

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA TAXA DE DEPURAÇÃO RENAL DE CREATININA PARA AVALIAÇÃO DO “STATUS” DO CÁLCIO EM EQUINOS¹

CARVALHO, P. R.;^{2*} d'ARCE, R. D.;³ NETO, R. M.;³ MANZANO, A.⁴

Resumo - Esta pesquisa foi conduzida com objetivo de avaliar a eficiência da determinação da taxa do “clearance” de creatinina para o cálcio (% DRCr- Ca) como ferramenta de diagnóstico na prevenção de osteopatias em eqüinos recebendo dietas com teores variáveis ou desequilibradas em Ca na ração. Foram utilizadas 20 potras árabes e mestiça árabe com idade média de $19,9 \pm 4,58$ meses, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco potras por unidade experimental, submetidas a quatro tratamentos para coletas diárias de sangue e urina nos tempos de 0, 48, 72, 96 e 120 horas após período de adaptação de 15 dias. As rações dos tratamentos com diferentes níveis de Ca/dia na dieta foram compostas de: A- Ca normal e fósforo (P) normal - 24 g de Ca e 18 g de P/dia; B- Ca baixo e P alto - 4,42 g de Ca e 30,10 g de P/dia; C - Ca baixo e P baixo - 15,6 g de Ca e 9,6 g de P/dia; e D - Ca alto e P baixo - 29,04 g de Ca e 14,04 g de P/dia na dieta. As médias variaram ($P > 0,05$) de 3,52% (0 h) a 10,14% (96 h) para o %DRCr- P no tratamento A. Proporcionalmente ao decréscimo de Ca na dieta, as médias para o %DRCr- Ca também decresceram ($P < 0,05$) de 3,50% (0 h) para 1,43% (72 h) no grupo C e de 5,10% (0 h) para 0,79% (72 h) no grupo B. O contrario foi assinalado com o acréscimo de Ca no tratamento D em que as médias apresentaram acréscimos ($P < 0,05$) de 6,89% (0 h) a 11,42% (120 h). As excreções médias de Ca decresceram ($P < 0,05$) de 31,23 mg a (0 h) para 8,46 mg (48 h) e 10,03 mg P/dL (120 h) no grupo B (alto P). Estes resultados permitiram concluir que a dieta animal apresenta sinais de deficiência em Ca quando a média do % DRCr- Ca for menor que 3,50%.

Palavras-chave: taxa clearance, depuração renal, osteodistrofia, urina, potra árabe

Introdução

O esqueleto em mamíferos apresenta duas e às vezes incompatíveis funções, a estrutural e a metabólica. Metabolicamente, o esqueleto funciona principalmente como reservatório de íons de vital importância, entre os quais o cálcio (Ca). No osso e cartilagem, hormônios atuam de maneira coordenada a manter o balanço entre estas duas funções. Os tecidos do esqueleto detém entre 80 e 85% de toda matéria mineral do organismo animal, sendo mais de 99% do Ca corporal encontrado nos ossos e dentes. Segundo Wasserman (1984), o mineral ósseo de estrutura cristalina hidroxiapatita $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ e os sais, $CaCO_3$ e fosfato tricalcio. A renovação constante de tecido ósseo é a base para classificação da morfologia e patogenia de doença metabólica óssea caracterizada por osteopenia.

O rim é o principal órgão regulador da homeostasia do Ca no fluído extracelular em eqüinos. Segundo Gans & Mercer(1984) para equivalente estágio de maturidade

¹ Apoio financeiro da EMBRAPA – UEPAE, São Carlos-SP.

² Parte da Dissertação de mestrado do primeiro autor.

³ Méd. Vet., Dr., Pesquisador, Secretaria Agricultura e Abastecimento. Av. Rodrigues Alves, 40-40, Horto Florestal, CEP 17030-000, Bauru-SP. E-mail: p_reiscar@apta.sp.gov.br

⁴ Professor da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz –ESALQ/USP, Piracicaba - SP.

