangue foi mantida por *flushing* com solução fisiológica contendo 20 UI de heparina/mL (0,5 mL heparina em 125 mL de solução) e entre os períodos de coleta por *flushing* com solução fisiológica contendo 200 IU heparina, 0.01 ml penicilina/ampicilina e 0.01 mL de álcool benzílico/mL de solução (HUNTINGTON; REYNOLDS e STROUD, 1989). Assim, a cada 125 mL de solução fisiológica foram adicionados 1,25 mL de álcool benzílico P.A. (Synth, Diadema, SP, Brasil), 5 mL de heparina contendo 25000 UI, totalizando 200 UI para cada mL, e benzilpenicilina potássica 5000000 UI contabilizando 40000 UI para cada 1 mL ou 1 grama de ampicilina sódica totalizando 8 mg para cada 1 mL.

5.3.4 Análises Químicas

A análise gasométrica das amostras de sangue foi realizada em equipamento automático (AVL 990 Busy, Austria) do qual foram obtidos os valores de saturação de O_2 , pO_2 (pressão parcial de oxigênio), pCO_2 (pressão parcial de gás carbônico), pH.

O volume de células vermelhas das amostras de sangue total foi determinado com uso de tubos capilares em microcentrífuga (Centimicro Quimis, Mod. Q 222H/HM, São Paulo, Brasil).

Imediatamente após a coleta, as amostras foram tratadas a determinação de PAH. O método escolhido foi o sulfonato-naftileno. Através dos valores obtidos nessa análise, foi possível calcular o fluxo de sangue nos animais. As amostras de plasma foram tratadas inicialmente com ácido tricloroacético 5% (TCA), sendo uma alíquota de 1000 µL de plasma desproteïnizada com 9000 µL de ácido tricloroacético 5%. Após a precipitação da amostra, a mesma passou por uma filtração rápida (papel filtro quantitativo, porosidade 7.5 micras, diâmetro 12.5, Nalgon, Alemanha). Depois de filtrada, a amostra permaneceu por duas horas em banho-maria a 90°C, e posteriormente foi analisada para a concentração de PAH utilizando método colorimétrico descrito por Huntington et al., (1982) com algumas modificações.

A hemoglobina sanguínea foi determinada colorimetricamente após conversão para cianometahemoglobina em amostras de sangue total, contando com a utilização de kits comerciais (Bioclin K023, MG, Brasil). As concentrações plasmáticas de glicose (Bioclin K082, MG, Brasil) e ureia (Bioclin K047, MG, Brasil) também foram determinadas através de Kits comerciais, sendo os dois testes enzimático-colorimétricos. A concentração plasmática de amônia foi analisada pelo método fenol-hipoclorito conforme descreve Weatherburn (1967).

5.3.5 Método de utilização das análises químicas

A partir das análises colorimétricas de metabólicos foram estabelecidas quatro maneiras de utilização dos resultados obtidos em relação à análise estatística. Essas alternativas foram classificadas em método A, B, C e D. As análises colorimétricas foram realizadas no plasma, utilizando reagente e comprimento de onda específicos.

No método A, as amostras obtidas em cada horário de coleta foram analisadas em triplicata, e foram utilizados para os cálculos da média de cada horário apenas os dois valores que tiveram o menor Coeficiente de Variação. Para o método B, a análise química foi realizada em triplicata, e os três valores obtidos foram utilizados para os cálculos.

Para os métodos C e D, duas amostras compostas por animal e por período, foram obtidas, sendo uma representativa do tratamento controle, que corresponde aos primeiros três horários de coleta, e outra representativa de um dos tratamentos, que corresponde aos 4 últimos horários de coleta. Assim, no método C, as amostras foram analisadas em triplicatas, e os valores de absorbância obtidos foram ajustados de acordo com o peso de amostra

pipetado em cada tubo de ensaio. Para o método D, a análise foi realizada em triplicata, entretanto os valores obtidos de absorvância não foram ajustados de acordo com o peso.

5.4 CÁLCULOS

O estudo da produção ou utilização de um metabólito em um órgão específico requer conhecimento da taxa de entrada e saída do metabólito no órgão. Assim, o fluxo de sangue juntamente com a diferença na concentração do metabólito em um determinado órgão origina esta informação.

O fluxo de sangue (FS) através dos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) foi calculado de acordo com Katz e Bergman (1969) como:

$$FS \text{ (L/h)} = IRPAH / (VPAH - APAH)$$

onde, IRPAH é a taxa de infusão do PAH (mg/h), VPAH e APAH são a concentração de PAH (mg/L) nos sangues venosos (portal ou hepático) e arterial, respectivamente.

A concentração de O₂ (mL/L) foi calculada de acordo com Huntington e Tyrrell (1985) utilizando a seguinte equação e representa a soma da ligação Hemoglobina-O₂ e a quantidade de O₂ dissolvido:

$$O_2 \text{ (mL/L)}: [(\% O_2/100) \times 1,34 \times Hgb + (0,023 \times (pO_2/760 \text{ mmHg})) \times 1000]$$

onde, % O₂ é a percentagem de saturação de O₂, 1,34 é a capacidade máxima de transporte de O₂ pela hemoglobina (mL O₂/g hemoglobina), Hgb é a concentração de hemoglobina no sangue (g/L), 0,023 é o teor de O₂ dissolvido no sangue (mL/mL sangue) e pO₂ é a pressão de O₂ (mmHg).

A utilização de O₂ pelos TDVP e TV foi calculada multiplicando-se o FS portal ou hepático pela respectiva diferença venosa-arterial da concentração de O₂. A utilização de O₂ pelo fígado foi calculada como a diferença entre a quantidade utilizada pelo sistema visceral total (TV) menos a quantidade utilizada pelos TDVP.

O fluxo portal ou visceral líquido dos metabólitos foi estimado como a diferença entre a concentração portal ou hepática menos a concentração arterial do nutriente, multiplicado pelo fluxo de sangue portal ou hepático, respectivamente. Considerando o metabolismo visceral total o resultado da soma do metabolismo portal e hepático, então o metabolismo hepático (uso de oxigênio, produção de ureia e produção de glicose) foi calculado como a diferença entre o fluxo visceral menos o fluxo portal líquido dos metabólitos.

A produção de calor (H, kcal/dia) pelos TDVP e TV foi calculada assumindo um equivalente de calor de 4,89 kcal/L de O₂, conforme descrito por McLean, (1972):

$$H = O_2 \text{ (L/h)} \times 4,89 \times 24$$

Os valores proporcionais foram obtidos ao dividir o valor de metabólitos (PAH, glicose, ureia, amônia e oxigênio) pós infusão pelo valor imediatamente anterior a infusão.

5.5 MODELO MATEMÁTICO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi calculada a média de todas as variáveis nas duas primeiras horas de infusão e nas duas horas finais de infusão e a diferença das medias dentro do mesmo período (0-90 minutos ou 90-210 minutos) entre os diferentes tratamentos. A variância dos dados foi analisada pelo PROC MIXED, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijkl}$$

onde: A , P , T representa os efeitos dos animais, períodos e tratamento (infusão de compostos nitrogenados no Ensaio 2), μ a média das observações e e_{ijkl} o erro residual.

Através dos valores de Erro Padrão da Média (EPM) obtidos na análise de variância dos dados, foi possível comparar as quatro diferentes metodologias, sendo os valores de EPM comparadas pelo teste de Tukey. Significância foi atribuída quando $P \leq 0,10$. Assim, a metodologia que obteve os menores valores de EPM foi eleita como a mais adequada e foi apresentada.

6 RESULTADOS

6.1 ANIMAIS

Condições de saúde e bem-estar foram rigorosamente atendidas, viabilizando finalizar o experimento com os animais livres de enfermidades e com todos os catéteres patentes. Apesar do intenso cronograma de coleta de sangue, um rígido controle do hematócrito sanguíneo foi instaurado, a fim de mantê-lo em níveis compatíveis com a saúde dos animais. Ao observar valores de hematócrito abaixo de 18%, a medida adotada seria a suspensão das coletas de sangue. No entanto, em apenas um caso essa medida foi necessária.

6.2 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE

A dieta ofertada para os animais foi calculada com o auxílio do software Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) específico para ovinos, de forma a contemplar as exigências de manutenção dos animais. O consumo dos animais manteve-se em torno de 1,6% do peso vivo (PV).

