

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS EM
RATOS WISTAR EXPOSTOS À AMÔNIA POR INALAÇÃO**

Dissertação de Mestrado

Lorena Floriani Orlandini

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS EM
RATOS WISTAR EXPOSTOS À AMÔNIA POR INALAÇÃO**

Lorena Floriani Orlandini

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. André Silva Carissimi

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Orlandini, Lorena Floriani

Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar expostos à amônia por inalação / Lorena Floriani Orlandini. -- 2012.

66 f.

Orientador: André Silva Carissimi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Amônia. 2. Inalação. 3. Ratos Wistar. 4. Bioquímica. 5. Hematologia. I. Carissimi, André Silva, orient. II. Título.

Lorena Floriani Orlandini

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS EM
RATOS WISTAR EXPOSTOS À AMÔNIA POR INALAÇÃO**

APROVADA POR:

Prof. Dr. André Silva Carissimi
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^a. Dra. Carla Dalmaz, UFRGS
Membro da Comissão

Dra. Luisa Macedo Gomes de Braga, PUCRS
Membro da Comissão

Dra. Patrícia Sesterheim, UFRGS
Membro da Comissão

Porto Alegre, 30 de abril de 2012.

RESUMO

Embora a importância do controle dos níveis de amônia em biotérios seja reconhecida há muitos anos e várias consequências da exposição por inalação em espécies convencionais de laboratório sobre o trato respiratório tenham sido descritas na literatura, existem poucos estudos que avaliaram os efeitos sistêmicos e subclínicos nos animais. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil hematológico e bioquímico em ratos Wistar alojados sob condições ambientais adversas (*ammonia build-up*) com tempo de permanência de 5 (Grupo 1, n=20), 10 (Grupo 2, n=20) ou 15 dias (Grupo 3, n=20). A elevação dos níveis de poluentes no ambiente de alojamento experimental foi obtida através da redução da taxa de ventilação e da colocação de maravalha servida, de forma a alcançar-se uma concentração média aproximada de 90 ppm de amônia, variando de 76 a 106 ppm. A análise hematológica revelou que os animais do Grupo 1 apresentaram valores de hemoglobina e hematócrito significativamente maiores em relação todos os outros grupos. Com relação aos parâmetros bioquímicos, novamente observou-se que o Grupo 1 diferiu estatisticamente do Grupo Controle, do Grupo 2 e do Grupo 3 para creatinina e para gama-glutamyltransferase. Diferenças entre o Grupo 1 e os demais grupos experimentais foram encontradas para fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, amilase e glicose. Os demais parâmetros apresentaram resultados variáveis e aparentemente inconclusivos. Concluindo, a análise dos resultados indica que a maioria das alterações no perfil hematológico e bioquímico de animais expostos ocorre entre o dia 0 e o dia 5 e posteriormente retorna aos valores basais, devido a uma possível resposta adaptativa ao aumento da concentração de amônia atmosférica no ambiente de alojamento.

Palavras-chave: Amônia. Inalação. Ratos Wistar. Bioquímica. Hematologia.

ABSTRACT

Although the importance of controlling the levels of ammonia in animal facilities has been acknowledged for many years now, and several consequences of exposure by inhalation in conventional laboratory species on the respiratory tract have been described in the literature, there are few studies assessing the systemic and subclinical effects on animals. This study aimed at assessing the hematological and biochemical profile in Wistar rats housed under adverse environmental conditions (ammonia build-up) with stay time of 5 (Group 1, n=20), 10 (Group 2, n=20) or 15 days (Group 3, n=20). The increase in the levels of pollutants in the experimental environment housing was achieved by reducing the rate of ventilation and the placement of soiled bedding served, in order to achieve an average concentration of ammonia of approximately 90 ppm, ranging from 76 to 106 ppm. The hematological analysis revealed that animals in Group 1 had hemoglobin and hematocrit values significantly higher than all other groups. Concerning the biochemical parameters, once again it was observed that Group 1 differed statically from the Control Group, Group 2 and Group 3 regarding creatinine and gamma-glutamyltransferase. Differences between Group 1 and the other experimental groups were found regarding alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, amylase and glucose. The other parameters showed variable results, apparently inconclusive. In conclusion, the analysis of the results indicates that most changes in the hematological and biochemical profile of the animals exposed occur between day 0 and day 5, and then return to baseline, in reason of a possible adaptive response to the increase of atmospheric ammonia concentration in the environment housing.

Keywords: Ammonia. Inhalation. Wistar rats. Biochemistry. Hematology.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Amônia em biotérios	17
3.2 Efeitos da amônia em animais de laboratório	19
3.3 Parâmetros bioquímicos e hematológicos na experimentação animal	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Animais	28
4.2 Alojamento e manutenção	28
4.3 Obtenção, controle e mensuração de amônia	29
4.4 Grupos experimentais	30
4.5 Coleta, processamento e análise das amostras	30
4.5.1 Parâmetros bioquímicos	30
4.5.2 Parâmetros hematológicos	31
4.6 Análises estatísticas	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Temperatura, Umidade e Concentração de Amônia	33
5.2 Peso (Massa corporal)	34

5.3 Parâmetros bioquímicos.....	36
5.4 Parâmetros hematológicos	46
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores de referência de parâmetros bioquímicos em ratos Wistar machos adultos.....	26
TABELA 2 – Valores de referência de parâmetros hematológicos em ratos Wistar machos adultos.....	27
TABELA 3 – Massa corporal em gramas de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia.....	34
TABELA 4 – Média da variação percentual de peso corporal de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia.....	35
TABELA 5 – Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia.....	38
TABELA 6 – Parâmetros hematológicos de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Concentração de amônia nas salas de alojamento dos grupos experimentais.....	33
FIGURA 2 – Peso médio em gramas dos animais do Grupo Controle e dos grupos experimentais.....	35
FIGURA 3 – Dosagem sérica de fosfatase alcalina (FAL) em U/L.....	39
FIGURA 4 – Dosagem plasmática de alanina aminotransferase (ALT) em U/L.....	40
FIGURA 5 – Dosagem plasmática de aspartato aminotransferase (AST) em U/L.....	40
FIGURA 6 – Dosagem sérica de amilase em U/L.....	41
FIGURA 7 – Dosagem plasmática de creatinina em mg/dL.....	41
FIGURA 8 – Dosagem sérica de creatina cinase (CK) em U/L.....	42
FIGURA 9 – Dosagem plasmática de glicose em mg/dL.....	42
FIGURA 10 – Dosagem plasmática de gama-glutamilttransferase (GGT) em U/L.....	43
FIGURA 11 – Dosagem sérica de lactato desidrogenase (LDH) em U/L.....	43

FIGURA 12 – Dosagem plasmática de ureia em mg/dL.....	44
FIGURA 13 – Dosagem sérica de proteínas totais em g/L.....	44
FIGURA 14 – Dosagem sérica de albumina em g/L.....	45
FIGURA 15 – Dosagem sérica de globulinas em g/L.....	45
FIGURA 16 – Contagem de leucócitos totais por mL.....	46
FIGURA 17 – Contagem de eritrócitos $\times 10^6$ por mL.....	48
FIGURA 18 – Concentração de hemoglobina (HGB) em g/dL.....	49
FIGURA 19 – Valores de hematócrito (HCT) (%).....	49
FIGURA 20 – Contagem de plaquetas $\times 10^3$ /mL.....	50
FIGURA 21 – Volume corpuscular médio (VCM) em fL.....	50
FIGURA 22 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AALAS – *American Association for Laboratory Animal Science*

ACGIH – *American Conference of Industrial Hygienists*

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

ATSDR – *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

cels – células

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CK – creatina cinase

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

dL – decilitro

EDTA – ácido etilenodiamino-tetracético

FAL – fosfatase alcalina

fL – fentolitros

g – gramas

G0 – Grupo Controle

G1 – Grupo 1

G2 – Grupo 2

G3 – Grupo 3

GGT – gama-glutamiltransferase

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IER – *Institute for Environmental Research*

IFCC – *International Federation of Clinical Chemistry*

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

ILAR – *Institute for Laboratory Animal Research*

IPCS – *International Programme on Chemical Safety*

IVC – *Individually Ventilated Cage*

L – litro

LACVET – Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias

LC50 – Concentração letal para 50% dos indivíduos

LDH – lactato desidrogenase

LOAEL – *Lowest Observed Adverse Effect Level*

mg – miligrama

mL – mililitro

μL – microlitro

mm - milímetro

mmol – milimol

μmol – micromol

NH₃ – amônia

NH₄⁺ – íon amônio

NOAEL – *No Observed Adverse Effect Level*

NRC – *National Research Council*

OECD – *Organisation for Economic Co-Operation and Development*

pH - potencial

PIV – *Positive Individually Ventilation*

ppm – partes por milhão

RD50 – Concentração que determina a redução de 50% na frequência respiratória

U – unidade

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VCM – volume corpuscular médio

WHO – *World Health Organization*

1 INTRODUÇÃO

Na ciência em animais de laboratório, práticas de alojamento e manejo adequadas devem ser adotadas a fim de garantir uma metodologia científica que permita a validação dos resultados obtidos. Nesse contexto, especial importância é dada à padronização e ao controle das variáveis no ambiente de alojamento, uma vez que estariam diretamente relacionados à confiabilidade e à reprodutibilidade dos ensaios experimentais. Em geral, variações em fatores como temperatura, umidade, ventilação, ruído e iluminação podem causar desequilíbrio na homeostase e induzir mudanças nos processos metabólicos e fisiológicos, que conseqüentemente poderiam alterar a resposta de um animal em experimentação (LANG; VESELL, 1976; CLOUGH, 1982; LIPMAN, 1992; AALAS, 2008).

Apesar de sua importância, a influência das variáveis ambientais sobre os resultados é muitas vezes ignorada ou subestimada pelos pesquisadores (DAVIS *et al.*, 1973; LANG; VESELL, 1976; CLOUGH, 1982). Em publicações científicas, o ambiente físico é, em geral, descrito sumariamente, dificultando ou inviabilizando a reprodução dos experimentos de maneira adequada. A maioria dos autores descreve cuidadosamente os instrumentos e reagentes químicos, contudo é evidente escassez de informações sobre os animais e sobre o ambiente de alojamento (CLAASSEN, 1994; ÖBRINK; REHBINDER, 2000). De acordo com Clough (1982), a capacidade de resposta dos animais em experimentação é influenciada pelas condições ambientais de forma muito mais intensa do que o pensado por muitos investigadores. Muitas vezes, há necessidade de repetir-se experimentos simplesmente porque foram mal descritos. Isso representa desperdício de tempo e recursos e, muito mais importante, envolve a utilização de mais animais, o que é completamente injustificado por razões éticas.

Um exemplo de fator ambiental que interfere na resposta dos animais é a taxa de renovação de ar no interior das salas. É sabido que a ventilação inadequada ou insuficiente tem como principal resultado o acúmulo de gases e vapores liberados como produtos resultantes do metabolismo. Entre esses produtos, a amônia é reconhecidamente o contaminante gasoso potencialmente tóxico mais comum em biotérios. Outros gases poluentes que podem ser encontrados incluem o dióxido de carbono, o metano, o ácido acético, o ácido sulfídrico e dióxido sulfúrico, porém, aparentemente com pouca importância sobre a saúde dos animais (SERRANO, 1971; BRIEL; KRUCKENBERG; BESCH, 1972 *apud* FAITH; HESSLER, 2006; FAITH; HUERKAMP, 2009).

A grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre as consequências da exposição à amônia por inalação foi realizada há bastante tempo e, em geral, limita-se a análise dos efeitos locais sobre os olhos e o sistema respiratório (IPCS/WHO, 1986). Sabe-se que a amônia pode ser absorvida e causar alterações sistêmicas, a exemplo daquelas já descritas na literatura (WEATHERBY, 1952 *apud* IPCS/WHO, 1986; COON *et al.* 1970; PROKOPEVA *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986; VESELL *et al.*, 1973; RICHARD; BOULEY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986; RICHARD; JOUARY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986; SCHOEB; DAVIDSON; LINDSEY, 1982; SCHAERDEL *et al.*, 1983; TARGOWSKI *et al.*, 1984; MANNINEN; ANTTILA; SAVOLAINEN, 1988).

Poucos estudos analisaram parâmetros bioquímicos ou hematológicos em espécies convencionais de laboratório submetidas à exposição inalatória de amônia. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da exposição controlada de amônia sobre tais parâmetros em ratos Wistar mantidos em sistema de gaiola aberta sob condições sanitárias convencionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da exposição de ratos Wistar à condições ambientais com elevada concentração de amônia sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Criar uma condição desfavorável no ambiente de alojamento dos animais, resultante da elevação de produtos oriundos da excreção dos próprios animais, com especial referência à amônia atmosférica;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos nos animais;
- Identificar possíveis alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos ratos expostos;
- Estudar o efeito de diferentes tempos de exposição (cinco, dez ou quinze dias) sobre estas alterações.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Amônia em biotérios

Em sistemas de criação e alojamento de animais de laboratório, gases e vapores potencialmente nocivos originados a partir de produtos do metabolismo dos animais podem acumular-se quando a ventilação é insuficiente (SERRANO, 1971; WU; JOINER; McFARLAND, 1985; KELLER *et al.*, 1989; FAITH; HUERKAMP, 2009). De acordo com Carissimi (1999), iniciou-se na década de 40, a conscientização da importância e a introdução de sistemas de ventilação em salas de animais de laboratório, com base nos princípios de ventilação para o conforto humano. Há décadas, a amônia tem sido descrita como o principal produto capaz de produzir toxicidade sistêmica nos animais (WEATHERBY, 1952 *apud* IPCS/WHO, 1986; BRIEL; KRUCKENBERG; BESCH, 1972 *apud* FAITH; HESSLER, 2006; VESELL *et al.*, 1973; APPELMAN; BERGE; REUZEL, 1982; KAPEGHIAN *et al.*, 1982). Além da taxa de ventilação, os níveis de amônia também estão associados a múltiplos fatores, tais como temperatura, umidade relativa, frequência de limpeza das gaiolas, densidade de ocupação, espécie animal, volume e constituição do material da cama (REEB *et al.* 1998; REEB-WHITAKER *et al.*, 2001; FAITH; HESSLER, 2006; ROSENBAUM; VANDEWOUDE; JOHNSON, 2009).

A amônia (NH_3) é um gás incolor, alcalino e corrosivo de odor acre característico; com limiar de detecção do odor para humanos de aproximadamente 5 partes por milhão (ppm) (IPCS/WHO, 1986; ATSDR, 2006). Sua produção ocorre a partir da hidrólise de uréia pela ação das bactérias urease positivas presentes nas fezes e na urina dos animais. Por esta razão, normalmente a produção de amônia segue a curva de crescimento bacteriano em função do substrato disponível e das condições de calor e umidade ideais de crescimento

(SERRANO, 1971; GAMBLE; CLOUGH, 1976). O equilíbrio entre as formas ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3) é dependente do pH e da temperatura, sendo a forma ionizada predominante em pH fisiológico. A distribuição de amônia entre os compartimentos do organismo também é fortemente influenciada pelo pH. Em pH mais elevado, a amônia apresenta-se, em forma gasosa, como uma molécula relativamente lipofílica (NH_3), que facilmente atravessa as membranas celulares e intracelulares. A amônia não ionizada difunde-se livremente, enquanto o íon amônio difunde-se com menor facilidade (IPCS/WHO, 1986; ATSDR, 2006). De acordo com Gamble e Clough (1976), uma vez que pequenas variações no pH causam aumentos significativos de NH_3 , a intoxicação por amônia pode ocorrer sem uma grande mudança na concentração de amônia total.