⁵ Engº Agrº., Dr., Pesquisador, EMBRAPA-UEPAE, São Carlos-SP.

e ingestão de Ca por bovinos e ovinos, cavalos absorvem mais Ca e excretam maior proporção do Ca absorvido na urina, numa relação linear direta entre absorção e excreção. Os rins de eqüinos em crescimento excretam média aproximada de 30% do Ca absorvido e do cavalo de 18 a 24 meses, entre 40 a 50% do Ca absorvido. A grande quantia de carbonato de Ca encontrada na urina eqüina confirma a importância do rim na excreção e manutenção da homeostasia do Ca plasmático. A absorção de Ca da dieta pode variar de 45 a 70% e a perda fecal endógena tem apresentado média de 20 mg/kg PV/dia, a excreção endógena renal de 5 mg a 6 mg Ca/kg PV/dia em cavalos ingerindo Ca próximo das exigências de manutenção (SCHRYVER et al., 1970a, 1974a).

Dificuldade encontrada na obtenção de coleção total de urina no tempo de 24 horas, especialmente em cavalo, segundo Traver et al. (1976), pode ser resolvida adotando-se técnica simplificada na rotina clínica baseada em que a depuração de uma substância, X, que requer somente concentração de X e creatinina (Cr) em coleta simultânea de amostra de urina e soro sangüíneo para determinação do clearance de Cr para o íon X (% Cr- X). Knudsen (1959) demonstrou em cavalos que o clearance de creatinina endógena tem valor relativo ao redor de 90% em relação ao clearance de inulina e é usado nas determinações de Cr para avaliação da filtração glomerular renal no cavalo (GANS & MERCER, 1984). Desta maneira, nesta pesquisa objetivou-se determinar o % DRCr- Ca em amostras de urina e soro sangüíneo colhidos simultaneamente de eqüinos sadios submetidos às dietas com diferentes níveis de Ca nas rações experimentais com o propósito de avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo sobre o status nutricional e metabólico do Ca.

Material e Métodos

A fase experimental deste estudo foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa de Âmbito Estadual da EMBRAPA de São Carlos-SP, clima tipo Cw, subtropical chuvoso, inverno seco e precipitação anual média de 1502 mm.

Foram utilizadas 20 potras, sendo 10 potras puras da raça Árabe e 10 mestiças Árabe, com idade média de $19,9 \pm$ meses. O peso e altura médios das potras e o desvio padrão no início do experimento foram, respectivamente, de $277,2 \text{ kg} \pm 37,76$ e $1,37 \text{ m} \pm 0,05$. Os animais foram distribuídos em baias individuais de alvenaria com área de $11,97 \text{ m}^2$, piso de cimento, providas de cocho de cimento onde recebiam a ração de concentrado e volumoso nos tratamentos especificados.

Os tratamentos, em número de quatro, foram aplicados a grupos de cinco potras, distribuídos a seguir: A- Ca normal e P normal - 24 g de Ca e 18 g de P/dia na dieta para atender as exigências dos animais desta faixa etária; B- Ca baixo e P alto - 4,42 g de Ca e 30,10 g de P/dia na dieta; C - Ca baixo e P baixo - 15,6 g de Ca e 9,6 g de P por dia na dieta; D - Ca alto e P baixo - 29,04 g de Ca e 14,04 g de P/dia na dieta. Os animais receberam 6 kg de MS/dia, sendo a primeira refeição as 10 h e a segunda as 16 h (Tabela 1). Cloreto de sódio aditivado com mistura de microminerais e água foram fornecidos ad libitum. A composição química dos ingredientes das dietas foram determinadas segundo a metodologia descrita pelo AOAC (1970). A composição mineral em Ca e P das dietas foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica da marca Varian[®]. O sangue total para obtenção do soro foi colhido por punção da jugular em tubo de vidro tipo vacutainer sem anticoagulante. Após 15 dias de adaptação, as amostras de urina e soro foram obtidas diariamente com colheita simultânea no horário entre 12 h e 14 h nos tempos 0, 48, 72, 96 e 120 h da fase experimental. O Ca e Cr no soro e urina, para

determinação do clearance percentual de Ca (% DRCr- Ca), foram dosados pelo método kit Labtest® - Sistemas Diagnósticos Ltda., por reação colorimétrica com leitura em espectrofotômetro de absorção molecular modelo micronal 382-B.