Os resultados médios de consumo de matéria orgânica (CMO), digestibilidade da matéria orgânica (DMO), excreção fecal de matéria orgânica (EFMO), assim como, consumo de fibra em detergente neutro (CFDN), digestibilidade da fibra em detergente neutro (DFDN), excreção fecal de fibra em detergente neutro (EFDN) e consumo de nitrogênio (CN), digestibilidade do nitrogênio (DN) e excreção de nitrogênio fecal (EFN) são apresentados (tabela 2) a seguir.

Tabela 2 – Consumo, digestibilidade e excreção fecal da matéria orgânica (CMO, DMO, EFMO), fibra em detergente neutro (CFDN, DFDN, EFFDN) e nitrogênio (CN, DN, EFN) em ovinos alimentados com feno de tifton e refinazil

Item ¹	Medidas de dispersão		
	Média	Desvio Padrão ²	Coef. Variação ³
CMO (g/Kg PV)	16,86	2,30	13,66
DMO (%)	65	3	4,61
EFMO (g/Kg PV)	5,48	0,61	11,11
CFDN (g/Kg PV)	10,64	1,67	15,65
DFDN (%)	65	4	5,75
EFFDN(g/Kg PV)	3,69	0,48	12,91
CN (g/Kg PV)	0,39	0,04	11,37
DN (%)	74	2	2,65
EFN(g/Kg PV)	0,10	0,01	9,17
CMOD (g/Kg PV)	10,35	1,71	16,56
Consumo ED Kcal/dia	1929,25	281,86	14,61

¹Consumo, digestibilidade e excreção fecal dos componentes da dieta, onde CMO= consumo de matéria orgânica, DMO= digestibilidade da matéria orgânica, EFMO = excreção fecal da matéria orgânica, CFDN= consumo de fibra solúvel em detergente neutro, DFDN= digestibilidade da fibra solúvel em detergente neutro, EFFDN= excreção fecal de fibra solúvel em detergente neutro, CN= consumo de nitrogênio, DN= digestibilidade do nitrogênio, EFN= excreção fecal de nitrogênio em gramas (g)/ Kg (quilograma) de peso vivo (PV). ²D.P.= Desvio Padrão demonstrando dispersão em relação a média. ³C.V.= coeficiente de variação.

6.3 ERRO PADRÃO DA MÉDIA COMO CRITÉRIO DE ESCOLHA

Como já foi citado anteriormente, foram considerados quatro diferentes métodos analíticos para avaliação estatística dos dados. O critério de escolha adotado foi baseado em qual dos métodos analíticos que daria origem aos menores valores de erro padrão da média (EPM). Sendo assim, determinou-se o método A como fonte dos dados obtidos no estudo.

Tabela 3 – Variabilidade (i.e. erro padrão da média (EPM)) das medidas de concentração plasmática e de fluxo visceral de metabólitos em ovinos em função do método analítico¹

Variável	Método Analítico				P*
	A	B	C	D	
<i>Concentração sanguínea (mg/L)</i>					
PAH	5,45 ^b	5,44 ^b	6,59 ^a	6,52 ^a	0,0001*
Amônia	0,43	0,43	0,36	0,27	0,314
Ureia	16,37	16,37	15,23	15,14	0,963
Glicose	56,52 ^a	56,48 ^a	32,99 ^b	31,57 ^b	0,0001*
<i>Fluxo Portal (mg/L)</i>					
Oxigênio	432,23	495,75	363,13	432,23	0,302
Amônia	60,13 ^a	63,15 ^a	62,48 ^a	67,60 ^a	0,745
Ureia	57,90 ^a	62,15 ^a	76,38 ^a	170,85 ^b	0,051*
Glicose	388,80	651,00	431,80	735,40	0,105
<i>Fluxo Hepático (mg/L)</i>					
Oxigênio	289,18 ^b	444,68 ^a	435,23 ^a	289,18 ^b	0,003*
Amônia	60,98	63,20	63,33	70,65	0,665
Ureia	77,95 ^b	83,73 ^b	119,55 ^{ab}	153,08 ^a	0,003*
Glicose	634,90	735,10	699,50	1005,70	0,218
<i>Fluxo Visceral (mg/L)</i>					
Oxigênio	604,10	781,00	684,70	604,10	0,208
Amônia	5,48 ^b	5,82 ^b	30,83 ^a	30,98 ^a	0,0001*
Ureia	54,20 ^b	60,40 ^{ab}	84,90 ^a	130,60 ^a	0,008*
Glicose	405,50	745,50	666,40	859,60	0,265

*Probabilidade de diferença. ¹Métodos Analíticos: A: Amostras de plasma obtidas com intervalo de 30 minutos, analisadas em triplicata, porém utilizadas para o cálculo de valor médio apenas as duas que tiveram o menor CV entre si. B: Amostras de plasma obtidas com intervalo de 30 minutos, analisadas em triplicata, sendo todos resultados utilizados para o cálculo do valor médio. C: Amostras de plasma obtidas com intervalo de 30 minutos, formando duas amostras compostas, uma do intervalo 0-90 minutos e outra do intervalo de 90-210, analisadas em triplicata, sendo o valor de absorbância corrigido de acordo com o peso. D: Amostras de plasma obtidas com intervalo de 30 minutos, formando duas amostras compostas, uma do intervalo 0-90 minutos e outra do intervalo de 90-210, analisadas em triplicata, sendo o valor de absorbância não corrigido de acordo com o peso. Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (10 %).

A concentração de glicose plasmática (Tabela 3) apresentou menor valor de EPM quando originada pelas metodologias C e D, em comparação a A e B. Os valores de EPM encontrados para PAH, entretanto, foram menores ($P=0,0001$) para os métodos A e B do que para C e D.

Os fluxos portal, hepático e visceral dos metabólitos amônia, ureia e oxigênio apresentaram menores valores de EPM nos métodos A e B, sendo que o método A prevaleceu em relação ao B. O fluxo portal de glicose apresentou tendência ($P<0,20$) de valores de EPM menor no método analítico A que os outros métodos analíticos. O fluxo portal de ureia foi menores ($P<0,10$) para o método analítico A. O valor de EPM referente ao fluxo hepático de oxigênio foi menor ($P=0,03$) nos métodos analíticos A e D do que em B e C.

Os valores de EPM relativos aos fluxos visceral de amônia e de ureia foram menores ($P<0,10$) nos métodos analíticos A e B em analogia aos demais.

6.4 CONCENTRAÇÃO E FLUXO DOS METABÓLITOS

A concentração plasmática de PAH arterial, portal e hepática (Tabela 4) não apresentou diferenças entre os tratamentos, visto que a infusão de PAH foi contínua e semelhante em todos os tratamentos.

O fluxo de plasma visceral, assim como o fluxo de sangue visceral, apresentou diferença ($P>0,10$) entre os tratamentos nos primeiros 90 minutos de infusão. O tratamento controle apresentou menores valores de fluxo em relação aos demais, provavelmente por questões relacionadas à solução infundida.

Tabela 4 – Concentração de ácido paramino-hipúrico (PAH), fluxo de plasma (FP) e fluxo de sangue (FS) pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com diferentes tratamentos.

Item	Tempo (min.) ²	Tratamentos				EPM	P*
		NaCl	Bic.Amônio	Alanina	Arginina		
<i>PAH mg/L</i>							
PAH Arterial	0-90	36,5	40,5	43,3	40,3	5,48	0,5389
	90-210	41,3	43,5	43,5	41,3	5,48	0,7234
Proporção		1,145	1,08	1,015	1,02	0,06	0,4397
PAH Hepático	0-90	51,00	51,50	54,80	49,50	5,46	0,6478
	90-210	53,50	55,30	55,50	52,30	5,46	0,4983
Proporção		1,06	1,08	1,03	1,05	0,03	0,7272
PAH Portal	0-90	51,50	54,00	55,80	51,80	5,52	0,7101
	90-210	56,00	58,50	57,30	54,50	5,46	0,4983
Proporção		1,09	1,09	1,04	1,05	0,04	0,6392
<i>Fluxo Plasma L/h</i>							
FPP	0-90	97,80	108,30	117,30	121,00	15,73	0,1263
	90-210	93,50	92,00	104,30	105,30	9,32	0,4817
Proporção		1,01	0,89	0,93	0,88	0,11	0,5641
FPV	0-90	104,50 ^a	134,30 ^b	127,50 ^b	142,00 ^b	16,99	0,0826
	90-210	111,30	117,80	120,30	121,80	10,68	0,8185
Proporção		1,16	0,93	0,97	0,86	0,14	0,3029
<i>Fluxo Sangue L/h</i>							
FSP	0-90	122,50	136,00	146,00	151,00	19,82	0,1446
	90-210	115,00	114,80	130,30	130,20	11,32	0,4091
Proporção		0,98	0,89	0,93	0,88	0,11	0,7069
FSV	0-90	131,00 ^a	168,30 ^b	158,80 ^b	177,30 ^b	20,89	0,0897
	90-210	137,00	146,30	150,00	150,80	12,64	0,7854
Proporção		1,13	0,93	0,98	0,86	0,13	0,3595

*Probabilidade. ²Solução salina (controle) foi utilizada durante os primeiros 90 minutos em todos os tratamentos.