As faixas toleráveis e os níveis máximos de exposição não estão disponíveis para os roedores de laboratório: “a concentração de amônia deve ser mantida tão baixa quanto possível” (KOOLHAAS, 2010). As recomendações para a ventilação em biotérios são baseadas na necessidade de manter a amônia em concentrações aceitáveis, e os limites de exposição para humanos recomendados pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) (25 ppm para uma jornada de trabalho diária de 8h, 5 dias por semana) são normalmente adotados em sistemas de criação e experimentação. Assim, os complexos mecanismos fisiológicos pelos quais os roedores de laboratório sentem e percebem o ambiente são normalmente ignorados para determinar e promover condições ideais de alojamento (GREEN *et al.*, 2008).

De acordo com Studier e Baca (1968), considerando que roedores selvagens estão adaptados à vida em ambientes pouco ventilados, é possível que esses animais possam tolerar concentrações consideravelmente maiores em biotérios. Green *et al.* (2008), não observaram manifestações de preferência ou aversão em camundongos, quando dada a opção de habitar locais com diferentes concentrações de amônia, variando de 4 a 116 ppm, sugerindo uma

tolerância relativamente alta para amônia ambiental. Esse estudo demonstrou que os animais preferiam permanecer nos níveis superiores, apesar da presença de amônia numa concentração igual ou superior ao limite atualmente recomendado de exposição de 25 ppm.

Sabe-se que a amônia atmosférica pode ser absorvida a partir do trato respiratório (SCHOEB; DAVIDSON; LINDSEY, 1982; SCHAERDEL *et al.*, 1983; MANNINEN; ANTTILA; SAVOLAINEN, 1988). O principal local de absorção é o trato respiratório superior. No entanto, em condições de alta umidade, a amônia pode ser adsorvida pelos aerossóis e ser levada mais profundamente aos pulmões (SCHOEB; DAVIDSON; LINDSEY, 1982). Segundo Manninen, Anttila e Savolainen (1988), em exposições por inalação de 25 ppm ou 300 ppm, durante 5 dias, 6 horas por dia, a amônia do sangue venoso em ratos aumentou de forma linear e demonstrou uma relação dose-dependente. Todavia, após 10 e 15 dias, a relação entre a concentração atmosférica e nível de amônia no sangue foi perdida. Schaerdel *et al.* (1983) mediram a concentração de amônia 8, 12 e 24 horas depois do início da exposição a concentrações de 15, 32, 310 ou 1.157 ppm, e também observaram um aumento significativo após 8 horas. Nesse estudo, os níveis sanguíneos diminuíram após 12 e 24 horas, indicando um aumento do metabolismo de amônia.

Após absorvida, a amônia é metabolizada à glutamina como principal produto inicial e frações menores de glutamato e aspartato. A síntese de glutamina é a rota mais importante na detoxicação da amônia (COOPER; LAI, 1987).

3.2 Efeitos da amônia em animais de laboratório

Os efeitos da amônia em animais de laboratório não estão claramente elucidados na literatura (ROSENBAUM; VANDEWOUDE; JOHNSON, 2009), contudo, sabe-se que a principal via de exposição é o trato respiratório, onde ocorrem os efeitos tóxicos mais

comuns. Em atmosferas com altas concentrações de amônia, irritação dérmica e ocular também podem ocorrer. A gravidade e a extensão dos efeitos nos animais estão relacionadas tanto à concentração quanto à duração da exposição. A dose máxima em que não são observados efeitos (NOAEL – *No Observed Adverse Effect Level*), a menor concentração que determina o aparecimento dos primeiros sinais de toxicidade (LOAEL – *Lowest Observed Adverse Effect Level*), bem como os níveis que determinam a redução de 50% na frequência respiratória (RD50) e a dose letal para 50% dos animais (LC50), também estão relacionados ao tempo de exposição (PROKOP'EVA *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986; BARROW; ALARIE; STOCK, 1978; RICHARD; BOULEY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986; RICHARD; JOUARY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986; APPELMAN; BERGE; REUZEL, 1982; KAPEGHIAN *et al.*, 1982).

Em roedores, os efeitos mais comumente descritos na literatura após curtos períodos de exposição incluem irritação das vias aéreas superiores, diminuição da frequência respiratória, profundidade respiratória aumentada e redução no peso corporal. Exposições por períodos mais prolongados e/ou a concentrações elevadas geralmente resultam em lesões no trato respiratório superior e inferior e nos capilares alveolares (BRODERSON; LINDSEY; CRAWFORD, 1976; GAMBLE; CLOUGH, 1976; BARROW; ALARIE; STOCK, 1978; COON *et al.*, 1970; RICHARD; BOULEY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986; RICHARD; JOUARY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986).

Alterações no movimento ciliar da traqueia (ciliostase) foram descritas por Dalhman, (1956, *apud* SERRANO, 1971) em ratos expostos a 10 ppm de amônia. Contudo, Coon *et al.* (1970) não notaram quaisquer sinais de toxicidade durante a exposição contínua de ratos Sprague-Dawley e Long-Evans a 57 ppm de amônia por 114 dias ou a 182 ppm por 90 dias. Nesse estudo, os primeiros efeitos concretos só foram relatados a 376 ppm, quando se notou leve corrimento nasal em 25% dos animais expostos. A 653 ppm, todos os ratos apresentaram

dispnéia e irritação nasal, e a microscopia revelou alterações patológicas pulmonares. Alpatov e Mikhailov (1963, *apud* IPCS/WHO, 1986) também não observaram sinais de toxicidade a até 57 ppm (*threshold level*) em ratos albinos expostos durante dois meses e descreveram alterações histológicas pulmonares a partir de 143 ppm. Outros pesquisadores não encontraram qualquer alteração após uma única exposição de ratos albinos a 143 ppm por 60 minutos (PROKOPEVA *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986).

Os achados histopatológicos descritos por Broderon, Lindsey e Crawford (1976) no epitélio olfativo e respiratório de ratos Sherman e Fischer expostos continuamente a fontes naturais de amônia a uma concentração média de 150 ppm, por 75 dias, ou expostos a 250 ppm de amônia purificada três horas por dia, durante 35 dias, limitaram-se a cavidade nasal. Em exposições a concentrações variando de 150 a 300 ppm, outros pesquisadores a observaram alterações no epitélio da cavidade nasal e perda progressiva de cílios, estratificação e aumento da espessura no epitélio da traquéia de ratos e camundongos, com formação de um exsudado mucogelatinoso (GAMBLE; CLOUGH, 1976; BUCKLEY *et al.*, 1984). Richard, Bouley e Boudene (1978 *apud* IPCS/WHO, 1986) relataram sinais de irritação nasal em ratos expostos a concentrações de 250 a 300 ppm a partir do 4º dia de exposição; após 3 semanas, sinais de inflamação no trato respiratório superior e inferior (bronquíolos e alvéolos) foram também observados. Em camundongos, 711 ppm foi relatada como a concentração mínima em que são observadas alterações histopatológicas nas vias respiratórias superiores, após exposições repetidas por via inalatória, 6 horas por dia, durante 4 dias. Nenhuma lesão na traqueia ou pulmões foi encontrada a esse nível de exposição (ZISSU, 1995).

Curiosamente, Silverman *et al.* (2008), comparando níveis de amônia e dióxido de carbono por 9 dias em gaiolas reutilizáveis e recicláveis de camundongos, encontraram concentrações de amônia ocasionalmente maiores que 25 ppm e, em alguns casos, maiores do

que 150 ppm, e não notaram qualquer sinal de irritação ou toxicidade (espirros, “*sneezing*”, olhos ou nariz vermelhos ou alterações nos padrões de comportamento) durante o monitoramento dos animais. Li e Pauluhn (2010), estudando os efeitos da amônia em atmosferas secas e úmidas, não identificaram comportamentos aversivos em ratos Wistar e camundongos expostos a concentrações de até 571 ppm por 45 min, concluindo que esta exposição não é suficientemente agressiva para levar a fuga como resultado da irritação das vias aéreas superiores. Os animais de todos os grupos toleraram exposições de 132 ppm a 1.785 ppm sem evidências de irritação do trato respiratório ou alterações no peso corporal e pulmonar.

No mesmo estudo, a concentração de amônia que resultou em diminuição de 50% na frequência respiratória (RD50) nos ratos variou de 1.300 ppm, em atmosfera úmida, a 1.395 ppm, em atmosfera seca. Camundongos demonstraram ser mais suscetíveis à amônia em atmosferas secas, com níveis de amônia para RD₅₀ variando de 835 ppm a 1.051 ppm (LI; PAULUHN, 2010). Para Zissu (1995) a redução de 50% na frequência respiratória de camundongos ocorreu a 257 ppm, após 15 minutos de exposição. Em outro experimento, o RD₅₀ para camundongos Swiss-Webster expostos à inalação de amônia durante 30 minutos, em concentrações variando de 100 a 800 ppm, foi de 303 ppm, com a máxima redução da frequência respiratória em cada nível de exposição ocorrendo durante os dois primeiros minutos (BARROW; ALARIE; STOCK, 1978).

A concentração na qual ocorre a mortalidade de 50% dos indivíduos (LC50) encontrada por Appelman, Berge e Reuzel (1982), em ratos Wistar machos e fêmeas, foi de 40.300 ppm para uma exposição de 10 minutos e 16.600 ppm para uma exposição de 60 minutos. Em outro artigo publicado no mesmo ano, camundongos foram expostos durante uma hora a diferentes concentrações e observados por duas semanas. O nível de 4.230 ppm foi considerado letal para 50% dos indivíduos (KAPEGHIAN *et al.*, 1982). Durante a

exposição a concentrações letais, sinais de agitação, irritação ocular, descarga nasal, dispnéia excitação, coma e morte são geralmente relatados e os exames post-mortem dos animais revelam pulmões congestos e hemorrágicos (APPELMAN; BERGE; REUZEL, 1982; KAPEGHIAN *et al.*, 1982). Coon *et al.* (1970) registraram mortalidade de mais de 50% do animais após a exposição contínua à amônia a 653 ppm durante 25 dias.

Toxicidade ocular associada à exposição de roedores e lagomorfos à amônia também foi relatada. Van Winkle e Balk (1986) sugeriram que a amônia seria um fator importante na patogênese de opacidade córnea espontânea em camundongos, ao observarem que o aumento na frequência de limpeza das gaiolas reduzia a incidência dessa lesão a um nível muito baixo. Coelhos, após 24 de exposição, apresentaram diversas alterações oftálmicas, incluindo edema da conjuntiva, inflamação, e opacidade do cristalino (NRC, 1979 *apud* IPCS/WHO, 1986).

Além da toxicidade local sobre o trato respiratório e olhos, alguns efeitos sistêmicos causados pela exposição à inalação de amônia já foram relatados em animais de laboratório. Alterações na glicemia, na concentração de proteínas totais, na contagem de leucócitos, no consumo de oxigênio, redução do tônus muscular e do tempo de latência do reflexo (PROKOP'eva *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986); aumento da glutamina sanguínea e cerebral, alterações no equilíbrio ácido básico e na concentração de citrulina hepática (MANNINEN; ANTTILA; SAVOLAINEN, 1988) e na atividade de enzimas hepáticas (VESELL *et al.*, 1973) estão descritos na literatura. Alterações cardiovasculares e acidose metabólica, foram observadas em coelhos expostos a concentrações acima de 2.500 ppm de amônia por uma hora (RICHARD; JOUARY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986). Coon *et al.* (1970) relataram calcificação dos túbulos renais, fibrose do miocárdio e alterações hepáticas gordurosas a concentrações de aproximadamente 675 ppm. Em um ensaio realizado em cobaias, exposições a níveis de 140 a 200 ppm de amônia durante 6 horas por dia, 5 dias

por semana, resultaram em alterações no fígado, baço, rins e glândulas supra-renais (WEATHERBY, 1952 *apud* IPCS/WHO, 1986).

De acordo com outros pesquisadores, a amônia pode ainda afetar o sistema imunológico. A exposição de ratos e camundongos à amônia a concentrações de 25 a 250 ppm por uma semana, seguida de exposição à *Pasteurella multocida* e à *Mycoplasma pulmonis*, aumentou significativamente a mortalidade do grupo exposto em relação ao grupo controle (RICHARD; BOULEY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986). Um aumento significativo da gravidade dos sinais respiratórios característicos de micoplasmose respiratória murina foi observada em ratos expostos a 25 ppm de amônia por 4 a 6 semanas após a inoculação intranasal de *Mycoplasma pulmonis* (BRODERSON; LINDSEY; CRAWFORD, 1976). Schoeb, Davidson e Lindsey (1982) demonstraram um maior crescimento de *Mycoplasma* sp. nas vias aéreas superiores e inferiores de ratos submetidos a inalação de 100 ppm de amônia, quando comparado ao grupo controle (menor ou igual a 2 ppm). Aumentos de IgG e IgM também foram observados e o maior crescimento do microorganismo nos tecidos foi atribuído pelos autores a efeitos indiretos da amônia no hospedeiro (SCHOEB; DAVIDSON; LINDSEY, 1982). Cobaias expostos a 90 ppm por três semanas desenvolveram uma diminuição significativa na resposta imune celular (TARGOWSKI *et al.*, 1984).

3.3 Parâmetros bioquímicos e hematológicos na experimentação animal

Dados obtidos a partir de ensaios pré-clínicos de toxicidade devem ser avaliados antes da liberação de novos medicamentos, aditivos, pesticidas e outros produtos químicos. Alterações de parâmetros em modelos experimentais podem estar relacionadas aos efeitos terapêuticos e/ou toxicológicos. Entre esses parâmetros, os valores bioquímicos e hematológicos são de grande importância na determinação dos efeitos induzidos pelo

tratamento. Os resultados obtidos são comparados aos de grupos controle ou aos valores de referência da literatura e são essenciais para a interpretação (PETTERINO; ARGENTINO-STORINO, 2006).

Um dos modelos mais comumente utilizados em ensaios pré-clínicos é o rato Wistar, no entanto a disponibilidade de valores de referência para esta linhagem é limitada. Poucas publicações fornecem dados confiáveis: muitos estudos são antigos, avaliam um pequeno número animais ou de parâmetros, e a metodologia utilizada muitas vezes não é descrita. Finalmente, diversos estudos analisam amostras em *pool* de plasma, o que pode levar a valores de referência incorretos (LIBERATI; SANSONE; FEUSTON, 2004; BOEHM *et al.*, 2007). Na maioria dos casos, diferenças metodológicas – nos equipamentos e nas técnicas de análise utilizadas, e grande variação nos valores, dificultam ou impedem a comparação direta dos resultados (SOLBERG; STAMM, 1991; LIBERATI; SANSONE; FEUSTON, 2004). Valores bioquímicos e hematológicos de referência para ratos Wistar machos estão demonstrados na Tabela 1 e na Tabela 2 (ZHANG *et al.*, 2004; BOEHM *et al.*, 2007; HOOPER *et al.*, 2007a; HOOPER *et al.*, 2007b; CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008a; CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008b).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos e camundongos são influenciados por vários fatores, tais como local de coleta, idade, sexo, método de contenção, anestesia, e nível de estresse. O local de amostragem e a metodologia devem ser mantidos constantes para evitar possíveis variáveis (ZHANG *et al.*, 2004; PILNY, 2008; BOLLIGER *et al.*, 2010). Em roedores de laboratório, a coleta por exsanguinação mediante anestesia permite obtenção de maiores volumes, facilitando a análise das amostras, e pode ser realizada a partir da veia cava caudal, aorta, ou através de punção cardíaca (BOLLIGER *et al.*, 2010).