Na análise estatística dos dados, cada tratamento foi aplicado a cada unidade inteiramente ao acaso, a cinco animais, de acordo com o modelo matemático: $Y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$. Os resultados das determinações do %DRCr- Ca, Ca e Cr no soro e urina foram analisados nos tempos de 0, 48, 72, 96 e 120 h para cada unidade experimental. Os dados foram processados mediante o uso do software "Statistical Analysis System" (SAS, 1994). O efeito do tempo foi estudado através da regressão polinomial, enquanto que as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância indicado. Foi aplicada a fórmula estabelecida por Knudsen (1959) e adaptada por Traver et al. (1976) na qual os autores interrelacionaram a concentração do mineral pesquisado (Ca) na urina e soro com a concentração de creatinina (Cr) no soro e urina de equinos para obtenção do percentual de depuração renal (%DRCr-) do mineral pesquisado:

$$\%DRCr- Ca = \frac{Ca \text{ (urina)}}{Ca \text{ (soro)}} \times \frac{Cr \text{ (soro)}}{Cr \text{ (urina)}} \times 100$$

Tabela 1 - Composição das rações experimentais

| Ingredientes, % | Tratamentos | | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | A | B | C | D |
| | 0,40% Ca | 0,07% Ca | 0,26% Ca | 0,48% Ca |
| Feno de Coast cross | 59,2150 | 16,1150 | 100,00 | 59,2620 |
| Farelo de milho | 26,7000 | 50,0000 | - | 26,7000 |
| Farelo de trigo | 4,0000 | 33,3400 | - | 4,0000 |
| Farelo de soja | 9,3000 | - | - | 9,3000 |
| Carbonato de cálcio, (p.a) | 0,5280 | - | - | 0,7380 |
| Fosfato monossódico, (p.a) | 0,2570 | 0,5450 | - | - |
| Total (Total) | 100,0000 | 100,0000 | 100,0000 | 100,0000 |
| <u>Análise calculada, %</u> | | | | |
| Matéria seca | 88,7600 | 88,0207 | 89,3700 | 88,7560 |
| Proteína bruta | 10,0158 | 10,1738 | 4,6300 | 10,0180 |
| Fibra bruta | 25,0423 | 10,1505 | 39,5200 | 25,0609 |
| Extrato etéreo | 2,8838 | 3,1448 | 2,5000 | 2,8850 |
| Materia mineral | 3,9734 | 2,6494 | 4,9900 | 3,9758 |
| Extrato não nitrogenado | 46,0540 | 61,3726 | 37,7300 | 46,0720 |
| <u>Composição analisada, %</u> | | | | |
| Cálcio | 0,4000 | 0,0736 | 0,2600 | 0,4840 |
| Fósforo | 0,3000 | 0,5016 | 0,1600 | 0,2338 |

Resultados e Discussão

A determinação diária do clearance de creatinina não mostrou alteração do metabolismo ou disfunção renal dos animais por influência dos tratamentos durante a fase experimental. A análise variância mostrou efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos.

As médias do tratamento A para % DRCr- Ca variaram de 3,52% (0 h) a 10,15% (96 h) entre os tempos (Tabela 2 ; Figura 1). Estas médias são semelhante aos valores % DRCr- Ca descritos por Caple et al. (1982) ao registrarem em equínos adultos com dieta de 3,9 g de Ca/kg de ração médias maiores que 2,5% para o %DRCr- Ca. Nesta pesquisa, as médias obtidas refletiram a digestibilidade esperada para o Ca presente nos ingredientes da dieta do grupo A (4 g Ca/kg ração) quando comparada à variação de 45% a 70% de digestibilidade verdadeira do Ca presente nos ingredientes citados por Schryver et al. (1970a) ou acima de 65% de digestibilidade verdadeira nos vários ingredientes utilizados na dieta de equínos.