³Erro padrão da média, n=4 por tratamento. Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (10 %).

Tabela 5 – Concentração sanguínea e captação de oxigênio pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 $\mu\text{mol N/min}$ de diferentes compostos nitrogenados.

Item	Tempo (min.) ²	Tratamentos				EPM ³	P*
		NaCl	Bic.Amônio	Alanina	Arginina		
<i>Concentração Oxigênio (mg/L)</i>							
Oxigênio Arterial	0-90	105,80	104,30	104,00	111,50	7,99	0,8065
	90-210	106,30	103,00	103,30	110,50	7,90	0,8056
Proporção		1,00	0,99	0,99	0,99	0,00	0,1112
Oxigênio Hepático	0-90	72,00	78,30	70,50	73,50	7,56	0,7654
	90-210	71,50	67,80	66,00	69,80	7,49	0,8792
Proporção		1,00	0,86	0,95	0,95	0,03	0,1169
Oxigênio Portal	0-90	82,3	84,5	81	88,5	7,47	0,7931
	90-210	81,5	80,8	79,3	82,8	7,10	0,9626
Proporção		0,99	0,96	0,97	0,94	0,02	0,4333
<i>Fluxo Oxigênio (mL/h)</i>							
TDVP	0-90	-2892,00	-2704,30	-3294,80	-3515,00	532,48	0,2687
	90-210	-2860,30	-2536,80	-3114,00	-3586,00	313,86	0,1126
Proporção		1,06	1,02	1,00	1,06	0,12	0,9363
TV	0-90	-4446,50 ^a	-4369,80 ^a	-5267,00 ^{ab}	-6709,50 ^b	738,48	0,0711
	90-210	-4767,50	-5173,50	-5577,50	-6126,30	429,83	0,1865
Proporção		1,19	1,29	1,07	0,93	0,17	0,3949
Fígado	0-90	-1554,80 ^a	-1665,00 ^a	-1972,30 ^{ab}	-3194,80 ^b	342,62	0,0477
	90-210	-1906,80	-2637,30	-2463,30	-2540,00	225,78	0,1990
Proporção		1,47	1,71	1,21	0,85	0,29	0,2000

*Probabilidade de diferença entre os tratamentos empregados no estudo. ²Solução salina (controle) foi utilizada durante os primeiros 90 minutos em todos os tratamentos. ³Erro padrão da média, n=4 por tratamento. Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (10 %).

A concentração sanguínea de O₂ arterial, hepática e portal não foi diferente ($P>0,10$) entre os tratamentos aplicados nesse estudo (Tabela 5) nos dois intervalos de tempo.

A captação de O₂ pelos TDVP tendeu ($P<0,20$) em ser diferente entre os tratamentos, sendo maior quando o composto arginina foi infundido, no intervalo de tempo de 90-210 minutos.

A captação de O_2 pelos tecidos viscerais foi significativamente superior ($P < 0,10$) para o tratamento arginina em relação ao tratamento controle e bicarbonato de amônio no intervalo de tempo de 0-90 minutos de infusão (período controle), ou seja, antes de iniciar a infusão dos compostos nitrogenados em estudo. No intervalo de tempo de 90-210 minutos é possível observar numericamente uma maior captação de O_2 para o tratamento arginina.

Do mesmo modo, a captação hepática de O_2 foi superior ($P < 0,10$) para o tratamento arginina em relação ao tratamento controle e bicarbonato de amônio no intervalo de tempo de 0-90 minutos de infusão, que corresponde ao período controle. Entretanto, no intervalo de tempo 90-210 minutos a captação hepática de O_2 tendeu ($P < 0,20$) a ser maior no tratamento bicarbonato de amônio, comportamento semelhante ao observado quando transformado em valor proporcional.

A concentração plasmática arterial, hepática e portal de N-ureia (Tabela 6) quando transformada em valores proporcionais foi significativamente maior ($P < 0,10$) para o tratamento bicarbonato de amônio em relação aos demais.

O fluxo de N-ureia em valores proporcionais nos TDVP apresentou tendência ($P < 0,20$) em ser maior no tratamento bicarbonato de amônio.

O fluxo de N-ureia nos tecidos viscerais foi significativamente maior ($P < 0,10$) quando realizada a infusão de bicarbonato de amônio no intervalo de 90-210 minutos. Nesse mesmo intervalo de tempo, o fluxo hepático de N-ureia tendeu em ser maior ($P = 0,1038$) no tratamento bicarbonato de amônio em relação ao controle e arginina.

Tabela 6 – Concentração sanguínea e fluxo de N-ureia pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 $\mu\text{mol N/min}$ de diferentes compostos nitrogenados.

Item	Tempo (min.) ²	Tratamentos				EPM	P
		NaCl	Bic.Amônio	Alanina	Arginina		
<i>Concentração de Ureia mg/L</i>							
Ureia Arterial	0-90	136,50	140,30	147,30	125,30	17,85	0,6617
	90-210	130,80	145,50	138,50	123,00	18,01	0,5227
Proporção		0,96 ^a	1,05 ^b	0,93 ^a	0,99 ^a	0,02	0,0306
Ureia Hepática	0-90	137,80	142,00	150,00	127,00	17,92	0,6373
	90-210	132,50	148,80	140,80	125,30	18,31	0,4954
Proporção		0,96 ^a	1,06 ^b	0,93 ^a	0,99 ^a	0,02	0,0244
Ureia Portal	0-90	133,50	138,30	145,00	122,50	17,68	0,6413
	90-210	128,00	141,50	135,30	120,80	17,71	0,5684
Proporção		0,96 ^a	1,04 ^b	0,93 ^a	0,98 ^a	0,02	0,0659
<i>Fluxo N-ureia mg/h</i>							
TDVP	0-90	-285,30	-180,50	-270,00	-302,80	66,19	0,5134
	90-210	-263,50	-342,00	-330,00	-274,50	51,36	0,6177
Proporção		1,07	3,56	1,17	1,14	0,88	0,1878
TV	0-90	145,80	257,50	315,30	235,50	54,94	0,1765
	90-210	186,00 ^a	409,80 ^b	272,30 ^a	244,30 ^a	59,22	0,0557
Proporção		1,48	2,21	0,92	2,43	1,02	0,6030
Fígado	0-90	431,00	437,50	585,50	538,30	69,39	0,3056
	90-210	449,80 ^a	752,00 ^b	602,00 ^{ab}	518,80 ^a	89,15	0,1038
Proporção		1,15	1,70	1,01	1,10	0,23	0,2047

*Probabilidade de diferença entre os tratamentos empregados no estudo.²Solução salina (controle) foi utilizada durante os primeiros 90 minutos em todos os tratamentos. ³Erro padrão da média, n=4 por tratamento. Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (10 %).

Tabela 7 – Concentração sanguínea e fluxo de N-amônia pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 $\mu\text{mol N/min}$ de diferentes compostos nitrogenados.