Tabela 1 – Valores de referência de parâmetros bioquímicos em ratos Wistar machos adultos

	Zhang <i>et al.</i> (2004) ^a			Boehm <i>et al.</i> (2007) ^b			Hooper <i>et al.</i> (2007a) ^c			Charles River Laboratories (2008a) ^d						
	2 meses		4 meses		10 a 12 semanas		“jovens”		“adultos”		56 a 70 dias					
	Unidade	N	Valor	N	Valor	Unidade	N	Valor	Unidade	N	Valor	N	Valor	Unidade	N	Valor
FAL	U/L	54	226±74,5	109	126,3±40,5	U/L	30	132 (65-193)	U/L	-	342±61,7	-	218,6±73,5	U/L	121	239.66±69.64
ALT	U/L	54	44,5±10,4	109	38,7±11,0	U/L	28	33 (24-49)	U/L	-	68,6±5,6	-	50,1±4,1	U/L	121	58.41±24.80
AST	U/L	54	129,2±29,4	109	121,7±31,0	U/L	28	66 (50-96)	U/L	-	156,8±59,5	-	135,6±35,6	U/L	121	142.54±124.36
Amilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	U/L	-	-
Creatinina	µmol/L	54	51,3±14,6	109	65,6±15,0	µmol/L	29	37 (31-48)	mg/dL	-	0,4±0,1	-	0,5±0,1	mg/dL	121	0.53±0.10
CK	-	-	-	-	-	U/L	29	435 (139-811)	U/L	-	814±307,4	-	571,7±325,8	U/L	-	-
Glicose	mmol/L	54	5,3±0,9	109	6,2±1,5	mmol/L	29	6.8 (5.1-9.2)	mg/dL	-	62,7±15,8	-	64,5±34,1	mg/dL	120	274.36±85.16
GGT	-	-	-	-	-	U/L	29	0	U/L	-	<0.2	-	<0.2	U/L	-	-
LDH	-	-	-	-	-	U/L	30	114 (83-298)	U/L	-	>3.500	-	>3.500	U/L	-	-
Ureia/BUN	mmol/L	54	6,1±1,2	109	6,7±1,5	mmol/L	30	7.0 (4.0-9.3)	mg/dL	-	36,6±5,9	-	44,4±7,1	mg/dL	121	20.60±5.67
Proteína total	g/L	54	64,2±5,3	109	64,6±6,5	g/dL	30	5 (4-6)	g/dL	-	6,2±0,5	-	6,1±1,4	g/dL	122	7.45±0.77
Albumina	g/L	54	39,9±2,8	109	37,5±4,2	-	-	-	g/dL	-	3,6±0,3	-	3,7±0,2	g/dL	121	3.87±0.36
Globulinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: a = Valores expressos em média ± desvio padrão. Coleta realizada via plexo retro orbital, após anestesia (mebumalnatrium), em jejum. Animais de 2 meses, peso de 180 a 220g. Animais de 4 meses, peso de 460 a 560. b = Valores expressos em mediana e intervalo de referência (percentis 2,5-97,5). Coleta realizada via aorta ou ventrículo esquerdo, após anestesia (tiopental, 100 mg/kg, i.p.), estado alimentar não informado. c = Valores expressos em média ± desvio padrão. Coleta realizada por punção cardíaca, após anestesia (dióxido de carbono), estado alimentar não informado. N total: 60 (lactentes, jovens e adultos). Idades não informadas. d = Valores expressos em média ± desvio padrão. Coleta realizada por punção cardíaca, método de anestesia não informado, em jejum. (-) = Dados não disponibilizados.

Fonte: ZHANG *et al.*, 2004; BOEHM *et al.*, 2007; HOOPER *et al.*, 2007a; CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008a.

Tabela 2 – Valores de referência de parâmetros hematológicos em ratos Wistar machos adultos

Hopper <i>et al.</i>^a				Charles River Laboratories^b		
(2007)				(2008b)		
Unidade		lactentes, jovens e adultos		Unidade	56 a 70 dias	
		N	Valor		N	Valor
leucócitos	x10 ³ cels/μL	-	65,1 ± 2,7	K/μL	122	9,45 ± 3,01
eritrócitos	x10 ⁶ cels/μL	-	7,6 ± 1,1	K/μL	122	7,72 ± 1,19
HGB	g/dL	-	15,1 ± 1,7	g/dL	122	17,19 ± 2,76
HCT	%	-	45,1 ± 6,2	%	122	50,58 ± 7,92
PLT	x10 ³ cels/μL	-	627 ± 215,6	K/μL	122	1815,40 ± 489,72
VCM	fL	-	60,3 ± 3,4	fL	122	65,60 ± 4,64
CHCM	g/dL	-	33,1 ± 0,8	g/dL	122	34,06 ± 2,16

Nota: a = Valores expressos em média ± desvio padrão. Coleta realizada por punção cardíaca, método de anestesia e estado alimentar não informados. N total: 50 (lactentes, jovens e adultos). Idades não informadas. b = Valores expressos em média ± desvio padrão. Coleta realizada por punção cardíaca, método de anestesia não informado, em jejum. (-) = Dados não disponibilizados.

Fonte: HOOPER *et al.*, 2007b; CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008b.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (nº. 19070) e segue os preceitos éticos e as diretrizes nacionais e internacionais para a utilização de animais de laboratório.

4.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos Wistar adultos, padrão sanitário convencional, com idade inicial de 90 dias, provenientes Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Com base nas recomendações do protocolo da *Organisation for Economic Co-Operation and Development* (OECD) para testes de exposição subcrônica por inalação (OECD, 2008), utilizou-se 20 animais por grupo totalizando de 80 indivíduos, considerando os três grupos experimentais e o Grupo Controle.

4.2 Alojamento e manutenção

Os animais foram alojados coletivamente, em grupos de três ou quatro ratos por gaiola, em duas salas destinadas à experimentação de roedores, onde permaneceram durante todo o período de estudo. As gaiolas foram aleatoriamente colocadas nas estantes e suas posições foram modificadas diariamente, após a observação dos animais. Foram utilizadas gaiolas constituídas de polipropileno, de dimensões 340 mm de largura x 490 mm de comprimento x 160 mm de altura, com tampa gradeada em aço inox e comedouro embutido

em “V”, contendo aproximadamente 3 cm de cama de maravalha de *Pinus* sp. previamente autoclavada. As gaiolas foram trocadas a cada 2 dias. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab CR1®) e receberam água *ad libitum* durante todo o período experimental. O fotoperíodo (12 horas claro e 12 horas escuro) foi obtido pela utilização de um aparelho tipo “timer” (Icel TI-12A®). A temperatura e a umidade foram medidas por um termo-higrômetro (Incoterm 7663.02.0.00®).

4.3 Obtenção, controle e mensuração de amônia

A elevação atmosférica de amônia foi alcançada através da redução da taxa de ventilação (trocas de ar / hora) e da colocação de maravalha servida, contendo urina e fezes de ratos machos adultos, em caixas dispostas na sala de alojamento. Esta metodologia foi desenvolvida com o objetivo de obterem-se concentrações elevadas de amônia atmosférica, originadas a partir do próprio metabolismo dos animais (fontes naturais) sem, contudo, interferir nas condições de umidade relativa no microambiente experimental.

Considerando as dimensões das salas e a vazão dos equipamentos de condicionamento e exaustão de ar, a taxa de ventilação calculada no ambiente de alojamento do Grupo Controle foi de 23,6 trocas de ar por hora e no ambiente de alojamento dos grupos experimentais, de 4,3 trocas de ar por hora. Cada indivíduo foi pesado imediatamente antes do início do experimento (dia 0) e a cada 5 dias. A concentração de amônia foi medida e registrada duas vezes ao dia, sempre nos mesmos horários (às 8h e às 18h), utilizando-se detector portátil (Dräger®), com sensibilidade de detecção de 0 a 300 ppm de amônia. A amostra de ar foi tomada a uma altura de 1 metro do chão, no ponto correspondente ao centro volumétrico da sala.

4.4 Grupos experimentais

Aproximadamente um terço dos animais do Grupo Controle (G0) foi mantido e analisado simultaneamente a cada um dos três grupos experimentais, nas condições de alojamento descritas no item 4.2. Os grupos experimentais foram alojados durante 5 (Grupo 1), 10 (Grupo 2) ou 15 dias (Grupo 3), nas mesmas condições do Grupo Controle, diferindo apenas na taxa de ventilação e na concentração ambiental de amônia atmosférica. Cada indivíduo foi pesado imediatamente antes do início do experimento (dia 0) e a cada 5 dias.

4.5 Coleta, processamento e análise das amostras

Ao final do período de exposição para cada grupo, os ratos foram anestesiados com a associação de cloridrato de xilazina 2% (Syntec®) (10mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (Syntec®) (75mg/kg) por via intraperitoneal. O sangue foi coletado a vácuo (Vacutainer®) através de punção cardíaca. Os procedimentos descritos acima foram realizados individualmente e em local isolado, a fim de evitar qualquer tipo de angústia ou estresse nos demais animais. Não foi realizado jejum prévio às coletas.

4.5.1 Parâmetros bioquímicos

Tubos de 4 mL com ativador de coágulo (CAT, BD®) foram utilizados na coleta de amostras para realização da maioria das análises bioquímicas, incluindo a concentração de proteínas totais, albumina e globulinas; e a atividade das enzimas creatina cinase (CK), fosfatase alcalina (FAL), amilase e lactato desidrogenase (LDH) no soro dos animais. Devido ao volume de sangue relativamente pequeno, a atividade das enzimas gama-

glutamiltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST); e as concentrações de creatinina, uréia e glicose (GLI) foram realizadas no plasma, obtido através da coleta em tubos de 2 mL contendo EDTA (ácido etilenodiamino-tetracético) K2 3,6 mg (BD®). As amostras sem anticoagulante foram deixadas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente previamente à centrifugação pra retenção completa do coágulo. Para obtenção de soro e plasma as amostras foram centrifugadas a 2500 RPM durante 10 minutos e 5 minutos, respectivamente.

Alíquotas foram acondicionadas em microtubos (Eppendorf®) e mantidas refrigeradas a 4°C ou congeladas a -20°C para posterior análise bioquímica no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET) da UFRGS. As análises foram realizadas por espectrofotometria, utilizando-se kits comerciais da Labtest, seguindo as recomendações do fabricante, em aparelho semiautomático (Metrolab DR 1600®, Wiener). A proteína total foi mensurada por refratometria.

4.5.2 Parâmetros hematológicos

Em todas as amostras também foi realizado o hemograma completo, onde foram determinados o hematócrito (HCT), a concentração de hemoglobina (HGB) e a contagem de plaquetas, eritrócitos e leucócitos totais. A partir dos resultados da contagem eritrocitária e do hematócrito, foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

As análises hematológicas foram realizadas no sangue total, obtido através da coleta em tubos de 2 mL contendo EDTA K2 3,6 mg (BD®). O hematócrito foi realizado por microcentrifugação durante 5 minutos a 10.000 RPM em centrífuga especial pra microhematócrito em tubos capilares não heparinizados. Para a determinação da HGB

utilizou-se o analisador hematológico automático (ABX Micros, ABC Vet Horiba).

4.6 Análises estatísticas

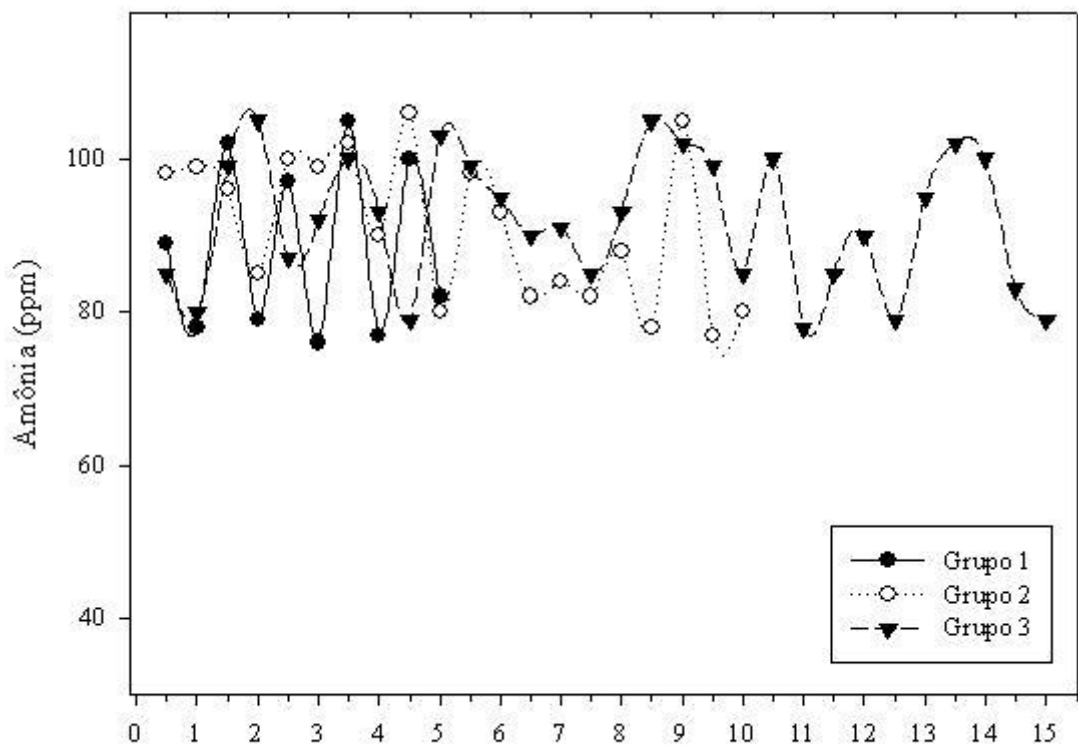
A análise estatística foi realizada utilizando o programa com SPSS 17.0 (SPSS Software, Inc., San Diego, EUA) para Windows. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade. Em parâmetros com distribuição normal, as amostras foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Na presença de diferenças significativas entre as médias, comparações foram feitas usando o teste *Tukey Honestly Significant Difference*. Para os parâmetros onde não se observou distribuição de Gauss, cada mediana foi comparada utilizando o teste *Kruskal-Wallis*, e na presença de diferenças significativas entre as medianas, os dados foram ranqueados e as médias foram comparadas pelo teste *Tukey Honestly Significant Difference*. Valores foram considerados significativos para $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Temperatura, Umidade e Concentração de Amônia

As medições diárias de amônia indicaram valores mínimos e máximos de 76 ppm e 105 ppm durante o alojamento do Grupo 1 (5 dias de exposição), 77 ppm e 106 ppm do Grupo 2 (10 dias de exposição) e 78 ppm e 105 ppm do Grupo 3 (15 dias de exposição), conforme ilustrado na Figura 1. A concentração de amônia na sala medida durante o alojamento do Grupo Controle foi menor ou igual a 2 ppm.