Assim, nesta pesquisa as médias do % DRCr- Ca do grupo A presume-se balanço positivo de Ca, predito pela excreção urinária média variando, respectivamente, de 25,94 mg (A) a 36,52 mg (D) de Ca na urina, contrapondo-se ($P < 0,05$) entre tempos ao grupo B (Tabela 2). Resultados semelhantes foram testemunhados por Schryver et al. (1970a, b) ao mencionarem valor de 5 a 6 mg/kg PV/dia de Ca na urina como perda obrigatória em cavalos com dieta de Ca calculada para manutenção (retenção zero). Segundo os autores acima, as médias de excreções endógenas fecal e urinária foram de 20 mg e 5 mg/kg PV/dia, respectivamente. Assumindo, variação de absorção de 45% a 70% e média de 50% de digestibilidade verdadeira dos alimentos, segundo Schryver et al. (1974a), um pônei requer entre 35 mg e 60 mg Ca/kg PV/dia e média de 43 mg de Ca/kg PV/dia para balancear perda obrigatória (manutenção). O decréscimo ($P < 0,01$) de 5,10% (0 h) para 1,22% (48 h) para o % DRCr- Ca no tratamento B em função do baixo Ca (0,74 g/kg) na dieta confirmaram as observações dos autores acima, que baixo Ca e alto P na dieta levam a excreção renal aumentada do P na urina (Tabela 2; Figura 1).

Ainda, concordando com estes resultados e dos autores acima Traver et al.

Tabela 2 - Médias do % DRCr- Ca de cinco potras da raça árabe e mestiça árabe nos tratamentos e tempos estudados

| Tratamentos | Tempos (h) ¹ | | | | |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | 0 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| | Médias* % DRCr- Ca | | | | |
| | 5% | | | | |
| A | 3,52 _a ^A | 5,95 _a ^A | 5,27 _a ^A | 10,14 _a ^A | 7,77 _a ^A |
| B | 5,10 _a ^A | 1,22 _b ^A | 0,79 _b ^B | 0,98 _b ^A | 1,62 _b ^A |
| C | 3,50 _a ^A | 5,04 _a ^A | 1,43 _b ^B | 2,23 _a ^A | 2,30 _a ^A |
| D | 6,89 _a ^A | 3,80 _a ^A | 5,96 _a ^A | 3,71 _a ^A | 11,42 _a ^A |
| | 1% | | | | |
| A | 3,52 _a ^A | 5,95 _a ^A | 5,27 _a ^{AB} | 10,14 _a ^A | 7,77 _a ^A |
| B | 5,10 _a ^A | 1,22 _b ^A | 0,79 _b ^B | 0,98 _b ^A | 1,62 _b ^A |
| C | 3,50 _a ^A | 5,04 _a ^A | 1,43 _a ^{AB} | 2,23 _a ^A | 2,31 _a ^A |
| D | 6,89 _a ^A | 3,80 _a ^A | 5,96 _a ^A | 3,71 _a ^A | 11,42 _a ^A |
| | Ca na urina (mg/dL) | | | | |
| A | 25,94 _b ^A | 25,08 _b ^A | 37,57 _a ^{bA} | 47,20 _a ^A | 27,64 _{ab} ^A |
| B | 31,23 _a ^A | 8,46 _b ^A | 2,57 _b ^B | 11,43 _b ^B | 10,03 _b ^A |
| C | 26,56 _a ^A | 22,28 _a ^A | 24,56 _a ^{AB} | 19,34 _a ^B | 36,86 _a ^A |
| D | 36,52 _a ^A | 26,39 _a ^A | 37,03 _a ^A | 26,80 _a ^{AB} | 32,53 _a ^A |

*Médias com letras distintas minúsculas na linha ou maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância indicado

¹Médias de cinco repetições por tempo (0, 48, 72, 96 e 120 h)

(1976) e Caple et al. (1982) afirmaram que as osteopatias caracterizadas por desequilíbrio de Ca e P, seja pela combinação de baixo Ca e alto P, excesso de Ca e P, Ca normal com excesso de P na dieta, podem ser diagnosticadas e prevenidas em tempo hábil através de amostra simultaneamente de soro e urina para dosagem de Ca e Cr determinando-se o % DRCr- Ca.