Item	Tempo (min.) ²	Tratamentos				EPM	P
		NaCl	Bic.Amônio	Alanina	Arginina		
<i>Concentração N-amônia mg/L</i>							
N-amônia Arterial	0-90	1,00	0,50	0,75	0,25	0,37	0,5014
	90-210	0,50	0,75	0,50	0,50	0,40	0,9590
Proporção		0,56	1,12	0,73	0,44	0,25	0,3417
N-amônia Hepática	0-90	1,00	0,75	0,75	0,25	0,30	0,3337
	90-210	0,50	1,00	0,50	0,50	0,32	0,6382
Proporção		0,55 ^a	1,38 ^b	0,66 ^a	0,42 ^a	0,24	0,0932
N-amônia Portal	0-90	4,25	4,25	3,75	3,75	0,75	0,8247
	90-210	4,25 ^a	7,50 ^b	4,00 ^a	4,00 ^a	0,70	0,0074
Proporção		0,88 ^a	1,85 ^b	1,08 ^a	1,08 ^a	0,08	0,0004
<i>Fluxo N-amônia L/h</i>							
TDVP	0-90	335,30	353,30	352,00	364,30	55,97	0,9445
	90-210	305,75 ^a	605,25 ^b	350,50 ^a	348,25 ^a	64,52	0,0089
Proporção		0,92 ^a	1,75 ^b	0,99 ^a	0,96 ^a	0,13	0,0028
TV	0-90	2,80	0,00	-4,30	-1,00	6,60	0,8658
	90-210	2,30	10,50	-6,00	-3,00	4,44	0,1402
Proporção		0,16	5,45	1,91	0,25	2,36	0,3402
Fígado	0-90	-332,80	-353,50	-356,30	-365,30	57,41	0,9051
	90-210	-303,80 ^a	-594,80 ^b	-356,80 ^a	-351,30 ^a	64,84	0,0132
Proporção		0,93 ^a	1,71 ^b	1,00 ^a	0,97 ^a	0,13	0,0033

*Probabilidade. ²Solução salina (controle) foi utilizada durante os primeiros 90 minutos em todos os tratamentos.

³Erro padrão da média, n=4 por tratamento. Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (10 %).

A concentração de N-amônia hepática e portal (Tabela 7), quando em valores proporcionais, foi maior ($P < 0,10$) no tratamento bicarbonato de amônio. A concentração de N-amônia portal no intervalo de tempo 90-210 minutos de infusão também foi maior ($P < 0,10$) no tratamento bicarbonato de amônio em relação aos outros tratamentos.

O fluxo de N-amônia nos TDVP, tecidos viscerais e no fígado foi maior ($P < 0,10$) no intervalo de infusão de 90-210 minutos para o tratamento bicarbonato de amônio.

Quando em valores proporcionais, o fluxo de N-amônia nos tecidos drenados pela veia porta e no fígado foi superior aos demais ($P < 0,10$) no tratamento bicarbonato de amônio.

Tabela 8 – Concentração sanguínea e fluxo de glicose pelos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) em ovinos infundidos com solução salina ou com 375 µmol N/min de diferentes compostos nitrogenados.

Item	Tempo (min.) ¹	Tratamentos				EPM	P*
		NaCl	Bic.Amônio	Alanina	Arginina		
<i>Concentração de Glicose mg/L</i>							
Glicose Arterial	0-90	613,50	607,50	603,00	578,50	57,30	0,7104
	90-210	624,30	618,00	613,50	624,50	63,06	0,9915
Proporção		1,01	1,02	1,02	1,08	0,02	0,1959
Glicose Hepática	0-90	631,80	623,00	615,30	595,00	57,92	0,6810
	90-210	646,80	645,30	640,80	647,30	66,27	0,9987
Proporção		1,02	1,03	1,05	1,09	0,02	0,2561
Glicose Portal	0-90	600,30	587,50	589,00	565,80	53,88	0,7427
	90-210	609,00	601,00	591,00	609,00	59,90	0,9630
Proporção		1,01	1,02	1,01	1,08	0,02	0,2276
<i>Fluxo de Glicose mg/h</i>							
TDVP	0-90	-1072,30	-1979,00	-1579,50	-1459,30	466,30	0,5780
	90-210	-1358,30 ^a	-1510,30 ^a	-2401,50 ^b	-1612,30 ^a	358,96	0,1020
Proporção		1,35	1,12	1,84	1,18	0,40	0,6059
TV	0-90	1744,50	2240,80	1462,80	2339,50	421,34	0,4097
	90-210	2467,30	3137,50	3101,30	2694,30	498,56	0,5181
Proporção		1,57	2,39	2,20	1,19	0,78	0,6314
Fígado	0-90	2816,80	4219,80	3042,00	3799,00	499,01	0,2104
	90-210	3825,50	4647,80	5502,50	4306,30	787,02	0,2326
Proporção		1,42	1,37	1,98	1,13	0,41	0,4350

*Probabilidade. ¹Solução salina (controle) foi utilizada durante os primeiros 90 minutos em todos os tratamentos.

³Erro padrão da média, n=4 por tratamento. Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (10 %).

Tanto a concentração quanto o fluxo de glicose (Tabela 8) não foram estatisticamente alterados pelos tratamentos utilizados neste estudo. Porém, ao infundir alanina no intervalo de tempo de 90-210 minutos, foi observada uma tendência ($P < 0,20$) de aumento no fluxo de glicose pelos tecidos drenados pela veia porta.

Tabela 9 – Produção de calor (oxigênio consumido na forma de energia) dos tecidos viscerais (PCV), tecidos hepáticos (PCH) e tecidos drenados pela veia porta (PCP) antes e após a infusão de diferentes compostos nitrogenados

Item ¹	Tempo (min.) ²	Tratamentos			
		NaCl	Bic.Amônio	Alanina	Arginina
<i>Produção de Calor Kcal/dia</i>					
PCV	0-90	593,9	478,5	757,9	764,6
	90-210	526,7	569,8	651,6	702,8
PCH	0-90	222,7	164,3	316,2	375,1
	90-210	205,4	258,9	278,9	272,6
PCP	0-90	371,21	314,19	441,64	404,26
	90-210	321,35	310,92	372,73	408,64

¹PCV = produção calor dos tecidos viscerais; PCH= produção de calor hepática; PCP= produção de calor dos tecidos drenados pela veia porta; ²0-90 minutos: corresponde ao período anterior a infusão dos tratamentos, 90-210 minutos: corresponde ao período de infusão de um dos quatro tratamentos.

O tratamento Bicarbonato de Amônio (Tabela 9) foi o único dentre os demais tratamentos que apresentou claro aumento da produção de calor, mostrando que uma maior quantidade de energia foi necessário para a metabolização desse composto quando infundido.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo identificar o efeito da infusão de diferentes compostos nitrogenados sobre o gasto de O_2 relacionado à ureagênese e a neoglicogênese, dois processos metabólicos vitais e inter-relacionados, que juntamente ao ciclo de Krebs, compartilham metabólitos comuns.

O fluxo de glicose pelos TDVP foi negativo indicando que a produção de glicose não atendeu a demanda desses tecidos, logo o fluxo de glicose no fígado e tecidos viscerais foi positivo em todos os tratamentos. Diferente do esperado, a infusão do composto nitrogenado alanina não promoveu aumento significativo no gasto de O_2 pelos tecidos viscerais e fígado. Um maior custo de O_2 supostamente estaria relacionado às reações metabólicas de síntese de glicose e ureia que demandam um incremento no uso de ATP, considerando que este composto é potencialmente hábil em produzir este efeito.

Ao infundir NH_4HCO_3 0,25 M totalizando 375 $\mu\text{mol/ min}$ esperava-se efeitos claros de aumento de gasto de O_2 hepático e visceral, porém obteve-se apenas tendência de aumento de custo energético de metabolização pelo fígado. De acordo com um estudo desenvolvido por Milano, Hotston-Moore e Lobleby (2000), ao infundir NH_4HCO_3 1,2 M totalizando 400 $\mu\text{mol/ min}$, também não foi observado um aumento significativo no consumo de O_2 pelo fígado e TDVP, e sim apenas uma tendência de aumento no consumo devido à síntese de ureia adicional.

A infusão mesentérica de arginina não proporcionou aumento de captação de O_2 pelos TDVP e tecidos viscerais, nem produção adicional de ureia, apesar de sua composição molecular ser rica em N.

Os principais componentes do gasto de energia no trato gastrointestinal são a Na^+ , K^+ - ATPase (30 a 60%) e a síntese proteica (25%) e, no fígado, os ciclos de substratos que envolvem fosforilação e desfosforilação, Na, K-ATPase, síntese proteica, síntese de ureia e neoglicogênese (KOZLOSKI, 2011).

Ao infundir 340 $\mu\text{mol/ min}$ de $NH_4^+HCO_3^-$ por três horas durante 7 dias consecutivos na veia mesentérica, Recavarren et al. (2004) observaram efeitos claros de aumento do consumo de O_2 nos TDVP, fígado e tecidos viscerais. Em um estudo semelhante a este, os autores obtiveram resultados parecidos ao utilizar o mesmo protocolo de infusão, como: aumento na remoção hepática de NH_4^+ e produção de N-ureia, sem nenhum efeito na produção de glicose hepática. Entretanto, quando avaliado o consumo de O_2 , os resultados foram adversos, sendo que no segundo estudo não foi observado nenhum efeito sobre o

consumo de O_2 e isso foi atribuído ao fato de que devido à infusão crônica de amônia na veia mesentérica, a observação da mudança significativa no consumo de O_2 fica comprometida (RECAVARREN e MILANO, 2013).