Figura 1 – Concentração de amônia nas salas de alojamento dos grupos experimentais



Nota: Resultados de duas medições diárias, às 8h e às 18h. Grupo 1 (5 dias de exposição); Grupo 2 (10 dias de exposição); Grupo 3 (15 dias de exposição).

Durante o período de estudo, as temperaturas mínima e máxima registradas no ambiente de alojamento dos animais controle foram, respectivamente, 19,3°C e 23,2°C. Na sala onde os animais foram expostos à amônia, a temperatura mínima registrada foi de 20,1°C

e a máxima de 23,8°C. A umidade relativa do ar variou de 60 a 89% na sala controle e 65 a 90% na sala experimental.

5.2 Peso (Massa corporal)

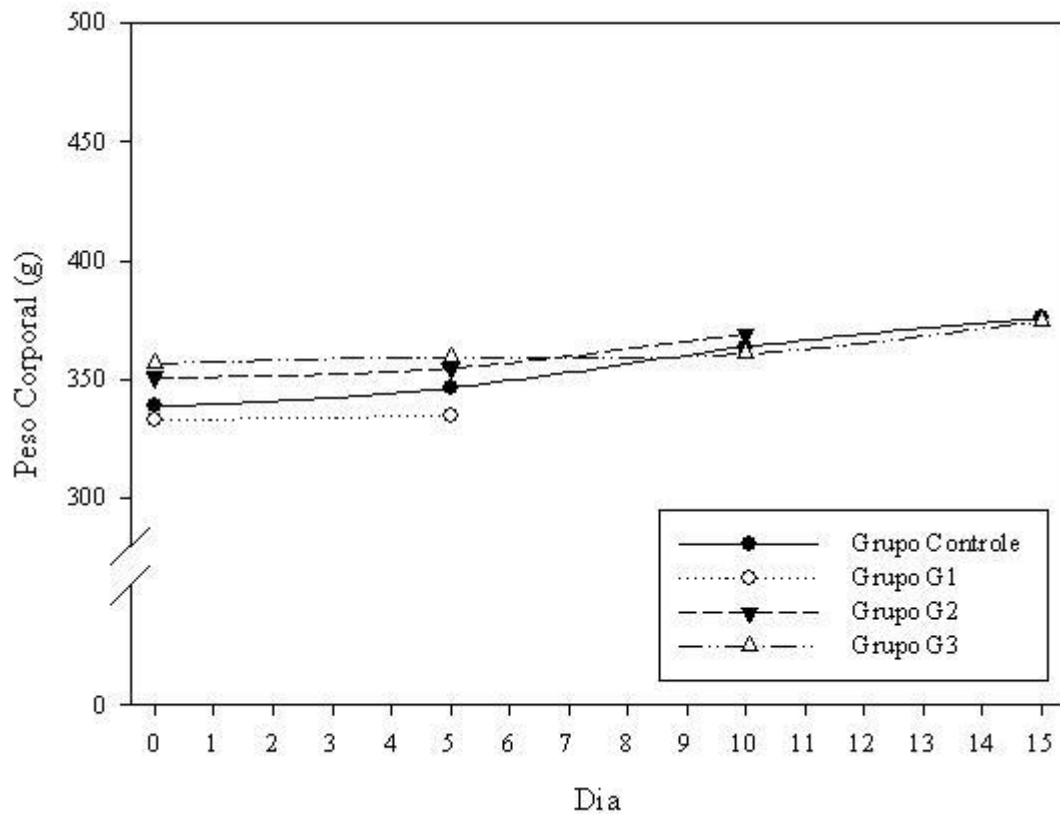
As medidas de peso (massa corporal, em gramas) dos animais do Grupo Controle, Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3, estão demonstrados na Tabela 3 e na Figura 2. A Tabela 4 demonstra as diferenças encontradas entre os grupos em relação à variação de peso, entre o dia 0 e o dia 5, entre o dia 5 e o dia 10 e entre o dia 10 e o dia 15.

Tabela 3 – Massa corporal em gramas de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia

	N	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15
Grupo Controle	20	338,45 ± 29,56	346,45 ± 30,71	363,64 ± 37,66	375,86 ± 39,04
Grupo 1	20	332,75 ± 30,63	334,60 ± 31,24	-	-
Grupo 2	20	350,90 ± 25,86	354,85 ± 25,69	369,30 ± 29,85	-
Grupo 3	20	356,71 ± 28,61	359,48 ± 30,08	360,76 ± 30,87	374,57 ± 33,69

Nota: Valores apresentados em média ± desvio padrão

Figura 2 – Peso médio em gramas dos animais do Grupo Controle e dos grupos experimentais



Nota: Grupo Controle = dia 0, dia 5, dia 10 e dia 15; Grupo 1 = dia 0 e dia 5; Grupo 2 = dia 0, dia 5 e dia 10; Grupo 3 = dia 0, dia 5, dia 10 e dia 15

Tabela 4 – Média da variação percentual de peso corporal de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia

	Grupo Controle	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Dia 0 – 5	2,37 ± 1,90	1,34 ± 1,62	1,15 ± 1,66	0,76 ± 1,70
Dia 5 – 10	3,27 ± 1,94	-	4,02 ± 2,01 ³	0,36 ± 1,78 ^{0,2}
Dia 10 – 15	3,39 ± 1,94	-	-	3,80 ± 1,58

Nota: Valores apresentados em média ± desvio padrão. 0 = diferença significativa comparada ao Grupo Controle; 2 = diferença significativa comparada ao Grupo 2; 3 = diferença significativa comparada ao Grupo 3

5.3 Parâmetros bioquímicos

Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas em oito dos treze parâmetros bioquímicos analisados. Fosfatase alcalina (FAL), amilase e glicose apresentaram valores diferentes apenas entre os grupos experimentais (G1, G2 e G3). Diferenças dos grupos experimentais em relação ao Grupo Controle (G0) foram observadas nos valores obtidos para alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, creatina cinase (CK) e gama-glutamilttransferase (GGT). Os resultados das análises bioquímicas estão demonstrados na Tabela 5.

Embora não tenham sido observadas diferenças em comparação ao Grupo Controle, aumento da atividade da FAL foi observada no Grupo 1 em relação ao demais grupos experimentais (Grupo 2 e Grupo 3) (Figura 3).

A atividade da ALT foi menor no Grupo 2, quando comparada a todos os demais grupos. Houve diferença também entre o G1 e o G3; no Grupo 3 a atividade da ALT estava aumentada em relação ao Grupo 1, contudo nenhum desses dois grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao Grupo Controle (Figura 4). Em relação à AST, conforme ilustrado na Figura 5, foram observados aumentos na atividade enzimática no Grupo 1 e no Grupo 3 em relação ao Grupo Controle e ao Grupo 2.

A Figura 6 ilustra o aumento da amilase nos grupos G2 e G3 em comparação ao Grupo 1, mas não ao Grupo Controle.

A concentração de creatinina no Grupo 1 foi maior que no Grupo Controle e nos demais grupos experimentais. Ainda, o Grupo 3 apresentou concentrações significativamente maiores de creatinina que o Grupo 2 (Figura 7).

O aumento da atividade da creatina cinase no Grupo 1 em relação ao Grupo Controle e ao Grupo 2 está demonstrado na Figura 8. A CK no Grupo 3 também estava aumentada em relação ao Grupo 2, embora não tenha diferido do Grupo Controle.

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia

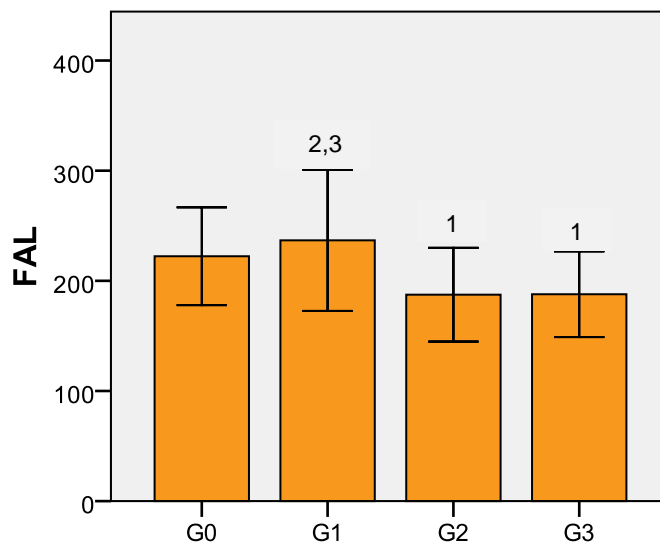
	Unidade	Grupo Controle		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
		Valor	Min/Max	Valor	Min/Max	Valor	Min/Max	Valor	Min/Max
FAL _a	U/L	222 ± 44	132/297	236 ± 64 ^{2,3}	147/378	187 ± 43 ¹	127/274	188 ± 39 ¹	121/281
ALT _a	U/L	48,6 ± 6,9	36/59	47,6 ± 8,9 ^{2,3}	33/69	40,9 ± 4,6 ^{0,1,3}	34/52	54,0 ± 6,9 ^{1,2}	39/67
AST _b	U/L	96; 83 – 104	69/131	153; 113 - 231 ^{0,2}	82/462	92; 87 - 99 ^{1,3}	78/116	108; 99 - 125 ^{0,2}	79/148
amilase _a	U/L	1431 ± 134	1194/1675	1308 ± 144 ^{2,3}	1072/1518	1532 ± 172 ¹	1152/1774	1476 ± 97 ¹	1262/1614
creatinina _a	mg/dL	0,31 ± 0,05	0,21/0,40	0,38 ± 0,04 ^{0,2,3}	0,29/0,47	0,30 ± 0,03 ^{1,3}	0,24/0,36	0,34 ± 0,04 ^{1,2}	0,28/0,42
CK _b	U/L	615; 550 – 768	411/944	1053; 719 - 1702 ^{0,2}	507/2868	575; 465 - 683 ^{1,3}	358/906	955; 619 - 1152 ²	412/1618
glicose _a	mg/dL	216 ± 41	136/301	231 ± 40 ^{2,3}	149/327	191 ± 30 ¹	153/258	194 ± 21 ¹	159/233
GGT _a	U/L	10,9 ± 3,8	2,5/17,8	5,8 ± 2,5 ^{0,2,3}	2,2/9,6	10,4 ± 2,3 ¹	6,4/14,5	9,7 ± 2,8 ¹	5,0/14,5
LDH _b	U/L	1397; 1005 – 1569	481/2090	1536; 1099 – 2909	754/5608	1205; 562 – 1602	288/2414	2317; 1075 - 3186	673/3976
uréia _a	mg/dL	52,27 ± 4,09	45,35/59,97	49,60 ± 5,85	37,24/60,53	52,52 ± 4,26	45,50/60,12	52,33 ± 2,12	48,45/55,50
proteína total _a	g/L	65,5 ± 2,3	61,6/69,6	65,5 ± 3,1	60,3/71,8	67,0 ± 1,7	63,4/70,3	65,9 ± 2,6	60,3/71,3
albumina _b	g/L	25,8; 24,1 - 26,4	22,0/29,3	25,7; 24,9 - 26,7	22,6/28,0	26,5; 24,8 - 26,8	23,6/27,6	26,3; 25,2 - 26,7	24,4/27,3
globulinas _a	g/L	40,2 ± 1,9	37,3/43,3	39,3 ± 2,6	34,8/43,1	40,6 ± 1,4	38,2/43,8	39,7 ± 2,8	33,9/45,6

Nota: ^a = média ± desvio padrão; ^b = mediana; percentil 25 – percentil 75; ⁰ = diferença significativa comparada ao Grupo Controle (G0); ¹ = diferença significativa comparada ao Grupo 1 (G1); ² = diferença significativa comparada ao Grupo 2 (G2); ³ = diferença significativa comparada ao Grupo 3 (G3).

Os valores de glicose obtidos a partir da análise das amostras demonstraram diferenças entre os grupos experimentais, mas não em relação ao Grupo Controle. O Grupo 1 apresentou maiores valores de glicose em relação aos Grupos 2 e 3 (Figura 9).

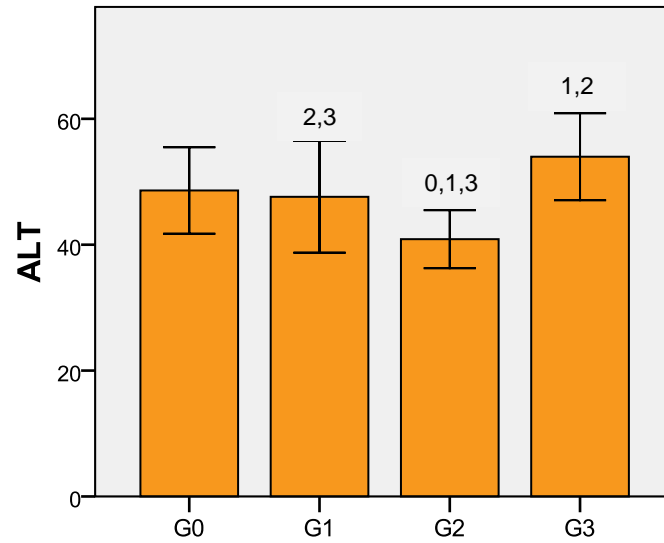
Conforme ilustrado na Figura 10, a atividade da GGT foi significativamente menor no Grupo 1 em relação ao Grupo Controle, ao Grupo 2 e ao Grupo 3. A atividade da lactato desidrogenase (LDH) (Figura 11), bem como a concentração de uréia (Figura 12), proteína total (Figura 13), albumina (Figura 14) e globulinas (Figura 15) não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle nem entre os grupos experimentais.