Argenzio et al. (1974) comprovaram que na regulação da homeostase do Ca e P, excesso de P e baixo Ca na dieta, levaram a hipersecreção da glândula paratireóide com aumento da reabsorção óssea podendo induzir generalizada descalcificação osteodistrófica e aparecimento do Hiperparatiroidismo Nutricional Secundário, quando perdurarem alto teor de P associado ao baixo de Ca na dieta. Caple et al. (1982) conferiram ao tempo de 72 h o que melhor reflete desequilíbrios. Van Doorn (2004) não encontraram influência de teores aumentados de Ca na dieta sobre a absorção do P, uma vez que os principais sítios de absorção de P são a segunda metade do intestino delgado, colo dorsal e pequeno colo, mas situação contrária sim, o que torna o cavalo ainda mais vulnerável ao excesso de P na dieta.

As médias de Ca (mg/dL) na urina entre tempos do tratamento B variaram de 2,57 mg (72 h) a 11,43 mg Ca/dL (96 h) na urina, representando decréscimo ($P < 0,01$) de 91,60% e 63,40%, respectivamente, em relação à média de 31,23 mg Ca/dL (grupo B, 0 h) na urina. Parâmetros semelhantes de excreção de Ca na urina foram testemunhados por Schryver et al. (1970a) ao reportarem que em pôneis em crescimento os teores crescentes de Ca de 0,15% (baixo), 0,80% (intermediário) e 1,50% (alto) na dieta determinaram médias de excreção urinária proporcionalmente crescente a quantia de Ca ingerida, respectivamente, de 5,5 mg, 63 mg e 99 mg/kg PV/dia de excreção. Van Doorn et al. (2004) relataram a excreção urinária de Ca variável de 26,7% (alto P) a 46,1% (baixo P) da média acima de 69 g/dia de Ca ingerido. Nesta pesquisa, entre tratamentos, as proporções de Ca na ração e na urina mostraram regressão linear significativa: $Y = 0,8216X + 10,7890$ e $R^2 = 0,9179$, evidenciando que maiores excreções (grupos A e D) de Ca e menores excreções (grupos B e C) de Ca na urina.

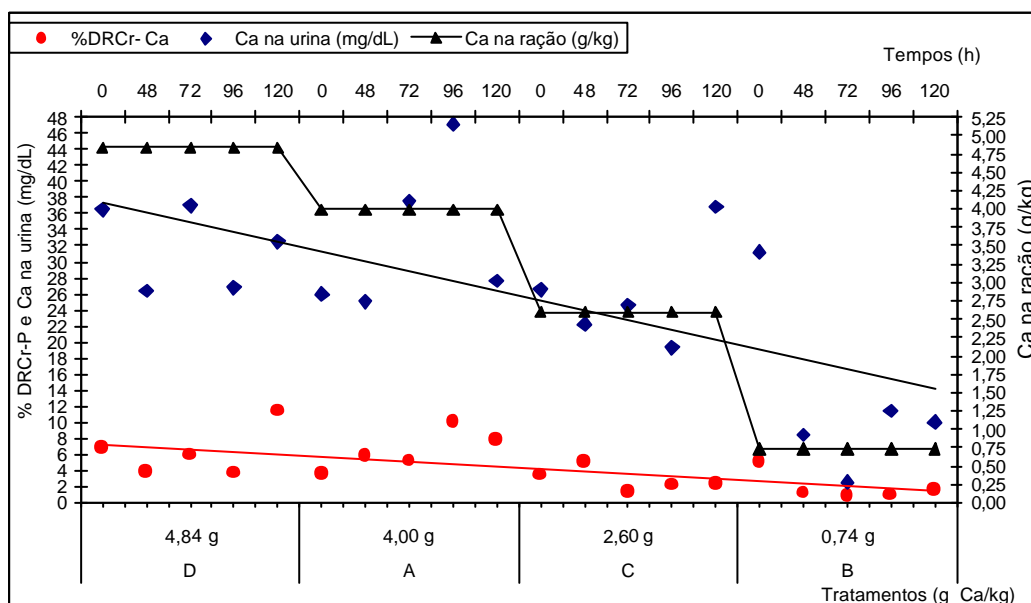


Figura 1 – Médias do % DRCr- Ca e de Ca na urina (mg/dL) nos tempos de 0, 48, 72, 96 e 120 horas segundo os tratamentos estudados