De acordo com dados de Lobley et al. (1996) de 2,5 a 5% do O_2 consumido por todo o organismo (energia perdida na forma de calor) pode ser atribuído a ureagênese no fígado, quando se considera uma alta estimativa de 4 mol de ATP utilizado para cada 1 mol de ureia produzida (porém esse custo pode ser de apenas 1 mol de ATP por mol de ureia produzida), dado compatível ao observado nesse estudo. Ao comparar valores de produção de calor (energia perdida na forma de calor), representando consumo de O_2 , obteve-se um aumento de 5,13% após o início da infusão de bicarbonato de amônio em relação ao período prévio à sua infusão.

Com a infusão mesentérica de arginina nesse estudo, esperava-se um aumento na neoglicogênese hepática, assim como uma maior produção de ureia pelo fígado, entretanto nenhuma das variáveis foi alterada pela infusão deste composto. De acordo com Wolff e Bergman (1972), a contribuição dos aminoácidos neoglicogênicos como substrato pode variar de 12 a 30% na neoglicogênese. Além disso, a arginina é composta por quatro moléculas de N, resultando em um substancial fornecimento de N quando infundida nos animais.

Diferente dos resultados obtidos nesse estudo, Maltby et al. (2005) observaram um aumento de produção hepática de ureia quando infundiram arginina a uma taxa de 0,47 mL/min de L-arginina 0,53M em bovinos. Porém, semelhante ao presente estudo, não foi possível observar aumento no fluxo de amônia pelos tecidos drenados pela veia porta com a infusão de arginina, o que sugere maior ureagênese hepática não devido ao acréscimo no fluxo de amônia, mas sim através de outras fontes de grupamento N, podendo estar associado a alterações na síntese e degradação de proteínas no fígado ou metabolismo de proteínas de exportação por exemplo.

A arginina é o ativador mitocondrial da enzima N-acetil-glutamato-sintetase oriunda da união do acetil-CoA mais o glutamato, e cabe a essa enzima a ativação da carbamil-P-sintetase I que é responsável pela incorporação do grupamento amônia na Carbamil-P que imediatamente ingressa no Ciclo da Ureia. Para a síntese da Carbamoil-P requer-se a presença da amônia, do bicarbonato e de ATP. Levando em conta que a infusão de arginina não promoveu aumento da captação de amônia pelos tecidos drenados pela veia porta, sugere-se que seja a deficiência de amônia o limitante para o processo de síntese de Carbamoil-P. Assim, em situações em que se tem infusão de arginina mesentérica, o papel da amônia mitocondrial passa a ter uma particular importância, já que nessas situações se tem um

aumentado fluxo de Carbamil-P-sintetase, e a ausência de amônia acaba por limitar a síntese de ureia (NELSON e COX, 2008; MALTBY et al., 2005).

Com a infusão de alanina mesentérica, esperava-se obter acréscimo da concentração e do fluxo de glicose visceral, assim como promover maior ureagênese. O fluxo de glicose nos TDVP aumentou significativamente, assim como o fluxo hepático de ureia. Apesar de não ser observada diferença significativa, numericamente é possível visualizar uma maior produção de glicose no fígado e fluxo nos tecidos viscerais quando infundido alanina em relação aos demais tratamentos. Em um estudo desenvolvido por Reynolds et al., (1994) com bovinos, a infusão mesentérica de L-alanina a fim de mimetizar o aumento de sua absorção, não alterou a produção de glicose hepática e captação de propionato. Porém, a remoção de outros precursores neoglicolíticos como L- lactato foi reduzida e ocorreu um aumento na ureagênese hepática.

O propionato fornece a maior parte dos carbonos requeridos para a neoglicogênese hepática, mas quantidades fornecidas por aminoácidos, como a alanina podem variar de acordo com a demanda metabólica. Dentre os aminoácidos considerados neoglicogênicos, a alanina tem maior contribuição de carbonos para a neoglicogênese hepática, sendo o único aminoácido considerado importante quantitativamente como precursor neoglicogênico (WOLFF e BERGMAN, 1972; LARSEN e KRISTENSEN, 2009).

A neoglicogênese tem um custo energético bastante variável, que está relacionado com o ponto de entrada do substrato na rota neoglicolítica. Após serem degradados os aminoácidos dão origem a diferentes intermediários do ciclo de Krebs que ao ingressarem na rota neoglicolítico passam por diferentes reações e proporcionam distintos balanços de produção ou consumo de ATP. De acordo com a terceira hipótese desse estudo, a arginina dá origem ao α -cetogluturato que quando utilizado como precursor neoglicogênico promove um balanço energético positivo de 8 ATPs, já a alanina dá origem ao piruvato que ao ser utilizado como precursor neoglicogênico promove um balanço energético negativo de 12 ATPs (KOZLOSKI, 2011). Infelizmente não foi possível comparar o efeito dos dois aminoácidos no presente estudo, visto que não apresentaram diferenças significativas quando comparados.

A ureagênese está conectada ao ciclo de Krebs e a neoglicogênese hepática através de metabólitos comuns como o aspartato, o oxaloacetato, o α -cetogluturato e o glutamato. Assim, quando gerada uma sobrecarga na ureagênese por conta da excessiva demanda de intermediários do ciclo da ureia, a neoglicogênese torna-se comprometida. Assim pode considerar que a amônia exerce efeito inibitório na neoglicogênese, principalmente a partir do propionato (NORO e WITTEWER, 2011; OVERTON et al., 1999). Quando ocorre um excesso

de absorção de amônia, tem um maior custo de ATP relacionado à ureagênese, visto que toda a amônia que chega com a circulação portal precisa ser detoxificada, podendo este prejudicar a disponibilidade de energia para a neoglicogênese (MEIJER et al., 1978).

De acordo com Butler e Elliot (1970) vacas recebendo dietas com 24 % e 15 % de proteína bruta quando comparadas, as que recebiam a dieta com maior teor proteico obtiveram melhoria na capacidade neoglicogênica com incremento na atividade hepática de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Sendo a transformação de oxaloacetato catalizado pela PEPCK, o mais importante passo da neoglicogênese, a atividade dessa enzima está altamente relacionada com a taxa neoglicolítica (KAMPL et al., 1993). Resultado semelhante a este foi obtido por Noro et al. (2012) em ovinos recebendo altas concentrações de Nitrogênio Não-Proteico na dieta, em que os mesmos apresentaram uma maior capacidade neoglicogênica relacionada a atividade da enzima PEPCK.

O consumo médio diário de Energia Digestível (ED) pelos ovinos foi de 1929,25 Kcal/dia. Considerando que em média, cerca de 82% da energia digestível é metabolizável, ao converter o valor de exigência de manutenção de ED para EM o valor obtido foi de 1581,98 Kcal/dia (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006).

De acordo com Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) a exigência de manutenção calculada para os animais utilizados nesse experimento foi de 1828 Kcal/dia de Energia Metabolizável. Assim, a dieta fornecida não atendeu a exigência calculada pelo programa. Considerando valores médios representantes de todos os tratamentos, o gasto de oxigênio pelos tecidos viscerais representou 40,22 % do total de EM consumida, e do fígado representou 15,57 % do total de EM consumida.

Considerando a exigência de EM calculada pelo programa CNPCS, o gasto de oxigênio pelos tecidos viscerais representaria 34,80% do total de EM que deveria ter sido consumida, e pelo fígado representaria 13,48%, valores inferiores aos obtidos ao considerar o valor real de EM consumida.

De acordo com o CNCPS, o consumo de PB ao fornecer uma dieta composta por feno de Tifton e concentrado proteinado de milho deveria ter sido em torno de 158g diárias de PB, para que a exigência dos animais fosse atendida. Entretanto, observou-se um consumo de 109,7g PB, abaixo do exigido para manutenção dos animais, o que pode ter contribuído para a não obtenção de resultados claros ao infundir diferentes compostos nitrogenados.

8 CONCLUSÕES

O aumento da carga hepática de compostos nitrogenados aumentou o gasto hepático de O_2 como consequência de um aumento na ureagênese, o que não foi observado para a neoglicogênese. O incremento da circulação portal de amônia aumenta a síntese de ureia e consequentemente o custo energético.

O gasto de O_2 associado à síntese de ureia é maior do que o gasto de O_2 relacionado à neoglicogênese.