Figura 3 – Dosagem sérica de fosfatase alcalina (FAL) em U/L



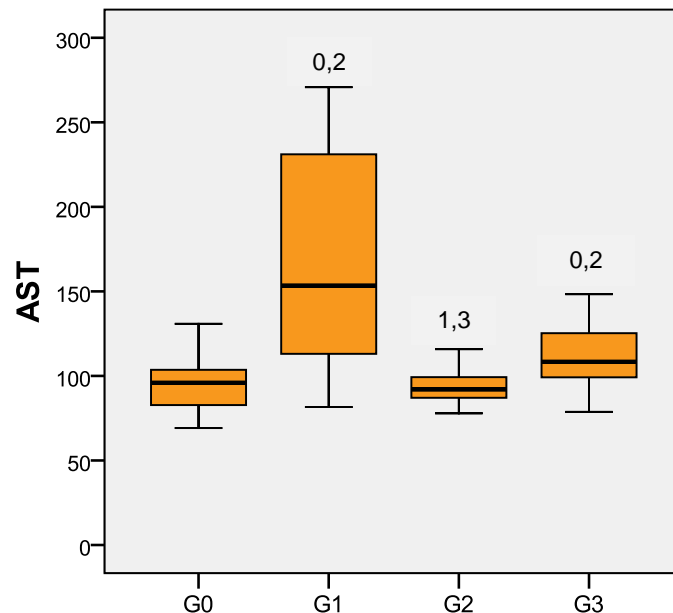
Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 (222 \pm 44), grupo G1 (236 \pm 64), grupo G2 (187 \pm 43) e grupo G3 (188 \pm 39). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 4 – Dosagem plasmática de alanina aminotransferase (ALT) em U/L



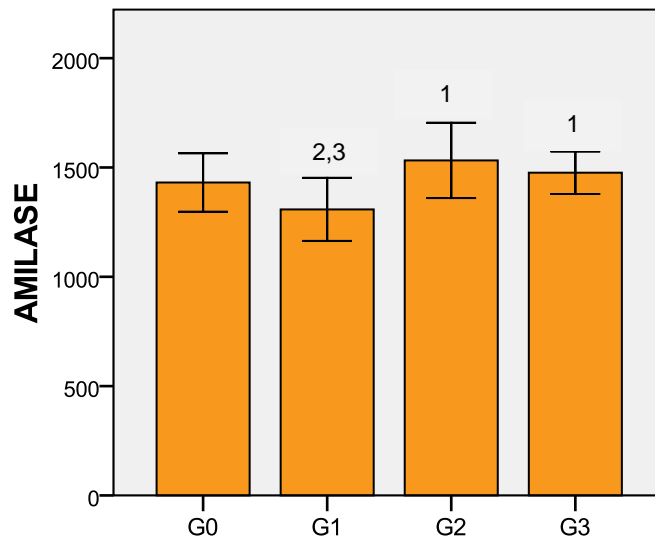
Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($48,6 \pm 6,9$), grupo G1 ($47,6 \pm 8,9$), grupo G2 ($40,9 \pm 4,6$) e grupo G3 ($54,0 \pm 6,9$). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 5 – Dosagem plasmática de aspartato aminotransferase (AST) em U/L



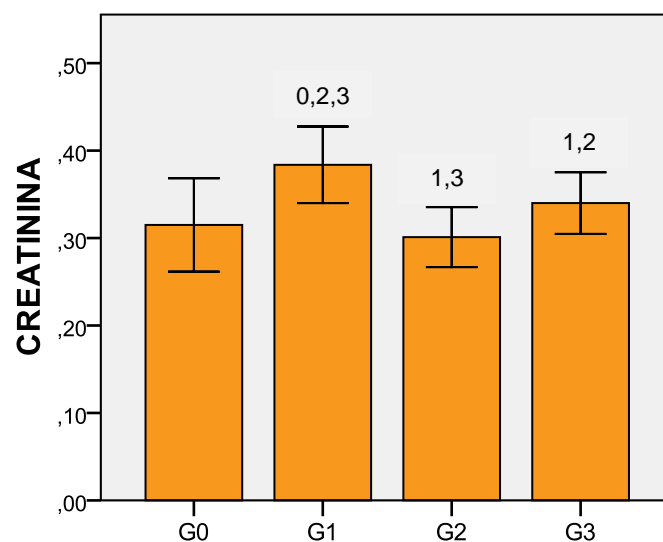
Nota: Valores representados em mediana; percentil 25 – percentil 75. Grupo G0 (96; 83 – 104), grupo G1 (153; 113 – 231), grupo G2 (92; 87 – 99) e grupo G3 (108; 99 – 125). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 6 – Dosagem sérica de amilase em U/L



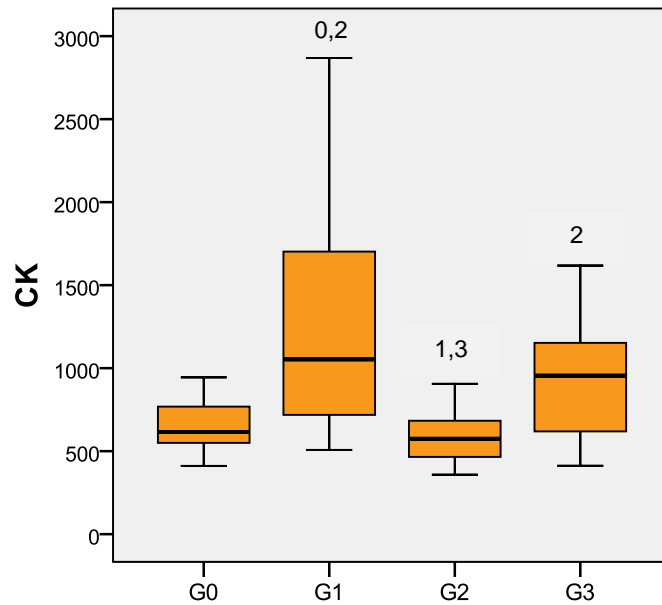
Nota: Valores representados em média ± desvio padrão. Grupo G0 (1431 ± 134), grupo G1 (1308 ± 144), grupo G2 (1532 ± 172) e grupo G3 (1476 ± 97). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 7 – Dosagem plasmática de creatinina em mg/dL



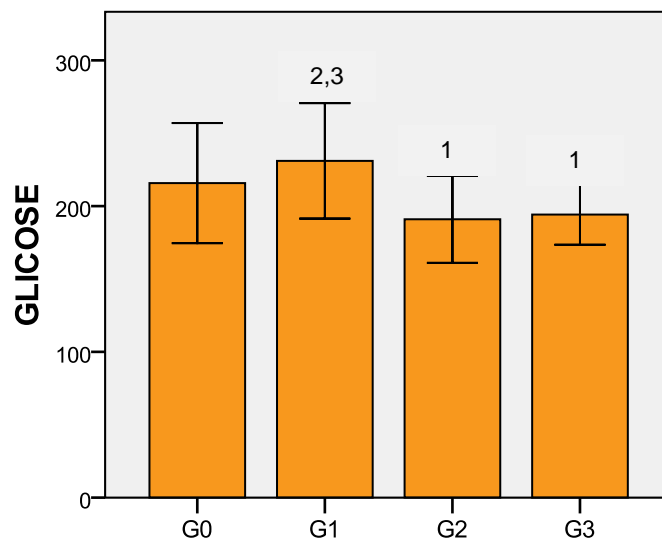
Nota: Valores representados em média ± desvio padrão. Grupo G0 (0,31 ± 0,05), grupo G1 (0,38 ± 0,04), grupo G2 (0,30 ± 0,03) e grupo G3 (0,34 ± 0,04). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 8 – Dosagem sérica de creatina cinase (CK) em U/L



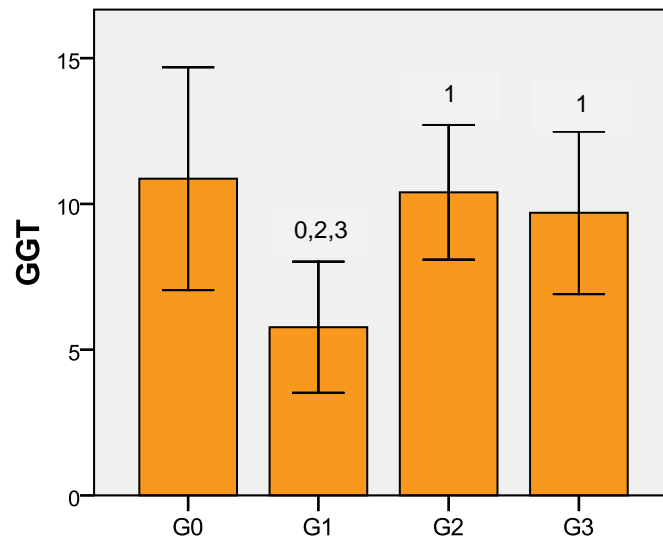
Nota: Valores representados em mediana; percentil 25 – percentil 75. Grupo G0 (615; 550 – 768), grupo G1 (1053; 719 – 1702), grupo G2 (575; 465 – 683) e grupo G3 (955; 619 – 1152). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 9 – Dosagem plasmática de glicose em mg/dL



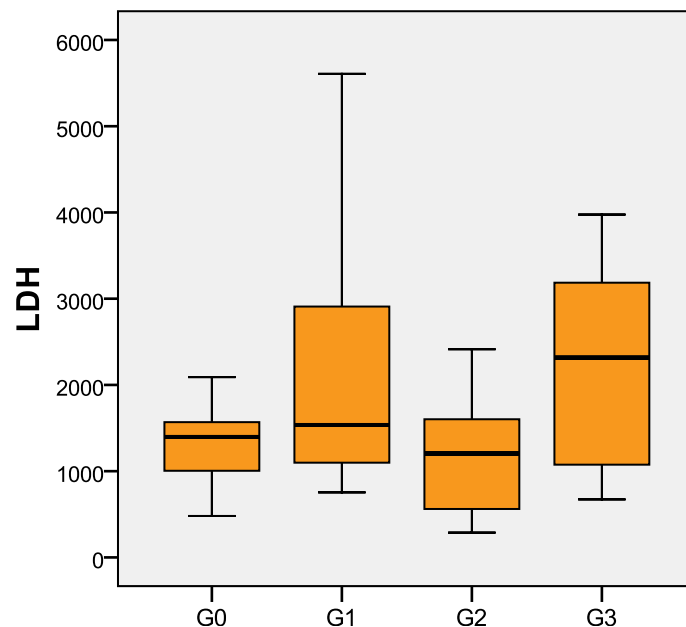
Nota: Valores representados em média ± desvio padrão. Grupo G0 (216 ± 41), grupo G1 (231 ± 40), grupo G2 (191 ± 30) e grupo G3 (194 ± 21). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 10 – Dosagem plasmática de gama-glutamilttransferase (GGT) em U/L



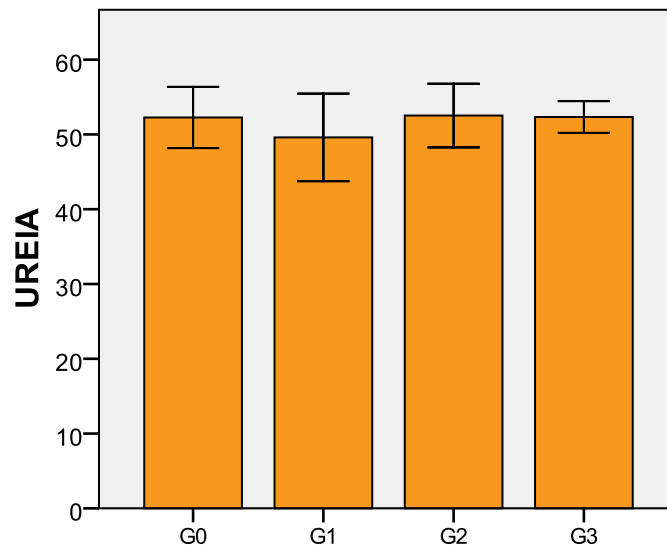
Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($10,9 \pm 3,8$), grupo G1 ($5,8 \pm 2,5$), grupo G2 ($10,4 \pm 2,3$) e grupo G3 ($9,7 \pm 2,8$). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 11 – Dosagem sérica de lactato desidrogenase (LDH) em U/L



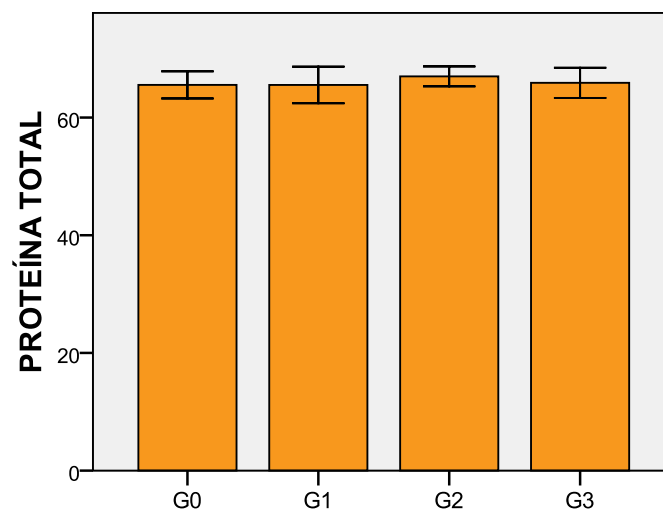
Nota: Valores representados em mediana; percentil 25 – percentil 75. Grupo G0 (1005 - 1569), grupo G1 (1536; 1099 - 2909), grupo (1205; 562 – 1602) e grupo G3 (2317; 1075 - 3186). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 12 – Dosagem plasmática de ureia em mg/dL



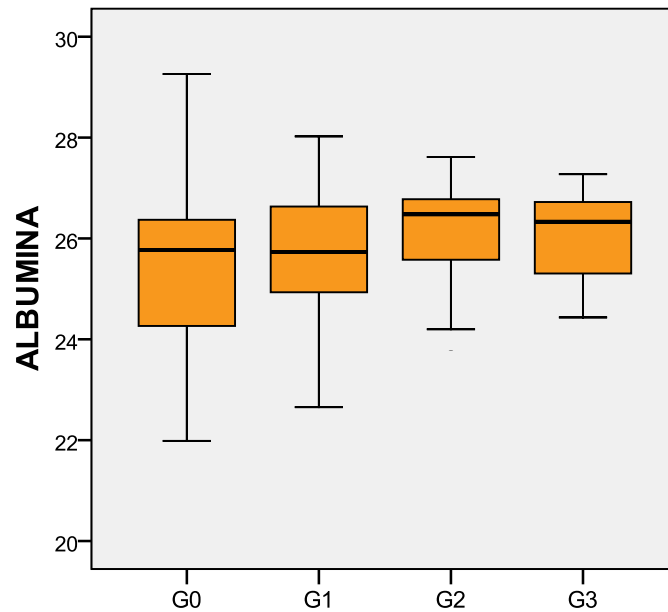
Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($52,27 \pm 4,09$), grupo G1 ($49,60 \pm 5,85$), grupo G2 ($52,52 \pm 4,26$) e grupo G3 ($52,33 \pm 2,12$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 13 – Dosagem sérica de proteínas totais em g/L



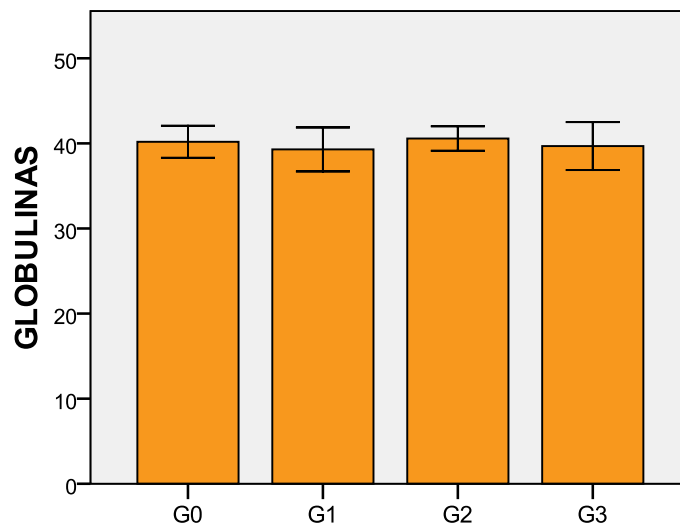
Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($65,5 \pm 2,3$), grupo G1 ($65,5 \pm 3,1$), grupo G2 ($67,0 \pm 1,7$) e grupo G3 ($65,9 \pm 2,6$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 14 – Dosagem sérica de albumina em g/L



Nota: Valores representados em mediana; percentil 25 – percentil 75. Grupo G0 (25,8; 24,1 - 26,4), grupo G1 (25,7; 24,9 - 26,7), grupo G2 (26,5; 24,8 - 26,8) e grupo G3 (26,3; 25,2 - 26,7). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 15 – Dosagem sérica de globulinas em g/L



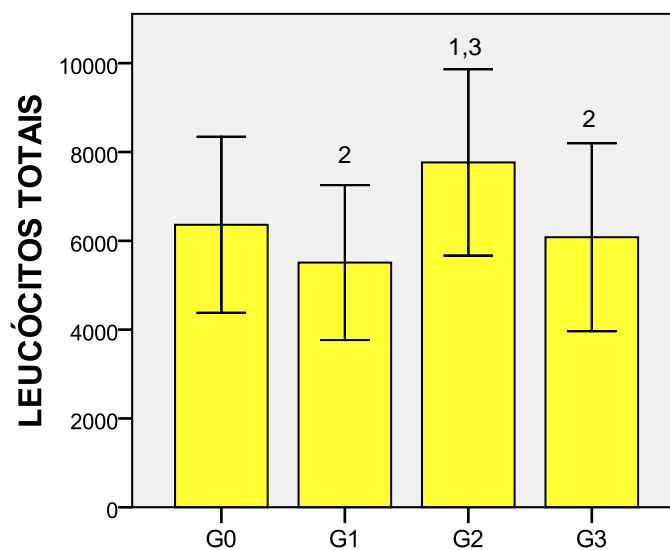
Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($40,2 \pm 1,9$), grupo G1 ($39,3 \pm 2,6$), grupo G2 ($40,6 \pm 1,4$) e grupo G3 ($39,7 \pm 2,8$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

5.4 Parâmetros hematológicos

Os resultados das análises hematológicas demonstraram diferenças significativas em todos os parâmetros analisados, exceto para a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Tabela 6).