A dieta do grupo C continha 2,6 g Ca/kg da ração e entre tempos apresentou menor média de 1,43% (72 h) para % DRCr- Ca, sendo menor que as médias dos tratamentos A (Ca normal - 4 g Ca/Kg ração) e D (Ca alto - 4,84 g Ca/kg ração). Segundo Argenzio et al. (1974) anomalias ósseas clínicas e subclínicas resultantes de desequilíbrio de Ca na dieta podem levar animais a desenvolverem glomerulonefrite e nefrite intersticial e, se persistirem hipocalcemia e hiperfosfatemia, o quadro pode evoluir para insuficiência renal crônica nas quais é evidente a incapacidade dos rins para manutenção da homeostase do Ca e P.

Conclusões

O % DRCr- Ca é índice que detectou com eficiência no tempo quando a dieta de eqüinos foi extremamente deficiente em Ca, sendo que a partir de 48 h ou 72 h é possível averiguar no tempo o status mineral e metabólico do Ca em eqüinos. Eqüinos alimentados com alto Ca na ração no tratamento D excretaram mais Ca na urina no tempo quando comparados a animais com dieta pobre em Ca no tratamentos B e C. Animais com 3,50% provinham de dieta com níveis normais de Ca e foram considerados o valor mínimo para o % DRCr- Ca.

Referências Bibliográficas

- ARGENZIO, R.A.; LOWE, J.E.; HINTZ, H.F. Calcium and phosphorus homeostasia in horses. **J. Nutr.**, v.104, n.1, p. 18-27, 1974.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 11.ed. 1970. 1015p.
- CAPLE, I.W.; DOAKE, P.A.; ELLIS, P.G. Assessment of the calcium and phosphorus nutrition in horses by analysis of urine. **Aust. Vet. J.**, v.58, n.4, p.125-31, 1982.
- GANS, J.H.; MERCER, P.F. In: SWENSON, M.J. (Ed.). **Duke's Physiology of domestic animals. The kidneys**. Corn. Univ. Press Ltd., Tenth ed., 1984. p. 507-536.
- KNUDSEN, E. Renal clearance studies on the horse. I: inulin, endogenous creatinine and urea. **Acta Vet. Scand.**, v.1, p.52-66, 1959.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of horses**. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1978. 33p.
- SAS Institute. SAS[®]/ STAT. **User's Guide**: statistical version. SAS Institute, 1994.
- SCHRYVER, H.F.; CRAIG, P.H.; HINTZ, H.F. Calcium metabolism in ponies fed varying levels of calcium. **J. Nutr.**, v.100, n.8, p.955-964, 1970 a.
- SCHRYVER, H.F.; CRAIG, P.H.; HINTZ, H.F. et al. The site of calcium absorption in the horse. **J. Nutr.**, v.100, n.10, p.1127-1132, 1970 b.
- SCHRYVER, H.F.; HINTZ, H.F.; LOWE, J.E. Calcium and phosphorus in the nutrition of the horse. **Corn. Vet.**, v.64, n.4, p.493-515, 1974 a.
- TRAVER, D.S.; COFFMAN, J.R.; MOORE, J.N. et al. Urine clearance ratios as diagnostic acid in equine metabolic disease. In: **Proc. Am. Assoc. Eq. Pract.**..., v.22, p.177-183, 1976.
- WASSERMAN, R.H. In: SWENSON, M.J. (Ed.). **Duke's physiology of domestic animals. Bones**. 10. ed. Ithaca, Cornell University Press, 1984. p. 467-485.
- VAN DOORN, D.A.; EVERTS, H.; WOUTERSE, H.; BEYNEN, A.C. The apparent digestibility of phytate phosphorus and the influence of supplemental phytase in horses. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.1756-1763, 2004.