O aumento da carga hepática de alanina ou de arginina não alterou o gasto de O_2 por este órgão. Não foi possível comparar os aminoácidos em estudo, visto que a infusão de arginina não alterou nenhuma das variáveis observadas.

BIBLIOGRAFIA

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**, 15th ed. Arlington, VA, 1997.

ATKINSON, R. L. et. al., Effects of ruminal protein degradability and frequency of supplementation on nitrogen retention, apparent digestibility and nutrient flux across visceral tissues in lambs fed low-quality forage. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 727-736, 2010.

BAREJ, W.; OSTASZEWSKI, P.; PIERZYNOWSKI, G. Urea and glucose formation in ovine liver after ammonia and lactate loading in vivo. **Animal Research Veterinary**, v. 18, p. 29-34, 1987.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 1ª ed. São Paulo: Editora Gráfica, 582 p. 2006.

BUTLER, T. M.; ELLIOT, J. M. Effect of diet and glucocorticoid administration on liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 1727-1733, 1970.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Cengage Learning, 864 p. 2015.

DYCE, K. M. et. al. **Tratado de Anatomia Veterinária**, 2. ed. Philadelphia: Guanabara Koogan, 663 p. 1996.

GEBHARDT, R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 53, p. 275-354, 1992.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**, 5. ed. São Paulo: Artmed Editora SA, 554, p. 2012.

HAUSSINGER, D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. **Biochemistry Journal**, v. 267, p. 281-290, 1990.

HEPCENTRO: **Hepatologia Médica**. Disponível em: <www.hepcentro.com.br> Acesso em 20 de outubro de 2014.

HERDT, T. H. Fuel homeostasis in the ruminant. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practical**, v. 4, p. 213-231, 1988.

HUNTINGTON, G. B.; ARCHIBEQUE, S. L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. **Proceedings os the American Society of Animal Science**, 1999.

HUNTINGTON, G. B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. **Reproduction Nutrition Development**, v. 30, p. 35-47, 1990.

HUNTINGTON, G. B. Portal blood flow and net absorption of ammonia-nitrogen, urea-nitrogen, and glucose in Nonlactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v 65, p. 1155-1162, 1982.

HUNTINGTON, G. B.; REYNOLDS, C. K.; STROUD, B. H. Techniques for measuring blood flow in splanchnic tissues of cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1583-1595, 1989.

HUNTINGTON, G. B.; TYRRELL, H. F. Oxygen consumption by portal-drained viscera of cattle: Comparison of analytical methods and relationship to whole body oxygen consumption. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2727-2731, 1985.

JUNGERMANN, K.; KIETZMANN, T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 179-203, 1996.

KAMPL, B. et al., Determination of the cytosolic enzyme activities in the liver of lactating cows in vivo. I. Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. **Veterinary Archives**, v. 63, p. 107-113, 1993.

KATZ, M. L.; BERGMAN, E. N. A method for simultaneous cannulation of the major splanchnic blood vessels of the sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, p. 655-661, 1969.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica de Ruminantes**, 3. ed. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 212 p. 2011.

KRAFT, G. **Régulation nutritionnelle du métabolisme hépatique des acides aminés chez le ruminant en croissance** 2009. 355 f. Thesis (PhD Sciences de la vie et santé) - l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) Paris.

KUO, F. C.; HWU, W. L.; VALLE, D. et al. Colocalization in pericentral hepatocytes in adult mice and similarity in developmental expression pattern of ornithine aminotransferase and glutamine synthetase mrna. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 9468-9472, 1991.

LARSEN, M., KRISTENSEN, N. B. Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic amino acid metabolism in periparturient dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 3306-3318, 2009.

LINDSAY, D. B.; REYNOLDS, C. K. Metabolism of the portal-drained viscera and liver. In: FORBES, J. M. and FRANCE, J. (Eds.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. CAB International, Wallingford, p. 311-343, 2005.

LOBLEY, G. E.; MILANO, G. D.; VAN DER WALT, J. G. The liver: Integrator of nitrogen metabolism. In: CRONJÉ, P. B. et al. (eds.) **Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction**. CAB International, Wallingford, UK, p. 149-168, 2000.

LOBLEY, G. E. et al. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 667-685, 1995.

LOBLEY, G. E., WEIJS, P. J. M., CONNELL, A., BROWN, D. S., MILNE, E. Fate of absorbed and exogenous ammonia as influenced by forage or forage-concentrate diets in growing sheep. **British Journal Nutrition**, v.76, p. 231-248, 1996.

MALTBY, S. A. et al. Splanchnic metabolism of nitrogenous compounds and urinary nitrogen excretion in steers fed alfalfa under conditions of increased absorption of ammonia and L-arginine supply across the portal-drained viscera. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1075-1087, 2005.

MCLEAN, J. A. On the calculation of heat production from open-circuit calorimetric measurements. **British Journal Nutrition**, v. 27, p. 597-600, 1972.

MEIJER, A. J. et al. Interrelationships between Gluconeogenesis and Ureagenesis in Isolated Hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 2308-2320, 1978.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **Journal AOAC**, v. 85, p. 1217-1240. 2002.

MILANO, G. D.; HOTSTON-MOORE, A.; LOBLEY, G. E., Influence of hepatic ammonia removal on ureagenesis amino acid utilization and energy metabolism in ovine liver. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 307-315, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**, 4th ed. New York City: W. H. Freeman, 1202 p. 2008.

NORO, M. et al. Non-protein nitrogen supplementation increases gluconeogenic capacity in sheep. **Livestock Science**, v. 148, p. 243-248, 2012.

NORO, M.; WITWER, F. Interrelaciones entre ureagénesis y gluconeogénesis hepática em ruminantes alimentados com elevado contenido de nitrógeno. **Veterinária México**, 43, p. 143-154, 2011.

ORTIGUES-MARTY, I.; VERNET, J.; MAJDOUB, L. Whole body glucose turnover in growing and non-productive adult ruminants: Meta-analysis and review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, p. 371-383, 2003.

ORTIGUES, I.; DURAND, D. Adaptation of energy metabolism to undernutrition in ewes. Contribution of portal-drained viscera, liver and hindquarters. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 209-226, 1994.

OVERTON, T. R. et al. Substrate Utilization for Hepatic Gluconeogenesis is altered by increased Glucose Demand in Ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1940-1951, 1999.

RECAVARREN, M. I. et al. Splanchnic net balance of oxygen and metabolites in response to mesenteric vein infusion of ammonia in sheep. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 13, p. 335-338, 2004.

RECAVARREN, M. I.; MILANO, G. D. Splanchnic net balance of oxygen and metabolites in response to a discontinuous mesenteric vein infusion of ammonium in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 1015-1021, 2013.

REYNOLDS, C. K. et al. Effects of Mesenteric Vein L-Alanine Infusion on Liver metabolism of Organic Acids by Beef Heifers Fed Diets Differing in Forage: Concentrate Ratio. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3196-3206, 1994.

REYNOLDS, C. K. Metabolism of nitrogenous compounds by ruminant liver. **The Journal of Nutrition**, v. 122, p. 850-854, 1992.

SEAL, C. J.; REYNOLDS, C. K. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 6, p. 185-208, 1993.

SENGER, C. D. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science Technology**, v. 146, p. 169-174. 2008.

SMITH, N. E.; BALDWIN, R. L. Effects of Breed, Pregnancy, and Lactation on Weight of Organs and Tissues in Dairy Cattle, **Journal of Dairy Science**, v. 57, p. 1055-1060, 1973.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**, 11. ed. Cornell University Press, 856 p. 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 2. ed., Cornell University, 1994.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. 408 **Analysis Chemical**, v. 39, p. 971-974. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60252a045>. 1967.

WOLFF, J. E.; BERGMAN, E. N. Gluconeogenesis from plasma amino acids in fed sheep. **American Journal of Physiology**, v. 223, p. 455-460, 1972.

APÊNDICES

Apêndice A - Dados utilizados para a análise estatística. PAH= concentração de ácido paramino-hipúrico, Ox= concentração de oxigênio, Ur= concentração de ureia, Am= concentração de amônia, Gli = concentração de glicose, A= arterial, H= hepático e P= portal.