A contagem de leucócitos totais e de eritrócitos diferiu significativamente apenas entre os grupos experimentais. A contagem de leucócitos totais foi maior no Grupo 2, quando comparada aos grupos G1 e G3 (Figura 16). Maiores valores de eritrócitos foram observados no Grupo 1 quando comparado ao Grupo 3, contudo não diferiram do Grupo 2 ou do Grupo Controle (Figura 17).

Figura 16 – Contagem de leucócitos totais por mL



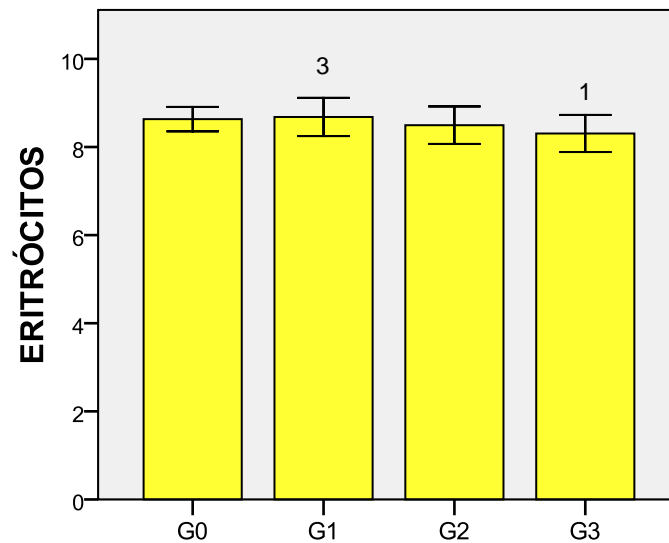
Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 (6361 \pm 1982), grupo G1 (5510 \pm 1744), grupo G2 (7765 \pm 2098) e grupo G3 (6081 \pm 2116). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Tabela 6 – Parâmetros hematológicos de ratos Wistar não expostos (Grupo Controle) e expostos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) à amônia

	Unidade	Grupo Controle		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
		Valor	Min/Max	Valor	Min/Max	Valor	Min/Max	Valor	Min/Max
leucócitos totais _a	/mL	6361 ± 1982	3000/10000	5510 ± 1744 ²	3000/9400	7765 ± 2098 ^{1,3}	4800/12500	6081 ± 2116 ²	2300/9500
eritrócitos _a	x10 ⁶ /mL	8,63 ± 0,28	8,05/9,04	8,68 ± 0,43 ³	7,94/9,46	8,49 ± 0,43	7,91/9,31	8,31 ± 0,42 ¹	7,53/8,99
HGB _a	g/dL	14,6 ± 0,6	13,5/15,7	15,4 ± 0,8 ^{0,2,3}	14,2/16,9	14,5 ± 0,40 ¹	14,0/15,4	14,3 ± 0,7 ¹	13,4/15,6
HCT _a	%	46,2 ± 1,7	42,0/49,0	49,4 ± 2,5 ^{0,2,3}	46,0/54,0	47,0 ± 1,8 ¹	43,5/50,0	45,8 ± 1,9 ¹	43,0/49,0
PLT _b	x10 ³ /mL	830; 794 – 970	754/1078	824; 803 - 874 ³	748/932	820; 783 - 852 ³	726/960	770; 722 - 809 ^{0,1,2}	639/875
VCM _a	fL	54,1 ± 1,4	51,5/56,2	56,3 ± 1,7 ⁰	52,8/59,6	55,0 ± 1,6	52,3/58,2	55,2 ± 1,9	51,7/58,4
CHCM _b	%	31,6; 31,1 - 32,0	30,4/32,9	31,2; 30,8 - 31,6	30,6/32,5	31,2; 30,6 - 31,5	30,4/31,9	31,1; 30,8 - 31,6	30,4/32,2

Nota: ^a = média ± desvio padrão; ^b = mediana; percentil 25 – percentil 75; ⁰ = diferença significativa comparada ao Grupo Controle (G0); ¹ = diferença significativa comparada ao Grupo 1 (G1); ² = diferença significativa comparada ao Grupo 2 (G2); ³ = diferença significativa comparada ao Grupo 3 (G3).

Figura 17 – Contagem de eritrócitos $\times 10^6$ por mL

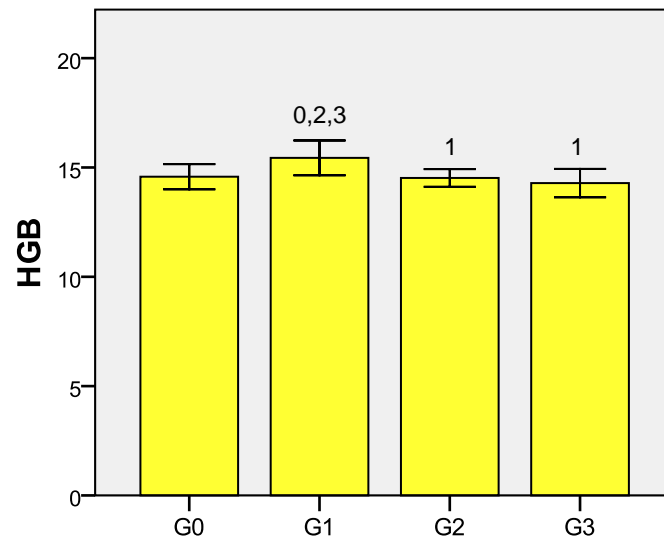


Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 (8,63 \pm 0,28), grupo G1 (8,68 \pm 0,43), grupo G2 (8,49 \pm 0,43) e grupo G3 (8,31 \pm 0,42). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

A hemoglobina (HGB) e o hematócrito (HCT) apresentaram o mesmo padrão de comportamento, conforme ilustrado nas Figuras 18 e 19, com valores maiores no Grupo 1 em comparação ao Grupo Controle e aos demais grupos expostos à amônia. A contagem de plaquetas indicou valores significativamente menores no Grupo 3 em relação a todos os outros grupos (Figura 20).

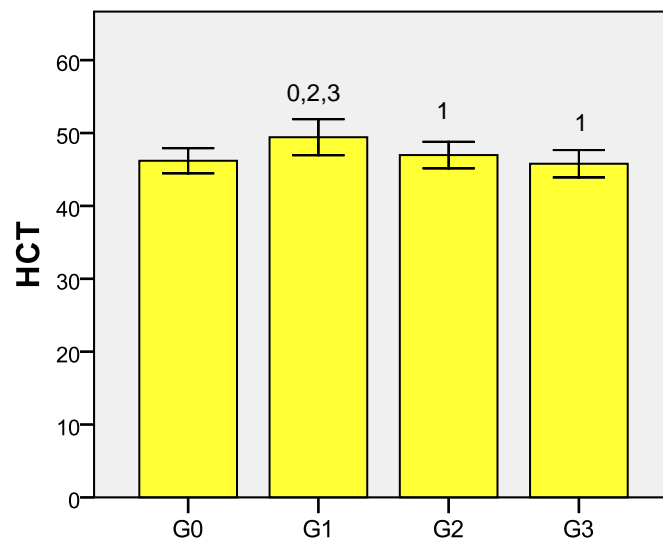
O volume corpuscular médio observado no Grupo 1 foi maior em relação ao Grupo Controle, mas não diferiu dos demais grupos experimentais (Figura 21). A Figura 22 ilustra a variação da CHCM entre os grupos.

Figura 18 – Concentração de hemoglobina (HGB) em g/dL

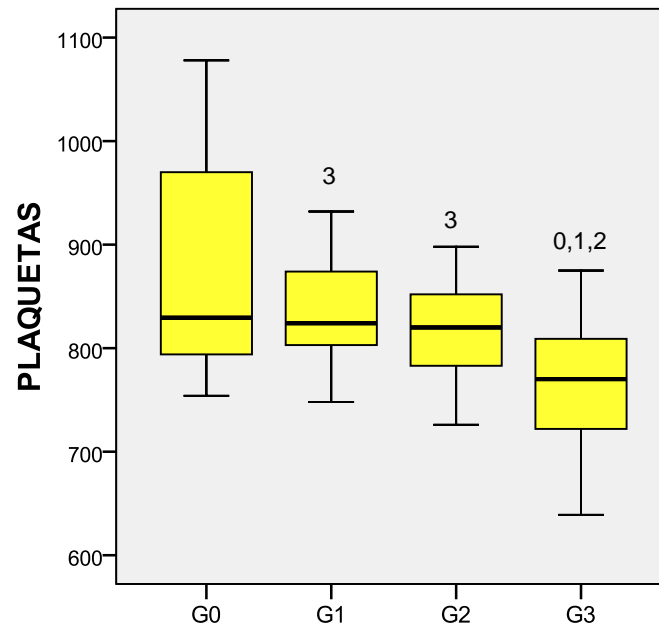


Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($14,6 \pm 0,58$), grupo G1 ($15,4 \pm 0,80$), grupo G2 ($14,5 \pm 0,40$) e grupo G3 ($14,3 \pm 0,65$). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 19 – Valores de hematócrito (HCT) (%)

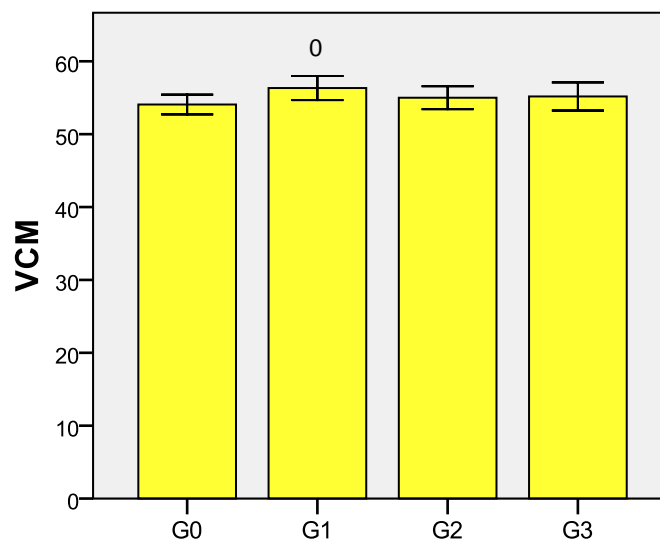


Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($46,2 \pm 1,72$), grupo G1 ($49,4 \pm 2,5$), grupo G2 ($47,0 \pm 1,8$) e grupo G3 ($45,8 \pm 1,9$). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 20 – Contagem de plaquetas $\times 10^3/\text{mL}$ 

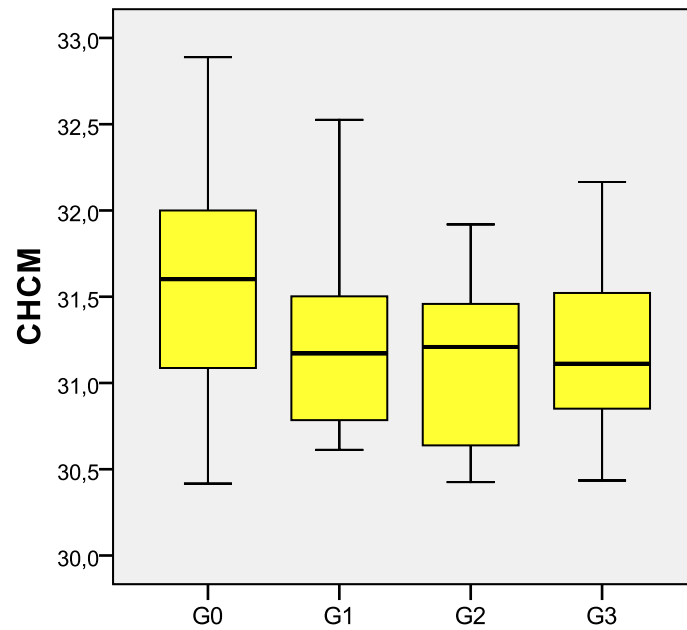
Nota: Valores representados em mediana; percentil 25 – percentil 75. Grupo G0 (830; 794 – 970), grupo G1 (824; 803 – 874), grupo G2 (820; 783 – 852) e grupo G3 (770; 722 – 809). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 21 – Volume corpuscular médio (VCM) em fL



Nota: Valores representados em média \pm desvio padrão. Grupo G0 ($54,1 \pm 1,4$), grupo G1 ($56,3 \pm 1,7$), grupo G2 ($55,0 \pm 1,6$) e grupo G3 ($55,2 \pm 1,9$). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

Figura 22 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%)



Nota: Valores representados em mediana; percentil 25 – percentil 75. Grupo G0 (31,6; 31,1 - 32,0), grupo G1 (31,2; 30,8 - 31,6), grupo G2 (31,2; 30,6 - 31,5) e grupo G3 (31,1; 30,8 - 31,6). 1 = diferença significativa comparada ao grupo G1; 2 = diferença significativa comparada ao grupo G2; 3 = diferença significativa comparada ao grupo G3. Nível de significância para $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Embora a importância do controle dos níveis de amônia em alojamentos de roedores de laboratório seja historicamente reconhecida e enfatizada até os dias de hoje, são escassos os estudos atuais sobre seus efeitos nos animais. Este fato talvez possa estar relacionado ao desenvolvimento e à utilização de equipamentos destinados a proporcionar melhor qualidade atmosférica no microambiente de alojamento, como os dispositivos de ventilação utilizando pressão positiva no interior das caixas (PIV – *Positive Individually Ventilation*) ou sistemas de caixas ventiladas individualmente (IVCs – *Individually Ventilated Cages*). O primeiro protótipo de gaiola com ventilação individualizada foi desenvolvido na década de 60 pelo *The Jackson Laboratory* e foi lançado comercialmente em 1979 (KELLER; MATTINGLY; KNAPKE, 1983; WU; JOINER; McFARLAND, 1985; CLOUGH *et al.*, 1995; THOREN, 2010). A partir da década de 90, principalmente devido ao aumento na utilização de animais livres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free – SPF*), transgênicos e imunocomprometidos, a demanda por esses sistemas começou a crescer, sobretudo nos Estados Unidos e na Europa. Nesse contexto, os estudos sobre as consequências da exposição à amônia parecem estar desaparecendo gradualmente à medida que aumenta a utilização de IVCs (CLOUGH *et al.*, 1995; HOGLUND; RENSTROM, 2001).

Contudo, é importante observar que, em alguns países, a exemplo do Brasil, muitos biotérios ainda utilizam sistemas convencionais de criação e experimentação em gaiolas abertas. Assim sendo, milhares de artigos científicos utilizando animais de laboratório são realizados anualmente em alojamentos desprovidos de sistemas de ventilação individualizada. Além disso, cabe ressaltar que, mesmo em IVCs, os níveis de amônia podem superar 100 ppm, uma vez que são extremamente variáveis, dependendo de diversos fatores, tais como a densidade populacional, a frequência de troca e o tipo de cama, a temperatura e a umidade

relativa (SERRANO, 1971; HOGLUND; RENSTROM, 2001). Silverman *et al.* (2008) e Lipman (1992) registraram concentrações superiores 200 ppm e 250 ppm de amônia, respectivamente, em gaiolas individualmente ventiladas. Perkins e Lipman (1995) encontraram concentrações 350 ppm em gaiolas com filtro superior, 7 dias após a limpeza.

Até os dias atuais, poucos efeitos sistêmicos e subclínicos atribuídos à inalação de amônia em roedores foram avaliados, e não há estudos específicos a acerca das consequências da exposição sobre o perfil bioquímico e hematológico em ratos Wistar. No presente estudo, várias diferenças foram encontradas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, após exposição a concentrações de amônia variando de 76 a 106 ppm, em relação ao Grupo Controle. Diferenças também foram observadas entre os grupos experimentais. Dos parâmetros bioquímicos analisados, o Grupo 1 apresentou diferenças em relação ao Grupo Controle na dosagem de ALT, creatinina, CK e GGT. O Grupo 2 diferiu do Grupo Controle apenas na atividade da ALT e do Grupo 3, apenas na AST.

A atividade da fosfatase alcalina no Grupo 1 foi maior que em todos os demais grupos, embora não tenha diferido estatisticamente dos animais do Grupo Controle. A FAL está amplamente distribuída no organismo, principalmente nos tecidos hepático, ósseo, rins e mucosa intestinal, sendo que o fígado contribui com mais da metade da atividade da enzima no soro (GONZÁLEZ; SILVA, 2006; HOFFMANN; SOLTER, 2008). Achados sugestivos de envolvimento hepático e renal em roedores expostos à amônia, incluindo alterações metabólicas (VESELL *et al.*, 1973; MANNINEN; ANTTILA; SAVOLAINEN, 1988) e histopatológicas (WEATHERBY, 1952 *apud* IPCS/WHO, 1986; COON *et al.*, 1970), estão descritos na literatura. Congestão do fígado e rins foram relatadas por Weatherby (1952, *apud* IPCS/WHO, 1986) em cobaias expostos a concentrações de amônia variando de 140 a 200 ppm, 6 horas por dia, 5 dias por semana, durante 18 semanas. A 675 ppm Coon *et al.* (1970)

encontraram calcificação dos túbulos renais e degeneração hepática gordurosa em ratos, cobaias e coelhos continuamente expostos por 90 dias.

Alterações hepáticas são também frequentemente acompanhadas de aumento da atividade de alanina aminotransferase. Além disso, a ALT pode estar aumentada em uma grande variedade de desordens, tais como alterações renais e musculares, pancreatites, hipóxia, doenças metabólicas, distúrbios alimentares e intoxicações (LASSEN, 2004; GONZÁLEZ; SILVA, 2006; HOFFMANN; SOLTER, 2008). Neste trabalho, o grupo exposto à amônia por 10 dias (Grupo 2) apresentou menor atividade da enzima em relação a todos os outros grupos. Nutrição inadequada e insuficiência renal podem levar a diminuição da atividade da ALT (GONZÁLEZ; SILVA, 2006; HOFFMANN; SOLTER, 2008).

Os grupos expostos à amônia por 5 ou 15 dias demonstraram atividade da aspartato aminotransferase significativamente maior em relação ao Grupo Controle e ao grupo exposto por 10 dias. Aumento da atividade sérica de AST pode ser causado por alterações no tecido muscular cardíaco ou esquelético, por injúrias hepáticas ou quando ocorre hemólise (LASSEN, 2004; GONZÁLEZ; SILVA, 2006; HOFFMANN; SOLTER, 2008). Segundo González e Silva (2006), patologias de localização no SNC também são demonstradas pela maior atividade da enzima.

A dosagem da amilase é geralmente utilizada na triagem de lesões pancreáticas, embora muitos casos de pancreatite apresentem amilase normal. Patologias do intestino delgado e fígado podem contribuir para o aumento da atividade desta enzima, assim como a insuficiência renal, devido à diminuição da taxa de filtração glomerular (NOTHAN; CALLOW, 1971; GONZÁLEZ; SILVA, 2006). A única alteração estatisticamente significativa observada neste estudo foi a menor da atividade no Grupo 1, em relação ao Grupo 2 e ao Grupo 3. Não foram encontradas explicações razoáveis para esta diminuição da amilase nos animais expostos durante 5 dias.

A dosagem de creatinina é o método mais utilizado para diagnosticar e monitorar alterações renais. Qualquer aumento de creatinina no sangue é um indicador de disfunção renal, entretanto, danos ao tecido muscular podem também resultar em aumento plasmático de creatinina (GONZÁLEZ; SILVA, 2006; BRAUN, LEFEBVRE, 2008). No presente trabalho, observou-se aumento na concentração de creatinina plasmática nos animais expostos à amônia por 5 dias (Grupo 1), em relação a todos os demais grupos. Alterações renais em cobaias, coelhos e ratos submetidos à exposição ao gás amônia já foram relatadas (WEATHERBY, 1952 *apud* IPCS/WHO, 1986; COON *et al.*, 1970). Interessantemente, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de ureia, que em geral são analisados juntamente com a creatinina para avaliar o funcionamento renal (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Tais resultados indicam que a exposição à amônia não prejudicou a excreção renal de ureia, de acordo com o observado por Manninen, Anttila e Savolainen (1988) após a exposição de ratas Wistar por 5, 10 ou 15 dias; e sugere que a causa da elevação de creatinina esteja relacionada a alterações musculares. Prokop'eva *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986 notaram redução no tônus muscular em ratos submetidos à inalação de 430 ppm de amônia.

A creatina cinase está presente principalmente no citoplasma das células da musculatura esquelética, cardíaca, diafragmática e do tecido cerebral. Na maioria das espécies, a atividade da CK é de duas a quatro vezes maior na musculatura esquelética do que no miocárdio (BOYD, 1983) e, no tecido cerebral, a atividade da CK equivale a aproximadamente 10% da atividade no músculo esquelético (GONZÁLEZ; SILVA, 2006; HOFFMANN; SOLTER, 2008). O aumento da creatina cinase observado no Grupo 1, comparado aos demais grupos, embora não tenha sido estatisticamente significativo em relação Grupo 3, poderia indicar envolvimento muscular e/ou neurológico nos animais expostos por 5 dias. Alterações na musculatura esquelética (PROKOPEVA *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986) e cardíaca (COON *et al.*, 1970; RICHARD; JOUARY; BOUDENE, 1978

apud IPCS/WHO, 1986; KAPEGHIAN *et al.*, 1982) já foram relatadas em coelhos, ratos e camundongos expostos à amônia. A análise dos níveis de glutamina cerebral feita por Manninen, Anttila e Savolainen (1988), indicou aumento da concentração de amônia no tecido encefálico de ratos após a exposição à 25 ppm ou 300 ppm amônia por 5 dias. É interessante notar ainda que, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos, a atividade da lactato desidrogenase (LDH), utilizada principalmente como indicador de lesões musculares, foi maior nos grupos expostos por 5 ou 15 dias.

A dosagem de glicose novamente indicou maiores valores no Grupo 1 em relação aos demais grupos, diferindo estatisticamente dos grupos expostos por 10 ou 15 dias. O aumento concentração de glicose sanguínea foi relatado em ratos após exposição a 430 ppm de amônia por inalação (PROKOP'EVA *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986). Alterações na glicemia podem ser associadas ao estresse (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). A maravalha servida colocada no ambiente de alojamento experimental, com a finalidade de elevar a amônia atmosférica, presumivelmente continha, além de urina e fezes, feromônios excretados pelos outros animais, constituindo um provável agente estressor. Por outro lado, a ausência de jejum prévio às coletas também poderia explicar a variação encontrada nos resultados da análise de glicose.

A atividade da gama-glutamyltransferase foi menor no Grupo 1, em relação a todos os demais grupos. Considerando principalmente os resultados obtidos para FAL, seria equivocado rejeitar a hipótese de que a amônia cause efeitos tóxicos sobre o sistema hepatobiliar após os 5 primeiros dias de exposição. A GGT é encontrada principalmente no epitélio dos ductos biliares e renais, e em menor quantidade no pâncreas, intestino delgado, cérebro e coração. Apesar de ser encontrada no pâncreas e nos rins, a enzima não eleva em desordens nesses tecidos, a menos que exista envolvimento hepático (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Em relação aos efeitos da amônia por inalação sobre a hematologia, observou-se que o Grupo 1 apresentou diferenças quando comparado ao Grupo Controle em 3 dos 7 parâmetros estudados (HGB, HCT e VCM), enquanto o Grupo 2 diferiu apenas dos demais grupos experimentais. No Grupo 3 diferenças significativas em relação ao Grupo Controle ocorreram somente na contagem de plaquetas.

De acordo com Campbell (2004), as contagens de leucócitos em roedores de laboratório revelam uma variação diária distinta e, em ratos, as amostras obtidas por punção cardíaca, apresentam valores de leucócitos totais significativamente menores, em comparação às amostras obtidas no seio retro-orbital ou dos vasos da cauda. Neste estudo, os resultados da contagem de leucócitos totais indicaram maiores valores nos animais expostos durante 10 dias, comparados aos grupos submetidos à inalação de amônia por 5 ou 15 dias. Prokop'eva *et al.* (1973 *apud* IPCS/WHO, 1986) observaram leucocitose em ratos expostos à aproximadamente 430 ppm de amônia. Segundo Pilny (2008), o estresse associado à manipulação e à coleta de sangue em ratos pode alterar as contagens de glóbulos brancos, causando uma leucocitose imediata. Além disso, o ritmo circadiano afeta a concentração de leucócitos, com um aumento durante a fase de luz e diminuição durante a fase escura (PILNY, 2008). A análise dos valores relativos do perfil leucocitário poderia auxiliar na interpretação dessas alterações (WEISER; THRALL, 2004).

Ainda que diferenças significativas na contagem de eritrócitos tenham sido observadas apenas entre os grupos experimentais (Grupo 1 e Grupo 3), é importante notar que o Grupo 1 apresentou maiores valores em comparação a todos os demais grupos, inclusive ao Grupo Controle. O mesmo ocorreu com o VCM calculado, embora nesse caso o Grupo 1 tenha apresentado aumento significativo somente em relação ao Grupo Controle. A concentração de hemoglobina e o hematócrito também apresentaram esse comportamento, com maiores valores no Grupo 1 em relação a todos os demais grupos. A contagem de

plaquetas foi significativamente menor no Grupo 3 comparada aos outros grupos. A quantidade de plaquetas no sangue pode estar diminuída devido à menor produção pela medula óssea, à maior remoção do sangue ou ao aumento do consumo (ativação plaquetária). A avaliação citológica da medula óssea poderia auxiliar na compreensão dessas alterações (BAKER, 2004).

Embora várias diferenças tenham sido encontradas entre os ratos expostos e os ratos não expostos à amônia, a maior parte dos valores alterados poderia ser considerada “normal”, se comparada aos valores de referência encontrados na literatura (ZHANG *et al.*, 2004; BOEHM *et al.*, 2007; HOOPER *et al.*, 2007a; HOOPER *et al.*, 2007b; CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008a; CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008b). Por outro lado, alguns resultados que não apresentaram diferenças entre os grupos, poderiam ser considerados alterados se comparados a algumas das referências mencionadas. Esse fato confirma a importância da determinação de valores de referência para cada biotério e da padronização dos métodos de coleta e análise das amostras (BOEHM *et al.*, 2007).

De forma geral, no presente estudo, o maior número de alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos foi encontrado no 5º dia após o início da exposição, em comparação ao 10º e ao 15º dias. Tais resultados estão de acordo com os achados por Manninen, Anttila e Savolainen (1988), que sugeriram haver uma possível adaptação metabólica em roedores expostos à amônia. Esses pesquisadores submeteram ratas Wistar, com idade inicial de 14 semanas, à inalação de 300 ppm de amônia e observaram um aumento na concentração sanguínea de amônia e glutamina após 5 dias de exposição. No 10º e no 15º essa relação foi perdida, com a concentração de amônia retornando aos níveis basais e a glutamina estabilizando-se. Ao mesmo tempo, notou-se um aumento gradual na formação de citrulina hepática, indicando que a diminuição das concentrações de amônia no sangue

coincide com o aumento da ureogênese. A histologia não revelou alterações hepáticas ou renais.

A análise isolada dos parâmetros bioquímicos e hematológicos não permitiu concluir precisamente os tecidos afetados e os mecanismos que teriam causado as alterações decorrentes da inalação de amônia. Entretanto, algumas variações bioquímicas entre os grupos observadas neste estudo (FA, ALT, AST, creatinina e CK), são compatíveis com achados já descritos na literatura, os quais relataram alterações hepáticas (WEATHERBY, 1952 *apud* IPCS/WHO, 1986; COON *et al.*, 1970; VESELL *et al.*, 1973; MANNINEN; ANTTILA; SAVOLAINEN, 1988), renais (WEATHERBY, 1952 *apud* IPCS/WHO, 1986; COON *et al.*, 1970), musculares (PROKOPEVA *et al.*, 1973 *apud* IPCS/WHO, 1986), cardíacas (COON *et al.*, 1970; RICHARD; JOUARY; BOUDENE, 1978 *apud* IPCS/WHO, 1986) e neurológicas (APPELMAN; BERGE; REUZEL, 1982; KAPEGHIAN *et al.*, 1982; MANNINEN; ANTTILA; SAVOLAINEN, 1988). A análise histopatológica é uma ferramenta essencial para auxiliar na compreensão dos resultados obtidos neste trabalho.

Mais estudos sobre os efeitos sistêmicos causados pela elevação da amônia atmosférica devem ser desenvolvidos, uma vez que os limites de exposição para roedores não estão definidos. Considerando as alterações no trato respiratório superior descritas a 10 ppm por Dalhman (1956, *apud* SERRANO, 1971), presume-se que efeitos tóxicos subclínicos ocorram a concentrações inferiores a aquelas atualmente aceitas (25 ppm) (GREEN *et al.*, 2008). Ainda, de acordo com a variação dos resultados em função do tempo de exposição observada aqui, é possível que oscilações nos níveis de amônia sejam tão importantes quanto a exposição a concentrações consideradas elevadas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicam que:

- Ratos Wistar expostos à inalação contínua de amônia atmosférica, obtida a partir de fontes naturais, em concentrações variando de 76 ppm a 106 ppm, apresentam alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos e que estas alterações variam conforme o tempo de exposição;
- Diferenças dos grupos experimentais, expostos por 5, 10 ou 15 dias, em relação ao Grupo Controle foram observadas na atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatina cinase (CK) e gama-glutamyltransferase (GGT), bem como na concentração de creatinina e nos valores de hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB) e volume corpuscular médio (VCM). Variações significativas nos valores de fosfatase alcalina (FAL), amilase, glicose (GGT) e contagem de leucócitos totais, eritrócitos e plaquetas foram encontradas também entre os grupos experimentais;
- Não foram identificadas diferenças entre os grupos em relação à atividade da lactato desidrogenase (LDH), concentração de ureia, proteínas totais, albuminas e globulinas, e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM);
- Notoriamente, o grupo exposto por 5 dias apresentou o maior número de variações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, em comparação aos grupos expostos por 10 ou 15 dias, demonstrando que o tempo de exposição está relacionado às alterações. Estes achados sugerem que ratos submetidos à elevação de amônia atmosférica desenvolvem uma resposta metabólica adaptativa envolvendo mecanismos ainda desconhecidos;
- O aumento da amônia no ambiente de alojamento de ratos Wistar pode, portanto, constituir um viés e comprometer os resultados bioquímicos e hematológicos obtidos em ensaios experimentais.

REFERÊNCIAS

- ALPATOV, I.M.; MIKHAILOV, V.I. [Inquires into the gaseous ammonia toxicity. Communication 1] (em Russo). **Gigiena Truda i Professional'nye Zabolevaniia**, v. 12, p. 51-53. 1963.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxic Substances Portal – Ammonia**. 2006. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg126.pdf>> Acesso em: 23 set. 2011.
- AALAS. American Association for Laboratory Animal Science. **Performance- based criteria as the basis for determining laboratory animal housing standards**. 2008. Disponível em: <http://www.aalas.org/association/position_statements.aspx#housing> Acesso em: 06 ago. 2011.
- APPELMAN, L.M.; BERGE, W.F.T.; REUZEL, P.G. Acute inhalation toxicity study of ammonia in rats with variable exposure periods. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 43, p. 662-665, 1982.
- BARROW, C.S.; ALARIE, Y.; STOCK, M.F. Sensory irritation and incapacitation evoked by thermal decomposition products of polymers and comparisons with known sensory irritants. **Archives of Environmental Health**, v. 33, p. 79-88, 1978.
- BAKER, D.C. Diagnosis of disorders of hemostasis. In: THRALL, M.A. *et al.* (Ed.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 179-198.
- BOEHM *et al.* Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. **Biological Chemistry**. v. 388, i. 11, p. 547-554. 2007.
- BOLLIGER, A.P. *et al.* Hematology of Laboratory Animals. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2010. p. 852-862.
- BOLON, B. *et al.* Toxic interactions in the rat nose: pollutants from soiled bedding and methyl bromide. **Toxicologic Pathology**, v. 19, p. 571-579. 1991.
- BOYD, J.W. The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 12, i. 2, p. 9-24. 1983.
- BRAUN, J. P; LEFEBVRE, H.P. Kidney Function and Damage. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 485-523.
- BRIEL, J., KRUCKENBERG, S.M; BESCH, E.L. **Observations on ammonia generation in laboratory animal quarters**. Kansas State University, Manhattan: IER Publication, 72-03. 1972.

BRODERSON, J. R.; LINDSEY, J. R.; CRAWFORD, J. E. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. **American Journal of Pathology**, v.85., i. 1, p. 115-130. 1976.

BUCKLEY, L.A., *et al.* Respiratory tract lesions induced by sensory irritants at the RD50 concentration. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 74, i.3, p. 417-429. 1984.

CAMPBELL, T.W. Mammalian hematology: laboratory animals and miscellaneous species. In: THRALL, M.A. *et al.* (Ed.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 211-224.

CARISSIMI, A.S. **Manutenção de ratos (*Rattus norvegicus*) em sistema de ventilação microambiental com diferentes intervalos de trocas de cama: aspectos sanitários e econômicos**. 1999. 89 f. : il. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, São Paulo.

CLAASSEN, V. Neglected factors in pharmacology and neuroscience research. Housing conditions. In: HUSTON, J.P (Ed). **Techniques in the Behavioral and Neural Sciences**, Amsterdam: Elsevier, 1994. p. 225-250.

CLOUGH, G. Environmental effects on animals used in biomedical research. **Biological Reviews**. v. 57, p. 487-523. 1982.

CLOUGH, G. *et al.* A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel. **Laboratory Animals**, v. 29, i. 2, p. 139-151. 1995.

COON, R. A. *et al.* Animal inhalation studies on ammonia, ethylene glycol, formaldehyde, dimethylamine, and ethanol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 16, p. 646-655. 1970.

COOPER, A.J.L.; LAI, J.C.K. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. **Neurochemical Pathology**, v. 6, i. 1-2, p. 67-95. 1987.

CHARLES RIVER LABORATORIES. 2008a. **Wistar rat biochemistry**; North American Colonies; January 2008 – December 2008. Disponível em: <http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_wistar_rat_biochemistry_2008.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012.

CHARLES RIVER LABORATORIES. 2008b. **Wistar rat hematology**; North American Colonies; January 2008 – December 2008. Disponível em: <http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_wistar_rat_hematology_2008.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2012.

DAVIS, D.E. *et al.* ILAR Committee on Laboratory Animal. **Ethology recommendations for a standardized minimum description of animal treatment**. Institute for Laboratory Animal Research News, v. 16, i. 4, p. 3-4. 1973.

DALHAMN, T. Mucous flow and ciliary activity in the trachea of healthy rats and rats exposed to respiratory irritant gases (SO₂, H₃N, HCHO): a functional and morphologic (light

microscopic and electron microscopic) study, with special reference to technique. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 36, i. 123, p. 1-161. 1956.

FAITH, R. E.; HUERKAMP, M. J. Environmental considerations for research animals. In: HESSLER, J. R.; LEHNER, N. D. M. (Ed). **Planning and Designing Research Animal Facilities**. 1st ed. London: Academic Press, 2009. p. 59 -84.

FAITH, R. E; HESSLER, J. R. Housing and environment. In: SUCKOW, M. A. *et al.* (Ed.). **The laboratory rat**. 2nd ed. London: Elsevier, 2006. p. 303-337

GAMBLE, M. R.; CLOUGH, G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. **Laboratory Animals**, v. 10, p. 93-104. 1976.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006. 358p.

GREEN, A.R. *et al.* Development and application of a novel environmental preference chamber for assessing responses of laboratory mice to atmospheric ammonia. **The Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, p. 49-56. 2008.

HOFFMANN, W.E.; SOLTER, P.F. Diagnostic enzymology of domestic animals. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS; M.L (Ed). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 351-378.

HOGLUND, A.U.; RENSTROM, A. Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: cage environment and animal health aspects. **Laboratory Animals**, v. 35, i. 1, p. 51-57. 2001.

HOOPER *et al.* **Biochemical profiles of rats Wistar (*Rattus norvegicus*) at laboratory animal breeding center**. Trabalho apresentado X Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório, VI Congresso Mundial da Ciência de Animais de Laboratório, V Encontro de Pesquisadores do Mercosul. COBEA (SBCAL), São Paulo, 2007a.

HOOPER *et al.* **Hematological profiles of wistar rats at laboratory animal breeding center**. Trabalho apresentado X Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório, VI Congresso Mundial da Ciência de Animais de Laboratório, V Encontro de Pesquisadores do Mercosul. COBEA (SBCAL), São Paulo, 2007b.

IPCS/WHO (International Programme on Chemical Safety/World Health Organization) **Ammonia. Environmental Health Criteria 54**. Genebra, 1986. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc54.htm>> Acesso em: 17 ago. 2011.

KAPEGHIAN, J.C. *et al.* Acute inhalation toxicity of ammonia in mice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 29, i. 3, p. 371-378.1982.

KELLER, G.L.; MATTINGLY, S.F.; KNAPKE, F.B. A forced-air individually ventilated caging system for rodents. **Laboratory Animal Science**, v. 33, i. 6, p. 580-582. 1983.

KELLER, L.S. *et al.* An evaluation of intra-cage ventilation in three animal caging systems. **Laboratory Animal Science**, v. 39, i. 3, p. 237-242. 1989.

KOOLHAAS, J. M. The laboratory rat. In: FUCHS, E. *et al.* (Ed.). **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**. 8th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 311-326.

LANG, C.M.; VESELL, E.S. Environmental and genetic factors affecting laboratory animals: impact on biomedical research. **Federation Proceedings**, v. 35, i. 5, p. 1123-1124. 1976.

LASSEN, E.D. Laboratory evaluation of the liver. In: THRALL, M.A. *et al.* (Ed.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p.355-376.

LI, W.; PAULUHN, J. Comparative assessment of the sensory irritation potency in mice and rats nose-only exposed to ammonia in dry and humidified atmospheres. **Toxicology**, v. 276, i. 2, p. 135-142. 2010.

LIBERATI, T.A.; SANSONE, S.R.; FEUSTON, M.H. Hematology and clinical chemistry values in pregnant Wistar Hannover rats compared with nonmated controls. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, i. 2, p. 68-73. 2004.

LIPMAN, N.S. Microenvironmental conditions in isolator cages: an important research variable. **Laboratory Animals**, v. 21, p. 23-26.1992.

MANNINEN, A; ANTTILA, S; SAVOLAINEN, H. Rat metabolic adaptation to ammonia inhalation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology**, v. 187. i. 3, p. 278-281. 1988.

NOTHAM, M.M.; CALLOW, A.D. Investigations on the origin of amylase in serum and urine. **Gastroenterology**, v. 60, i. 1, p. 82-89. 1971.

NRC (National Research Council). **Ammonia**. Subcommittee on ammonia. Committee on medical and biological effects of environmental pollutants. Division of Medical Sciences Baltimore, MD: University Park Press. 1979.

ÖBRINK, K.J.; REHBINDER, C. Animal definition: a necessity for the validity of animal experiments? **Laboratory Animals**, v. 34, i. 2, p. 121-130. 2000.

OECD. Draft Proposal for a revised Guideline 412. OECD Guideline for the testing of chemicals. **Subchronic Inhalation Toxicity**. 2008. Disponível em: <www.oecd.org/dataoecd/37/24/40277898.doc> Acesso em: 28 ago. 2010.

PERKINS, S.E.; LIPMAN, N.S. Characterization and quantification of microenvironmental contaminants in isolator cages with a variety of contact beddings. **Contemporary topics in laboratory animal science**, v. 34, i. 3, p. 93-98. 1995.

PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, i. 3, p. 213-219. 2006.

PILNY, A.A. Clinical hematology of rodent species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, i. 3, p. 523-533. 2008.

PROKOP'EVA, A.S.; YUSHKOV, G.G.; UBASHEEV, I.O. [Materials for a toxicological characteristic of the one-term effect of ammonia on the organisms of animals after brief exposure]. **Gigiena Truda i Professional'nye Zabolvaniia**, v. 6, p. 56-57 (em Russo). 1973.

REEB, C.K. *et al.* Microenvironment in ventilated animal cages with differing ventilation rates, mice populations, and frequency of bedding changes. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 37, i. 2, p. 43-49. 1998.

REEB-WHITAKER *et al.* The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. **Laboratory Animals**, v. 35, i. 1, p. 58-73. 2001.

RICHARD, D.; BOULEY, G.; BOUDENE, C. Effets de l'inhalation continue d'ammoniac chez le rat et la souris. **Bulletin Européen de Physiopathologie Respiratoire**, v. 14, p. 573-582. 1978.

RICHARD, D.; JOUARY, J.; BOUDENE, C. Toxicité aiguë par voie aérienne du gaz ammoniac chez le lapin. **Comptes rendus de l'académie des sciences**, v. 287. p. 375-378. 1978.

ROSENBAUM, M.D.; VANDEWOUDE, S.; JOHNSON, T.E. Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironmental. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 48, i. 6, p. 763-773. 2009.

SCHAERDEL, A.D. *et al.* Localized and systemic effects of environmental ammonia in rats. **Laboratory Animal Science**, v. 33, i. 1, p.40-45. 1983.

SCHOEB, T.R.; DAVIDSON, M. K.; LINDSEY, J. R. Intracage ammonia promotes growth of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of rats. **Infection and Immunity**. v.38, i. 1, p. 212-217. 1982.

SOLBERG, H.E.; STAMM, D. International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division: approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. **European Journal of Clinical Chemistry and Biochemistry**, v. 29, i. 8, p. 531-535. 1991.

SERRANO, L.J. Carbon dioxide and ammonia in mouse cages: effect of cage covers, population, and activity. **Laboratory Animal Science**, v. 21, i. 1, p. 75-85. 1971.

SILVERMAN, J. *et al.* Ammonia and carbon dioxide concentrations in disposable and reusable ventilated mouse cages. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, i. 2, p. 57-62.

STUDIER, E.H.; BACA, T.P. Atmospheric conditions in artificial rodent burrows. **The Southwestern Naturalist**, v. 13, i. 4, p. 401-410. 1968.

TARGOWSKI, S.P. *et al.* Effect of ammonia on in vivo and in vitro immune responses. **Infection and immunity**, v. 43, i. 1, p. 289-293. 1984.

THOREN. **IVC Technology; We Pioneered It, We Perfected It.** 2010. Disponível em: </www.thoren.com/About_us.htm>. Acesso em: 17 abr. 2012.

VESELL, E.S. *et al.* Hepatic drug metabolism in rats: impairment in a dirty environment. **Science** 2, v. 179, i. 4076, p. 896-897. 1973.

VESELL E.S. *et al.* Environmental and genetic factors affecting response of laboratory animals to drugs. **Federation Proceedings**, v. 35, i. 5, p. 1125-1132. 1976.

WEATHERBY, J.H. Chronic toxicity of ammonia fumes by inhalation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 81, i. 1, p. 300-301. 1952.

WEISER, G.; THRALL, M.A. Introduction to leukocytes and the leukogram. In: THRALL, M.A. *et al.* (Ed.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 125-130.

VAN WINKLE, T.J.; BALK, M.W. Spontaneous corneal opacities in laboratory mice. **Laboratory Animal Science**, v. 36, i. 3, p. 248-255. 1986.

WU, D.; JOINER, G.N.; McFARLAND, A.R. A forced-air ventilation system for rodent cages. **Laboratory Animal Science**, v. 35, i. 5, p. 499-504. 1985.

WOODS, J. E. The animal enclosure – a microenvironment. **Laboratory Animal Science**, v. 30, i. 2, p. 407-413. 1980.

ZHANG *et al.* The comparison of the normal blood biochemical values of Wistar rats with different age and sex. **Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 4, i. 3, p. 215-218. 2004.

ZISSU, D. Histopathological changes in the respiratory tract of mice exposed to ten families of airborne chemicals. **Journal of Applied Toxicology**, v. 15, i. 3, p. 207-213. 1995.