10	Período	Tratamento	Sequência	PAH A	PAH H	PAH P	Hematc. A	Hematc. H	Hematc. P	OxA	OxH	OxP
				mg/L	mg/L	mg/L	%	%	%	mmHg	mmHg	mmHg
47	1	Alanina	0.5-1.0h	28,4	41,1	42,5	20,7	20,3	19,3	107	69	87
47	1	Alanina	1.5-3.h	28,6	44,9	46,0	19,8	20,3	20,5	106	68	83
47	2	Arginina	0.5-1.0h	33,7	42,4	45,4	20,0	19,7	20,3	105	72	87
47	2	Arginina	1.5-3.h	30,7	43,3	45,6	19,3	19,5	19,5	103	58	73
47	3	Controle	0.5-1.0h	33,2	49,6	51,3	19,3	18,7	19,7	97	66	76
47	3	Controle	1.5-3.h	38,8	50,7	53,4	17,5	18,0	17,8	97	63	75
47	4	BicAmonio	0.5-1.0h	40,2	48,7	51,6	18,7	18,3	18,0	103	81	84
47	4	BicAmonio	1.5-3.h	37,6	46,2	48,5	16,8	16,5	17,3	101	66	80
42	4	BicAmonio	0.5-1.0h	31,7	42,8	44,3	26,0	26,0	26,0	118	95	101
42	4	BicAmonio	1.5-3.h	33,9	48,4	50,5	25,5	26,0	25,8	116	79	92
42	1	Alanina	0.5-1.0h	34,4	44,1	44,7	23,0	23,0	23,0	103	72	82
42	1	Alanina	1.5-3.h	37,3	47,4	49,9	23,0	23,0	23,0	102	68	80
42	2	Arginina	0.5-1.0h	31,7	40,3	40,6	22,3	21,3	21,7	149	104	121
42	2	Arginina	1.5-3.h	31,9	41,8	42,8	21,3	21,0	21,0	148	105	117
42	3	Controle	0.5-1.0h	30,7	40,0	40,9	21,7	20,7	21,0	122	88	97
42	3	Controle	1.5-3.h	31,4	42,0	43,5	20,8	20,8	20,5	123	90	97
48	3	Arginina	0.5-1.0h	48,9	59,6	59,8	19,7	19,0	18,7	97	63	76
48	3	Arginina	1.5-3.h	55,3	66,4	67,8	18,5	19,0	19,0	96	59	72
48	4	Controle	0.5-1.0h	50,7	61,6	62,2	18,7	17,3	17,7	91	54	69
48	4	Controle	1.5-3.h	53,4	66,5	67,6	16,5	16,5	16,8	92	58	70
48	1	BicAmonio	0.5-1.0h	54,9	62,8	64,7	17,7	18,0	18,0	109	80	86
48	1	BicAmonio	1.5-3.h	56,6	69,6	73,2	19,7	18,7	18,7	108	73	85
48	2	Alanina	0.5-1.0h	52,9	60,6	61,1	17,3	17,7	17,3	104	72	82
48	2	Alanina	1.5-3.h	55,4	64,5	65,5	18,5	18,0	18,3	104	68	79
46	2	Controle	0.5-1.0h	31,4	51,9	52,1	23,0	24,0	23,0	113	79	88
46	2	Controle	1.5-3.h	42,0	55,3	59,9	19,3	19,3	19,3	113	75	84
46	3	BicAmonio	0.5-1.0h	34,9	50,7	54,5	18,0	18,0	17,3	87	59	67
46	3	BicAmonio	1.5-3.h	45,1	56,6	61,7	18,8	18,0	18,0	87	53	65
46	4	Alanina	0.5-1.0h	58,0	73,3	75,4	18,0	18,3	18,3	102	65	77
46	4	Alanina	1.5-3.h	53,1	64,7	66,7	18,3	18,3	18,0	101	60	75
46	1	Arginina	0.5-1.0h	46,0	56,4	60,5	18,3	18,0	18,0	95	55	70
46	1	Arginina	1.5-3.h	47,1	58,3	60,7	17,5	17,8	17,5	95	57	69

Apêndice A -...continuação.

Animal	Periodo	Tratamento	Sequência	UrA mg/L	UrH mg/L	UrP mg/L	AmA mg/L	AmH mg/L	AmP mg/L	GliA mg/L	GliH mg/L	GliP mg/L
47	1	Alanina	0.5-1.0h	125,10	128,14	123,93	0,00	0,00	2,19	649,48	665,24	627,41
47	1	Alanina	1.5-3.h	119,00	122,48	117,98	0,00	0,00	2,70	626,22	661,30	610,46
47	2	Arginina	0.5-1.0h	127,54	129,78	123,01	0,00	0,00	2,93	570,22	591,89	558,55
47	2	Arginina	1.5-3.h	127,27	129,85	124,68	0,00	0,00	3,18	657,33	685,68	638,58
47	3	Controle	0.5-1.0h	141,11	142,60	138,87	0,00	0,00	2,44	569,64	583,83	556,55
47	3	Controle	1.5-3.h	132,28	134,49	129,03	0,00	0,00	1,78	557,36	587,24	543,04
47	4	BicAmonio	0.5-1.0h	101,69	103,82	100,84	1,01	0,97	3,81	506,87	532,64	499,88
47	4	BicAmonio	1.5-3.h	113,58	116,75	110,64	1,53	1,50	7,76	505,39	523,11	494,11
42	4	BicAmonio	0.5-1.0h	83,27	84,41	81,01	1,12	1,08	3,59	587,67	600,14	547,55
42	4	BicAmonio	1.5-3.h	88,08	90,21	85,24	1,48	1,48	6,30	608,27	624,54	596,48
42	1	Alanina	0.5-1.0h	114,90	117,60	113,05	1,12	1,11	3,37	588,76	598,52	576,29
42	1	Alanina	1.5-3.h	98,74	99,65	94,98	1,29	1,20	3,86	598,11	619,66	581,84
42	2	Arginina	0.5-1.0h	101,93	103,62	100,52	0,02	0,02	1,53	566,87	578,93	558,65
42	2	Arginina	1.5-3.h	95,84	96,29	93,76	0,00	0,00	1,67	601,14	612,24	592,50
42	3	Controle	0.5-1.0h	112,68	113,38	109,68	1,59	1,74	4,49	559,62	570,94	554,23
42	3	Controle	1.5-3.h	101,31	103,24	99,44	0,97	0,98	3,92	565,69	580,65	554,36
48	3	Arginina	0.5-1.0h	126,46	128,70	125,20	1,43	1,33	5,59	502,82	519,29	495,69
48	3	Arginina	1.5-3.h	127,45	129,94	124,59	1,80	1,70	5,85	525,74	547,15	512,15
48	4	Controle	0.5-1.0h	130,75	132,33	127,87	1,53	1,34	5,10	508,06	525,27	501,61
48	4	Controle	1.5-3.h	133,83	134,53	130,95	1,33	1,34	4,88	509,27	525,00	499,60
48	1	BicAmonio	0.5-1.0h	200,17	202,75	199,90	0,49	0,55	4,06	513,80	528,62	506,67
48	1	BicAmonio	1.5-3.h	203,75	207,63	199,91	0,26	0,52	8,24	505,02	534,11	490,75
48	2	Alanina	0.5-1.0h	191,32	193,10	189,09	0,67	0,53	3,59	491,94	501,60	481,75
48	2	Alanina	1.5-3.h	184,65	187,01	181,08	0,34	0,26	3,95	542,37	563,69	517,82
46	2	Controle	0.5-1.0h	160,54	163,00	156,96	0,42	0,60	5,79	816,41	847,14	788,35
46	2	Controle	1.5-3.h	156,20	157,93	152,58	0,32	0,39	5,51	864,84	893,91	839,29
46	3	BicAmonio	0.5-1.0h	176,24	177,50	171,30	0,33	0,32	5,02	821,16	830,34	794,95
46	3	BicAmonio	1.5-3.h	175,83	180,45	170,17	0,37	0,54	7,82	854,26	898,99	823,29
46	4	Alanina	0.5-1.0h	158,23	161,03	153,58	0,53	0,63	5,98	682,23	694,90	670,67
46	4	Alanina	1.5-3.h	150,76	153,56	147,10	0,68	0,68	5,08	688,02	717,75	654,15
46	1	Arginina	0.5-1.0h	144,54	144,88	141,09	0,31	0,37	4,35	674,37	689,89	648,91
46	1	Arginina	1.5-3.h	142,49	145,26	139,49	0,15	0,15	4,80	713,96	743,76	691,60

Apêndice B - Dados utilizados para a análise estatística. FPP = fluxo de plasma portal, FPV= fluxo plasma visceral, FSP= fluxo de sangue portal, FSV=fluxo de sangue visceral, FP= fluxo portal, FV= fluxo visceral, FH= fluxo hepático, Ox= oxigênio, Am= Amônia, Ur= ureia, Gli= glicose.

Animal	Período	Tratamento	Sequência	FPP L/h	FPV L/h	FSP L/h	FSV L/h	FPOX L/h	FVOX L/h	FHOX L/h
47	1	Alanina	0.5-1.0h	96	106	121	133	-2435,92	-5066,04	-2630,13
47	1	Alanina	1.5-3.h	78	83	97	104	-2213,25	-4025,77	-1812,52
47	2	Arginina	0.5-1.0h	116	155	144	193	-2639,23	-6324,10	-3684,87
47	2	Arginina	1.5-3.h	91	108	112	134	-3286,69	-5990,11	-2703,42
47	3	Controle	0.5-1.0h	75	82	92	101	-1985,78	-3119,41	-1133,63
47	3	Controle	1.5-3.h	92	113	112	138	-2528,76	-4746,13	-2217,37
47	4	BicAmonio	0.5-1.0h	119	160	147	196	-2707,12	-4298,62	-1591,50
47	4	BicAmonio	1.5-3.h	124	157	149	187	-3154,12	-6601,91	-3447,79
42	4	BicAmonio	0.5-1.0h	107	121	145	164	-2503,04	-3908,52	-1405,48
42	4	BicAmonio	1.5-3.h	81	93	109	126	-2706,12	-4732,31	-2026,19
42	1	Alanina	0.5-1.0h	131	140	170	182	-3601,60	-5642,77	-2041,18
42	1	Alanina	1.5-3.h	107	133	139	172	-3109,38	-5854,53	-2745,15
42	2	Arginina	0.5-1.0h	151	157	195	199	-5451,58	-8839,16	-3387,58
42	2	Arginina	1.5-3.h	123	136	156	172	-4742,95	-7290,94	-2547,99
42	3	Controle	0.5-1.0h	133	146	170	184	-4215,78	-6287,96	-2072,17
42	3	Controle	1.5-3.h	112	127	141	160	-3700,48	-5337,99	-1637,51
48	3	Arginina	0.5-1.0h	124	126	155	156	-3245,31	-5302,24	-2056,93
48	3	Arginina	1.5-3.h	108	122	132	150	-3181,54	-5601,41	-2419,87
48	4	Controle	0.5-1.0h	118	124	145	150	-3226,45	-5560,48	-2334,03
48	4	Controle	1.5-3.h	95	103	114	124	-2459,71	-4231,92	-1772,22
48	1	BicAmonio	0.5-1.0h	138	171	168	209	-3846,44	-6143,80	-2297,36
48	1	BicAmonio	1.5-3.h	82	104	101	128	-2347,97	-4499,75	-2151,78
48	2	Alanina	0.5-1.0h	164	175	199	213	-4427,37	-6817,25	-2389,88
48	2	Alanina	1.5-3.h	133	148	164	180	-3952,83	-6482,98	-2530,14
46	2	Controle	0.5-1.0h	65	66	85	87	-2056,18	-2915,70	-859,53
46	2	Controle	1.5-3.h	75	102	93	126	-2738,14	-4778,86	-2040,72
46	3	BicAmonio	0.5-1.0h	69	85	84	104	-1712,15	-2887,31	-1175,17
46	3	BicAmonio	1.5-3.h	81	117	100	143	-2109,40	-4817,51	-2708,11
46	4	Alanina	0.5-1.0h	78	89	95	108	-2375,83	-3969,48	-1593,65
46	4	Alanina	1.5-3.h	99	117	122	143	-3184,01	-5935,58	-2751,57
46	1	Arginina	0.5-1.0h	93	130	114	159	-2792,91	-6280,81	-3487,91
46	1	Arginina	1.5-3.h	99	121	120	147	-3120,31	-5643,72	-2523,41

Apêndice B -...continuação.

Animal	Período	Tratamento	Sequência	FPAM L/h	FVAM L/h	FHAM L/h	FPU L/h	FVU L/h	FHU L/h	FPG L/h	FVG L/h	FHG L/h
47	1	Alanina	0.5-1.0h	210	0	-210	-111	322,24	433,73	-2109,81	1669,53	3779,34
47	1	Alanina	1.5-3.h	210	0	-210	-79	288,82	367,98	-1227,33	2911,81	4139,14
47	2	Arginina	0.5-1.0h	339	0	-339	-523	348,88	872,31	-1348,43	3368,99	4717,42
47	2	Arginina	1.5-3.h	288	0	-288	-234	278,49	512,43	-1699,17	3058,08	4757,24
47	3	Controle	0.5-1.0h	182	0	-182	-167	122,92	289,93	-975,60	1165,40	2141,00
47	3	Controle	1.5-3.h	165	0	-165	-299	250,32	549,80	-1322,43	3388,04	4710,47
47	4	BicAmonio	0.5-1.0h	334	-6	-340	-102	341,19	443,06	-833,19	4124,64	4957,83
47	4	BicAmonio	1.5-3.h	774	-4	-778	-365	496,31	861,42	-1400,07	2774,04	4174,11
42	4	BicAmonio	0.5-1.0h	264	-4	-268	-242	137,68	380,08	-4290,86	1513,46	5804,32
42	4	BicAmonio	1.5-3.h	391	0	-391	-230	198,79	428,84	-956,83	1516,23	2473,06
42	1	Alanina	0.5-1.0h	294	-2	-296	-242	379,60	621,18	-1632,71	1369,04	3001,75
42	1	Alanina	1.5-3.h	274	-12	-287	-402	121,53	524,02	-1741,69	2860,75	4602,45
42	2	Arginina	0.5-1.0h	227	0	-227	-212	265,51	477,69	-1242,45	1888,28	3130,73
42	2	Arginina	1.5-3.h	206	0	-206	-257	61,00	317,70	-1062,98	1508,52	2571,51
42	3	Controle	0.5-1.0h	386	22	-365	-400	102,18	501,90	-719,02	1652,77	2371,78
42	3	Controle	1.5-3.h	329	1	-328	-208	245,69	453,91	-1264,13	1898,58	3162,72
48	3	Arginina	0.5-1.0h	516	-12	-528	-157	283,45	440,15	-886,08	2080,67	2966,75
48	3	Arginina	1.5-3.h	437	-12	-449	-308	303,37	611,20	-1465,82	2602,15	4067,97
48	4	Controle	0.5-1.0h	422	-23	-445	-340	196,38	536,06	-761,68	2136,21	2897,90
48	4	Controle	1.5-3.h	338	1	-337	-274	72,43	346,00	-920,05	1623,70	2543,75
48	1	BicAmonio	0.5-1.0h	493	11	-483	-38	442,72	480,28	-988,32	2541,39	3529,70
48	1	BicAmonio	1.5-3.h	650	27	-623	-313	403,13	715,96	-1163,60	3021,97	4185,57
48	2	Alanina	0.5-1.0h	480	-24	-504	-366	311,94	677,58	-1675,98	1690,71	3366,69
48	2	Alanina	1.5-3.h	481	-12	-493	-476	349,40	825,37	-3273,23	3150,23	6423,46
46	2	Controle	0.5-1.0h	351	12	-339	-234	161,95	395,62	-1831,54	2024,31	3855,85
46	2	Controle	1.5-3.h	391	7	-385	-273	176,19	448,91	-1927,08	2958,25	4885,34
46	3	BicAmonio	0.5-1.0h	322	-1	-323	-340	107,54	447,07	-1803,71	783,51	2587,22
46	3	BicAmonio	1.5-3.h	606	19	-587	-460	541,23	1001,61	-2519,85	5237,73	7757,58
46	4	Alanina	0.5-1.0h	424	9	-415	-361	247,43	608,93	-898,66	1121,39	2020,05
46	4	Alanina	1.5-3.h	437	0	-437	-363	328,55	691,46	-3363,85	3481,91	6845,76
46	1	Arginina	0.5-1.0h	375	8	-367	-319	43,91	363,40	-2360,77	2020,50	4381,27
46	1	Arginina	1.5-3.h	462	0	-462	-299	335,06	633,59	-2220,60	3607,69	5828,29

Apêndice C - Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: Avaliação dos fatores que afetam o metabolismo visceral dos ruminantes.

Numero do Parecer: 011/2012

Pesquisador Responsável: Gilberto Vilmar Kozloski

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:

Santa Maria, 09 de abril de 2012.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Eliane M. Zanchet".

Eliane Maria Zanchet
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM